

UNIVERSITA' DEL SALENTO

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE**

XXVIII CICLO, 2013-2016

SSD BIO/06

**INTERAZIONE TRA NANOMATERIALI E
SISTEMI BIOLOGICI**

**Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa Luciana DINI**

**Dottoranda:
Dott.ssa Stefania MARIANO**

**Il Coordinatore del Dottorato
Chiar.ma Prof.ssa G. PIRO**

INDICE

Riassunto	1
Introduzione	2
1. Nanoscienza e nanotecnologie	2
1.1 Nanomateriali	3
1.1.1 Sintesi dei NM	6
1.1.2 NM	11
1.1.2.1 NM di Carbonio	11
1.1.2.2 Quantum Dots	13
1.1.2.3 Liposomi	14
1.1.2.4 Nanoparticelle polimeriche	15
1.1.2.5 NP metalliche	16
1.1.2.6 NP magnetiche	21
1.1.2.7 NP di ultima generazione , le NP di carbonato di calcio	22
2. Applicazioni delle nanotecnologie	24
2.1 Settore agroalimentare	26
2.2 Nanomedicina e nanotossicologia	28
2.2.1 Interazione delle NP con le barriere biologiche	31
2.2.2 La via respiratoria	32
2.2.3 Assorbimento gastro-intestinale	34
2.2.4 Assorbimento cutaneo	35
2.2.5 Attraversamento della barriera ematoencefalica	35
2.2.6 Attraversamento della barriera placentare	36
2.2.7 Uptake e destino delle NP	37
3. Nanotecnologie e ambiente	42
3.1 Dispersione e comportamento delle NP nell'ambiente	42
3.2 NP nell'aria	43
3.3 NP nell'acqua	43
3.4 NP nei suoli e nei sedimenti	45
3.5 Modelli animali per lo studio di ecotossicità: lo <i>Zebrafish</i>	45
4. Tecniche di caratterizzazione dei NM	47
4.1 Microscopia elettronico a scansione (SEM)	49
4.2 Microscopia elettronico a trasmissione (TEM)	51
4.3 Microscopia a scansione di sonda (SPM)	53
4.4 Tecniche analitiche	55
4.4.1 Spettrometria a dispersione di energia o microanalisi (EDS)	55
4.4.2 Spettroscopia di perdita di energia (EELS): Electron Energy Loss Spectroscopy	56
4.4.3 Spettroscopia vibrazionale	57
4.4.3.1 Infrarosso e Raman	57
4.4.3.2 Diffrazione a raggi X	59
Scopo del lavoro	60
Materiali e metodi	62
1. Nanoparticelle metalliche	62
1.1 Nanoparticelle di argento (AgNP)	62
1.1.1 Sintesi delle AgNP	62
1.1.2 Caratterizzazione delle AgNP	62
<i>Spettroscopia UV-visibile</i>	62
<i>Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)</i>	63

1.1.3	Modello sperimentale <i>in vitro</i>	64
1.1.3.1	Protocollo sperimentale per le cellule HeLa	65
1.1.3.2	Protocollo sperimentale per i linfociti umani	65
1.1.3.3	Internalizzazione delle AgNP-G	66
	<i>SEM-EDX</i>	66
	<i>Spettrometria di assorbimento atomico</i>	66
1.1.3.4	Valutazione degli effetti delle AgNP	67
	<i>Vitalità cellulare: test MTT</i>	67
	<i>Valutazione delle alterazioni morfologiche: ematossilina eosina</i>	68
	<i>Valutazione del rilascio di ROS: test NBT</i>	69
	<i>Valutazione dell'induzione di apoptosi e necrosi: marcatura con Annexina/Ioduro di propidio</i>	70
	<i>Autofagia: marcatura con monodansilcadaverina (MDC)</i>	71
	<i>Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria a flusso</i>	71
	<i>Valutazione dell'indice mitotico: immunomarcatura anti-phospho Histone H3</i>	71
1.1.4	Modello sperimentale <i>in vivo</i> : Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	72
1.1.4.1	Protocollo di trattamento	73
1.1.4.2	Preparazioni istologiche	73
1.1.4.3	Biodistribuzione delle AgNP	73
	<i>Autometallografia</i>	73
	<i>FESEM</i>	74
	<i>Microscopia elettronica a trasmissione</i>	74
1.2	Nanoparticelle di oro (AuNP)	76
1.2.1	Sintesi delle AuNP	76
1.2.2	Caratterizzazione delle AuNP	78
1.2.3	Protocollo sperimentale <i>in vivo</i>	79
1.2.4	Biodistribuzione e localizzazione subcellulare di AuNP: analisi al microscopio elettronico a trasmissione	80
2.	Nanoparticelle non metalliche	80
2.1	Nanoparticelle di carbonato di calcio (CaCO ₃ NP)	80
2.1.1	Sintesi di CaCO ₃ NP	80
2.1.2	Caratterizzazione di CaCO ₃ NP	81
	<i>Microscopia elettronica a trasmissione</i>	81
	<i>Diffrazione ai raggi X (XRD)</i>	81
	<i>Spettroscopia infrarossa (IR)</i>	82
	<i>Misura del potenziale ζ</i>	82
2.1.3	Funzionalizzazione CaCO ₃ NP: metodo Label By Label (LBL)	82
2.1.4	Modello sperimentale <i>in vitro</i>	83
2.1.4.1	Protocollo sperimentale	83
2.1.4.2	Internalizzazione da parte delle linee cellulari e localizzazione subcellulare di CaCO ₃ NP	84
	<i>Microscopia confocale in fluorescenza</i>	84
	<i>Microscopia elettronica a trasmissione</i>	85
2.1.4.3	Esperimenti di inibizione del meccanismo di endocitosi delle NP	85
2.1.4.4	Valutazione degli effetti delle CaCO ₃ NP	86
	<i>Vitalità cellulare: test MTT</i>	86
Risultati		87
1.	Nanoparticelle metalliche	87

1.1	Nanoparticelle di argento (AgNP)	87
1.1.1	Caratterizzazione delle AgNP	87
1.1.2	Studio in vitro degli effetti delle AgNP-G su diverse linee cellulari umane	89
1.1.2.1	Cellule HeLa	89
	<i>Internalizzazione delle AgNP-G</i>	89
	<i>Effetti sulla vitalità cellulare</i>	92
	<i>Produzione di ROS nelle cellule HeLa incubate con AgNP-G</i>	95
	<i>Induzione di apoptosi, autofagia e necrosi in cellule HeLa in presenza di AgNP-G</i>	96
	<i>Effetti delle AgNP sul ciclo cellulare</i>	98
1.1.2.2	Linfociti umani	102
	<i>Internalizzazione delle AgNP-G</i>	102
	<i>Effetti sulla vitalità cellulare</i>	103
	<i>Produzione di ROS nei linfociti umani incubati con AgNP-G</i>	105
1.1.3	Studi in vivo	106
1.2	Nanoparticelle di oro (AuNP)	112
1.2.1	Caratterizzazione di AuNP	112
1.2.2	Biodistribuzione in vivo	113
2.	Nanoparticelle non metalliche	118
2.1	Nanoparticelle di carbonato di calcio (CaCO ₃ NP)	118
2.1.1	Caratterizzazione delle CaCO ₃ NP	118
	<i>TEM</i>	118
	<i>Analisi elementare mediante diffrazione ai raggi X e spettroscopia infrarossa</i>	120
	<i>Analisi di stabilità mediante valutazione del potenziale ζ</i>	122
2.1.2	Valutazione in vitro degli effetti di CaCO ₃ NP sulle cellule HeLa e MCF7	123
	<i>Internalizzazione e localizzazione intracellulare delle CaCO₃NP</i>	123
	<i>Internalizzazione delle CaCO₃NP: esperimenti di inibizione del processo di endocitosi</i>	134
	<i>Valutazione della vitalità cellulare</i>	135
	Discussione	137
	Conclusioni	148
	Bibliografia	150
	Pubblicazioni	166

ABBREVIAZIONI

ABS	<i>Absorbance</i>
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AgNO₃	<i>Nitrato di argento</i>
AgNP	<i>Nanoparticella di argento</i>
Au	<i>Oro</i>
AuCL₄	<i>Cloruro di oro</i>
AuNP	<i>Nanoparticella di oro</i>
CaCO₃NP	<i>Nanoparticella di carbonato di calcio</i>
CAT	<i>Catalasi</i>
CME	<i>Endocitosi Mediata da Clatrina</i>
CNT	<i>Nanotubi di carbonio</i>
CTRL	<i>Controllo</i>
DF	<i>Dark Field</i>
DMSO	<i>Dimetilsolfossido</i>
DO	<i>Densità ottica</i>
EDS	<i>Electron Diffraction Spectroscopy</i>
EELS	<i>Electron Energy Loss Spectroscopy</i>
EDX	<i>Electron Diffraction X ray</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ER	<i>Reticolo endoplasmatico</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FESEM	<i>Field Emission Scanning Electron microscopy</i>
FITC	<i>Isotiocianato di Fluoresceina</i>
FT/IR	<i>Infrarosso in trasformata di Fourier</i>
GAG	<i>Glicosamminoglicani</i>
GF-AAS	<i>Grafite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy</i>
GSH	<i>Glutathione</i>
HAuCL₄	<i>Acido Tetracloroaurico</i>
IM	<i>Indice Mitotico</i>
IR	<i>Infrarosso</i>
LBL	<i>Label By Label</i>
LUV	<i>Large unilamellar Vescicles</i>
MDC	<i>Monodansilcadaverina</i>
MLV	<i>Multi-lamellar Vescicles</i>
MNP	<i>Nanoparticelle Metalliche</i>
MWCNT	<i>Multi Wall Carbon NanoTube</i>
MTT	<i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NADPH	<i>Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato</i>
NaHCO₃	<i>Bicarbonato di sodio</i>
NaOH	<i>Idrossido di Sodio</i>
NBT	<i>Nitroblu Tetrazolium</i>
NM	<i>Nanomateriale</i>
NOM	<i>Materia Organica Naturale</i>
NP	<i>Nanoparticella</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>

Pd	<i>Palladio</i>
PEG	<i>Polietilenglicole</i>
PEI	<i>Polietilammine</i>
PI	<i>Ioduro di Propidio</i>
PMAA	<i>Polimetilmetacrilato</i>
PVP	<i>Polivinilpirrolidone</i>
QD	<i>Quantum Dot</i>
Rfid	<i>Radifrequenza Identificata</i>
RME	<i>Endocitosi Mediata da Recettori</i>
ROS	<i>Reactive OxygenSpecies</i>
SAED	<i>Selected Area Electron Diffraction</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SNC	<i>Sistema nervoso Centrale</i>
SOD	<i>Superossido Dismutasi</i>
SPM	<i>Scanning Probe Microscopy</i>
STEM	<i>Scanning Transmission Electron Microscopy</i>
STM	<i>Scanning Tunnel Microscopy</i>
SUV	<i>Small Unilamellar Vescicles</i>
SWCNT	<i>Single Wall Carbon NanoTube</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TiO₂	<i>Diossido di Titanio</i>
UV-Vis	<i>UV-Visibile</i>
XRD	<i>X Ray Diffraction</i>

RIASSUNTO

Le nanoparticelle (NP) sono aggregati atomici o molecolari con un diametro compreso tra 1 e 100 nm in almeno una dimensione, con particolari proprietà chimico-fisiche, che le rendono sfruttabili in differenti campi di applicazione, come quello alimentare, ambientale, medico, etc. Esse rappresentano strumenti fondamentali per la medicina e la biologia, in quanto possono essere impiegate per applicazioni biomediche (dalla diagnosi, alla terapia, alla teranostica). Tuttavia, lo sviluppo di NP con un'efficacia terapeutica richiede una conoscenza approfondita delle loro interazioni con le cellule, allo scopo sia di migliorare l'efficienza del loro utilizzo che per ridurre l'effetto tossico. In questo lavoro di dottorato sono state prese in esame NP, metalliche e non metalliche, potenzialmente utilizzabili in terapie antitumorali. Sono state caratterizzate, mediante tecniche di spettroscopia e microscopia elettronica, e i loro effetti (in termini di biodistribuzione e tossicità) sono stati valutati mediante modelli *in vitro* (linee cellulari normali e trasformate) ed *in vivo* (mammiferi e non-mammiferi).

Le nanoparticelle di argento (AgNP) inducono una produzione di ROS in cellula e determinano evidenti modificazioni morfologiche e morte cellulare per apoptosi e necrosi. Inoltre, le AgNP esplicano un effetto anti-proliferativo, inducendo un arresto del ciclo cellulare. Gli effetti delle AgNP risultano essere dose e tempo dipendenti, dovuti ad una loro graduale internalizzazione da parte delle cellule.

Lo studio della biodistribuzione delle AgNP in *Zebrafish* mediante TEM e STEM-EDX ha mostrato un accumulo di NP nelle branchie; in quantità inferiori le NP si distribuiscono anche nel fegato e nell'intestino, causando cambiamenti morfologici nelle strutture cellulari.

In collaborazione con il CNR di Pisa, sono state testate nanoparticelle d'oro (AuNP), utilizzabili per aumentare l'efficacia della radioterapia e adroterapia. La biodistribuzione *in vivo*, utilizzando un modello murino, ha dimostrato che le AuNP si distribuiscono in diversi organi, cervello, rene, milza, fegato, pancreas, intestino e cuore, ad eccezione di stomaco e cistifellea.

Gli effetti delle nanoparticelle di Carbonato di calcio (CaCO_3NP) sono stati valutati su cellule HeLa e MCF7. Le CaCO_3NP sono risultate essere altamente biocompatibili per entrambi i tipi cellulari, con una localizzazione tempo-dipendente, a livello del citoplasma, dei mitocondri, dei lisosomi e del nucleo.

INTRODUZIONE

1. Nanoscienza e Nanotecnologie

Il concetto di nanoscienza fu formulato per la prima volta dal fisico Richard Feynman nel 1959 (Feynman, R. 1960) nel discorso intitolato “There’s plenty of room at the bottom-An invitation to enter a new field of physics”, durante il quale ipotizzò che nel futuro si sarebbero potuti costruire dispositivi di varia natura agendo direttamente sulla posizione degli atomi nella materia.

Il termine nanotecnologia comparve, invece, nel 1974 nell’articolo "On the Basic Concept of 'Nano-Technology'" di N.Taniguchi: "'Nano-technology' mainly consists of the processing of separation, consolidation, and deformation of materials by one atom or one molecule". Si tratta della prima pubblicazione scientifica in cui la fattibilità della nanotecnologia fu dimostrata. A partire dal 1980 l’idea deterministica di nanotecnologia, intesa come manipolazione di singoli atomi e molecole, fu analizzata e fatta propria da K.E.Drexler, che si fece promotore della divulgazione dei fenomeni osservabili su scala nanometrica e delle conseguenti implicazioni tecnologiche future e futuribili. Tale visione proposta da Drexler è spesso identificata come nanotecnologia molecolare, come si può leggere tra le pagine del suo libro: “Engines of creation: the coming era of nanotechnology”.

Sorprendentemente, tutt’ora non esiste una definizione universalmente accettata per nanoscienze e nanotecnologie, ma ve ne sono diverse simili tra loro. Secondo la Royal Society & The Royal Academy of Engineering (UK), “Nanoscience is the study of phenomena and manipulation of materials at atomic, molecular and macromolecular scales, where properties differ significantly from those at a larger scale” e, secondo la National Nanotechnology Initiative (NNI) USA, “Nanotechnology is the understanding and control of matter at dimensions of roughly 1 to 100 nanometers, where unique phenomena enable novel applications... At this level, the physical, chemical, and biological properties of materials differ in fundamental and valuable ways from the properties of individual atoms and molecules or bulk matter”. Le nanoscienze costituiscono il punto di incontro di discipline diverse che vanno dalla fisica quantistica alla chimica supramolecolare, dalla scienza dei materiali alla biologia molecolare e rappresentano una realtà ormai

affermata nel mondo della ricerca. Le nanotecnologie, che sono invece ancora nella fase iniziale del loro sviluppo, puntano a sfruttare e ad applicare i metodi e le conoscenze derivanti dalle nanoscienze. Esse fanno riferimento ad un insieme di tecnologie, tecniche e processi che richiedono un approccio multidisciplinare e consentono la creazione e utilizzazione di materiali, dispositivi e sistemi con dimensioni a livello nanometrico. Le prospettive associate alla nanotecnologie derivano dal fatto che, a questi livelli di dimensioni, comportamenti e caratteristiche della materia cambiano drasticamente.

Le nanotecnologie trovano applicazione in praticamente tutti i settori produttivi. Ad oggi, il maggior interesse si è riversato principalmente sulla biologia (nanosensori e manipolatori di materia biologica), sulla medicina (marcatori, rivelatori, distributori di farmaci), sui nuovi materiali, sull'informazione, la computazione e la quantistica (quantum computing, memorie, display flessibili a LED organici) e sugli approcci con i quali poter manipolare superficialmente su un materiale singole molecole e atomi.

Numerosi prodotti riconducibili all'utilizzo delle nanotecnologie sono già disponibili sul mercato o in procinto di esserlo, ed il loro numero cresce costantemente. Tra essi si possono citare, ad esempio, nanoparticelle per cosmetici, coatings e vernici, tessuti che non si stropicciano e non rilasciano odori, articoli sportivi; ma anche nanocompositi, "hard disks" con superfici nanostrutturate per registrazione dati ad altissima densità, "chips" di memoria con dimensioni inferiori a 100 nm, dispositivi fotonici, superfici autopulenti, sistemi per diagnostica medica basati, per esempio, sul principio "lab-on-chip".

1.1 Nanomateriali

Con il termine "nanomateriali" (NM) si identificano nanostrutture particolate, che possono avere varia forma, ma che hanno almeno una dimensione nella scala "nano", ossia inferiore a 100 nanometri (nm) (fig. 1). I NM possono assumere forma sferica oppure tubulare, filamentosa o essere di forma irregolare, possono essere formate da vari materiali, e possono esistere allo stato disperso o in forma fusa, aggregata e agglomerata. Caratteristica comune delle NP è quella, a causa delle loro dimensioni, di possedere proprietà e caratteristiche differenti da quelle della specie chimica parentale. Le NP hanno infatti superficie esposta molto maggiore a parità di massa

rispetto allo stesso materiale in forma di macroparticella e questo aumenta in modo esponenziale la loro reattività chimica e biologica.

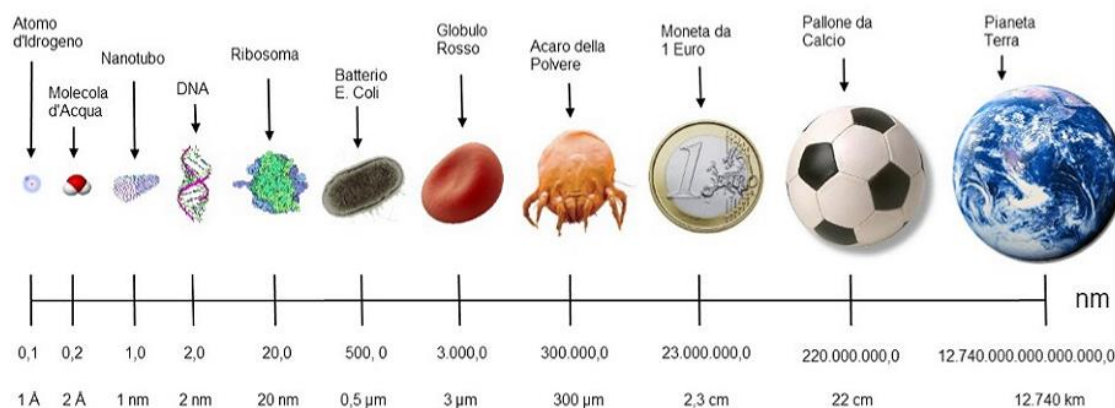


Fig. 1: scala nanometrica riferita al diametro di diverse forme di materia.

I NM possono avere origine naturale, quali ad esempio quelli prodotti da processi di combustione naturali (vulcani, incendi spontanei) oppure avere origine antropogenica (Stern *et al.*, 2008). In questo caso, si distinguono quelli prodotti involontariamente (originano dal traffico veicolare in particolare dai motori diesel, inceneritori, industrie e riscaldamento domestico) e quelli prodotti volontariamente. A quest'ultima categoria appartengono i NM artificiali, o ingegnerizzati, ossia appositamente prodotti dalle nanotecnologie per svolgere scopi tecnologici a vari livelli e in vari campi scientifici e industriali (Tab.1) (Borm *et al.*, 2006).

I NM più prodotti dalla nanotecnologia al giorno d'oggi sono quelli di titanio, silicio, alluminio, metalli e carbonio. Una classificazione di uso comune divide i nanomateriali in 4 gruppi:

- I) NM di carbonio, composti principalmente da carbonio, di solito nella forma di sfere vuote, ellissoidi o tubi. I nanomateriali di carbonio sferici o ellissoidi sono chiamati "fullereni", mentre quelli cilindrici sono detti "nanotubi".
- II) NM di metalli, che includono quantum dots, nanogold, nanosilver e ossidi di metalli come il diossido di titanio (TiO₂).

III) dendrimeri e polimeri di dimensioni nano, costituiti da unità ramificate. Questi possono essere utilizzati per il trasporto selettivo e controllato di farmaci, marcatori e oligonucleotidi poiché contengono cavità interne in cui possono essere incluse molecole.

IV) NM compositi, ottenuti cioè combinando fra loro solidi di diversa natura e spesso costituiti da una matrice (metallica, polimerica o ceramica) che viene rinforzata con particelle di dimensioni nanometriche. Questa unione permette di ottenere sistemi ibridi con proprietà meccaniche, termiche ed elettriche intermedie a quelle dei singoli costituenti e quindi materiali più resistenti, leggeri, poco sensibili alla corrosione, all'usura abrasiva.

In generale le proprietà particolari dei nanomateriali sono dovute al fatto che, per le loro dimensioni, seguono leggi fisiche che si trovano tra la fisica classica e la fisica quantistica; infatti, il rapporto superficie/volume è molto elevato, a metà tra quello degli atomi e quello di materiali di dimensioni oltre il micron. Le caratteristiche che consentono di variare le proprietà dei nanomateriali sono essenzialmente la composizione, la dimensione e la superficie e tutti questi parametri devono essere controllati quando si pensa all'applicazione tecnica dei nanomateriali. D'altro canto, gli effetti indesiderati dei NM sembra siano dovuti proprio a quelle caratteristiche che li rendono tanto interessanti, come un'ampia superficie ed elevata reattività superficiale. Molti studi hanno inoltre dimostrato che le modificazioni della carica di superficie influenzano fortemente le risposte biologiche alle NP, quali fagocitosi, genotossicità e infiammazione (Borm e Kreyling, 2004).

Tab. 1: principali fonti di NM.

Naturali	Antropogeniche	
	Non intenzionali	Intenzionali
Incendi	Motori a combustione interna	Nanoparticelle ingegnerizzate:
Vulcani	Centrali elettriche	• Nanomateriali di carbonio
	Inceneritori	• Nanomateriali metallici
	Jet di aeroplani	Dendrimeri
	Fumi metallici	Compositi
	Fumi polimerici	
	Superfici riscaldate	
	Cottura	
	Motori elettrici	

1.1.1 Sintesi dei NM.

Come già affermato l'essenza delle Nanotecnologie è quella di costruire nuovi materiali e oggetti sulla scala nanometrica. Per raggiungere questo scopo non si possono semplicemente utilizzare tecniche di miniaturizzazione dei materiali di partenza, ma sono richieste varie tecniche di produzione che possono essere classificate e riassunte nelle strategie del “Top-down” e “Bottom-up” (fig. 2). Concettualmente l'approccio Top-down consiste nel partire da un materiale in bulk ricavando la nanostruttura per rimozione progressiva di materia. Quello che ha sempre caratterizzato questa strategia di produzione è stata la riproducibilità, l'affidabilità e la complessità degli oggetti che si possono ottenere, per contro sono le tecniche a maggior impatto energetico e che producono maggiori scarti di produzione. La strategia di produzione Top-down è realizzata mediante l'uso delle tecniche di ingegneria di precisione e litografia, che hanno permesso la produzione della maggior parte dei dispositivi elettronici e ottici a disposizione. La strategia di Bottom-up, invece, consiste nella creazione di strutture più complesse partendo dall'assemblaggio di singoli atomi o molecole; questo si ottiene normalmente con la naturale manifestazione di interazione tra gli elementi costituenti, che si organizzano

così a formare la struttura desiderata. Le tecniche che lavorano secondo questa strategia sono sostanzialmente tre: la sintesi chimica, il Self-assembly, e l’“assemblaggio posizionale”.

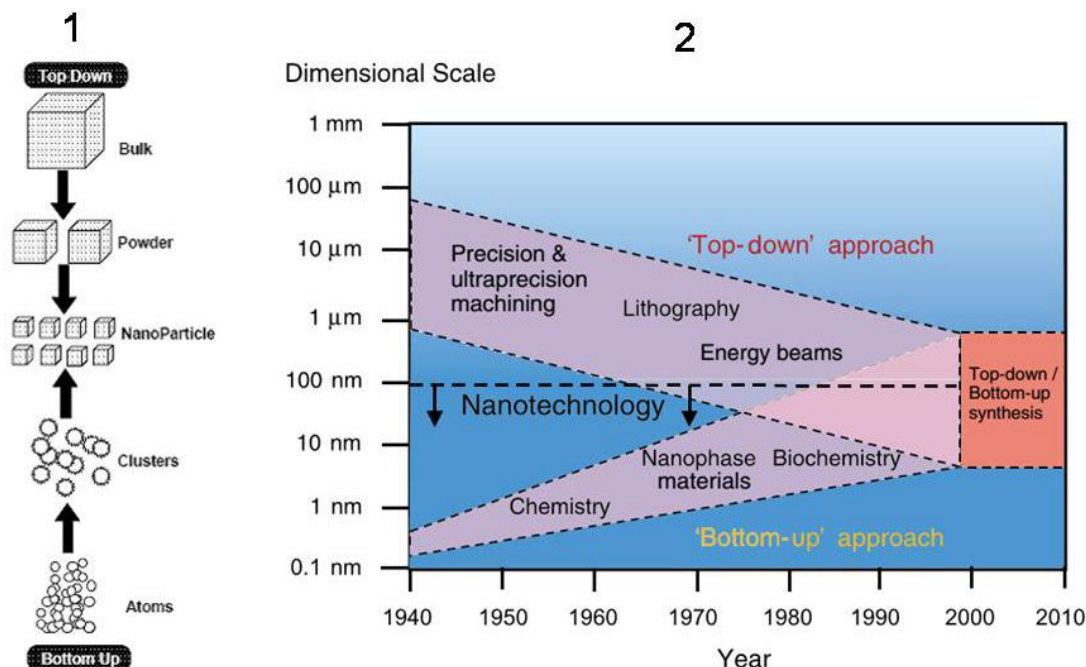


Fig. 2: strategie di produzione di nano-oggetti. (1) Differenza concettuale nella produzione di strutture secondo l’approccio Top-down e Bottom-up. (2) Limiti dimensionali raggiungibili da ciascuna tecnica di produzione.

Attraverso la sintesi chimica possiamo ottenere nanostrutture in due maniere. La prima consiste nel produrre e manipolare il materiale in bulk fino a ottenere la struttura desiderata. Il secondo modo consiste nel produrre gli elementi costituenti la struttura a un più alto livello di organizzazione rispetto ai vari materiali in bulk (ad esempio molecole), che saranno poi assemblati a formare la nanostruttura sfruttando una delle due rimanenti strategie di produzione Bottom-up. Con il processo di Self-assembly atomi e molecole si organizzano spontaneamente a ottenere nanostrutture, perché sono in grado di instaurare caratteristiche interazioni fisiche e chimiche locali che ne guidano il riconoscimento e l’assemblaggio. È un processo reversibile, che può essere controllato da un appropriato disegno dei componenti, dall’ambiente in cui avviene il processo, e dalle forze che lo guidano. Sebbene questo processo sia sfruttato in modo estremamente efficiente dalla natura, basti pensare a esempi come

L'accoppiamento delle basi azotate a formare la doppia elica del DNA, il folding di una catena polipeptidica a ottenere una specifica proteina, o al doppio strato fosfolipidico delle membrane biologiche, l'applicazione a livello industriale di questa tecnica è ancora limitata, ma estremamente attrattiva da un punto di vista ambientale ed economico per il basso impatto energetico e di produzioni di scarti. Con la tecnica dell'“assemblaggio posizionale” si intende la diretta manipolazioni di atomi, molecole o aggregati a formare la nanostruttura ricercata, proprio secondo quelle idee che furono di Feynman e riprese in seguito da Eric Drexler. Questa tecnica può essere sfruttata per creare strutture su una superficie utilizzando la Scanning probe microscopy (SPM), oppure nelle tre dimensioni sfruttando la tecnologia delle Optical tweezers; tuttavia restano ancora delle tecniche estremamente laboriose e non applicabili a livello industriale.

Un'interessante considerazione da evidenziare è come negli anni le strategie di produzione Top-down e Bottom-up si siano evolute in termini di capacità di fabbricare nanostrutture con dimensioni sempre più piccole per l'approccio Top-down, e più grandi per l'approccio Bottom-up. Questa crescita ha portato a una sovrapposizione dei limiti dimensionali raggiungibili con le due strategie (Whatmore, 2006), e allo sviluppo di tecniche per la costruzione di nanostrutture ibride costituite dall'unione di NP (di qualsiasi origine) con biopolimeri (Niemeyer, 2001).

A causa dei numerosi problemi che le procedure chimiche e fisiche di sintesi delle NP presentano, vi è una essenziale necessità di sviluppare procedure più rispettose dell'ambiente. Questa nuova consapevolezza ha portato a sviluppare un approccio ecologico per la sintesi di NP che presenta diversi vantaggi come la semplicità, economicità, compatibilità per le applicazioni biomediche e farmaceutiche, nonché per produzione su larga scala commerciale (Filippo *et al*, 2010).

Un approccio promettente per raggiungere questo obiettivo è quello di sfruttare la vasta gamma di risorse di natura biologica. Infatti, nel corso degli ultimi anni, piante, alghe, funghi, batteri e virus sono stati utilizzati per la produzione di NP metalliche a basso costo, a basso consumo energetico e con un metodo non tossico (Thakkar *et al*, 2010); possono essere utilizzati per la sintesi di materiali inorganici sia organismi unicellulari che pluricellulari con procedure sia intra che extracellulare (Mann 1996).

La sintesi e l'assemblaggio di NP trarrebbero vantaggi dallo sviluppo di tecnologie “pulite”, non tossiche e rispettose dell'ambiente che vanno sotto il nome di “*Green Chemistry*”.

La *Green Chemistry* prevede “l'utilizzo di una serie di principi atti a ridurre o eliminare l'uso di sostanze che generano rifiuti pericolosi nella progettazione, produzione e applicazione di prodotti chimici” (Anastas *et al*, 1998) (Fig. 3).

Tra i 12 principi della *Green Chemistry*, stilati da Dahl J.A. e dai suoi collaboratori per il raggiungimento di questi obiettivi, abbiamo:

- l'ottimizzazione del bilancio di massa globale così da minimizzare i rifiuti;
- la minimizzazione dei costi energetici;
- l'utilizzo di materie prime ricavate da fonti rinnovabili;
- l'uso di componenti che mantengano la loro efficacia funzionale riducendo nel contempo la tossicità nei confronti dell'uomo e dell'ambiente naturale;
- l'utilizzo, a livello industriale, di microorganismi che svolgano al loro interno delle reazioni enzimatiche a temperatura e pressione ambiente;
- la riduzione, tramite l'utilizzo di processi biomimetici, dei sottoprodotti di reazione, presenti in tutte le reazioni della chimica organica tradizionale.

L'utilizzo della *Green Chemistry* nelle nanoscienze permette di ottenere alta precisione nella sintesi e bassa produzione di scarti, enormi benefici nella produzione su scala commerciale, per la società e per l'ambiente (Dahl *et al*, 2007).

L'uso di sostanze chimiche a basso costo, di solventi non tossici e biodegradabili è fondamentale per la sintesi di materiali non pericolosi sia per l'ambiente che per l'uomo. L'agente riducente, il mezzo di reazione e l'agente stabilizzante sono i tre fattori chiave per la sintesi e la stabilità delle nanoparticelle metalliche (Darroudi *et al*, 2011).

Un metodo “pulito” per sintetizzare NP d'oro e d'argento prevede l'utilizzo di AuCl₄ ed AgNO₃ che subiscono riduzione con eparina e acido ialuronico, agenti riducenti e stabilizzanti. Le NP così ottenute mostrano stabilità in condizioni fisiologiche e hanno importanti attività biologiche (come efficacia anti-infiammatoria ed anti-coagulante) dimostrate da studi *in vivo* e *in vitro* (Kemp *et al*, 2009).

Recentemente un attivo campo di ricerca è rappresentato dall'incorporazione dei carboidrati sui nanomateriali. Jiang e collaboratori (2008) hanno sintetizzato NP ibride di poli(glucosamina) chitosano-Au usando chitosano e l'acido

etilendiamminotetraacetico (EDTA); si ha la riduzione in situ degli ioni Au in sfere polimeriche usando l'EDTA come agente riducente (Jiang *et al*, 2008).

Gole e collaboratori (2001) hanno utilizzato il glucosio come agente riducente per formare NP utilizzando ioni clorurati intrappolati in un film di ammine e lipidi a loro volta intrappolati su un substrato di vetro (Gole *et al*, 2001).

Raveendran ed altri hanno usato il β -D-glucosio come agente riducente e l'amido come agente incapsulante per ottenere le NP d'argento (Raveendran *et al*, 2003).

Recentemente è stata messa a punto una metodica chiamata *eco-friendly* grazie alla quale è possibile preparare nanoparticelle d'argento in mezzi polimerici naturali. In una soluzione acquosa contenente nitrato d'argento, glucosio come agente riducente e gelatina come agente stabilizzante, sono state sintetizzate nano particelle d'argento che sono risultate essere uniformi, con un diametro medio di 5 nm e, naturalmente, adese ad una matrice di gelatina chiamata preparato colloidale AgNP. Questo tipo di metodica può essere utilizzata per la sintesi di altre nanoparticelle metalliche tipo quelle d'oro (Au), di palladio (Pd) e, infine, le nanoparticelle di platino (Pt) (Darroudi *et al*, 2011).

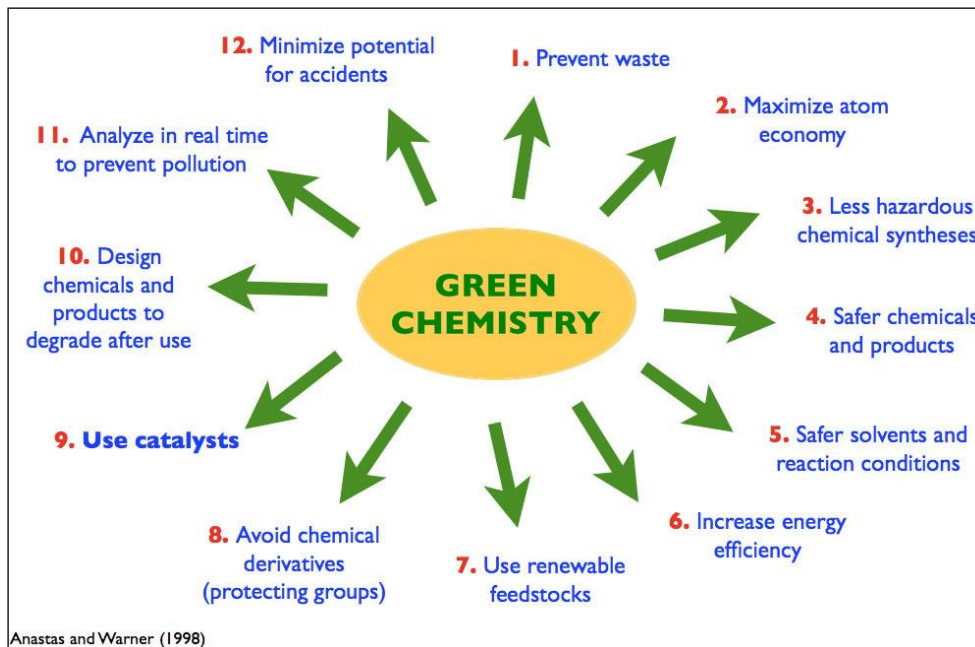


Fig. 3: i 12 principi della green chemistry.

1.1.2 NM

1.1.2.1 NM di carbonio

Nel 1985 il chimico americano Richard E. Smalley ha scoperto che, in particolari situazioni, gli atomi di carbonio compongono delle strutture ordinate di forma sferica con dimensioni dell'ordine del nanometro: le molecole di fullerene. Gli studi rivolti a questi nanomateriali del carbonio hanno portato alla scoperta e allo sviluppo dei nanotubi di carbonio (CNT). I CNT sono costituiti da fogli di grafite (atomi di carbonio disposti in piani paralleli) arrotolati in modo da formare una struttura cilindrica (Fig. 4).

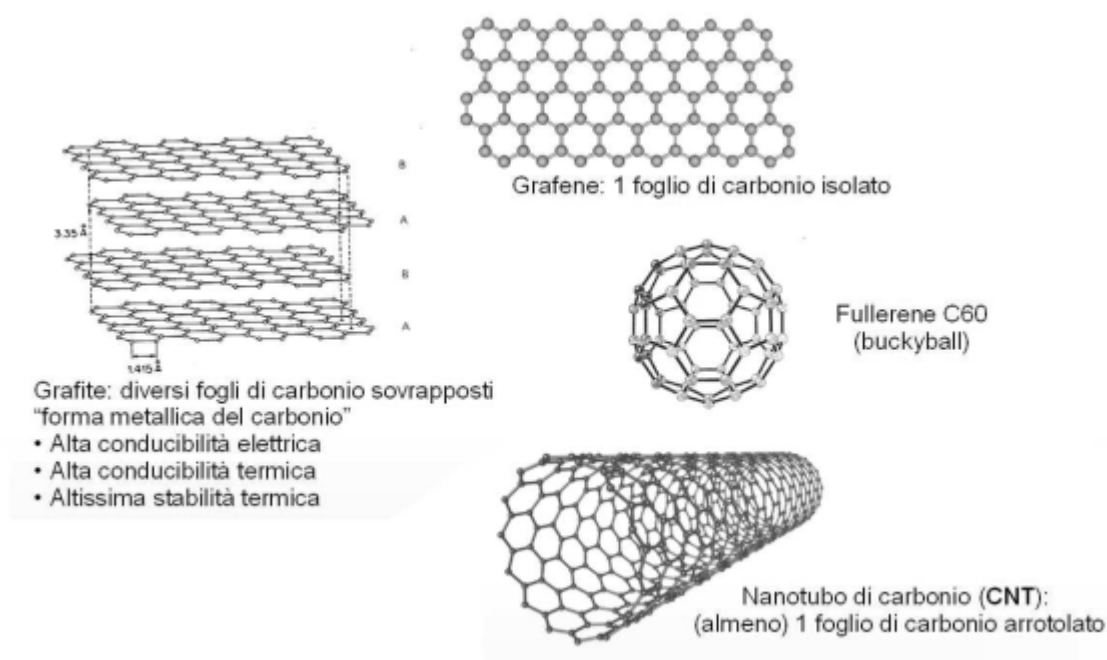


Fig. 4: grafite e i nanomateriali derivati dal carbonio.

Il diametro di un nanotubo è compreso tra 0,7 e 30 nm (oggetti più grandi vengono chiamati nanofibre di carbonio). L'elevatissimo rapporto tra lunghezza e diametro (nell'ordine di 10^4) consente di considerarli come delle nanostrutture virtualmente monodimensionali.

Esistono due tipologie di nanotubi (Pagona *et al*, 2006):

- a parete singola (SWCNT, Single-Wall Carbon NanoTube), cioè costituiti da un singolo foglio grafiteico avvolto su se stesso e racchiuso alle due estremità da due

calotte emisferiche; il loro diametro è generalmente al di sotto dei 2 nm e non supera i 10 nm (Fig. 5A);

- a parete multipla (MWCNT, Multi-Wall Carbon NanoTube), formati invece da più fogli avvolti coassialmente l'uno sull'altro (Fig. 5B), con un diametro che varia dai 2 ai 50 nm. Nei MWCNT ogni singolo nanotubo mantiene distinte le sue proprietà, rendendo difficile prevedere il comportamento risultante dato dalla somma dei diversi nanotubi.

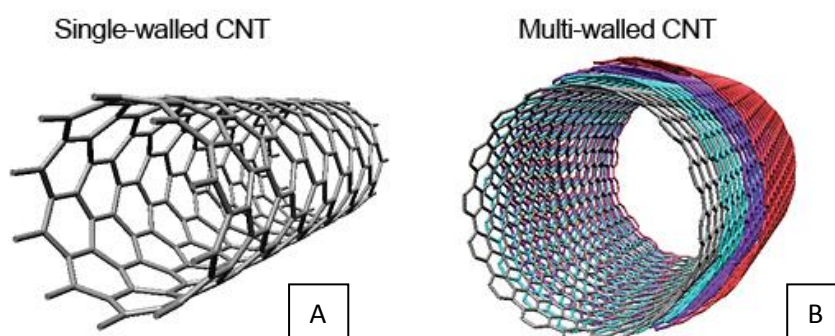


Fig. 5: struttura di un nanotubo di carbonio: A) SWCNT e B) MWCNT.

I CNT riscuotono un notevole interesse grazie alla loro resistenza meccanica e delle loro proprietà elettriche (Arndt *et al.*, 1999). Negli ultimi dieci anni, le proprietà fisiche e chimiche dei fullereni sono state un argomento di punta nel campo della ricerca e dello sviluppo, e probabilmente occuperanno questo posto ancora per molto tempo. Queste particelle hanno diverse applicazioni potenziali nel campo dell'elettronica. Inoltre, la possibilità di riempire i nanotubi e i fullereni di farmaci, e di funzionalizzarli esternamente con peptidi antigenici, può portare allo sviluppo di sistemi innovativi di trasporto selettivo e controllato, applicabili nelle terapie basate sul *drug delivery*. Nell'aprile del 2003, infatti, i fullereni cominciarono ad essere studiati anche dal punto di vista medico: sono stati creati legami tra specifici antibiotici e le strutture particolarmente resistenti presenti sulla parete dei batteri; e si è riusciti, perfino, ad avere attività di *targeting* per specifiche cellule tumorali come i melanomi. (Barnard *et al.*, 2003).

1.1.2.2 *Quantum dots*

I quantum dots (QD) sono nanocristalli colloidali inorganici, fluorescenti e semiconduttori con dimensioni che variano da 2 a 100 nm (Sanvincens *et al.*, 2008). Essi possiedono un *core* centrale costituito da un centinaio di atomi del II-VI gruppo della tavola periodica (ad esempio CdSe, PbSe) o del gruppo III-V gruppo (ad esempio GaAs, GaN). Molti di questi metalli racchiusi nel *core* sono tossici anche a basse concentrazioni, poiché la degradazione dei QD, promossa ad esempio da un ambiente ossidativo, provoca il rilascio di ioni metallici pesanti. Per evitare la degradazione del *core* e la conseguente tossicità, può essere aggiunto un rivestimento (ZnS) o gruppi funzionali e macromolecole che conferiscono ai QD ulteriori attività (Lewinski *et al.*, 2008). I QD possiedono inoltre la proprietà di assorbire la luce per poi riemetterla ad una lunghezza d'onda superiore, in funzione della loro dimensione, coprendo la scala di quasi tutti i colori (Fig. 6). Rispetto ai markers fluorescenti convenzionali, i QD possiedono un'elevata sensibilità, un'elevata resistenza chimica e una fluorescenza molto stabile che comporta una notevole resistenza al fotobleaching: per questi motivi sono eccellenti marcatori per saggi e agenti di contrasto nelle analisi di *imaging* (Medintz *et al.*, 2005).

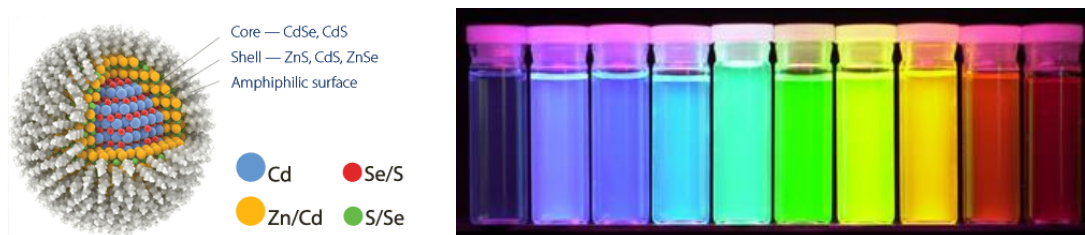


Fig. 6: schema di una particella semiconduttrice (QD) e immagine di soluzioni contenenti QD irradiate con luce UV, che fluorescono a lunghezze d'onda dipendenti dalla loro dimensione.

1.1.2.3 Liposomi

I liposomi sono vescicole fosfolipidiche di forma sferica che possiedono una struttura molto simile alle membrane biologiche, con una fase acquosa centrale circondata da un doppio strato lipidico idrofobico (Fig. 7A). I liposomi sono suddivisi in tre principali categorie in base alle dimensioni e alla lamellarità. I SUV (*small unilamellar vesicles*) hanno diametro compreso tra i 25 e i 50 nm e sono circondati da un unico strato lipidico; i LUV (*large unilamellar vesicles*) sono gruppi eterogenei di vescicole monostrato ma di dimensioni maggiori rispetto ai SUV; gli MLV (*multi-lamellar vesicles*), infine, sono formati da numerosi strati lipidici separati tra loro da una soluzione acquosa.

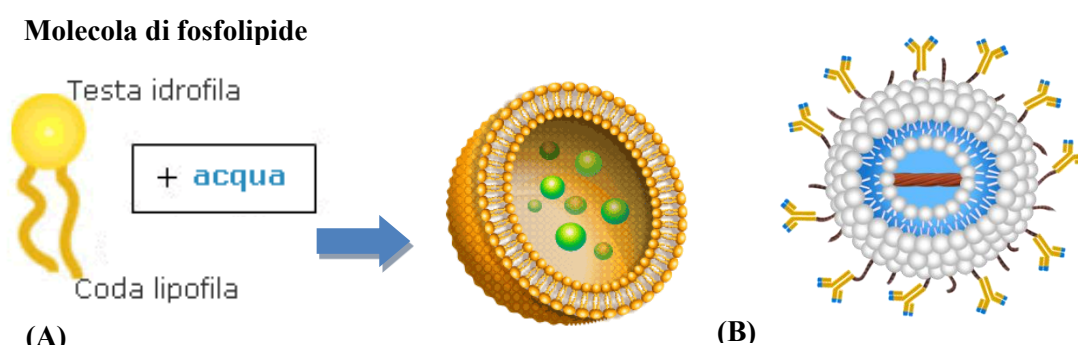


Fig. 7: struttura schematica di un liposoma (A) e di un liposoma contenente farmaci e rivestito con ligandi e polietilenglicole (PEG) (B).

Questo tipo di nanostruttura è di notevole interesse poichè, grazie alla sua natura anfipatica, è in grado di trasportare molecole idrofiliche inserite nel core interno acquoso, o sostanze idrofobiche intrappolate all'interno della membrana lipidica (Barratt, 2002). Inoltre, la superficie può essere funzionalizzata con l'aggiunta di ligandi e/o polimeri in grado di aumentare la specificità in caso di drug delivery (Fig. 7B), come ad esempio il PEG (polietilenglicole), un polimero in grado di minimizzare l'interazione dei nanosistemi con le componenti del siero e del sistema immunitario, e di aumentarne la stabilità. I liposomi sono ideali per accogliere al loro interno molecole idrofiliche, come proteine e acidi nucleici e subire modificazioni a

livello superficiale al variare del pH della soluzione in cui si trovano (variazione del potenziale ζ). Questa capacità viene sfruttata dai sistemi di drug delivery in quanto, in seguito alla fusione con la membrana plasmatica cellulare, i liposomi che si vanno a localizzare all'interno degli endosomi, rilasciano l'agente terapeutico in risposta ad una variazione del pH.

Sfortunatamente, i liposomi sono inoltre soggetti ad alcune limitazioni. Dati in letteratura riportano che, ad oggi, esistono limiti irrisolti sull'utilizzo nel drug delivery dei liposomi (Mohanraj *et al.*, 2006):

- il loro accumulo nelle cellule al di fuori dei tessuti bersaglio (macrofagi del fegato);
- gli effetti imprevedibili degli agenti attivi che essi trasportano;
- la morte cellulare (Daemen *et al.*, 1995);
- la bassa efficienza di incapsulamento;
- il rilascio troppo veloce di farmaci;
- la scarsa stabilità allo stoccaggio
- la mancanza di inneschi regolabili per il rilascio del farmaco (Mohanraj *et al.*, 2006).

1.1.2.4 NP polimeriche

Le NP polimeriche sono particelle colloidali solide che possono essere preparate con polimeri naturali (amido, destrano, collagene, chitosano) o polimeri sintetici (polietilenglicole, acido poliglutamico, acido polilattico). Hanno struttura sferica e dimensioni variabili tra 10 e 100 nm e in base al metodo di sintesi possono essere distinte in (Fig.8):

- nanosfere, costituite da una matrice porosa polimerica che è in grado di intrappolare al suo interno e sulla superficie molecole di farmaco per il drug delivery;
- nanocapsule, ovvero sistemi vescicolari nei quali la molecola da trasportare è confinata nella cavità circondata dalla membrana polimerica con un modello simile ai liposomi (Singh *et al.*, 2009).

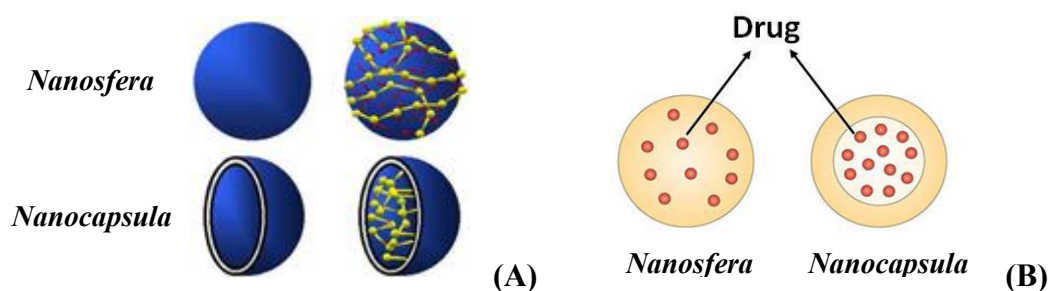


Fig. 8: (A) rappresentazione schematica di nanosfere e nanocapsule. (B) utilizzo di nanosfere e nanocapsule per il drug delivery: il farmaco è fisicamente e uniformemente disperso nella matrice (nanosfere) o è incorporato all'interno del core (nanocapsule). Le nanoparticelle polimeriche hanno ricevuto notevoli attenzioni in campo biomedico per la loro stabilità, biocompatibilità, biodegradabilità e per la loro facilità di funzionalizzazione (Tong *et al.*, 2007). Inoltre, in base al metodo di preparazione, si possono controllare le caratteristiche di rilascio del farmaco (Panyam *et al.*, 2003).

1.1.2.5 NP metalliche

Le proprietà fisiche di una nanoparticella metallica (MNP), come la risposta ottica, differiscono significativamente da quelle che si possono osservare su scala macroscopica, in quanto si trovano a metà tra quelle di un solido e quelle di una singola molecola. Gli effetti della riduzione delle dimensioni sulle proprietà elettroniche, compaiono quando le dimensioni della NP diventano comparabili o inferiori rispetto al cammino libero medio degli elettroni quasi liberi all'interno del metallo. Infatti, alle dimensioni “nano”, le collisioni elettrone-superficie non possono più essere trascurate rispetto ad altri processi di interazione (collisioni elettrone-elettrone e collisioni elettrone-fonone) (Muskens *et al.*, 2006). La risposta degli elettroni quasi liberi è perciò modificata dall'interazione con la superficie e variano in base alla forma, dimensioni, proprietà ottiche e proprietà elettromagnetiche. Il loro utilizzo si basa sul fatto che quando una nanoparticella metallica viene colpita dalla luce, il campo elettrico oscillante induce il movimento degli elettroni di conduzione; per cui quando si verifica l'assorbimento fotonico, si hanno fenomeni ottici particolari.

I metalli più utilizzati per la creazione di NP sono i metalli nobili come oro, argento o rame e hanno solitamente un diametro inferiore o prossimo ai 100 nm (Okuzaki *et al.*, 2013).

L'argento (Ag) è da tempo conosciuto come metallo prezioso avente proprietà antibatteriche e disinfettanti (Uygur *et al.*, 2009), anche se il meccanismo con il quale l'argento svolge la sua attività antimicrobica non è ancora del tutto chiaro. L'ipotesi è che la carica positiva dello ione Ag (Ag^+) sia in grado di interagire con la carica negativa presente sulla parete cellulare dei batteri inibendo la permeabilità della membrana (Ratte, 1999) e inattivando gli enzimi che interagiscono con i gruppi tiolici delle proteine (Gupta *et al.* 1998) con conseguente morte cellulare.

Le nanoparticelle di argento (AgNP) (Fig.9) sono interessanti perché offrono un lento e controllato rilascio di ioni Ag^+ (Kemp *et al.*, 2009) e al contempo mantengono le stesse proprietà antimicrobiche del metallo. Il meccanismo molecolare per tale attività è stato ipotizzato possa derivare dall'ossidazione dell'(Ag^0) in Ag^+ quando esposto a soluzione acquosa contenente agenti ossidanti (James, 1971). Tramite questa reazione vengono disattivate le proteine che permettono a batteri, funghi e virus di sopravvivere.

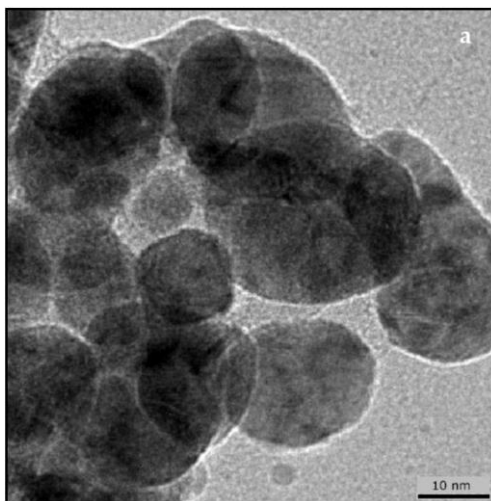


Fig.9: immagine al TEM di AgNP ottenute per riduzione.

Le AgNP per essere utilizzate nei sistemi biologici devono possedere una certa stabilità in soluzione in modo che ogni NP possa venire a contatto con le cellule del

tessuto in cui deve esplicitare i suoi effetti. Per questo motivo sono molto importanti le modalità di sintesi delle AgNP.

Il primo metodo di sintesi chimica è stato messo a punto da Turkevich e collaboratori (Turkevich *et al.*, 1951) e si basava sulla riduzione del nitrato d'argento e citrato. Successivamente sono stati riportati in letteratura metodi simili, ma aggiornati (Nanda e Saravanan 2009).

I metodi chimici di sintesi possono essere divisi in base al solvente che si utilizza; in alcuni si utilizza un solvente non deleterio e una riduzione naturale di agenti chimici come polisaccaridi, estratti di piante o microrganismi come agenti riducenti, altri metodi utilizzano sistemi micellari inversi dove il processo di aggregazione avviene nel nucleo acquoso delle micelle invertite e le particelle in crescita sono circondate da tensioattivo (Pileni, 1997).

Negli ultimi due decenni sono stati messi a punto vari protocolli di sintesi delle AgNP che prevedono la riduzione del nitrato d'argento (AgNO_3) con citrato, boro idruro e altri composti organici (Kemp *et al.*, 2009).

Un settore che si sta attivamente espandendo nel campo della sintesi delle NP metalliche si basa sull'utilizzo di zuccheri come agenti riducenti.

Filippo *et al.* (2010) hanno proposto un metodo chimico per la sintesi di AgNP che utilizza maltosio e saccarosio come agenti riducenti e *capping agent*. Essi hanno dimostrato che il saccarosio portava alla formazione di NP di Ag più piccole rispetto a quelle ottenute nella reazione con maltosio; perciò l'effetto della presenza di saccarosio è quello di controllare meglio la crescita delle AgNP (Filippo *et al.*, 2010).

Possono essere utilizzati glucosio e amido rispettivamente come agente riducente e stabilizzante ma vi è anche la possibilità di utilizzare dei carboidrati complessi come i glicosamminoglicani (GAG) (Kemp *et al.*, 2009). Inoltre, nel corso della preparazione delle nanoparticelle metalliche, è importante utilizzare degli agenti protettivi che possono essere assorbiti o si legano alla superficie di esse evitando la formazione di agglomerati (Bai *et al.*, 2007). Tra gli agenti protettivi vi sono i polimeri come il PVP, il PEG, il PMAA.

Le applicazioni più diffuse delle AgNP comprendono unguenti e creme per uso topico per prevenire infezioni in caso di ustioni o di ferite aperte (Satyavani *et al.*, 2011). Baker e collaboratori hanno scoperto che la completa morte della cellula

batterica potrebbe essere raggiunta a 8 mg/cm^2 di AgNP e che le particelle più piccole hanno proprietà antimicrobiche più efficienti. Altri sostengono l'ipotesi che la maggiore attività antimicrobica delle NP si ottiene grazie alla loro aggregazione. Tuttavia vi è una crescente preoccupazione circa l'uso delle AgNP e il loro impatto ambientale. La diffusione di AgNP nell'acque di scarico è un problema ambientale e i ricercatori hanno evidenziato che il numero di batteri nitrificanti presenti nei fanghi si riduce quando vengono esposti a grande quantità di AgNP; questo problema reca gravi implicazione sul trattamento delle acque reflue. Ciò ha motivato i ricercatori a sviluppare un sistema per immobilizzare le AgNP in membrane di zeolite le quali hanno propensione a essere adatte al rilascio controllato, dettando in questa maniera la quantità di nanoparticelle rilasciate nell'ambiente (Nagy *et al.*, 2011).

Le nanoparticelle d'oro (AuNP) con diametri che variano dai pochi a diverse centinaia di nanometri (2-250 nm) sono preparate per riduzione di un sale di oro (III), per esempio AuCl_3 . La reazione di riduzione e la contemporanea nucleazione in NP è svolta di solito in presenza di un agente stabilizzante. Si tratta di solito di una molecola carica che circonda la NP e fa in modo che esse si respingano e rimangano distanti. Queste molecole stabilizzatrici hanno un'estremità che è adsorbita o chimicamente legata alla superficie d'oro, mentre l'altra estremità è rivolta verso la soluzione (Fig. 10).

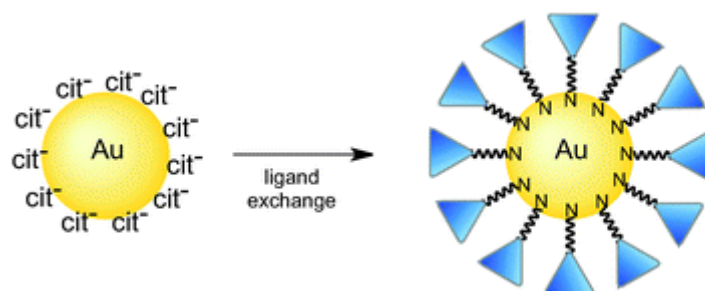


Fig. 10: schema di una AuNP, dell'agente stabilizzante e di una molecola di legante

Le molecole biologiche possono essere attaccate alle particelle in diversi modi. Se la molecola biologica ha un gruppo funzionale che si possa legare all'oro (per esempio un tiolo $-SH$ o una specifica sequenza peptidica), essa può prendere il posto della molecola di stabilizzante quando viene aggiunta alla soluzione contenente le NP. In questo modo, oligonucleotidi, peptidi sono legati direttamente all'Au. In alternativa, le molecole biologiche possono essere attaccate al guscio di stabilizzatore attraverso una reazione tra l'estremità dello stabilizzatore verso la soluzione e un gruppo funzionale della molecola biologica da legare.

Le AuNP hanno proprietà ottiche molto particolari, che non sono riscontrabili nel metallo massivo. Trattandosi di un metallo, gli elettroni sono liberi di spostarsi. Quando il cammino libero medio di un elettrone è di circa 50 nm e la luce incidente ha lunghezza d'onda maggiore rispetto alla grandezza della NP, si creano forti interazioni sulla superficie che portano a condizioni di risonanza. In particolare, la luce incidente può essere assorbita provocando l'oscillazione collettiva degli elettroni liberi nel metallo e determinando un intenso colore rosso delle NP. Poiché questo effetto è di superficie, si parla di risonanza plasmonica di superficie. Al cambiare della forma e della grandezza della particella, anche la geometria della superficie cambia e di conseguenza cambia anche la frequenza di oscillazione degli elettroni e quindi si ha una variazione delle proprietà ottiche del materiale.

Per queste loro peculiari proprietà ottiche le AuNP sono utilizzate come agente di contrasto e possono essere visualizzate con una grande varietà di tecniche spettroscopiche differenti.

I campi di applicazione in ambito biologico delle NP, in particolare delle AuNP, sono sempre più numerosi.

Alcune tecniche di imaging usano le AuNP come marcatori, grazie alla loro particolare interazione con la luce a diverse lunghezze d'onda. Quando si illuminano le cellule con onde elettromagnetiche di opportuna frequenza questi fenomeni di interazione rendono evidenti i distretti cellulari in cui si localizzano le AuNP e le molecole ad esse legate. Ad esempio AuNP legate ad anticorpi specifici possono essere utilizzate per evidenziare particolari compartimenti cellulari oppure per seguire il destino delle molecole attraverso le cellule vive. Gli anticorpi, infatti, sono proteine prodotte dalle cellule del sistema immunitario e possono essere costruiti in modo che leghino specificamente molecole in possesso di determinati segni morfologici di riconoscimento.

Spesso le AuNP sono usate anche come mezzo di contrasto per la visualizzazione di tessuti o organi in vivo, con potenziali applicazioni all'uomo.

Tuttavia l'applicazione più interessante delle NP in biologia è forse legata al trasporto mirato di molecole all'interno delle cellule. Le tecniche di sintesi delle AuNP, infatti, comportano la presenza di particolari specie chimiche sulla loro superficie. Queste sono molecole che formano un guscio che ricopre e stabilizza le particelle e che al contempo fornisce siti di legame (come gruppi –SH liberi) a cui poter attaccare varie altre molecole di interesse.

Sappiamo ad esempio quali siano le difficoltà che si riscontrano oggi nel trattare i tumori con i chemioterapici. Questi farmaci sono dei veleni che, pur potendo uccidere le cellule tumorali, a causa della loro bassa specificità in genere danneggiano anche i tessuti sani, con gravi effetti collaterali che colpiscono il paziente. Le AuNP possono essere legate contemporaneamente a farmaci antitumorali e a molecole in grado di funzionare da ligandi recettoriali. Attraverso le interazioni di tali ligandi con i recettori di membrana delle cellule, le AuNP trasportatrici di chemioterapici possono entrare in modo specifico all'interno di determinate popolazioni cellulari, senza colpire distretti indesiderati. Si è dimostrato addirittura che anche in assenza di interazioni recettore-ligando le cellule neoplastiche internalizzano in maggiore quantità le NP a causa della presenza di pori e difetti sulla loro membrana.

Un'altra importante applicazione delle AuNP riguarda l'ingegneria genetica e la terapia genica. Molecole di acidi nucleici possono essere, infatti, facilmente legate alle AuNP e veicolate con esse all'interno di specifiche cellule.

1.1.2.6 NP magnetiche

Negli ultimi anni, le nanoparticelle magnetiche hanno attirato sensibilmente l'interesse della comunità scientifica per la loro versatilità nel poter essere utilizzate in diversi campi di ricerca come quello tecnologico e medico. La possibilità di poterle utilizzare in differenti applicazioni biomedicali, come fluidi di contrasto per risonanza, sorgenti di calore per ipertermia e vettori per il trasporto di medicinali, è stata ragione di forte interesse. Tuttavia, per essere utilizzate a tali scopi, le

nanoparticelle magnetiche devono soddisfare, contemporaneamente, diverse condizioni, quali:

1. Minima tossicità per il corpo umano;
2. Buone proprietà magnetiche;
3. Distribuzione della dimensione delle NP stretta (dispersione della gaussiana descrivente le dimensioni delle nanoparticelle bassa);
4. Facilità di modificazione della superficie (rivestimento) per permettere mirate funzionalità delle nanoparticelle magnetiche in specifici contesti biomedicali.

Per assecondare le prime due condizioni (quelle più importanti per l'ipertermia magneto fluida), l'uso di ossidi di ferro ed, in particolare, di nanoparticelle di magnetite (Fe_3O_4) e maghemite (Fe_2O_3) è altamente preferibile, in quanto la biocompatibilità di questi materiali è già stata provata.

Oltre ai suddetti materiali, anche metalli e leghe metalliche come Fe e FePt sono stati utilizzati per la sintesi di nanoparticelle magnetiche. La maggior parte di questi materiali è tossica ma tale tossicità è fortemente ridotta quando le particelle vengono ricoperte o incapsulate con un materiale appropriato.

Negli ultimi tempi, sono stati compiuti notevoli progressi nella sintesi di materiali quali ferriti di cobalto (Co), di nichel (Ni) o di manganese (Mn).

Infine, per applicazioni biomediche sono state prese in esame anche particelle di FePt. La potenziale tossicità del platino può essere molto favorevole per i trattamenti contro i tumori. Infatti, per molto tempo complessi di questo materiale sono stati largamente utilizzati in chemioterapia e grazie alle proprietà magnetiche di questa lega, il composto FePt è considerato un materiale molto "promettente". Le NP di FePt sono state ottenute generalmente tramite decomposizione termica di Pt acetilacetato e ferro-carbonile in presenza di solventi e tensioattivi, semplicemente controllando la sequenza di aggiunta di questi ultimi.

1.1.2.7 NP di ultima generazione, le NP di carbonato di calcio

Tra la grande varietà di NP descritte in letteratura, un altro materiale impiegato nella sintesi di NP è il carbonato di calcio (CaCO_3). Il CaCO_3 è un biomateriale molto utilizzato nella produzione di materie plastiche, vernici, carta, inchiostri, nell'industria alimentare, nonché industrie farmaceutiche.

Le nanoparticelle di CaCO_3 (CaCO_3NP) si comportano come fonte intracellulare di calcio. Pertanto, la comprensione delle influenze cellulari CaCO_3NP è importante per il loro effettivo utilizzo. Tuttavia, nonostante vengano utilizzate dai primi anni novanta, non vi sono abbastanza dati in letteratura sulle loro influenze cellulari. In particolare, le caratteristiche che potrebbero portare ad effetti cellulari citotossici, come la solubilità, la capacità di adsorbimento e assorbimento cellulare, non sono state ben esplorate.

Il comportamento delle CaCO_3NP è dovuto alle loro proprietà ben definite, quali morfologia, struttura, dimensioni, area specifica e purezza chimica. A causa della loro disponibilità, sicurezza e lenta biodegradabilità, le CaCO_3NP possono essere utilizzate come sistemi a rilascio controllato nel *drug delivery*, allo scopo di mantenere i farmaci in siti mirati per tempi prolungati dopo la somministrazione. Test tossicologici di Zhang *et al.* su cellule HeLa hanno dimostrato che le CaCO_3NP possono essere un vettore moderatamente non tossico nel *drug delivery*.

Combes *et al.* hanno anche valutato la citotossicità del CaCO_3 presente nelle composizioni cementizie su cellule osteoprogenitrici di midollo osseo umano, osservando un'alta biocompatibilità di tali materiali basati su CaCO_3 .

Diverse procedure sono state messe a punto per la sintesi delle CaCO_3NP , i due metodi più comuni sono:

- la tecnica di deposizione in situ descritta da Mishra (Mishra *et al.*, 2005)
- la microemulsione acqua-olio descritta da Liu e Ghadam (Liu *et al.*, 1999; Ghadam *et al.*, 2014).

I metodi proposti, però, presentano alcuni svantaggi, dal momento che necessitano di alte temperature (1000-1100°C) e lunghi processi di purificazione basati sull'utilizzo di surfattanti e sulla funzionalizzazione della superficie. Inoltre, è ben noto che il metodo di sintesi influenza fortemente la fase cristallina di CaCO_3NP (Chen *et al.*, 2013) (calcite, vaterite, aragonite e carbonato di calcio amorfo). Nel 2013 Ciccarella *et al.* hanno brevettato la tecnica “*spray drying*”, un metodo facilmente utilizzabile su larga scala che permette anche di regolare la dimensione e morfologia delle NP, senza l'utilizzo di tensioattivi o altre specie chimiche comunemente utilizzati per stabilizzare la miscela e il prodotto di reazione. “*Spray drying*” è un metodo unico per convertire una soluzione, sospensione o emulsione in una polvere solida e in un unico passaggio.

2. Applicazioni delle nanotecnologie

Le potenziali applicazioni delle nanotecnologie in tutti i settori produttivi sono letteralmente infinite e le prospettive di crescita di questo mercato sono molto elevate.

Se da un lato, però, i benefici che le nanotecnologie potrebbero produrre sono enormi, non pochi e irrilevanti sono gli effetti che esse potrebbero avere sull'ambiente e sulla salute dell'uomo.

Il rilascio di nanoparticelle nell'ambiente può mettere a rischio la salute umana e degli ecosistemi. Una volta rilasciati nell'aria, nel suolo e nell'acqua i NM possono produrre molteplici effetti negativi (Mura *et al.*, 2013). Le NP presenti nell'aria possono essere assorbite dal corpo umano attraverso le vie respiratorie, con conseguenti effetti tossici. Parte di esse si depositeranno nel suolo e nelle acque. Nel suolo, poi, le NP possono legarsi alle sostanze colloidali che ne mediano la mobilità ed il trasferimento a piante e microrganismi. Ad oggi non si conosce il grado di biodegradabilità delle nanoparticelle ma si dispone comunque di studi che hanno dimostrato effetti di fitotossicità, riduzione della diversità e della massa microbica nei suoli e assorbimento da parte di piante con la conseguente presenza di NP nelle parti edibili. Nelle acque il maggior pericolo riguarda la persistenza di NP libere che possono entrare nella catena alimentare e/o essere assunte da specie acquatiche (alghe e pesci) (Fig. 11) sulle quali esercitano una provata tossicità. Per quel che riguarda la tossicità per gli esseri umani, questa dipende dai caratteri specifici della NP, dalla via di penetrazione (per contatto, inalazione e ingestione) e dalle specifiche reazioni che vengono innescate durante il viaggio delle NP all'interno dell'organismo.

Il comportamento biologico delle NP è fondamentalmente diverso da quello delle particelle di dimensioni maggiori. La ridotta dimensione determina quattro proprietà delle nanoparticelle che sono alla base del loro potenziale tossicologico (Elsaesser e Howard, 2012): 1) l'elevata reattività chimica, dovuta all'aumentata superficie per unità di massa; 2) la possibilità di passare attraverso le membrane cellulari (sia quella esterna che quelle intracellulari); 3) l'impossibilità di essere riconosciute dal sistema immunitario degli esseri umani; 4) la capacità di superare le barriere emato-encefalica e feto-placentare. A causa di tali proprietà le NP sono biologicamente attive e possono accumularsi in diversi organi, tra cui il fegato, il cervello, i polmoni

e i reni. Tra gli effetti tossicologici oggi conosciuti vi sono: danni ossidativi alle cellule; problemi neurologici dovuti alla loro capacità di depositarsi nel cervello; genotossicità; danni al sistema immunitario.

Nonostante la riconosciuta pericolosità delle NP, la valutazione del rischio posto dai nuovi NM, valutazione che dovrebbe guidare gli interventi di regolamentazione della loro produzione ed utilizzo, è particolarmente difficile (Shatkin, 2013). Una prima difficoltà riguarda la caratterizzazione del materiale da analizzare per gli studi tossicologici. Tale caratterizzazione deve tener conto di tutte le molteplici proprietà che possono far variare il comportamento di un NM, quali: dimensione, forma, impurità, stato di aggregazione e/o agglomerazione, struttura cristallina, carica superficiale, stabilità. Una seconda difficoltà riguarda la determinazione della metrica appropriata per la caratterizzazione della dose negli studi dose-risposta; ciò sia per la scelta dell'unità di misura (che non può essere il peso ma indicatori del rapporto massa superficie), sia per le proprietà di aggregazione/stabilità/diffusione che ne possono alterare la concentrazione in risposta a parametri ambientali quali pH, temperatura e presenza di eventuali reagenti. Una terza difficoltà si incontra nella valutazione dell'esposizione; poiché non si conosce con accuratezza il destino delle NP una volta immesse nell'ambiente è difficile prevedere dove, in che concentrazione ed in quale forma esse saranno presenti.

Nel caso delle nanotecnologie applicate al settore agroalimentare, gli studi tossicologici attualmente disponibili non sono sufficienti per una valutazione del rischio. Data la varietà di materiali e di applicazioni possibili e date le difficoltà dell'analisi tossicologica dei nanomateriali (ed in particolare le difficoltà nel definire protocolli sperimentali utili alla replicazione e validazione degli esperimenti) sarebbero necessari ingenti investimenti e sforzi di ricerca per colmare tale vuoto conoscitivo.

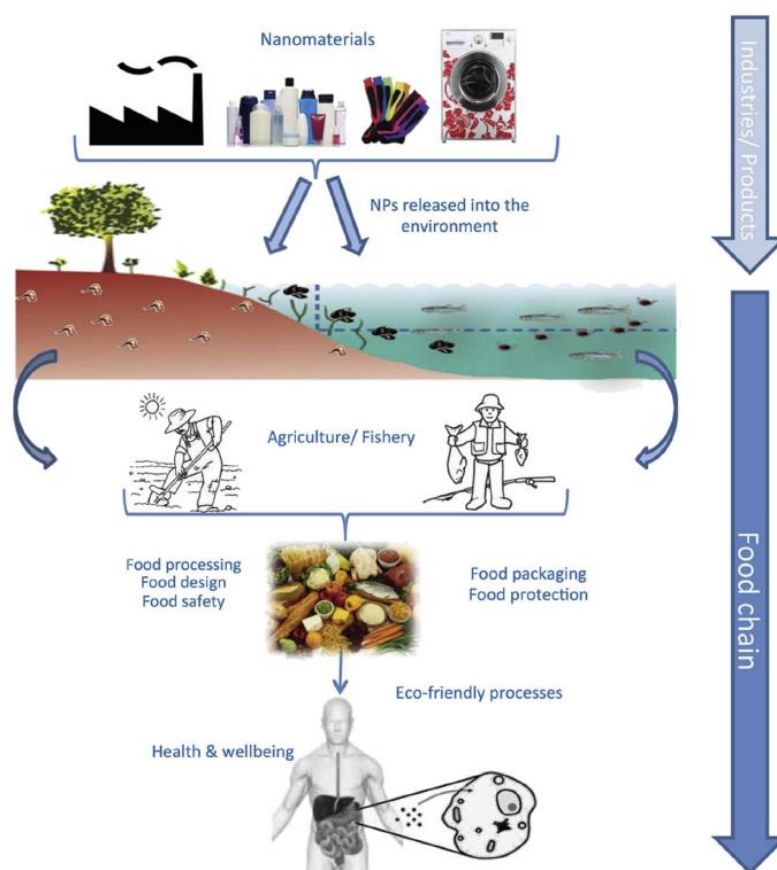


Fig. 11: esposizione dei consumatori alle NP attraverso l'ingestione di cibo. L'esposizione può derivare da NP rilasciati nell'ambiente che entrano nella catena alimentare.

2.1 Settore agroalimentare

L'impatto delle nanoscienze in molti campi collegati alla salute e al benessere è al giorno d'oggi molto forte, tanto che numerose applicazioni delle nanotecnologie riguardano anche il settore alimentare e la nutrizione.

L'introduzione delle nanotecnologie in campo agroalimentare prevede già una vasta gamma di applicazioni. Queste spaziano dal miglioramento di alcune caratteristiche degli alimenti quali colore, sapore e consistenza, all'ottenimento di un maggiore assorbimento ed una migliore biodisponibilità di nutrienti ed integratori alimentari, sino allo sviluppo di nuovi materiali di imballaggio, con proprietà antimicrobiche e/o meccaniche potenziate, in grado di migliorare la conservazione dei prodotti. Applicazioni più ambiziose prevedono lo sviluppo di nanosensori in grado di facilitare il monitoraggio dei cibi confezionati durante il trasporto e lo stoccaggio (Chaudry *et al.*, 2008). Molti prodotti sono già presenti in commercio e tanti altri

sono in fase di sperimentazione, tuttavia avere un panorama completo di ciò che è disponibile sul mercato e ciò che è in fase di ricerca, non risulta facile (Bouwmeester *et al.*, 2009). Le informazioni qui riportate provengono principalmente dall'inventario dei prodotti di consumo basati sulle nanotecnologie, realizzato dal Project on Emerging Nanotechnology.

Per la produzione agricola si stanno studiando nanosensori per il rilevamento di pesticidi, nanoemulsioni e nanocapsule di pesticidi per migliorarne l'idrosolubilità ed il rilascio direttamente in situ, nanofiltri per la purificazione delle acque e dei terreni, e coltivazioni di piante in grado di produrre NP (particle farming) (Mura *et al.*, 2013).

In commercio sono invece prevalentemente presenti nanofood e prodotti nanotecnologici destinati al contatto con il cibo durante le fasi di preparazione e conservazione. Per nanofood si intendono sia prodotti contenenti NP utilizzate come ingredienti o come additivi, sia prodotti contenenti nanostrutture utilizzate per veicolare e favorire l'assorbimento di composti bioattivi o per migliorare le caratteristiche organolettiche del cibo. Tra questi: formulazioni di licopene in nano scala per un assorbimento più rapido ed una maggiore durata di conservazione dell'antiossidante (BASF, Germania); supplementi a base di nanoargento dalle proprietà antimicrobiche (Sovereign Silver o Argentyn 23 della Natural-Immunogenics, Usa); pane arricchito con olio di tonno contenuto in nanocapsule che ne mascherano odore e sapore (pane Tip Top-up della compagnia australiana George Weston Foods); the arricchito con nanoselenio dalle proprietà antimicrobiche (Qinhuangdao Taiji Ring Nano-Product, Cina); svariati cibi contenenti nanobiossido di titanio come agente antiagglomerante (Albertsons, Kraft, Knorr e Daisy); nanomicelle per migliorare la biodisponibilità di composti bioattivi (Novasol di Aquanova, Germania).

Tra i materiali nanotecnologici destinati all'imballaggio di prodotti alimentari vengono utilizzati prevalentemente nanocomposti a base di argilla volti a minimizzare la perdita di anidride carbonica e l'entrata di ossigeno per prolungare la conservazione del prodotto; tale tecnologia viene attualmente adottata principalmente per bottiglie di plastica contenenti bevande gassate (Imperm, dalla Voridian/Nanocor, Usa, adottato dalla compagnia americana Miller Brewing per le bottiglie di birra). Uno dei nanocomponenti più diffusi in fase di preparazione e conservazione è il nanoargento utilizzato per le sue proprietà antimicrobiche; esso si

ritrova sia in numerose stoviglie che in vari frigoriferi di ultima generazione. Tra le applicazioni in fase di ricerca e sviluppo vi sono: la tecnologia Nano Bioswitch anche detta “a rilascio su comando” della Tno Life Sciences (Olanda), per incapsulare nell’imballaggio antimicrobici rilasciati solo in caso di necessità; l’identificazione in radio frequenza (Rfid) in grado di segnalare varie anomalie alle quali può essere sottoposto un prodotto alimentare durante il suo ciclo di vita; rivestimenti costituiti da nanoparticelle di biossido di zinco o ossido di magnesio, in grado di auto-pulirsi; nanoemulsioni per ottenere prodotti alimentari a basso contenuto calorico ma di cremosità equivalente a quelli standard; nanomateriali per incapsulare nutraceutici o per rinforzare gli imballaggi, sviluppati a partire da componenti alimentari naturali, e quindi più promettenti per l’accettabilità da parte del consumatore, quali: zeina (proteina del mais), caseina e alfa-lattoalbumina (proteine del latte) (Chaudry *et al.*, 2008; Cushen *et al.*, 2012).

2.2 Nanomedicina e nanotossicologia

Il termine Nanomedicina non indica una disciplina derivata delle nanoscienze, ma un nuovo settore che riunisce le conoscenze e tecnologie derivanti dalle Nanotecnologie e dalle Nanobiotecnologie, che hanno delle applicazioni in campo medico e sanitario (Wagner *et al.*, 2006). La Nanomedicina, secondo “European Technology Platform on Nanomedicine”, ha notevoli potenzialità nel migliorare il livello della salute pubblica fornendo nuove possibilità per la prevenzione, per una diagnosi più precoce e affidabile, e nuovi trattamenti per le malattie (Boisseau and Loubaton, 2011).

I miglioramenti che le nanotecnologie stanno apportando alla medicina riguardano il settore farmacologico, la terapia, la diagnostica e l’ottenimento immagini, materiali biocompatibili per protesi e impianti, e i dispositivi medici. Attualmente la maggior parte della ricerca nel campo della Nanomedicina è assorbita dal settore farmacologico e in particolare dallo sviluppo di nuovi sistemi di rilascio dei farmaci (circa 76%), ma anche di nuove terapie. Uno degli scopi è l’allestimento e la somministrazione dei farmaci. Indipendentemente dalla severità della malattia, la somministrazione sistemica delle molecole farmaco produce degli effetti collaterali legati alla terapia, e in casi ancora più gravi anche degli effetti tossici. Le nanotecnologie offrono miglioramenti sia in termini di selettività nei confronti del tessuto o cellula malata, che di somministrazione di principi attivi difficilmente

solubili, e anche di stabilità alla degradazione. Le principali nanostrutture impiegate a questo scopo sono riportate in figura 12 (Lehner et al., 2013). Tutte queste strutture vantano diverse proprietà:

- dimensione ben definita
- biocompatibilità
- sono inerti nei confronti del sistema immunitario
- buona selettività.

Gli obiettivi consistono nel migliorare ulteriormente la selettività, insieme all'inserimento di nuove funzioni come il controllo del rilascio in specifiche aree del citoplasma, e la risposta a stimoli esterni (come luce, calore, ultrasuoni o radiazioni elettromagnetiche) o interni alla cellula (come pH o attivazione enzimatica). L'applicazione in campo terapeutico, nei confronti di patologie come il cancro, infezioni (virali e batteriche), malattie cardio-vascolari, disordini endocrini, malattie degenerative, e malattie infiammatorie e immunologiche, rappresentano ancora una nicchia nel campo della nanomedicina (2%) sia per il numero di ricerche pubblicate che di prodotti utilizzati (Etheridge *et al.*, 2013). Anche in questo settore l'argomento che monopolizza interessi e le risorse è il trattamento del cancro.

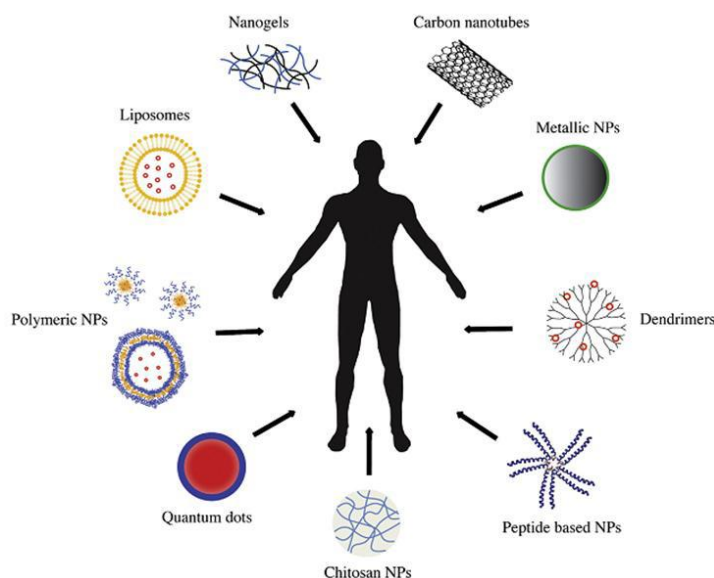


Fig. 12: esempio illustrativo delle attuali nanostrutture impiegate per la produzione di nuovi sistemi di rilascio dei farmaci, attualmente in fase di sperimentazione preclinica.

Un altro grande argomento di ricerca riguarda la diagnostica medica che complessivamente occupa circa il 15% della ricerca nanomedica.

Lo sviluppo di strumenti per la diagnosi *in vitro* coincide con lo sviluppo di biosensori e strumenti “Lab-on-a-chip”. Le potenzialità dei nanobiosensori sono molteplici a partire dall’aumento della velocità e sensibilità di analisi, che sono garantiti dalla misurazione diretta dell’interazione molecolare con l’analita. Un aumento della sensibilità comporta inoltre una diminuzione del campione biologico necessario all’analisi, con ulteriori vantaggi in termini di cura e compliance per il paziente che deve fornire il campione (anche per biopsia), diminuzione delle operazioni di pretrattamento del campione, e possibilità di analizzare campioni biologici rari come quelli biotici. Per contro il limite che si interpone con la realizzazione di dispositivi integrati lab-on-a-chip è l’aumento della viscosità che si manifesta alla nanoscala, e che supera l’effetto della gravità. Di conseguenza si richiedono sviluppi nel campo della nanofluidica. La diagnostica *in vivo* e l’ottenimento di immagini hanno raggiunto nel tempo un ruolo centrale nel trattamento del paziente. Le nanotecnologie puntano da un lato a interagire con tutte le attuali tecniche di ottenimento immagini che richiedono l’utilizzo di mezzi di contrasto o traccianti, dall’altro a sviluppare nuovi strumenti di indagine in grado di rivelare un tessuto di interesse, ma anche dispensare e monitorare una terapia.

L’esposizione umana a particolato nanostrutturato è oggetto di crescente attenzione in risposta al diffuso rilascio di NP da sorgenti antropogeniche e al rapido sviluppo delle nanotecnologie.

Molti studi hanno rivelato che le proprietà innovative uniche che rendono le nanostrutture così interessanti per l’industria e la biomedicina, come la loro piccola dimensione, l’estesa area superficiale, la composizione chimica, la solubilità e la geometria, possono contribuire al loro potenziale profilo tossicologico verso i sistemi biologici, l’organismo umano (consumatori, pazienti e lavoratori) e l’ambiente (Medina *et al.*, 2007). Quindi, mentre da un lato le nanotecnologie si vanno straordinariamente sviluppando nella prospettiva degli attesi benefici, dall’altro si pone con maggiore insistenza il problema della loro sicurezza (Service, 2005). Dato che per le nanostrutture non sono più applicabili i convenzionali parametri della tossicologia tradizionale, è sorta una nuova disciplina, denominata **nanotossicologia**, che si occupa dello studio della sicurezza delle nanotecnologie ed ha lo scopo di determinare i rischi associati all’esposizione a nanomateriali, esplorare le vie di

entrata delle nanostrutture nell'organismo umano ed indagare i meccanismi molecolari relativi alla tossicità. Nonostante le aree di applicazioni delle NP siano in continuo aumento, la quantità di studi che caratterizzano la loro potenziale tossicità e gli effetti citotossici sono ancora limitati: la mancanza di concordanza degli studi in letteratura è dovuta principalmente alla variabilità di linee cellulari, protocolli e materiali che sono impiegati. L'impossibilità di definire il rischio legato alla nanotecnologia, dovuto all'assenza di protocolli standard per la valutazione tossicologica dei nanomateriali, rischia quindi di rallentare l'avanzamento della nanotecnologia a causa del principio precauzionale o per paura di investimenti a rischio. In questo scenario, la nanotossicologia si pone come una branca fondamentale per la nanotecnologia.

2.2.1 Interazione delle NP con le barriere biologiche

Il corpo umano può venire a contatto con i NM di origine sintetica soprattutto mediante tre vie principali: l'inalazione attraverso le vie respiratorie, l'ingestione attraverso il tratto gastrointestinale e l'assorbimento attraverso la via cutanea (Oberdöster *et al.*, 2005). Nel caso in cui le NP riescano a superare queste barriere, ulteriori barriere proteggono organi interni al corpo umano. Queste barriere interne o secondarie sono la barriera emato-encefalica, che protegge il cervello, la barriera emato-testicolare, che protegge l'apparato riproduttivo maschile, e la placenta, che protegge l'embrione in via di sviluppo.

Parametri quali la dimensione, la composizione chimica, la struttura superficiale, la solubilità, la forma e lo stato di aggregazione possono modificare l'assorbimento e la traslocazione delle NP dal punto di entrata fino al sito target all'interno del corpo umano (Nel *et al.*, 2006).

Le nanostrutture, una volta inalate, ingerite o somministrate topicamente possono giungere fino alla circolazione sanguigna ed essere quindi trasportate ed accumulate a livello di vari organi. Studi condotti in vivo su animali hanno messo in rilievo che le NP possono localizzarsi a livello della circolazione sanguigna e del sistema nervoso centrale (SNC), inducendo reazioni infiammatorie a livello polmonare e problemi a livello cardiocircolatorio (Dailey *et al.*, 2006), oltre ad accumularsi in vari organi quali fegato, milza, linfonodi e midollo osseo (Singh *et al.*, 2007).

2.2.2 La via respiratoria

Una delle principali vie attraverso cui volontariamente o accidentalmente entriamo in contatto con nanostrutture è rappresentata dai polmoni. L'efficienza di deposizione delle NP inalate dipende principalmente dal loro diametro e dalle caratteristiche aerodinamiche: infatti dimensioni e forma sono importanti per determinare quale compartimento del sistema respiratorio risulterà prevalentemente esposto tra le vie aeree superiori, le vie aeree inferiori o gli alveoli. Le particelle, in generale, si depositano efficientemente nell'intero tratto respiratorio, dalla cavità nasale agli alveoli, tramite meccanismi diffusionali (Geiser *et al.*, 2007): le NP di piccole dimensioni hanno la possibilità di procedere più profondamente nell'albero respiratorio, di depositarsi e di essere assorbite dall'epitelio polmonare entrando in circolo, mentre quelle di diametro superiore vengono fermate più facilmente a livello della cavità respiratoria superiore ed espulse tramite meccanismi di clearance mucociliare (Nel *et al.*, 2006) (Figura 13).

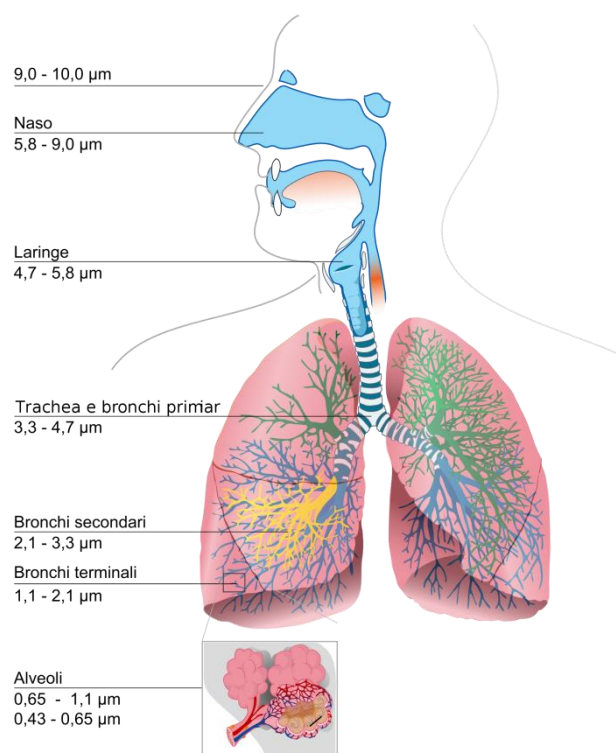


Fig. 13: penetrazione delle polveri nell'apparato respiratorio. È evidente come le nanopolveri siano in grado di penetrare a fondo nell'organismo e, si sospetta, entrare addirittura nel circolo sanguigno penetrando poi nelle cellule.

La clearance polmonare dipende non solo dalla massa totale di nanoparticelle inalate ma anche dalla loro dimensione e dall'area superficiale (Oberdöster *et al.*, 1994). Il trasporto muco-ciliare è fondamentale per la clearance delle vie respiratorie superiori, mentre a livello alveolare le NP traslocano tramite trans-citosi attraverso l'epitelio del tratto respiratorio raggiungendo l'interstizio polmonare, dove in seguito possono essere fagocitate da macrofagi alveolari oppure entrare nel circolo sanguigno direttamente o tramite via linfatica (Hoet *et al.*, 2004).

Recentemente, alcuni studi hanno dimostrato che è possibile la traslocazione di NP inalate a siti extrapolmonari, come il sistema circolatorio, il cuore, il fegato e il cervello (Gwinn *et al.*, 2006), anche se il meccanismo attraverso cui avviene la traslocazione non è stato del tutto chiarito.

Alcuni studi suggeriscono come le NP inalate, dopo essersi depositate nel polmone, eludano il controllo dei macrofagi alveolari e riescano ad infiltrarsi nello spazio interstiziale, mediante traslocazione dagli spazi alveolari attraverso l'epitelio (Borm *et al.*, 2006).

I fattori che si pensa influenzino maggiormente la tossicità polmonare dei nanomateriali

sono:

- 1) numero e dimensioni delle nanoparticelle
- 2) coating superficiale
- 3) grado di aggregazione/agglomerazione
- 4) cariche superficiali
- 5) metodo di sintesi

In teoria, le nanoparticelle aggregate possono anche disgregarsi, a contatto con liquidi particolari. Il grado di aggregazione o disgregazione delle nanoparticelle al momento dell'inalazione, o nelle fasi di deposizione nel tratto respiratorio, influisce grandemente sulle interazioni con le cellule polmonari. Infatti, se le NP aggregate si disgregano durante l'interazione con i fluidi alveolari, possono comportarsi come nanoparticelle singole e traslocare agli organi interni.

2.2.3 Assorbimento gastro-intestinale

Le nanoparticelle e le microparticelle (dai 100 ai 3000 nm) sono ingerite in quantitativi stimati tra 10^{12} e 10^{14} particelle al giorno per persona (stime eseguite in UK): principalmente si tratta di NP espulse dal tratto respiratorio tramite clearance muco-ciliare oppure di NP ingerite direttamente nel tratto gastro-intestinale, essendo esse presenti, come i silicati e le NP di biossido di titanio (TiO_2), in prodotti alimentari, nell'acqua, o in cosmetici, dentifrici, vernici e farmaci (Lomer *et al.*, 2002; Oberdöster *et al.*, 2005).

Una volta ingerite, le NP vengono veicolate allo stomaco e sottoposte ai normali processi digestivi, che possono essere in grado di attaccarle: recentemente è stato dimostrato che NP di rame di 23,5 nm vengono degradate in vivo a livello dello stomaco di ratto originando rame in forma ionica (Chen *et al.*, 2006). Nel tratto enterico, la cinetica di assorbimento è complessa e può avvenire per diffusione attraverso lo strato di muco, per contatto con gli enterociti, o per traslocazione: minore è il diametro delle NP e più veloce sarà il processo complessivo di assorbimento (Jani *et al.*, 1990). Se le NP resistono alla digestione gastrica, possono traslocare dal lume del tratto intestinale attraverso le cellule-M delle placche del Peyer (Hussain *et al.*, 2001) e, una volta raggiunto il tessuto sub-mucosale, possono raggiungere sia i follicoli linfatici, inducendo così una risposta immunitaria, sia i capillari, arrivando in questo modo a diversi organi periferici (Hoet *et al.*, 2004).

La traslocazione delle particelle ingerite dal lume intestinale al sangue e al circolo sistemico può essere influenzata da proprietà chimico-fisiche delle NP come dimensione, forma, composizione e carica: studi sia sul ratto che sull'uomo hanno dimostrato che particelle di TiO_2 di dimensione 150-500 nm, una volta ingerite, possono traslocare al circolo sistemico e accumularsi a livello di fegato e milza (Jani *et al.*, 1994), mentre evidenze sperimentali permettono di affermare che particelle di dimensioni anche superiori possono essere assorbite con meccanismi di “*persorption*” all'interno di vacuoli e attraversare così l'epitelio intestinale per localizzarsi a livello di fegato e altri organi (Hagens *et al.*, 2007). Le evidenze di assorbimento non sono però univoche, in quanto altri studi mostrano che nanoparticelle metalliche ultrafini, una volta ingerite, non sono traslocate in maniera significativa al circolo sistemico e da qui agli altri organi (Geiser *et al.*, 2005).

2.2.4 Assorbimento cutaneo

Le possibilità di trasporto delle NP attraverso la cute sana sono tuttora controverse, soprattutto per particelle di dimensioni superiori a 1 μm , mentre si hanno numerose evidenze sperimentali sulla possibilità di trasporto trans-dermico in caso di cute lesionata, in maniera dipendente da alcune variabili fisiche come forma delle NP, dimensione e carica superficiale.

Alcuni studi hanno dimostrato ad esempio la penetrazione di NP di TiO_2 dalle creme solari attraverso lo strato corneo e l'orifizio dei follicoli piliferi (Gwinn *et al.*, 2006), e il superamento della barriera dell'epidermide da parte di NP molto piccole, come alcuni quantum dots di circa 7 nm di diametro (Ryman-Rasmussen *et al.*, 2006): una volta raggiunto il derma le NP possono raggiungere i vasi linfatici, trasportate dai macrofagi e dalle cellule dendritiche, e dal circolo linfatico si suppone che queste nanostrutture possano accedere al circolo sanguigno ed essere distribuite a tutto il corpo (Gwinn *et al.*, 2006).

2.2.5 Attraversamento della barriera emato-encefalica

Le NP inalate possono accedere al sistema nervoso centrale (SNC) (Semmler *et al.*, 2004), per contatto con l'epitelio nasale e risalendo per trasporto trans-sinaptico dei nervi olfattivi fino al bulbo olfattivo (Oberdorster *et al.*, 2004).

Inoltre, i NM che circolano nel sangue possono entrare nel SNC attraverso il superamento della barriera emato-encefalica. Nonostante questa sia una barriera altamente selettiva, e consenta il passaggio soltanto per via trans-cellulare, in molte patologie, come ipertensione ed encefalomielite allergica, la permeabilità della barriera emato-encefalica risulta diminuita e fa passare NP, come dimostrato in alcuni modelli. E' stato inoltre dimostrato che la carica superficiale delle NP può alterare l'integrità della barriera ematoencefalica, con possibili conseguenze sugli impegni dei nanomateriali per *drug delivery* nel CNS (Muller *et al.*, 2004), ma anche sulla tossicità nel cervello (Lockman *et al.*, 2004).

L'utilizzo di NP paramagnetiche di magnetite (ossido di ferro Fe_3O_4) si è dimostrato sperimentalmente interessante (Jendelova *et al.*, 2004), e si pensa che potrà essere applicato ai trapianti, per seguire il destino delle cellule staminali introdotte per curare malattie degenerative. La tossicità di un utilizzo del genere, però, rimane

ancora del tutto sconosciuto. Non si sa ancora pressochè nulla, infatti, sulla tossicologia dei nanomateriali nel cervello. E' stato dimostrato che le NP inducono stress ossidativo, e proprio lo stress ossidativo è uno dei fattori implicati in malattie neurodegenerative come Parkinson's disease e Alzheimer's disease (Kedar et al., 2003). Uno studio del 2004 ha suggerito un'associazione tra NP presenti nel cervello e l'aumento dei marker dell'infiammazione e accumulo di AB42 nella corteccia frontale ed ippocampo di persone che avevano sviluppato malattia di Alzheimer (Calderon-Garciduenas *et al.*, 2004). Infine, in topi è stata mostrata un'attivazione delle citochine pro-infiammatorie nel cervello in seguito ad inalazione di particolato (Campbell *et al.*, 2005).

2.2.6 Attraversamento della barriera placentare

La placenta è una barriera biologica secondaria particolare, in quanto si forma e svolge la sua funzione solo per un periodo limitato, i 9 mesi di gravidanza della donna.

La madre e il feto concorrono insieme alla formazione della placenta, per cui qualsiasi disfunzione in uno dei due nei primi mesi di formazione della placenta potrebbe portare ad uno sviluppo alterato della stessa, causando diversi effetti sul feto in particolare, essendo dipendente da essa in termini di nutrizione e scambi gassosi.

Durante il periodo della gravidanza la placenta umana presenta spessore e permeabilità variabili, risultando più spessa e meno permeabile durante il primo trimestre, più sottile e più permeabile negli ultimi tre mesi. In quest'ultimo periodo, quindi, vi è una maggiore possibilità che sostanze esterne (incluse le NP esterne) possano attraversarla.

D'altra parte, la somministrazione di agenti potenzialmente nocivi in fase molto precoce della gravidanza (ad esempio subito dopo l'impianto dell'ovocita fecondato, quando la placenta non è ancora completamente sviluppato), può causare strutturale e alterazioni funzionali dell'organo. Ci sono prove indirette che la somministrazione di alcuni NP in questa fase può causare gravi danni alla placenta, associata ad un alto tasso di aborti spontanei e a malformazioni dell'embrione (Pietrojusti *et al.*, 2011).

2.2.7 *Uptake e destino intracellulare delle NP*

In letteratura sono disponibili ancora poche informazioni sui meccanismi coinvolti nell'*uptake* delle NP da parte delle cellule, tuttavia sembra che il meccanismo d'internalizzazione e quindi il destino intracellulare di un nanosistema sia influenzato da numerosi fattori:

- dalle proprietà chimico-fisiche del materiale con il quale esso è costruito (composizione chimica, dimensioni, forma e geometria, carica superficiale, stato di aggregazione, rivestimento superficiale) (Chithrani *et al.*, 2007);
- dalle condizioni sperimentali adottate dagli esperimenti *in vitro*;
- dalle caratteristiche delle cellule utilizzate e quindi soprattutto dalla linea cellulare e dallo stato di differenziazione.

In particolar modo, le caratteristiche superficiali delle NP risultano un fattore cruciale, poichè, oltre a determinare la biocompatibilità, giocano un ruolo fondamentale nell'adesione cellulare (Gupta *et al.*, 2005). Si è dimostrato che l'adesione tra cellule, matrice extracellulare e particelle è regolata soprattutto dalle integrine, una famiglia proteica di recettori coinvolti nell'adesione superficiale. La matrice citoscheletrica interagisce non solo con le integrine ma anche con proteine responsabili dei processi di internalizzazione cellulare, tra cui soprattutto l'endocitosi, che è il principale meccanismo d'ingresso delle NP.

In generale, una sostanza può entrare all'interno della cellula attraverso diffusione semplice o attraverso processi endocitici quali fagocitosi, macropinocitosi, endocitosi mediata da clatrina e endocitosi mediata da caveole.

La diffusione semplice è l'unico dei processi sovraelencati che non richiede energia, ma sfrutta semplicemente la presenza di un gradiente di concentrazione: solitamente sfruttano questo processo solo molecole di dimensioni molto ridotte e apolari, che diffondono attraverso il doppio strato fosfolipidico.

Con il termine endocitosi si indica invece l'internalizzazione da parte di una cellula di macromolecole e soluti all'interno di vescicole membranose originatesi dall'invaginazione della membrana plasmatica (Figura 14).

Endocitosi

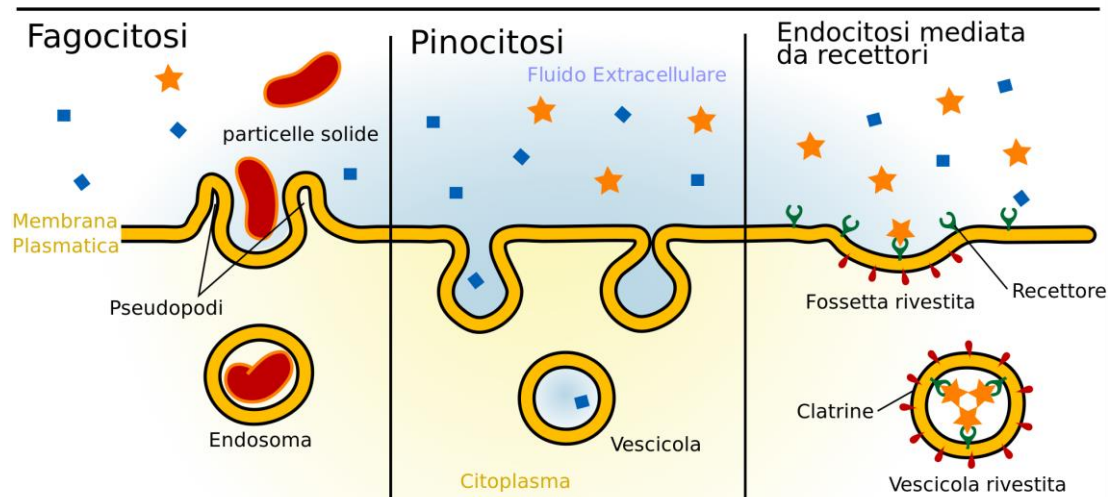


Fig. 14: schema dei diversi tipi di endocitosi.

La fagocitosi è possibile solo per alcuni tipi cellulari specializzati detti fagociti, quali i macrofagi, i monociti e i neutrofili, che sono in grado di rimuovere materiale di dimensioni anche maggiori di $0,5\ \mu\text{m}$ (batteri, lieviti e detriti), attraverso un'interazione specifica tra i recettori della cellula fagocitica e i ligandi sulla superficie della particella, che porta a una conseguente invaginazione della membrana, favorita dalla proteina actina, e alla formazione di vescicole (i fagosomi) contenenti il materiale da eliminare.

La macropinocitosi consiste nella formazione di vescicole (i macropinosomi) di grandi dimensioni e di forma irregolare, generati anch'essi da un'invaginazione actina-dipendente della membrana plasmatica (Swanson *et al.*, 1995). Il destino intracellulare dei macropinosomi è fortemente dipendente dal grado di specializzazione della cellula: nei macrofagi, ad esempio, si fondono con i lisosomi, mentre in altri tipi cellulari costituiscono una popolazione di vescicole distinte che non interagiscono con i compartimenti endocitici, ma che promuovono il riciclo del contenuto verso la membrana plasmatica.

L'endocitosi mediata da clatrina (CME) è il percorso endocitico più frequente e viene normalmente utilizzato dalla cellula per il continuo apporto di nutrienti, antigeni e fattori di crescita (Takei *et al.*, 2001). La CME è un tipo di endocitosi mediata da recettori: la fase iniziale consiste nel riconoscimento, da parte della cellula, della sostanza da internalizzare tramite l'interazione con specifici recettori di membrana.

La porzione citoplasmatica del recettore legato al suo ligando ha un'elevata affinità per la clatrina, una proteina citoplasmatica. Quando sulla membrana plasmatica si trova un numero sufficiente di recettori legati al ligando specifico e alla clatrina, questi tendono ad unirsi in un'unica regione per diffusione laterale: le molecole di clatrina formano così, legandosi tra loro, una sorta di rete che induce una flessione localizzata della membrana, formando la cosiddetta *coated pit* (fossetta rivestita). Questa si approfondisce ulteriormente fino a chiudersi in se stessa, separandosi dalla membrana cellulare e formando una vera e propria vescicola rivestita. Queste vescicole si spostano verso le regioni più interne del citoplasma e ad un certo punto della loro progressione perdono il rivestimento clatrinico: la clatrina disassemblata viene riciclata, le vescicole nude si fondono tra loro dando luogo agli endosomi, all'interno dei quali il basso valore di pH favorisce la dissociazione tra i ligandi e i recettori, e infine il materiale endocitato può essere accumulato all'interno della cellula, oppure andare incontro a degradazione lisosomiale o a transitosi.

L'endocitosi mediata da caveole è attiva soltanto in alcuni tipi di cellule, soprattutto endoteliali, muscolari e adipose. Le caveole prendono il nome dalla proteina che le origina, la caveolina, e consistono in piccole invaginazioni della membrana plasmatica ricche in glicosfingolipidi e colesterolo, e associate a particolari tipi di molecole, quali ad esempio proteine segnale (Shin *et al.*, 2007). L'endocitosi mediata da caveole è una via di internalizzazione definita non-acida e non-digestiva, in quanto nelle caveole non si va incontro ad acidificazione del contenuto e in quanto non si ha la fusione delle vescicole con i lisosomi: il materiale endocitato può essere trasferito direttamente nell'apparato del Golgi o nel reticolo endoplasmatico.

Gli esempi presenti in letteratura riguardo all'uptake delle nanostrutture mostrano come la cellula riesca ad utilizzare contemporaneamente anche più meccanismi diversi e come le caratteristiche delle nanostrutture influiscano notevolmente sul loro destino intracellulare. Oltre alle caratteristiche superficiali, che hanno un ruolo fondamentale nell'adesione cellulare, la carica superficiale è un'altra proprietà fondamentale nel determinare l'uptake cellulare delle NP: la membrana plasmatica presenta, infatti, una carica netta negativa per la presenza della fosfatidilserina nel foglietto interno ed inoltre la distribuzione degli ioni a cavallo della stessa membrana cellulare determina una polarizzazione positiva verso l'ambiente esterno. Le NP anioniche sono quindi endocitate in quantità minore rispetto a quelle cationiche. L'influenza della presenza di cariche sulla superficie delle NP è stata comprovata

anche da Roser (Roser *et al.*, 1998), che ha dimostrato sperimentalmente come l'internalizzazione di NP, rivestite di albumina e caricate positivamente, da parte di monociti e macrofagi, risulta maggiore rispetto a quella del medesimo tipo di particelle ma prive di carica. In un'altra pubblicazione invece (Foged *et al.*, 2005) è stato dimostrato come non ci sia un aumento dell'efficienza di internalizzazione da parte di cellule dendritiche di NP in polistirene caricate positivamente. L'evidente contraddizione presentata dai due diversi lavori supporta la tesi che non esistono regole fisse per i meccanismi utilizzati per l'*uptake* delle NP, ma semplicemente esiste una forte dipendenza dalle caratteristiche chimico-fisiche dei materiali e dal tipo di sistema cellulare utilizzato per gli esperimenti *in vitro*. Ad esempio si è osservato come, a seconda del tipo cellulare con cui entrano in contatto le NP, vari la loro capacità di penetrare all'interno delle cellule: studi effettuati su macrofagi alveolari isolati da ratto dimostrano come NP di silice vengano rapidamente internalizzate grazie all'eccezionale capacità di tali cellule di fagocitare particelle esterne; al contrario, per le cellule di carcinoma polmonare umano (A549) la velocità di *uptake* risulta notevolmente inferiore (Jin *et al.*, 2007). Inoltre queste cellule di origine polmonare possono essere coinvolte in meccanismi di internalizzazione diversi: tramite diffusione semplice nel caso di microsfele fluorescenti di polistirene (Geiser *et al.*, 2005), oppure tramite endocitosi mediata da clatrina, ad esempio per NP magnetiche rivestite di silice (Kim *et al.*, 2006) (Figura 20).

Numerosi lavori in letteratura si occupano dello studio di localizzazione di NP marcate con un fluoroforo o caricate con una sostanza fluorescente, mediante l'acquisizione di immagini al microscopio: il lavoro pubblicato da Savic *et al.* dimostra come micelle di dimensioni nanometriche siano in grado di penetrare a livello di organelli citoplasmatici quali reticolo endoplasmatico (ER), Golgi, lisosomi e mitocondri, ma non a livello del nucleo (Savic *et al.*, 2003).

In un altro lavoro, invece, allo scopo di verificare se le NP siano effettivamente in grado di raggiungere il nucleo, è stato effettuato un legame con polietilammine fluorescenti (PEI). Questo complesso PEI-NP è in grado di attaccarsi a componenti della membrana cellulare ed entrare per endocitosi all'interno della cellula: qui si muove all'interno di vescicole verso il comparto nucleare, all'interno del quale viene infine rilasciato (Godbey *et al.*, 1999). Per definire le dimensioni massime che una NP deve avere per penetrare all'interno del nucleo attraverso il complesso del poro nucleare (NPC, nuclear pore complex) sono state scelte AuNP di dimensioni

differenti (22, 26 e 36 nm). L'esperimento ha dimostrato che le NP più piccole sono in grado di entrare da sole nel nucleo (Figura 15-A), mentre quelle più grandi (fino a un massimo di circa 39 nm) penetrano nei pori nucleari mediante il complesso dell'importina (Figura 15-C) (Panté *et al.*, 2002).

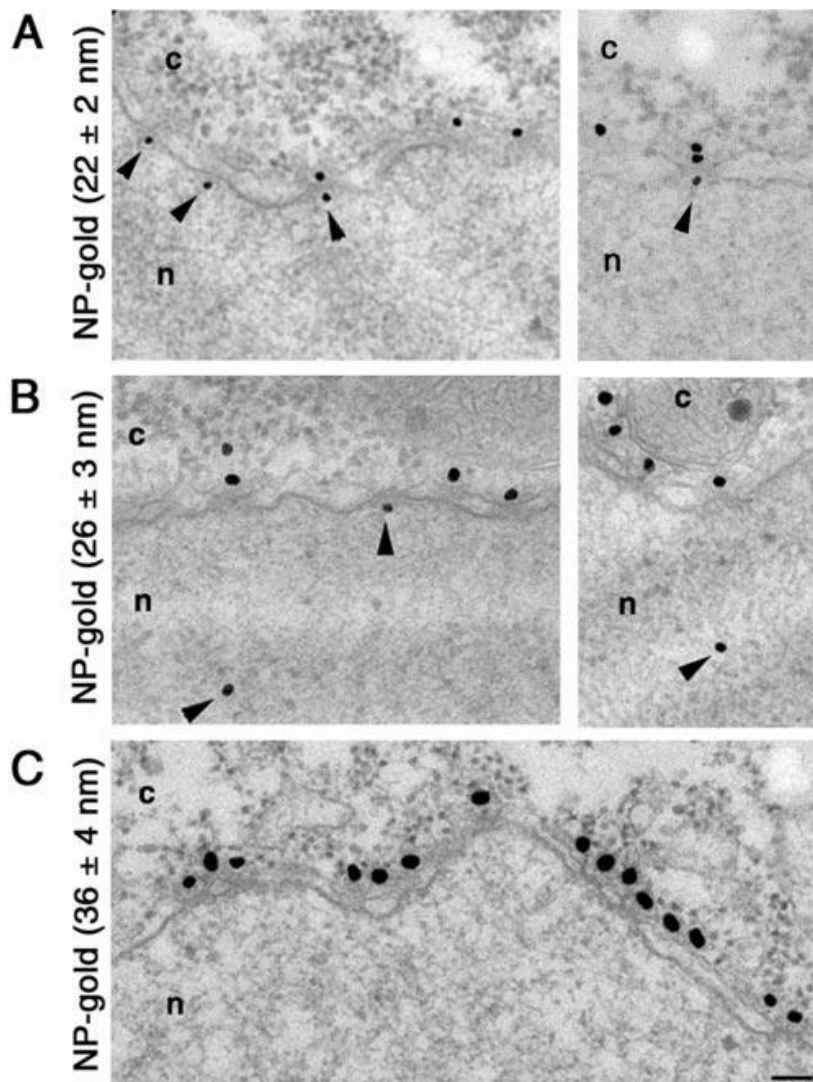


Fig. 15: ingresso nucleare di NP d'oro del diametro di : A) 22 nm, B) 26 nm e C) 36 nm (mediante il complesso dell'importina, C-1 e C-2). n = nucleo, c = citoplasma.

3. Nanotecnologie e ambiente

3.1 Dispersione e comportamento delle NP nell'ambiente

Come tutti i prodotti dell'industria anche le NP hanno un loro ciclo di vita, suddiviso in diverse fasi, quali produzione, realizzazione del prodotto finito, utilizzo e smaltimento. In tutte queste fasi è possibile un eventuale rilascio di NP nell'ambiente, volontariamente o meno (Bystrzejewska-Piotrowska *et al.*, 2009; Som *et al.*, 2010). In particolar modo, l'eventualità diventa certezza con lo smaltimento e la fine del ciclo di vita di un NM.

Una volta nell'ambiente, le NP possono distribuirsi nelle varie matrici ambientali e, a seconda delle loro proprietà chimico-fisiche, trasferirsi da un compartimento ad un altro o accumularsi. Inoltre, esse possono venire a contatto con gli organismi viventi, entrando così anche nella biosfera.

Attualmente, con un'unica eccezione (Kaegi *et al.*, 2008), non si dispone di dati ambientali che siano basati su effettive misurazioni effettuate in campo (Scown *et al.*, 2010) ma vi sono solamente modelli predittivi. Questa carenza di informazioni è dovuta a diverse difficoltà operative che insorgono durante le operazioni di misura delle NP, in primis l'impossibilità di distinguere le NP naturali da sempre presenti, da quelle artificiali (Savolainen *et al.*, 2010). In pratica non si riesce ad eliminare il contributo del rumore di fondo, rendendo vana la determinazione delle NP. Un'altra difficoltà in cui ci si imbatte è causata dall'elevata instabilità delle NP che, molto spesso, hanno la tendenza ad aggregarsi in tempi assai ridotti e a formare quindi particelle di dimensioni ben superiori a quelle classificabili come NP (1-100 nm).

Il problema reale è l'esistenza di un forte divario tra la crescita vertiginosa delle NP e del loro utilizzo e le metodologie e gli strumenti per la loro determinazione nell'ambiente. Pertanto, nell'attesa che lo sviluppo tecnologico possa fornire un valido supporto al superamento di queste ed altre problematiche inerenti la misura delle NP nell'ambiente, appare sensato avanzare per lo meno delle previsioni che tengano conto delle caratteristiche di questi materiali e dell'ambiente in cui questi possono immettersi.

3.2 NP nell'aria

L'aria è un compartimento che riesce a diffondere un inquinante in tempi molto rapidi ed in luoghi molto lontani rispetto alla sorgente di emissione. Tale compartimento è considerato provvisorio poiché il particolato atmosferico può rimanervi in sospensione fino a quando non raggiunge una certa dimensione a causa dei fenomeni di aggregazione o di condensazione, umide e secche. A quel punto, soggetto alla forza di gravità, il particolato ricade sugli altri comparti, come l'acqua ed il suolo.

Gli studi sulle concentrazioni delle NP nell'aria sono molto pochi (Scown *et al.*, 2010) e, come spesso accade quando si inizia la produzione di materiali nuovi e sconosciuti, sono in maggior parte rivolti alla tutela dei lavoratori esposti ad esse (Manodori e Benedetti, 2009). Contrariamente a quanto si potrebbe pensare, negli spazi chiusi, come le mura domestiche o negli uffici, i livelli di NP sono ben più elevati che all'esterno (Joner *et al.*, 2008). Questo non stupisce se si pensa alle dimensioni estremamente ridotte di tali elementi che quindi acquistano maggiore rilevanza laddove possono concentrarsi, rispetto a quando sono diluiti in grandi volumi d'aria. Un esempio di quanto appena visto si ritrova in un articolo di Maynard del 2008. Seduto nella sua caffetteria preferita, egli dichiarava di inalare 4 miliardi di NP al minuto, come confermato dal suo contatore di particelle a condensazione portatile (Maynard *et al.*, 2008). Altri autori ribadiscono quanto anticipato nel precedente paragrafo e cioè che l'assenza di tecnologie per la misurazione e l'incapacità di separare le NP da tutte le NP di fondo rende impossibile o, per lo meno, altamente problematico fornire i limiti per l'esposizione occupazionale (Savolainen *et al.*, 2010).

3.3 NP nell'acqua

Prevedere il comportamento ed il destino delle NP nell'acqua è un compito molto arduo, a causa della forte reattività di queste e delle numerose condizioni ambientali al contorno. Attualmente, non sono stati pubblicati dati sulle NP negli ambienti acquatici (Klaine *et al.*, 2008) ed anche gli studi sulle acque superficiali sono scarsi (Scown *et al.*, 2010). Le acque dolci correnti e quelle dei laghi possono essere estremamente ricche di colloidali naturali (1-200 nm) che possono adsorbire le NP più

affini sulla loro superficie. Ad esempio, è stato dimostrato (Klaine *et al.*, 2008) che la frazione di materia organica, contenuta nei colloidi, è in grado di stabilizzare le NP di Fe 0-valenti ed i CNT. Il destino delle NP, quindi, dipenderà dalla quantità di tali colloidi, dalle loro proprietà chimico fisiche e, naturalmente, dalle caratteristiche chimico-fisiche delle NP. La stabilità dei colloidi, a sua volta, dipende dall'interazione tra le forze attrattive e repulsive (Scown *et al.*, 2010) che, invece, sono dipendenti da parametri ambientali quali ad esempio temperatura, pH, concentrazione ionica, salinità ecc., le cui variazioni incidono quindi sulla mobilità dei colloidi stessi. Ciò che avviene nelle zone di transizione rappresenta un classico esempio di quanto appena discusso. Quando l'acqua dolce incontra l'acqua salata si assiste ad una repentina variazione della salinità e quindi della forza ionica e questo produce la flocculazione e la sedimentazione dei colloidi col loro carico di NP. Il fenomeno che, nel breve termine, può tramutarsi in un vantaggio per le specie che vivono nella colonna d'acqua costituisce, molto probabilmente, un problema per la componente che vive a diretto contatto col sedimento, cioè il benthos (Farrè *et al.*, 2009).

Le acque marine ed oceaniche costituiscono un ambiente generalmente più alcalino, che possiede una forza ionica maggiore ed un'ampia varietà di colloidi e di materia organica naturale (NOM). Inoltre, a differenza degli ambienti di acqua dolce, mari ed oceani presentano una variabilità nei parametri chimico-fisici legata al profilo della profondità, quali ad esempio la temperatura e, ancora, la stratificazione delle correnti può originare differenze di salinità e di contenuto di NOM (Klaine *et al.*, 2008). Tutto ciò può influenzare lo stato chimico e di aggregazione dei colloidi. Non è ancora chiaro, comunque, se le NP possano accumularsi all'interfaccia tra l'acqua più fredda e quella più calda, costituendo un rischio per la componente nectonica. Potrebbe inoltre esistere un rischio per la componente planctonica legato all'accumulo di NP nel microlayer superficiale, in cui la tensione superficiale e le forze viscosive possono intrappolare le NP. Le preoccupazioni degli ecotossicologi, attualmente, sembrano focalizzarsi sul benthos marino che è considerato come il più probabile dei ricettori finali delle NP immesse nell'ambiente a causa della tendenza di questi materiali a precipitare, alle condizioni di salinità e forza ionica tipiche di tali ambienti (Klaine *et al.*, 2008; Canesi *et al.*, 2009).

3.4 NP nei suoli e nei sedimenti

I suoli sono matrici complesse ed anche naturalmente molto ricche in NP (Theng e Yuan, 2008). Queste si originano dalle continue trasformazioni dei costituenti geogenici dei suoli, dovute ai fattori climatici ma anche all'elevata azione di bioturbazione. I sedimenti, essendo suoli in condizione di saturazione d'acqua, risultano ulteriormente complessi a causa delle interazioni tra l'acqua e la parte solida. Da sempre, i suoli sono stati considerati dei recettori finali per gli inquinanti ma la natura particolare delle NP e l'elevata probabilità di reagire in sistemi così complessi possono dar luogo ancora una volta a delle eccezioni.

Sia i suoli che i sedimenti contengono argille, colloidali e NOM (Natural Organic Matter) (Klaine et al, 2008) i quali, per via dell'elevata superficie specifica e della presenza di cariche superficiali, possono legarsi alle NP a seconda dell'affinità reciproca. In particolar modo la NOM contiene molte regioni idrofobiche. Tra i costituenti della NOM ci sono anche le sostanze umiche che, a loro volta, in misura del 50%, si dividono in frazione solubile e non solubile (Joner *et al.*, 2008). Date queste premesse, si intuisce quindi che, sostanze idrofobiche come i fullereni o i CNT, che da sole non si mobiliterebbero mai in acqua, potrebbero, invece, legarsi alla NOM, essendole affini e, qualora questa intercettasse dell'acqua, sarebbero comunque in grado di mobilitarsi.

Anche in questo caso, quindi, di fronte alla complessità del sistema in esame, si comprende quali possano essere le difficoltà riscontrabili nell'avanzare delle previsioni sul destino delle NP nei suoli e nel distinguere tali NP da tutte le NP naturalmente presenti nei suoli.

3.5 Modelli animali per gli studi di ecotossicità: lo Zebrafish

Per studiare l'impatto ambientale e gli effetti biologici delle diverse NP sugli organismi acquatici è da tempo utilizzato lo *Zebrafish* (*Danio rerio*), valido anche come modello, tra i vertebrati, per identificare i rischi per la salute umana, per via della sua omologia con il genoma umano e per le somiglianze fisiologiche e anatomiche.

Zebrafish è un piccolo pesce tropicale, dal basso costo d'allevamento, dalle piccole dimensioni, dalla rapida generazione di un gran numero di embrioni trasparenti e

dallo sviluppo embrionale veloce (López-Serrano *et al.*, 2014). Una sola deposizione produce 100-200 uova. Gli adulti sono lunghi 3 cm mentre le larve sono lunghe solo 1-4 mm e possono vivere per sette giorni in un unico pozzetto di una micropiastra da 96 o 386 pozzetti, sostenuti da nutrienti accumulati nel sacco vitellino (McGrath *et al.*, 2008). Zebrafish permette di indagare la teratogenicità di prodotti chimici che possono avere un grande impatto ambientale-ecologico (Zhu *et al.*, 2008). Nella valutazione si tiene conto dei tassi di mortalità, degli sviluppi anormali, dell'induzione dell'apoptosi e dell'espressione genica. In uno studio, le larve di Zebrafish esposte alle AgNP presentavano una differenziale attivazione dell'espressione del gene per la metallothioneina 2, enzima importante nella protezione contro la tossicità dei metalli pesanti e contro lo stress ossidativo. Gli animali acquatici, in generale, sono sensibili alle AgNP perché queste vanno ad interferire con i processi biologici una volta entrate attraverso tight junctions o canali ionici (Osborne *et al.*, 2013). Tra le superfici epiteliali l'attenzione si concentra sulle branchie dove la funzione respiratoria, per via dell'esposizione alle NP, può essere compromessa così come l'intestino (con le sue mucose) e la microflora endogena. Le membrane biologiche che separano l'ambiente acquatico dai tessuti interni sono importanti per i vari processi fisiologici e la perturbazione di tali processi da parte delle NP potrebbero compromettere la sopravvivenza degli organismi acquatici. In un altro studio si è visto che le NP possono interferire anche con la linea laterale dei pesci, nella quale sono presenti i neuromasti (particolari recettori) che contengono cellule ciliate che si estendono verso l'ambiente acquoso, mantenute da cellule di sostegno presenti nel derma. Le cellule ciliate fungono da organo sensoriale che è in grado di captare i cambiamenti di pressione dell'acqua mentre le cellule di sostegno sono importanti per la rigenerazione delle cellule ciliate. La linea laterale facilita diversi comportamenti come la cattura delle prede o la capacità di orientarsi nella corrente acquatica e proprio il suo diretto contatto con l'ambiente esterno, fa della linea laterale uno dei primi bersagli delle NP e rappresentano un ottimo test tossicologico per lo studio di antibiotici e di metalli in tracce sin dai primi stadi dell'embrione. La tossicità delle AgNP nella linea laterale compromette, quindi, il mantenimento dell'equilibrio nella corrente acquatica (McNeil *et al.*, 2014). Il destino e la tossicità delle NP nei sistemi acquatici dipende dalla loro interazione con una serie di cationi inorganici e specie anioniche, nutrienti e materiale organico presenti in abbondanza nel mezzo acquoso. Le nanoparticelle entrano tramite

L'epidermide e i meccanismi di rimozione non sono efficaci nei giovani embrioni in quanto le cellule immunitarie si sviluppano in una fase successiva. L'esposizione alle nanoparticelle come AgNP condiziona, inoltre, l'espressione del gene per l'enzima GST importante nella detossificazione e nella risposta allo stress ossidativo, causando una down-regulation di questo enzima e altri associati alla risposta da stress ossidativo come la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi (CAT) (Pavagadhi *et al.*, 2014). Lo ione argento è presente in quantità rintracciabili ed è uno dei più tossici; tuttavia negli ecosistemi marini prevalgono i complessi di cloruro d'argento con moderata tossicità. Zebrafish ha la capacità di variare l'assorbimento e l'eliminazione a seconda delle concentrazioni d'esposizione o la specifica capacità di isolare, disintossicare e conservare il metallo interiorizzato. (López-Serrano *et al.*, 2014).

4. Tecniche di caratterizzazione dei NM

La conoscenza di alcune caratteristiche basilari, inerenti la morfologia, la microstruttura, la distribuzione di fase e la composizione chimica, è essenziale per valutare le proprietà funzionali dei NM. Per la caratterizzazione dei NM possono essere impiegate sia tecniche di imaging sia tecniche analitiche (Dini *et al.*, 2015). Fra le prime trovano larga applicazione la microscopia ottica, la microscopia elettronica a scansione (SEM) e la microscopia elettronica in trasmissione (TEM). Fra le seconde, alcuni tipi di spettroscopia e la Diffrazione a raggi X (XRD). Per ogni tipologia di materiale da caratterizzare la scelta della tecnica più appropriata è basata sulla tipologia dei dettagli che si vogliono ricavare e sulla loro scala. (Tab. 2)

Le tecniche di imaging forniscono informazioni sulla morfologia e sulla nanostruttura dei nanomateriali (Oura *et al.*, 2003). Tali tecniche richiedono l'utilizzo di un microscopio, che può essere: ottico, e quindi basato sull'osservazione nell'ambito dello spettro elettromagnetico della luce in senso lato; elettronico, basato sull'utilizzo di una sorgente di elettroni; a scansione di sonda, basato sull'esplorazione della superficie del campione con una sonda, o di altro tipo.

I microscopi ottici hanno una risoluzione molto inferiore rispetto alle altre due classi di microscopi menzionati, tuttavia i microscopi ottici confocale e a scansione in campo vicino (spesso indicato con le sigle NSOM Near-field scanning optical microscope o SNOM Scanning nearfield optical microscope) hanno una risoluzione

che li rende interessanti nell'ambito specifico dei NM, perché consentono in maniera semplice e veloce di ottenere informazioni riguardo la forma, le dimensioni e la topografia superficiale degli stessi NM.

In campo biologico, per esempio, il microscopio ottico confocale consente di costruire un'immagine tridimensionale del campione analizzato senza dover effettuare il sezionamento dello stesso (Pawley *et al.*, 2006). Infatti, spostando il campione lungo l'asse verticale dopo ogni scansione, è possibile ottenere una serie di immagini successive corrispondenti a piani focali via via più profondi all'interno del medesimo campione.

La sovrapposizione ordinata di queste sezioni ottiche, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scansionato, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco. La possibilità, quindi, di ricostruire un volume in maniera non distruttiva, rende il microscopio ottico confocale uno strumento molto interessante per l'analisi di materiali bulk e di coatings con strutture caratteristiche a livello nanometrico.

Tab. 2: principali tecniche per la caratterizzazione di NM.

Parametro	Tecnica
Dimensioni	TEM, SEM, AFM, SLS, DLS, FFF, NTA, SEC, LD, UE, SMPS, FMPS
Forma	EM o DLS-SLS
Agglomerazione	TEM, SEM, AFM, SLS, DLS, FFF, NTA, SEC, LD, etc.
Composizione	ICP-AES, ICP-MS, MS, F-AAS, Et-AAS, EM-EDX, EM-EELS
Concentrazione	FFF+Spettroscopia, EM, NTA, LIBD
Struttura cristallina	XRD, TEM-SAED
Area superficiale	BET
Carica superficiale	Titolazioni potenziometriche
Potenziale ζ	Misure elettrocinetiche
Potenziale redox superficiale	XPS
Funzionalizzazione della superficie	SPR

TEM (Microscopia elettronica a Trasmissione), SEM (Microscopia elettronica a Trasmissione), AFM (Microscopia a forza atomica), SLS (Light Scattering Spectroscopy), DLS (Dynamic Light Scattering), FFF (Field Flow Fractionation), NTA (NP Tracking analysis), SMPS (Scanning Mobility Particle Size), ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy) LIBD (Laser Induced Breakdown Detection), XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy) SPR (Surface Plasmon Resonance).

4.1 Microscopia Elettronica a Scansione (SEM)

Il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) è spesso impiegato per studiare la morfologia e la microstruttura di NP, nanocompositi, film sottili, *coatings* e materiali bulk (Goodhew *et al.*, 1988). Tale microscopio, infatti, è ottimale per analizzare dettagli di dimensioni variabili da pochi nanometri fino a 1 mm, fornendo informazioni riguardo la forma, la dimensione, la topografia, la disposizione e l'orientamento dei grani e la loro composizione. L'assenza d'aria, insieme al fatto che gli elettroni sono particelle cariche, comporta che i campioni analizzati subiscano dei forti effetti di caricamento che talora possono alterare il risultato dell'immagine. Per questa ragione i campioni non conduttori vengono generalmente fissati su un supporto metallico e metallizzati, cioè ricoperti con un sottile strato di materiale conduttivo, generalmente di oro o di carbone, a meno che non si utilizzi microscopia a bassa tensione o a basso vuoto.

Gli elettroni sono accelerati applicando un voltaggio generalmente da 1 a 30 kV e focalizzati, attraverso una serie di lenti magnetiche, sul campione. Il fascio di elettroni, detto primario, viene fatto muovere in modo da effettuare una scansione della superficie punto per punto, prendendo in considerazione una zona rettangolare della stessa.

Dall'interazione del fascio di elettroni con gli atomi che costituiscono il campione, vengono emessi fotoni ma soprattutto elettroni che possiedono diverse caratteristiche di direzionalità ed energia, a seconda del tipo di interazione che hanno avuto con la materia. Gli elettroni sono poi catturati da rivelatori speciali e convertiti in impulsi elettrici che sono inviati in tempo reale ad uno schermo (un monitor), dove viene eseguita simultaneamente una scansione analogica. Il risultato è un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo, che ha caratteristiche simili a quelle di una immagine fotografica. Ciascun segnale fornisce una serie di informazioni di tipo morfologico e microstrutturale o composizionale (Fig.16).

Per le immagini dei campioni, il SEM utilizza gli elettroni secondari e gli elettroni retrodiffusi. I primi sono elettroni a bassa energia (circa 50 eV) che si generano quando un elettrone del fascio primario scalza un elettrone da un atomo della superficie o sub-superficie del campione. Essi sono utilizzati per ottenere informazioni topografiche ad elevata risoluzione. L'interpretazione delle immagini è

resa semplice dal fatto che il contrasto tra luci ed ombre, che si vede nell'immagine SEM (fatto salvo effetti di caricamento e contributi vari che possono alterare il contrasto), è molto simile a quello che si otterrebbe se il campione fosse illuminato con la luce. Gli elettroni retrodiffusi, invece, sono elettroni ad alta energia, prossima a quella del fascio primario. Sono generati dallo scattering elastico degli elettroni che rimbalzano indietro dal campione senza attraversarlo e vengono utilizzati per ricavare informazioni sulla densità atomica. La loro resa di emissione, infatti, è sensibile al numero atomico medio dell'area che attraversano: più è alto il numero atomico medio, più intenso è il segnale.

Nell'immagine al microscopio elettronico, l'alta intensità del segnale si traduce in un'area di gradazione più chiara.

Tra i microscopi a scansione una particolare attenzione merita il microscopio elettronico a emissione di campo, in cui la definizione raggiunta è al livello subnanometrico (Field Emission Gun FESEM). Per le sue caratteristiche, questo tipo di microscopio è particolarmente indicato nello studio di materiali per cui sono richiesti alta definizione ed elevati ingrandimenti.

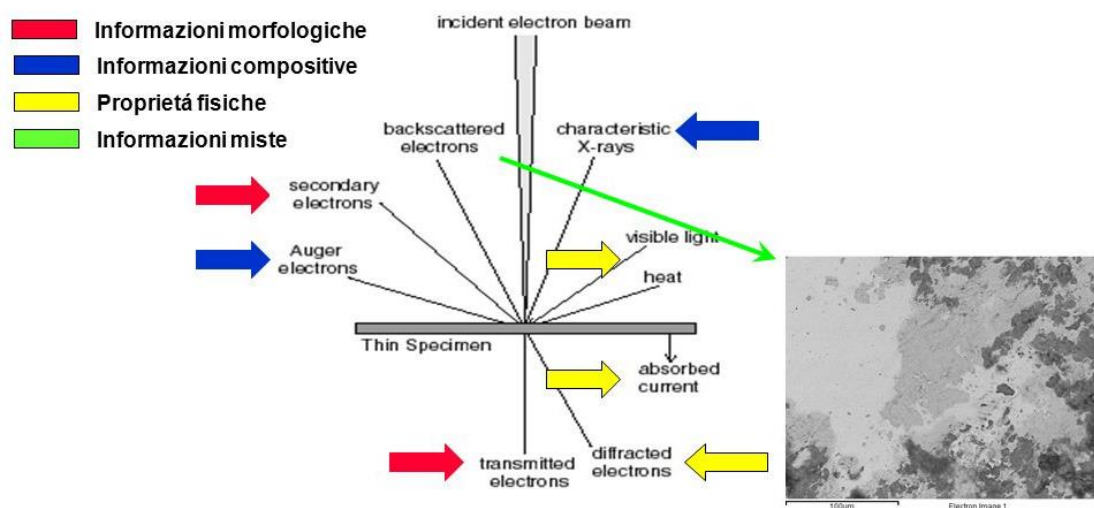


Fig. 16: Principali segnali ottenuti dall'interazione dell'elettrone primario con la materia.

4.2 Microscopia elettronico a trasmissione (TEM)

Il TEM utilizza gli stessi principi di funzionamento di un microscopio ottico solo che utilizza elettroni al posto della luce, permettendo così ingrandimenti molto più elevati.

Il limite invalicabile del potere risolutivo del microscopio ottico è legato sostanzialmente alla lunghezza d'onda della luce impiegata. Infatti il potere risolutivo cresce proporzionalmente al decrescere della lunghezza d'onda della radiazione impiegata e la scoperta che gli elettroni possiedono una radiazione di bassissima lunghezza d'onda ha suggerito la possibilità di usare fasci di elettroni per ottenere poteri

risolutivi assai elevati.

In linea di principio un microscopio elettronico opera come un normale microscopio ottico qualora si usasse luce con lunghezza d'onda bassissima. Poiché però i normali dispositivi ottici non deviano gli elettroni, si ricorre a lenti elettrostatiche o a lenti magnetiche che, agendo sulla carica elettrica degli elettroni, ne provocano la deviazione.

Il microscopio elettronico è essenzialmente composto da una sorgente elettronica di conveniente intensità (generalmente un filamento incandescente di tungsteno che emette elettroni per effetto termoelettronico) e da un dispositivo che imprime forti accelerazioni al fascio di elettroni emesso, sottoponendoli ad una elevata tensione in un range che va da 20 a 100 mila volt.

Il fascio di elettroni accelerato attraversa un condensatore (elettrostatico o magnetico), incide sul campione, viene raccolto su un obiettivo (elettrostatico o magnetico) e passando attraverso un oculare va ad incidere o su uno schermo fluorescente o su una lastra fotografica formando l'immagine per l'osservazione visiva. Naturalmente quanto descritto avviene nel vuoto ultra spinto assicurato da un sistema di pompe.

Come si è visto, il TEM risulta essere simile al SEM, in quanto entrambi impiegano un fascio di elettroni diretto sul campione. Questo significa che molte componenti come il cannone elettronico, le lenti condensatrici e il sistema di vuoto sono simili in entrambi gli strumenti. Tuttavia, i metodi con i quali queste immagini vengono prodotte ed ingrandite sono completamente differenti; mentre il SEM è

principalmente utilizzato per lo studio delle superfici, il TEM fornisce informazioni circa la struttura interna del campione analizzato.

Lo spessore del campione deve essere sufficientemente sottile in modo da consentire che alcuni degli elettroni incidenti siano in grado di attraversarlo; durante tale attraversamento molti elettroni sono assorbiti ed altri, in corrispondenza a disuniformità di arrangiamento atomico del cristallo, sono deviati irregolarmente. Dopo che il fascio ha attraversato il campione, viene focalizzato da una lente “obiettivo” e quindi allargato e proiettato su uno schermo fluorescente. Le zone dello schermo che appaiono scure sono dovute appunto ad un’irregolare deviazione degli elettroni da parte delle dislocazioni della struttura cristallina del campione.

Quando il fascio incide sul campione, una parte degli elettroni del medesimo viene diffratta, deviando dalla direzione del fascio trasmesso, mentre la restante passa attraverso il provino indisturbata; sia il fascio trasmesso che quello diffratto passano attraverso una lente obiettivo che ha il compito di focalizzarli e creare così un segnale in grado di dare informazioni sul campione.

Utilizzando il microscopio, l’operatore può decidere di utilizzare il fascio diretto o quello diffratto, mediante un diaframma, per formare l’immagine sullo schermo; la cui riproduzione è dovuta a fenomeni di contrasto. Il termine contrasto si riferisce alle differenze di intensità che rendono distinguibili dallo sfondo le parti di un’immagine.

Il contrasto di diffrazione è dovuto all’uso del diaframma che permette il passaggio dei soli elettroni deviati secondo un certo angolo; questo significa che qualunque cosa crei delle alterazioni negli angoli del reticolo (presenza di dislocazioni, precipitati, inclusioni, difetti di vario genere) altera la diffrazione degli elettroni e crea fenomeni di contrasto che permettono di individuare la causa che ha creato la diffrazione sullo schermo. Dato che in assenza del provino l’immagine appare chiara, e che le imperfezioni reticolari (o i precipitati) che deformano il reticolo creano contrasti scuri, il modo di visualizzazione che usa il fascio diffratto si dice "campo chiaro" (BF = Bright Field) (Fig. 17°). Analogamente si può posizionare il diaframma selezionando il passaggio del solo fascio diretto; così che ogni cosa che crei nel reticolo distorsioni altera le condizioni di diffrazione del fascio, dando origine a quei fenomeni di contrasto che permettono di vedere l’immagine sullo schermo.

In questo caso l'immagine appare scura e il contrasto provocato dal campione è chiaro; questa modalità di visualizzazione si dice "campo scuro" (DF = Dark Field) (Fig. 17b).

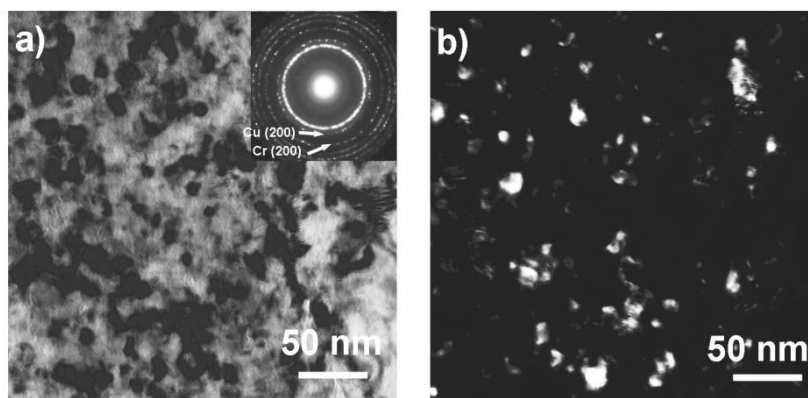


Fig. 17: immagini in bright field (a) e dark field (b) di nanocomposti CuCr.

4.3 Microscopia a Scansione di Sonda (SPM)

La microscopia a scansione di sonda (SPM, Scanning Probe Microscopy) è un ramo della microscopia che consente di generare le immagini di superfici usando una sonda fisica che esegue la scansione del campione (Di Girolamo *et al.*, 2010). L'immagine della superficie è ottenuta meccanicamente spostando la sonda in un raster di scansione del campione, riga per riga, e registrando l'interazione sonda-superficie in funzione della posizione. I principali tipi di microscopia a sonda sono la microscopia a scansione ad effetto tunnel (STM) e la microscopia a forza atomica (AFM).

La microscopia a scansione ad effetto tunnel (STM) consente di ottenere immagini di superfici di materiali conduttori in scala atomica. Il principio fisico con cui si ottengono le immagini è l'effetto tunnel secondo cui, quando una punta conduttrice è posta molto vicino ad una superficie, una differenza di tensione applicata tra la punta e la medesima superficie permette agli elettroni di realizzare un "tunnel" attraverso il vuoto tra le due parti interessate e creare una "corrente di tunneling".

Questa corrente è funzione della distanza della punta dalla superficie, della tensione applicata e della densità locale degli stati degli atomi che costituiscono la superficie

che si sta scansionando. Le informazioni sono acquisite monitorando la corrente di tunneling durante la scansione sulla superficie del campione. Si può lavorare sia mantenendo costante la distanza tra la punta e la superficie sia mantenendo fissa la corrente di tunneling. Nel primo caso, il sistema muove la punta in modo tale che la distanza tra la punta e la superficie rimanga costante. La variazione di corrente necessaria per mantenere fisso tale parametro viene “tradotta” in dati riguardanti la struttura superficiale del campione. Questa modalità è molto sensibile alla modulazione in scala atomica della superficie, ma risulta utile solo per superfici estremamente piatte e regolari. Nel secondo caso, la corrente di tunneling viene mantenuta costante attraverso un programma che fa variare la distanza tra la punta e la nube elettronica generata dagli atomi della superficie campione, in questo modo la sonda segue i contorni delle nubi elettroniche, permettendo il rilevamento topografico della superficie.

Questa modalità consente di lavorare con superfici rugose, ma i tempi di acquisizione sono molto lunghi.

Naturalmente l’STM richiede che si operi in vuoto, per evitare contaminazione del campione, e che il sistema sia ben isolato dai rumori ambientali: la punta deve essere portata a circa 0,002 nm dalla superficie per ottenere una risoluzione a livello di atomi della superficie di circa 0,2 nm.

Il microscopio a Forza Atomica (AFM) consiste principalmente in una piccola leva (cantilever) alla cui estremità è montata una punta con un raggio di curvatura dell’ordine dei nanometri con la quale si esegue la scansione della superficie del campione da analizzare, ottenendo un profilo tridimensionale della superficie in scala atomica (Meyer et al., 2003). La punta è posta in stretta prossimità della superficie. In questo modo si stabiliscono deboli forze di interazione tra punta e campione (del tipo Forze di Van der Waals), che determinano una flessione della leva ed una conseguente rilevazione della topografia della superficie. Le deflessioni della leva fino a 0,01 nm vengono misurate tramite un sistema ottico costituito da un laser e da un fotodiodo. Ci sono diversi modi di effettuare la scansione ma la più comune nel campo dei nanomateriali è la modalità contact, con la punta che “striscia” lievemente sulla superficie del campione durante la scansione. Le immagini ottenute sono stabili perché il contatto è continuo. Il limite della risoluzione è chiaramente il raggio di curvatura della punta montata sul cantilever. Il grosso vantaggio è che il microscopio lavora in aria (o perfino in ambiente liquido) ed i campioni non richiedono nessun

trattamento speciale che potrebbe alterarne la natura come nel caso del SEM. Il principale svantaggio rispetto al SEM consiste nelle dimensioni dell'immagine: il SEM è in grado di mostrare un'area dell'ordine del millimetro per millimetro ed una profondità di campo dell'ordine del millimetro; l'AFM può, invece, riprodurre solo una profondità dell'ordine del micrometro ed un'area massima di circa 100 per 100 μm .

4.4 *Tecniche analitiche*

Le tecniche analitiche sono fondamentali per la caratterizzazione dei nanomateriali, perché consentono di ottenere informazioni riguardo alla loro composizione chimica e alla natura dei legami chimici. Le più ampiamente utilizzate sono le spettroscopie elettroniche, anche perché spesso la strumentazione è incorporata all'interno dei microscopi elettronici. Stiamo parlando principalmente della Spettrometria per Dispersione di Energia (EDS o EDX) e della Spettroscopia EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy). Pari importanza ricoprono, comunque, anche le spettroscopie ottiche, come ad esempio la Spettroscopia Infrarossa, Raman e la Diffrazione a Raggi X (West et al., 1974; Skoog et al., 1988).

4.4.1 *Spettrometria a Dispersione di Energia o Microanalisi (EDS)*

Lo spettrometro a dispersione di energia è generalmente integrato nel microscopio elettronico, sia esso TEM o SEM, perché offre l'enorme vantaggio di poter determinare la composizione locale dei materiali osservati al microscopio, attraverso un'analisi qualitativa e quantitativa puntuale. La microanalisi a raggi X, infatti, fornisce informazioni specifiche circa la composizione degli elementi del campione, in termini di quantità e distribuzione (Shindo et al., 2002). Il fascio elettronico che investe il campione durante un'osservazione al SEM promuove la ionizzazione degli elettroni che appartengono agli orbitali più interni dell'atomo. Dal rilassamento che ne consegue vengono emessi dei raggi X che sono caratteristici dell'atomo da cui scaturiscono e, quindi, degli elementi che compongono il campione. Questi raggi X opportunamente registrati e discriminati sulla base della loro lunghezza d'onda o energia, consentono di determinare la composizione elementare del materiale analizzato, nella regione in cui è posizionata la sonda. Inoltre, l'intensità di queste

radiazioni caratteristiche è proporzionale alla concentrazione dell'elemento nel campione, da cui è possibile ottenere anche un'analisi semi-quantitativa. Lo spettro si presenta con una serie di picchi la cui posizione e altezza relativa è caratteristica di un dato elemento. Materiali composti produrranno spettri EDS che sono la convoluzione delle righe caratteristiche degli elementi che li costituiscono. L'EDS viene generalmente usato a supporto dell'osservazione dei campioni con elettroni retrodiffusi, per determinare la composizione chimica elementare nelle aree che già nell'immagine SEM mostrano un contrasto di colore.

Con speciali software è possibile realizzare le mappature per ogni singolo elemento che costituisce il campione. Al singolo pixel dell'immagine corrisponde un punto sulla superficie del campione dal quale è stato raccolto il segnale. La gradazione di colore è indice del numero di conteggi dei fotoni provenienti da tale punto caratteristici dell'elemento selezionato.

4.4.2 Spettroscopia di Perdita di Energia (EELS: Electron Energy Loss Spectroscopy)

La Spettroscopia a perdita di elettroni (EELS) si basa sulla misura dell'energia persa dagli elettroni a causa degli scattering anelastici che si generano dall'interazione tra gli elettroni primari ed il campione. Essa è considerata una tecnica complementare alla Spettroscopia di Diffrazione a Raggi X. In genere la relativa strumentazione è integrata nel TEM, proprio perché dall'interazione tra il fascio primario ed il campione vengono generati molti elettroni che, nel passare attraverso il campione, perdono energia e cambiano il loro momento angolare (Egerton et al., 2009). La distribuzione energetica degli elettroni in uscita presenta dei massimi in corrispondenza di quegli elettroni del fascio primario che hanno subito perdite singole di energia per eccitazione di modi vibrazionali, plasmoni o transizioni elettroniche. Questi elettroni vengono raccolti in uno spettro come quello riportato in figura 18. Lo spettro EELS presenta un picco corrispondente agli elettroni che non hanno subito scattering anelastico e che, quindi, presentano la stessa energia degli elettroni del fascio primario (*Zero Loss Peak*). Ad energia lievemente più bassa (entro i 50 eV) troviamo la zona dei plasmoni, generati dall'eccitazione collettiva degli elettroni di valenza a seguito della radiazione elettromagnetica. I plasmoni sono sensibili allo spessore del campione e sono molto intensi in quei materiali, come i

metalli, che presentano elettroni liberi. Lo shift del plasmone rispetto al *Zero Loss Peak* fornisce importanti informazioni riguardo al legame chimico. Sempre ritornando allo spettro, la zona a più bassa energia (> 50 eV) corrisponde alle interazioni anelastiche degli elettroni con gli orbitali interni. Questi picchi sono un *fingerprint* degli atomi che costituiscono il campione. L'area dei picchi fornisce, infine, anche informazioni quantitative circa la concentrazione dell'elemento individuato. L'EELS, in sintesi, consente una caratterizzazione qualitativa e quantitativa abbastanza accurata delle specie chimiche presenti, e del loro intorno chimico e stato di ossidazione.

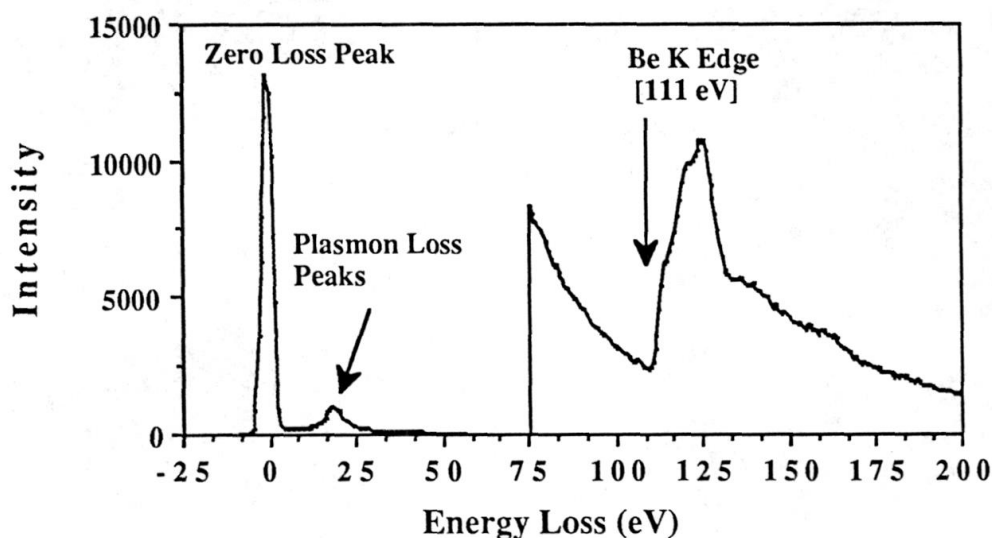


Fig. 18: esempio di spettroscopia EELS.

4.4.3 Spettroscopia vibrazionale

4.4.3.1 Infrarosso e Raman

La spettroscopia vibrazionale si occupa dello studio delle eccitazioni vibrazionali delle molecole. Con la spettroscopia infrarossa (o spettroscopia IR) il campione è sottoposto alla radiazione incidente nelle frequenze dell'infrarosso. Se il materiale analizzato non è trasparente alla radiazione passante, il fotone verrà assorbito dalla molecola la quale passerà ad uno stato vibrazionale eccitato. L'assorbimento della radiazione infrarossa, pertanto, produce nelle molecole dei moti vibrazionali definiti

come stretching (stiramento) e bending (piegamento), che sono caratteristici dell'atomo che costituisce il materiale e del legame in cui è coinvolto. La luce non assorbita è trasmessa attraverso il campione e indirizzata su un detector che determina le frequenze assorbite. In un tipico spettro infrarosso in ascissa troviamo una scala di frequenze espresse in numero d'onda e in ordinata la percentuale di trasmittanza. Dalle frequenze di assorbimento è possibile individuare la presenza di determinati gruppi funzionali e dall'intensità dei picchi dedurre la concentrazione. Nell'ambito specifico dei nanomateriali, la spettroscopia IR si è rivelata utile per provare la presenza di legami covalenti tra nanotubi di carbonio e molecole organiche opportunamente ancorate ai nanotubi (Baudot *et al.*, 2010).

La spettroscopia Raman è una tecnica spettroscopica basata sull'effetto Raman. Per le sue caratteristiche, è considerata complementare alla spettroscopia infrarossa, perché con essa è possibile indagare frequenze vibrazionali trasparenti all'infrarosso (Gardiner *et al.*, 1989). La spettroscopia Raman è una spettroscopia di scattering; infatti, si fa incidere sul campione una radiazione elettromagnetica monocromatica di intensità e frequenza nota e successivamente viene misurata la radiazione diffusa tramite rivelatore posto a 90° o 180° rispetto al cammino ottico lungo il campione. La radiazione può essere diffusa secondo tre diverse modalità: Stokes, anti-Stokes e Rayleigh (scattering elastico). La radiazione Stokes possiede energia minore rispetto alla radiazione originaria incidente, perché una parte di tale energia è utilizzata per promuovere una transizione ad un livello superiore.

La radiazione anti-Stokes riceve, invece, un contributo energetico dallo stato eccitato quando passa a un livello inferiore, per cui è caratterizzata da maggiore energia.

La radiazione Rayleigh è, infine, prodotta da fenomeni di scattering elastico e possiede la stessa energia della radiazione incidente. Il laser è una sorgente ideale per la Spettroscopia Raman, perché è caratterizzata da alta brillantezza, è monocromatica e disponibile in un ampio intervallo di frequenze.

Lo spettro Raman generalmente si raccoglie nella regione di frequenze del Visibile-UV, dove compaiono le eccitazioni delle linee Raman. Nel campo dei NM, studiando ad esempio le frequenze Raman, è possibile risalire alla dimensione e chiralità dei nanotubi di carbonio. In generale, la larghezza dei picchi Raman e lo shift a basse frequenze sono correlati con la riduzione della dimensione delle NP (Atkins *et al.*, 2004).

4.4.3.2 Diffrazione a raggi X

La spettroscopia di diffrazione a raggi X è generalmente impiegata per determinare la struttura cristallina dei materiali. Il fenomeno della diffrazione si verifica quando la radiazione elettromagnetica attraversa una serie di piani cristallini regolari la cui distanza tra loro è dello stesso ordine di grandezza della lunghezza d'onda della radiazione incidente.

Identificando i picchi nello spettro che ne risulta è possibile individuare le specie cristalline presenti e stabilire se nel materiale sono presenti una o più fasi cristallografiche. La tecnica XRD è molto importante nella caratterizzazione dei nanomateriali, perché dallo spettro è possibile dedurre anche la dimensione dei cristalliti ed eventuali fenomeni di stress e deformazioni presenti nel reticolo cristallino. La dimensione dei cristalliti può essere determinata attraverso l'equazione di Scherrer:

$$L = (C\lambda)/(\beta \cos\theta) [3]$$

dove C è una costante prossima ad 1, λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente, β l'allargamento del picco calcolato a metà altezza e θ è l'angolo di Bragg. Lo spostamento dei picchi rispetto ai valori tabulati per una determinata fase fornisce una misura dello stress cristallino e, quindi, della sua deformazione.

SCOPO DEL LAVORO

Il rapido sviluppo e impiego dei prodotti delle nanotecnologie ha portato ad un loro sempre più vasto utilizzo in svariati campi industriali, dall'agroalimentare all'energia e ambiente, dai mezzi di trasporto alla farmaceutica e al campo biomedicale, dalla meccanica ed elettromeccanica al tessile e abbigliamento, dalla chimica e petrolchimica all'elettronica e alle tecnologie dell'informazione, senza però fornire esaurienti informazioni sull'impatto dei nanomateriali (NM) sulla salute umana e sull'ambiente.

Come emerso dalla letteratura, a causa del gran numero di variabili che influenzano la potenziale tossicità delle NP (dimensioni, composizione chimica, forma, struttura superficiale, carica superficiale) non è possibile generalizzare sugli effetti associati all'esposizione ai NM. Ogni nuovo NM deve essere valutato singolarmente, tenendo in considerazione tutte le sue proprietà.

Di grande rilevanza sono anche gli approcci in ambito biomedico, che vanno dall'uso medico dei NM, alla formulazione di nuovi sistemi per la somministrazione dei farmaci, ai biosensori nanotecnologici, al possibile utilizzo della nanotecnologia molecolare. Molte sono le ricerche sperimentali per la produzione e la caratterizzazione di NP biocompatibili che possano diventare dei *carrier* efficienti da utilizzare nel *drug delivery*.

Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare l'interazione tra NP, metalliche (AgNP e AuNP) e non metalliche (CaCO_3 NP) utilizzabili nel campo del *drug delivery*, e diversi sistemi biologici, allo scopo sia di migliorare l'efficienza del loro utilizzo che di ridurre l'effetto tossico.

Sono state prese in esame NP metalliche in quanto le loro caratteristiche fisico-chimiche (attività catalitica, proprietà ottiche, elettroniche, antibatteriche e magnetiche) le rendono interessanti per via delle potenziali applicazioni, che vanno dalla microelettronica alla teranostica. Tra le non metalliche, quelle di CaCO_3 suscitano grande interesse per via delle caratteristiche ben definite come struttura, morfologia e purezza chimica. Inoltre, in letteratura sono ancora scarsi i dati sulle loro interazioni con i sistemi biologici e sugli effetti prodotti.

L'interazione delle NP con i sistemi biologici dipende, inoltre, dal tipo di NP, dalle sue caratteristiche chimico-fisiche, dal tipo di funzionalizzazione superficiale e dal modello cellulare utilizzato.

Alla luce di tutto ciò, le NP sono state sintetizzate mediante *green chemistry*, caratterizzate dal punto di vista fisico e morfologico, e sono stati valutati i loro effetti e la loro biodistribuzione mediante tecniche spettroscopiche, biochimiche e di microscopia ottica ed elettronica in sistemi *in vitro* ed *in vivo*.

Per gli studi *in vitro* sono state utilizzate linee cellulari umane normali (linfociti umani isolati da sangue periferico di donatori volontari sani) e tumorali (cellule tumorali umane di cervice uterina HeLa ed cellule tumorali umane di mammella MCF7). La scelta di questi sistemi biologici nasce dal fatto che numerosi studi riportano gli effetti dell'interazione tra NP e linee cellulari secondarie tumorali, per cui è stato possibile confrontare i risultati ottenuti con i dati presenti in letteratura. La scelta di una linea cellulare primaria, come i linfociti umani, nasce dal fatto che è noto che le NP possano entrare nell'uomo attraverso diverse vie, ed entrare nella circolazione sanguigna interagendo, quindi, anche con le cellule del sangue. Sono stati quindi valutati gli effetti sui modelli cellulari, analizzando la cinetica di internalizzazione, la morfologia cellulare, la vitalità, la proliferazione, la produzione di specie ossigeno reattive e il ciclo cellulare, in presenza delle NP.

Sono stati effettuati anche studi *in vivo*. La possibilità che l'utilizzo a livello industriale delle AgNP possa comportare un loro rilascio nell'ambiente, e quindi nelle acque, ha portato ad effettuare uno studio di tossicità a breve e lungo termine su un organismo modello, lo Zebrafish (*Danio rerio*), valutando la biodistribuzione delle NP nell'organismo, anche a livello subcellulare. Le AuNP, scelte come NM da utilizzare come radiosensibilizzate nella terapia protonica, sono state testate su un modello murino, allo scopo di indagare sulla biodistribuzione delle NPs a livello dei diversi organi e delle strutture subcellulari.

MATERIALI E METODI

1. Nanoparticelle (NP) metalliche

1.1 Nanoparticelle di argento (AgNP)

1.1.1 Sintesi delle AgNP

5 g di β -D glucosio (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) sono stati solubilizzati in 100 ml di acqua ultra pura. La soluzione e' stata riscaldata a 80 °C sotto agitazione per 20 minuti. Successivamente alla soluzione di glucosio (0.277 M) sono stati aggiunti 2 ml di AgNO_3 0,01 M. La miscela è stata fatta bollire per 30 minuti su piastra riscaldante in agitazione. Dopo 5 minuti circa la soluzione appare di colore giallo, indice della formazione delle AgNP.

Le NP così ottenute sono state indicate con la sigla AgNP-G.

Per la soluzione controllo 5 g di β -D glucosio sono stati solubilizzati in 100 ml di acqua ultra pura. La soluzione e' stata riscaldata a circa 80 °C sotto agitazione continuando ad agitare e riscaldare per un'ora.

1.1.2 Caratterizzazione delle AgNP-G

Spettroscopia UV-visibile.

Per la caratterizzazione delle soluzioni di NPs è stato utilizzato lo spettrofotometro T80 UV-visibile a doppio raggio (PG Instruments Ltd, Leicester, UK) (Fig.1). Gli spettri di assorbimento, registrati nel range 300 - 900 nm, sono stati ottenuti da soluzioni preparate fresche utilizzate entro 14 giorni dalla sintesi, misurando l'assorbimento dei preparati con una cuvetta di quarzo con un cammino ottico di 1 cm.



Fig. 1: Spettrofotometro UV-Visibile T80 (PG Instrument Ltd)

Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM).

Le immagini TEM e i patterns di diffrazione ottica sono stati acquisiti utilizzando un microscopio TEM Hitachi 7700 (Hitachi High Technologies America Inc., Dallas, TX, USA) (Fig.2), a 100 KV, che rappresenta il voltaggio di accelerazione migliore per ottenere la massima risoluzione e il minimo danneggiamento per radiazione del materiale. I campioni sono stati preparati ponendo piccole gocce delle soluzioni di NP su grid (600 mesh) di Cu supportate da carbone e lasciate asciugare all'aria.

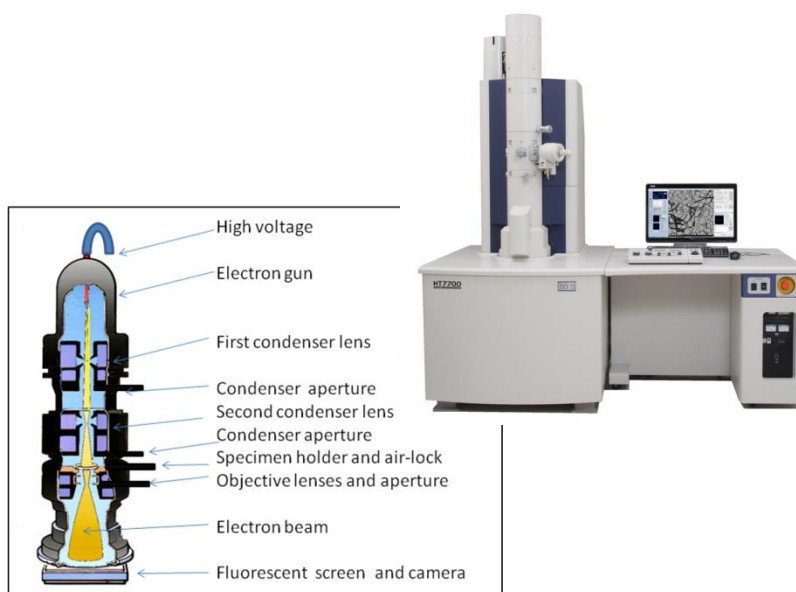


Fig. 2: Il microscopio elettronico "Hitachi 7700"

Per determinare la distribuzione dimensionale del NP 50 campi di 150x100 nm scelti a caso sono stati analizzati utilizzando il software Image Pro-Plus (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA).

1.1.3 Modello sperimentale in vitro

Cellule HeLa. Le cellule HeLa sono cellule tumorali immortalizzate altamente stabilizzate e rappresentano una grande risorsa per la ricerca scientifica. Questa linea cellulare è stata isolata da cellule di carcinoma di cervice uterina da Henrietta Lacks (dal cui nome deriva quello delle stesse cellule) che morì di questa malattia nel 1951. Le cellule HeLa sono oggi utilizzate nei laboratori di tutto il mondo per fini scientifici e, sebbene siano trattate come cellule tumorali, posseggono delle caratteristiche uniche che le differenziano da altre cellule di questo tipo: sono molto più resistenti di altre cellule tumorali e sono in grado di sopravvivere in condizioni che altre cellule non possono tollerare. Il loro tempo di duplicazione è di 24 ore. Le cellule crescono in adesione, hanno una forma poliedrica con un nucleo voluminoso al centro di un abbondante citoplasma.

La linea cellulare HeLa, utilizzata per gli esperimenti di questo lavoro, è stata acquistata dall'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova.

Le cellule HeLa sono state tenute in coltura in fiasche da 75 cm², usando come terreno di coltura l'EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (Biowest, S.A.S., Francia). Questo terreno di coltura contiene amminoacidi, vitamine, sali e glucosio in proporzioni definite: al momento dell'uso è addizionato con Pennicillina-Streptomicina (100 IU/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), L-Glutamina (2mM) (Biowest, S.A.S., Francia), Anfotericina B (10.000 IU/ml di terreno) (Biowest, S.A.S., Francia) e siero fetale bovino inattivato al calore (FCS) (Biowest, S.A.S., Francia), che costituisce il 10% del volume finale. L'inattivazione del siero è ottenuta con un trattamento a 57°C per 20 minuti. Tale trattamento preliminare permette la denaturazione delle proteine del complemento che, se attivate, provocherebbero la lisi cellulare. Tutte le manipolazioni a cui sono state sottoposte le cellule sono state effettuate all'interno di una cappa sterile a flusso laminare verticale, che garantisce la sterilità delle colture cellulari e un'adeguata protezione all'operatore. Il terreno di coltura delle cellule si cambia, di regola, ogni tre giorni mantenendo le cellule ad una concentrazione di 5×10^5 - 1×10^6 /mL di terreno di coltura. Le cellule aderiranno al fondo della fiasca dopo 24 ore di incubazione a 37°C e in atmosfera controllata al 5% CO₂ e al 99% di umidità.

Linfociti umani. I linfociti umani sono cellule mononucleate del sangue periferico, ottenute dopo la separazione mediante gradiente Ficoll di *buffy coats* provenienti da sangue di donatori maschi sani non-fumatori, di età compresa tra 25-45 anni. I

linfociti del sangue periferico sono stati separati dai monociti attraverso doppia aderenza al fondo della piastra di coltura. Le cellule sono state coltivate in fiasche da 25 cm² (Iwaki, Tokyo, Giappone) alla densità cellulare di 1x10⁶ cellule/mL in terreno Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Cambrex BioScience, Verviers, Belgio) addizionato con Pennicillina-Streptomicina (100 IU/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), L-Glutamina (2mM) (Biowest, S.A.S., Francia) e siero fetale bovino inattivato al calore (FCS) (Biowest, S.A.S., Francia), che costituisce il 10% del volume finale, in atmosfera controllata al 5% di CO₂ a 37 °C.

1.1.3.1 Protocollo sperimentale per le cellule HeLa

Per tutti gli esperimenti sono state piastrate 15x10⁴ cellule HeLa in 3 ml di terreno EMEM (addizionato con 100 IU/ml di Pennicillina-Streptomicina, 2mM di L-Glutamina e 10.000 IU di Anfotericina B per ml di terreno e al 10% di FCS). Dopo 24h di incubazione a 37°C in atmosfera controllata (aria + 5% CO₂) per permettere l'adesione delle cellule al substrato, le cellule HeLa sono state incubate per diversi tempi con le soluzioni di NP.

Le quantità di NP scelte, cioè, 2x10³ e 2x10⁴NP/cell, rappresentano, rispettivamente, la quantità meno tossica e più tossica per le cellule HeLa come riportato in lavori effettuati precedentemente in laboratorio (Dini et al, 2011).

I tempi di incubazione considerati sono stati: 15, 30 minuti, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 ore.

I controlli effettuati sono stati: a) cellule incubate in presenza della sola soluzione di β-D glucosio (4,6 mM e 46 mM che corrispondono alle concentrazioni di β-D - Glucosio equivalenti a quelle delle soluzioni di NP preparate in soluzione glucosata); b) cellule in coltura in terreno EMEM.

1.1.3.2 Protocollo sperimentale per i linfociti umani

I linfociti sono stati utilizzati in tutti gli esperimenti 24 h dopo l'isolamento, che è stato considerato come tempo 0 (T0). 15x10⁴ linfociti sono stati piastrati in ciascun pozzetto e trattati con 4.6 mM o 46 mM β-D-glucosio, 2x10³ e 2x10⁴ NP/cell ai seguenti tempi di incubazione: 30 minuti, 1, 3, 6, 12 e 24 ore.

1.1.3.3 Internalizzazione delle AgNP-G

SEM-EDX

Per identificare le AgNP-G all'interno delle cellule HeLa, le cellule sono state incubate per 30 minuti e 2 ore in presenza delle due quantità di AgNP-G ed incluse in Agar (al 5% in acqua). Le cellule sono state poi disidratate in concentrazioni crescenti di etanolo ed incluse in paraffina a 54°C (BIO-OPTICA Strumentazioni Scientifiche, Milano, Italia). Sono state preparate sezioni di 5 µm utilizzando un microtomo Reichert-Jung 2050 Supercut (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germania), posizionate su stub di acciaio e lasciate asciugare all'aria.

La microanalisi EDS è stata eseguita mediante EDX Bruker Quantax (Bruker Nano, New Jersey, USA) incorporato in un FESEM Zeiss Auriga 405 (Zeiss, Oberkochen, Germania).

Spettrometria di assorbimento atomico

Per valutare il legame e l'internalizzazione dell'argento nelle cellule HeLa e dei linfociti è stata utilizzata una tecnica di spettrometria di assorbimento atomico in fornetto di grafite (GF-AAS), utilizzando lo spettrometro Varian SpectrAA-600 (Varian Inc., Palo Alto, USA).

Lo strumento è dotato di una lampada a catodo cavo d'argento e un autocampionatore Varian GTA 100, alimentato da argon ad elevata purezza e acqua per il processo di raffreddamento. Un effetto Zeeman stato sfruttato per eliminare l'assorbimento di fondo. Il DL (*Detection Limit*), limite di rilevabilità o quantità minima rivelabile, è pari a 0,002 ppm. La soluzione acquosa di Glucosio è stata utilizzata come bianco. Come controlli negativi sono stati utilizzati il solo terreno di coltura, le sole AgNP-G, il terreno addizionato con la soluzione acquosa di Glucosio e successivamente anche con le cellule, per verificare l'assenza di argento.

Sulla base di tre set di misurazioni sono stati determinati i valori medi della concentrazione di argento nel solo terreno di coltura (Ag_T) e la concentrazione di Ag nel terreno di coltura con le cellule (Ag_{T+C}) a prefissati intervalli di incubazione. La quantità di argento assorbito dalle cellule (ΔAg) è stato determinato con la seguente formula:

$$\Delta Ag = Ag_T - Ag_{T+C}$$

L'errore sulla misura (σ) è stato assunto pari al semiscarto massimo.

Le quantità di AgNP-G internalizzate nelle cellule HeLa sono state indirettamente misurate come la diminuzione della concentrazione di argento (ppm) nel mezzo di coltura ad intervalli di tempo fissi dopo somministrazione AgNP-G alle cellule.

1.1.3.4 Valutazione degli effetti delle AgNP

Vitalità cellulare: test MTT

La vitalità delle cellule HeLa dopo i diversi trattamenti è stata valutata in modo indiretto tramite test spettrofotometrico dell'MTT.

L'MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) è un sale solubile in acqua, che in soluzione assume una colorazione giallognola.

Se aggiunto a colture di cellule vive, le deidrogenasi mitocondriali di queste sono in grado di tagliare l'anello tetrazolico causando la formazione di sali di formazano violacei, insolubili in soluzione acquosa.

Il colore più o meno intenso può essere quantificato spettrofotometricamente (a 570 nm) dopo aver sciolto i cristalli di formazano con dimetilsolfossido (DMSO). Il valore della Densità Ottica (D.O.) misurato è proporzionale al numero di cellule vitali.

Le cellule si lasciano ad incubare per 2h a 37°C, in atmosfera controllata al 5% di CO₂ con una soluzione di MTT (1 mg/ml in terreno di coltura). Passato il tempo di incubazione le cellule vengono lavate con PBS 0.2 M pH 7.2. I cristalli di formazano vengono sciolti con DMSO. La soluzione ottenuta si legge allo spettrofotometro a 570 nm, azzerando lo strumento con lo stesso DMSO.

Lo spettrofotometro utilizzato è Ultraspec 4000 UV/visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Le densità ottiche dei campioni sono state elaborate seguendo la seguente formula:

$$\text{Vitalità\%} = (\text{Abs}_{\text{trattato}} \times 100) / \text{Abs}_{\text{ctrl } t0}$$

assumendo come 100% l'assorbanza (Abs) del controllo (ctrl) al tempo 0 di trattamento (t0).

Le vitalità percentuali sono state quindi graficate dopo normalizzazione dei dati secondo la seguente formula:

$$\text{Vitalità cellulare} = (\text{Vitalità\%}_{\text{trattato}} - \text{Vitalità\%}_{\text{ctrl}}) / \text{Vitalità\%}_{\text{ctrl}}$$

Valutazione delle alterazioni morfologiche: colorazione ematossilina-eosina

La colorazione con ematossilina-eosina è una tecnica di routine applicabile ai tessuti ed alle cellule, che mette in evidenza la morfologia cellulare colorando in modo differenziale nucleo e citoplasma. In particolare l'ematossilina colora il nucleo di blu-viola, mentre l'eosina colora il citoplasma di rosa.

Le cellule, sia quelle in adesione che quelle staccatesi dal substrato in seguito al trattamento, sono state fissate per 5 minuti con formalina al 4% in PBS 0,2 M e pH 7,4.

Le cellule in adesione sono prima lavate con acqua distillata e poi coperte con una soluzione di ematossilina, precedentemente filtrata, che si lascia agire per 7-10 minuti. Trascorso tale tempo, il colorante viene rimosso, lavando prima con acqua corrente e poi con acqua distillata. Si procede, quindi, alla colorazione con eosina (preventivamente attivata mediante l'aggiunta di alcune gocce di acido acetico glaciale) per 3-4 minuti. Dopo aver rimosso il colorante e lavato con acqua distillata si procede alla disidratazione mediante concentrazioni crescenti di alcool: in sequenza si usano alcool 50°, 70°, 90° e infine alcool assoluto. A questo punto i vetrini vengono lasciati in xilene per almeno 15 minuti, per completare la disidratazione, ed infine montati con Eukitt.

Al contrario, le cellule che si sono staccate dal substrato e sono passate in sospensione, prima della colorazione, vengono risospese in PBS e depositate su vetrini gelatinati, sui quali saranno lasciate asciugare all'aria per almeno 24 ore.

I vetrini gelatinati permettono l'adesione delle cellule in sospensione al vetrino. Si prepara una soluzione di gelatina riscaldando a 80°C 0,5 L di acqua distillata, a cui si aggiungono 5 g di gelatina. Prima che tutta la gelatina sia sciolta si aggiungono 0,25 g di potassio cromo solfato. In questa soluzione, lasciata raffreddare a temperatura ambiente, vengono immersi più volte i vetrini precedentemente lavati con H₂O e detersivo e passati in alcool etilico al 96 %, asciugati poi con aria calda e riposti in stufa a 37°C *over night*.

Nel momento in cui si deve procedere alla colorazione, le cellule vengono prima idratate con una scala decrescente di alcoli: alcool assoluto, 90%, 70%, 50% e acqua. A questo punto si procede come descritto prima per le cellule in adesione.

Le cellule vengono poi osservate al microscopio ottico.

Per ogni campione sono stati contate almeno 500 cellule in almeno 10 campi casuali.

Le cellule che hanno mostrato una forma allungata e/o la superficie increspata o

modificazioni morfologiche indice di apoptosi (cioè nucleo picnotico, cromatina condensata, blebs) sono, nel complesso, classificati come cellule modificate.

Valutazione del rilascio di ROS: test NBT

Il nitroblu tetrazolium è un composto solubile in acqua ad una concentrazione di 10 mg/ml, in etanolo ad una concentrazione di 5 mg/ml e in 2-metoxietanolo ad una concentrazione di 20 mg/ml. Il composto, solubilizzato in acqua, è di colore giallo ed è stabile per 1-2 settimane al buio a 0°-4°C. Il nitroblu tetrazolium è utilizzato come indicatore redox di diverse attività enzimatiche come le deidrogenasi, la treonina deaminasi, la glucosio 6-fosfato deidrogenasi, la fosfofrutto chinasi o ossidasi. E' anche utilizzato come indicatore colorimetrico per infezioni batteriche del sangue o per evidenziare il differenziamento dei monociti in macrofagi. Le cellule in seguito a stress ossidativo producono sostanze riducenti come le esterasi acide, tra cui l' α -naftil acetato, liberando ioni idrogeno nel mezzo di coltura che provocano la riduzione del sale NBT. Si formerà un composto insolubile, cristalli di diformazano, che virerà da un colore giallo ad uno blu, la cui intensità varia in relazione alla concentrazione delle sostanze riducenti. Tale intensità può essere valutata allo spettrofotometro ed è indice del grado di ROS presenti nelle cellule.

Le cellule sono state trattate come riportato nel paragrafo 1.1.3.1 e 1.1.3.2.

Dopo ogni tempo di incubazione da ogni pozzetto viene prelevato il sovranatante e trasferito in tubi falcon; i pozzetti si lavano con PBS (0,2 M, pH 7,4) e il tutto viene trasferito negli stessi tubi; si centrifuga a 1000 rpm per 10 minuti e il pellet viene risospeso in 2,9 ml di terreno EMEM al 10 % di siero e 0,1 ml di soluzione NBT (soluzione madre di NBT 10 mg/ml da preparare al buio perché fotosensibile) e successivamente trasferito nei relativi pozzetti e lasciati nell'incubatore per 2h a 37 °C e al 5 % di CO₂.

Successivamente si preleva il terreno dai pozzetti, si lava con metanolo assoluto e si centrifuga, terreno e metanolo, a 1000 rpm per 10 minuti per allontanare il sovranatante.

Il pellet si risospende con una soluzione di KOH\DMSO (460 μ l + 540 μ l) per sciogliere i granuli di diformazano. Tale soluzione si versa poi nei relativi pozzetti. Si raccoglie tutto, si centrifuga a 1000 rpm per 10 minuti. Il sovranatante (soluzione blu), trasferito in cuvette di plastica di lato 1 cm, è letto ad uno spettrofotometro Ultraspec 4000 UV/visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Uppsala,

Sweden) dopo aver impostato la λ a 630 nm ed azzerato lo strumento (“bianco”) con una soluzione di KOH/DMSO nelle stesse quantità usate per il test.

La produzione di ROS in cellula è stata graficata dopo normalizzazione delle densità ottiche dei campioni seguendo la seguente formula:

$$\text{Produzione di ROS in cellula} = (\text{Abs}_{\text{trattato}} - \text{Abs}_{\text{ctrl}}) / \text{Abs}_{\text{ctrl}}$$

Valutazione dell'induzione di apoptosi e necrosi: marcatura con Annexina/Ioduro di propidio

La modalità di morte cellulare per necrosi o per apoptosi, è valutata tramite doppia marcatura con Annexina V e Ioduro di propidio, utilizzando il kit “Annexin V-FITC apoptosis Detection kit” (Sigma-Aldrich St. Louis, USA). L'utilizzo di due coloranti fluorescenti in successione permette di discriminare in una popolazione cellulare le cellule vive da quelle morte e, nell'ambito di quest'ultime, quelle morte per apoptosi da quelle morte per necrosi, in base al colore osservato al microscopio: le cellule apoptotiche sono di colore verde; le cellule necrotiche si colorano di rosso e di verde; le cellule vive non si colorano con nessuno dei due coloranti.

Le annexine sono un gruppo di proteine in grado di legare i fosfolipidi in presenza di calcio. L'Annexina V-FITC è una sonda fluorescente che lega la fosfatidilserina delle membrane cellulari in presenza di calcio. Le cellule apoptotiche espongono sul versante extracellulare della membrana plasmatica residui di fosfatidilserina. Nelle cellule vive, la fosfatidilserina è costantemente trasportata all'interno del bilayer fosfolipidico da un enzima Mg-ATP-dipendente. Il legame dell'Annexina alla fosfatidilserina, quindi, è possibile solo quando la cellula va incontro al processo apoptotico e la fosfatidilserina viene delocalizzata sul lato extracellulare della membrana plasmatica. Lo Ioduro di propidio lega in maniera diretta il DNA cellulare nelle cellule necrotiche dove l'integrità della membrana è compromessa.

Le cellule adese e/o passate in sospensione in seguito al trattamento vengono incubate per 10 minuti, a temperatura ambiente in camera umida e al buio, con una soluzione di Annexina V-FITC (50 $\mu\text{g/ml}$ in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, contenente 100 mM NaCl), e Ioduro di propidio (100 $\mu\text{g/ml}$ in 10 mM di buffer fosfato potassio, pH 7.4, contenente 150 mM NaCl). Passato il tempo di incubazione, le cellule sono lavate diverse volte con 1X Binding Buffer (100 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, contenente 1.4 mM NaCl e 25 mM CaCl_2). I vetrini sono montati con la soluzione di

1X Binding Buffer ed osservati a fresco con filtro FITC (eccitazione 494 nm, emissione 518 nm) e TRITC (eccitazione 488 nm, emissione 630 nm).

Autofagia: marcatura con monodansilcadaverina (MDC)

La monodansilcadaverina (MDC) è una molecola autofluorescente (assorbe luce a 380 nm e la emette a 525nm) utilizzata come marker selettivo di autofagia. Quando è somministrata alle cellule vive, essa si accumula specificatamente all'interno dei vacuoli autofagici e permette la visualizzazione, al microscopio ottico a fluorescenza, delle cellule che innescano un *pathway* autofagico (Biederbick et al., 1995).

La soluzione madre di MDC 5 mM si prepara sciogliendo 0.0084 g di MDC in 5 ml di PBS sterile. Questa è poi diluita alla concentrazione di 0.05 mM in PBS sterile. Allo scadere dei diversi tempi di *recovery* post-irraggiamento, le cellule vengono incubate con MDC 0.05 mM in PBS a 37°C per 10 minuti. Quindi le cellule vengono lavate per 3 volte con PBS e immediatamente visualizzate al microscopio ottico a fluorescenza utilizzando un filtro U.V. (eccitazione 365 nm, emissione 480 nm).

I campioni sono stati osservati con il microscopio Eclipse 80i della Nikon, le immagini acquisite con una videocamera DXM 1200F (Nikon Digital Camera) e le immagini sono state elaborate con il programma ATC della Nikon.

Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria a flusso

Per l'analisi del ciclo cellulare, le cellule HeLa sono state trattate come descritto nel paragrafo 1.1.3.1. Allo scadere di ogni tempo di incubazione, cellule sono state lavate con PBS (0,2 M, pH 7,4), staccate con tripsina e fissate in soluzione fredda metanolo/acetone (4:1) alla concentrazione di 2×10^6 cell/mL. Successivamente, le cellule sono state colorate contenente ioduro di propidio (PI) (60 ug/mL in PBS) e RNasi (100 mg/ml in PBS) e analizzate utilizzando un citofluorimetro FACScan BD (Becton Dickinson Biosciences, New Jersey, USA). La percentuale di cellule in fase sub-G1 del ciclo cellulare, riportata come percentuale di morte, è stata calcolata rispetto al totale di cellule (100%) nel test, e quella per le cellule in G0/G1, S e G2/M è stata calcolata dal totale di cellule, escluse le cellule in sub-G1.

Valutazione dell'indice mitotico : immunomarcatura anti-phospho Histone H3

L'anticorpo anti-phospho H3 riconosce l'istone H3 dopo che diventa fosforilato sulla serina in posizione 10 quando i cromosomi condensano durante la profase (Chadee et al., 1999; Strahl and Allis, 2000; Cunningham, 2002). L'istone H3 rimane fosforilato fino alla telofase, quando viene defosforilato da specifiche fosfatasi. L'anticorpo

Phospho H3 è utilizzato per identificare i cromosomi durante la mitosi nelle cellule in coltura.

Nel nostro modello sperimentale è stato usato un Anticorpo primario (1°) anti-phospho H3 anti-rabbit (Millipore, Billerica, MA, USA) e un Anticorpo secondario (2°) FITC-coniugato (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Le cellule HeLa trattate come riportato nel paragrafo 1.1.3.1, fissate con formalina al 4% in PBS e adese sul vetrino, sono state innanzitutto lavate (3 lavaggi da 5 minuti ciascuno) con una soluzione di PBS/BSA al 3% e permeabilizzate con una soluzione di Triton (0.05% in PBS) per 5 minuti. Dopo averle lavate (3x5 minuti) con PBS/BSA, le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario anti-phospho H3 per 60 minuti, in camera umida, diluito 1:300 nello stesso tampone.

Dopo lavaggi in PBS/BSA (3x5 minuti) le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario FITC-coniugato (1:50 in PBS/BSA per 60 minuti in camera umida e al buio).

Passato il tempo di incubazione, le cellule sono state lavate (3x5 minuti) con lo stesso tampone e lasciate asciugare all'aria. I vetrini sono stati montati con una soluzione di Glicerolo-PBS 1:1, sigillati con Eukitt ed osservati al microscopio a fluorescenza con filtro FITC (eccitazione 494 nm, emissione 518 nm).

Per escludere la presenza nelle cellule di autofluorescenza, la marcatura è stata effettuata allestendo i seguenti controlli:

- cellule in cui tutti i passaggi sono stati effettuati con la soluzione PBS/BSA 3%;
- cellule incubate con il solo Anticorpo 1°;
- cellule incubate con il solo Anticorpo 2°.

Per la valutazione dell'indice mitotico sono state contate al microscopio a fluorescenza un totale di almeno 500 cellule per campione, discriminando tra queste quelle marcate da quelle non marcate. È stato calcolato quindi l'indice mitotico percentuale ponendo uguale a 100% il totale delle cellule contate.

1.1.4 Modello sperimentale in vivo: Zebrafish (Danio rerio)

Zebrafish è un piccolo pesce tropicale, dal basso costo d'allevamento, dalle piccole dimensioni, dalla rapida generazione di un gran numero di embrioni trasparenti e dallo sviluppo embrionale veloce (López-Serrano *etal.*, 2014). Una sola deposizione produce 100-200 uova. Gli adulti sono lunghi 3 cm mentre le larve sono lunghe solo 1-4 mm e possono vivere per sette giorni in un unico pozzetto di una micropiastra da

96 o 386 pozzetti, sostenuti da nutrienti accumulati nel sacco vitellino (McGrath *et al.*, 2008). *Zebrafish* permette di indagare la teratogenicità di prodotti chimici che possono avere un grande impatto ambientale-ecologico (Zhu *et al.*, 2008).

1.1.4.1 Protocollo di trattamento

Zebrafish adulti (3-4 mesi) sono stati tenuti in vasche da 100 litri ad una temperatura di 27 ± 1 °C con cicli di 14h di luce e 10h di buio, secondo protocolli standard.

Sono stati effettuati diversi trattamenti, esponendo i pesci alle AgNP e ad una concentrazione di 0.01 mg/L per due tempi diversi.

Sono stati, quindi, suddivisi in 3 vasche:

- Controllo
- Esposizione per 3 giorni a AgNP
- Esposizione per 3 settimane a AgNP

A seguito del tempo di trattamento, i pesci sono stati dissezionati per il prelievo di branchie, fegato ed intestino.

1.1.4.2 Preparazioni istologiche

La massa viscerale e le branchie di 10 individui esposti e non esposti a AgNP sono stati prelevati dopo 3 e 21 giorni. I tessuti sono stati posti in appositi supporti e immersi in formalina al 10% per 24 ore a 4°C. In seguito, i campioni sono stati trasferiti in etanolo 70% e conservati a 4°C in condizioni di vuoto in un ASP300 Tissue Processor (Leica Microsystem, Nussloch, Germania). I campioni sono stati poi immersi in paraffina utilizzando dei supporti in metallo.

Sono state tagliate sezioni di 5µm di spessore, utilizzando il microtomo RM2125RT (Leica Microsystem, Nussloch, Germania), da sottoporre ad autometallografia e microscopia FEG-ESEM.

1.1.4.3 Biodistribuzione delle AgNP.

Autometallografia

L'autometallografia è stata effettuata su sezioni di paraffina di massa viscerale e di branchie secondo il metodo di Soto *et al.* (1998). La paraffina è stata eliminata mediante 2 passaggi in xilene per 10 minuti e i campioni sono stati poi idratati in alcool come segue: 2 passaggi per 2 minuti in etanolo 100%, 2 minuti in etanolo 96%, 2 minuti in etanolo 70% e 5 minuti in acqua deionizzata. Dopo l'idratazione, le

sezioni sono state mantenute a 37 ° C per 24 ore fino a quando non erano completamente asciutte. Le fasi successive del protocollo sono state effettuate in camera buia con luce rossa di sicurezza. L'emulsione fotografica (Ilford emulsione nucleare L4, Norderstedt, Germania) è stato riscaldato a 40 °C. Con l'aiuto di un pennello, le sezioni di tessuto sono state coperte con l'emulsione fotografica e, con l'aiuto di un cilindro in plastica, è stato creato uno strato di emulsione sottile e omogeneo sulle sezioni di tessuto. L'emulsione è stata lasciata al buio per 30 minuti fino a quando non si è completamente asciugata sulle sezioni. Le sezioni sono state poi messe nella soluzione di sviluppo (acqua deionizzata e soluzione di sviluppo B&W (TETENAL, Germania) in un rapporto di 1:4,5) per 15 minuti e poi risciacquate nel bagno di stop (soluzione all'1% di acido acetico) per 1 min. Sono stati poi messi in una soluzione fissativa di B&W Film/Carta Fixer (AGFA, Germania) al 10% in acqua deionizzata per 10 minuti. Infine, i vetrini sono stati lavati in acqua deionizzata e montati in gelatina Kaiser's glycerine (Merck, Madrid, Spagna). I vetrini asciutti, sono stati osservati al microscopio ottico Olympus BX51 per valutare la presenza di depositi di argento nero, indicanti la presenza di metalli nel tessuto.

FESEM

Le sezioni in paraffina di branchie e massa viscerale di organismi controllo ed individui esposti a AgNP-G sono stati direttamente posizionate su supporti in alluminio per SEM (stubs). Le sezioni sono state deparaffinate in Bio-Clear (Bio-Optica, Milano, Italia) e lasciati ad asciugare all'aria. I campioni sono stati osservati mediante Field Emission Microscope Zeiss Auriga 405 (Zeiss, Oberkochen, Germania) accoppiato ad uno spettroscopio Bruker Quantax energy dispersive x-ray (EDS). I campioni sono stati osservati in condizioni di alto vuoto (10^{-5} - 10^{-6} mbar) a voltaggio variabile.

Microscopia Elettronica a Trasmissione

I campioni di branchie e massa viscerale di organismi controllo ed individui esposti a AgNP-G per 3 e 21 giorni sono stati sottoposti a fissazione con Glutaraldeide 2,5%, seguita da lavaggi in tampone cacodilato e da una post-fissazione in OsO_4 1% nello stesso tampone per 2 ore in ghiaccio.

Dopo due lavaggi in tampone cacodilato, i campioni sono stati disidratati con concentrazioni crescenti di etanolo: 30% (2x10 minuti a 4°C), 50% (2x10 minuti a

4°C), 70% (*overnight* a 4°C), 90% (2x10 minuti a 4°C), 95% (2x10 minuti a 4°C), 100% (3x20 minuti a 4°C).

Una volta completata la disidratazione, per iniziare la procedura di infiltrazione, i campioni sono stati lasciati tutta la notte a 4°C in una soluzione di resina *Spurr* (TAAB, Berks, UK) ed etanolo assoluto 1:1 .

Dopo un cambio della soluzione 1:1 di resina-alcool per 30 minuti, sono stati posti per altri 30 minuti in una soluzione di resina-alcool assoluto 2/3:1/3 e quindi in resina assoluta per 2 ore a temperatura ambiente; infine, i campioni sono stati inclusi in resina assoluta fresca.

La polimerizzazione è stata effettuata in stufa a 60°C per 2 giorni. Sono state tagliate sezioni semifini (200 nm di spessore) e sezioni fini (50 nm) utilizzando l'ultramicrotomo PowerTome PT-PC (RMC, Arizona, USA) (Fig.3).



Fig. 3: PowerTome PT-PC, RMC Products, Arizona.

Le sezioni semifini sono state colorate con Blu di Toluidina a 60°C in stufa ed osservate al microscopio ottico; mentre quelle fini, raccolte su apposite reticelle di rame di 200 *mesh*, sono state colorate con sostanze elettrodomestiche per la microscopia elettronica: Acetato di Uranile (1% in acqua per 3 minuti) e Citrato di Piombo (0,3% in acqua per 4 minuti) e osservate con un microscopio elettronico HITACHI HT7700 (Tokyo, Giappone) a 60 KeV.

I campioni in cui sono state osservate strutture simili a NP, sono stati analizzati mediante microanalisi nella modalità STEM del microscopio Auriga 405 allo scopo di corroborare che le componenti osservate fossero effettivamente le AgNP.

1.2 Nanoparticelle di oro (AuNP)

1.2.1 Sintesi delle AuNP

I vari metodi di sintesi di AuNP per l'utilizzo biomedico sono concettualmente simili tra loro e prevedono fondamentalmente due fasi. Nella prima fase si fanno interagire tra loro gli ioni metallici, in modo tale che formino delle strutture più complesse, come agglomerati di atomi. Nella fase successiva invece, tali strutture vengono gradualmente consumate da meccanismi fisico-chimici, fino al raggiungimento delle dimensioni delle nanoparticelle desiderate.

Nello specifico, il metodo di sintesi utilizzato in questo lavoro di dottorato è denominato metodo di Turkevich ed è basato sulla riduzione dell'acido tetracloroaurico (HAuCl_4), prodotto per ossidazione dell'oro tramite l'acido cloridrico abbinato ad acido nitrico o acqua ossigenata, con il citrato di sodio, in acqua a 90 – 100°C.

Il citrato di sodio ha fondamentalmente due funzioni nel processo di sintesi:

- si comporta come agente riducente, causando la corrosione delle strutture complesse formate dagli ioni metallici e regolando così la dimensione delle AuNP
- si comporta come agente stabilizzante, adsorbendosi sulla superficie delle AuNP, impedendo così l'aggregazione tra loro delle particelle in sospensione.

Col crescere della concentrazione degli atomi di oro neutro la soluzione diventa sovrasatura, e l'oro inizia gradualmente a precipitare formando particelle di dimensione sub-nanometrica. Gli atomi di oro che continuano a formarsi si attaccano alle particelle già esistenti; se la soluzione è agitata in modo sufficientemente vigoroso le particelle risulteranno di dimensioni abbastanza uniformi.

Introdotta da J. Turkevich et al. nel 1951, e perfezionata da G. Frens negli anni 1970, questa procedura è la più semplice disponibile. In genere si ottengono sospensioni in acqua di AuNP sferiche di circa 10–20 nm di diametro, moderatamente

monodisperse. Si possono ottenere particelle più grandi, ma forma e monodispersione peggiorano. Tramite il metodo Turkevich si ottengono soluzioni colloidali la cui concentrazione media è di circa 0.2 mM.

Per il test *in vivo* si è scelto di utilizzare concentrazioni di AuNP comprese tra i 2 e i 5 mg/ml. Per avvicinarci a tale valore è stato utilizzato un metodo di preparazione in cui il controllo del pH e della temperatura di sintesi permette di ottenere concentrazioni finali intorno a 1 mM (Chunfang et al, 2011).

Si pesano 49,22 mg di acido tetracloroaurico triidrato ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) in un becker da 20 ml, si portano in soluzione con 5 ml di acqua Millipore e si trasferiscono in un pallone da 50 ml. Successivamente si pesano 40 mg di idrossido di sodio (NaOH) in un becker da 100 ml e si portano in soluzione con 50 ml di acqua Millipore, si aggiungono 15,4 ml di questa soluzione e 19,6 ml di acqua Millipore al pallone contenente la soluzione di HAuCl_4 .

Si aggiungono 10 ml di acqua Millipore a 0,5 g di citrato di sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) pesati precedentemente in un becker da 50 ml, il quale viene posto in ultrasuoni per circa 2 minuti.

Il pallone contenente la soluzione di NaOH e HAuCl_4 viene posizionato su un bagno d'olio scaldato a 110°C e la soluzione posta sotto agitazione magnetica per 30 minuti. Trascorso il tempo necessario, si aggiungono 1,2 ml di soluzione di citrato di sodio e si mantiene la soluzione alla stessa temperatura e sotto agitazione magnetica per 15 minuti. La soluzione assume una colorazione grigio pallido, quindi passa a violetto, al viola e, infine, al rosso rubino (Fig.4).

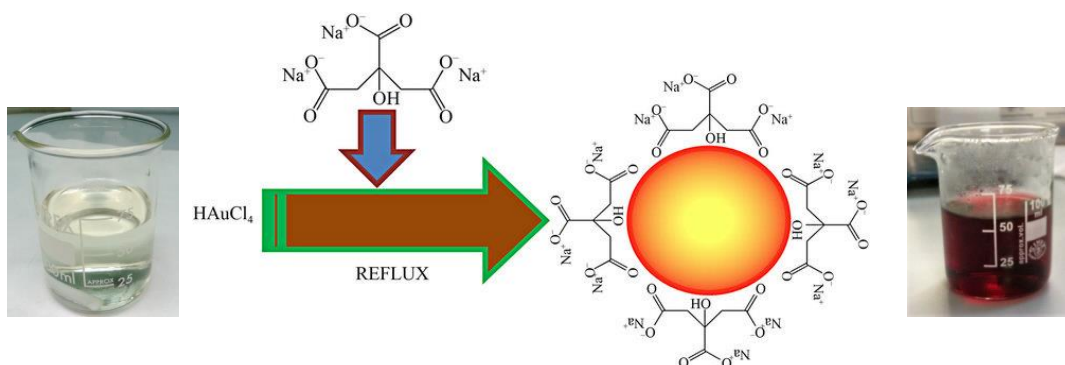


Figura 4: Schema di reazione della sintesi di AuNP con citrato

Le AuNP prodotte vengono divise in aliquote da 10 ml e centrifugate per 30 minuti a 7000 g ad una temperatura di 4°C , successivamente si preleva il surnatante e si raccoglie il pellet.

1.2.2 Caratterizzazione delle AuNP

La caratterizzazione delle AuNP, quali dimensioni e forma, è stata determinata attraverso *Spettroscopia UV-visibile e TEM (vedi paragrafo 1.1.2)*

Per ricavare la concentrazione delle soluzioni di AuNP sintetizzate si procede alla preparazione di una retta di taratura tramite i valori dei picchi massimi di assorbimento di 6 campioni di AuNP commerciali a concentrazione decrescente nota (fig. 5 e 6).

La concentrazione molare delle AuNP in soluzione viene ricavata tramite l'inserimento nell'equazione della retta dei valori di assorbanza misurati dalle soluzioni di nanoparticelle prodotte, con λ massima compresa tra 520 e 522 nm e con valore massimo di assorbanza di 0.969 (altrimenti si deve rientrare nell'intervallo attraverso delle diluizioni) (tabella 1).

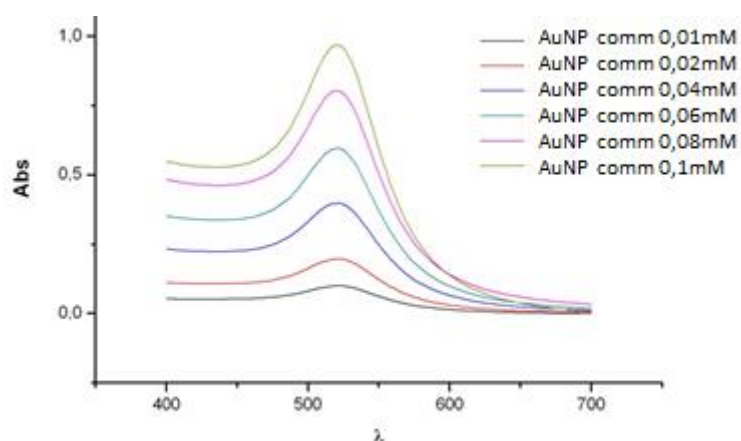


Fig. 5: Spettro UV-Vis di AuNP commerciali a concentrazione nota decrescente

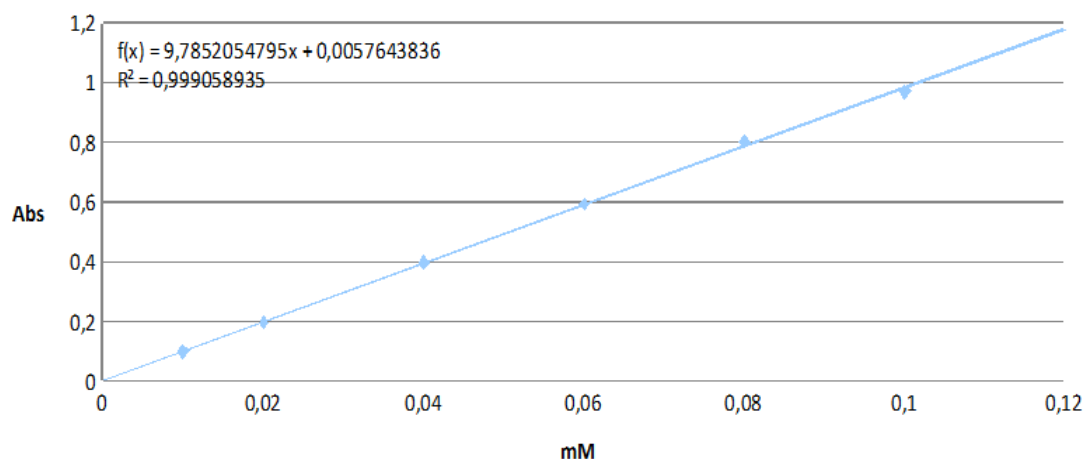


Figura 6: Retta di taratura ed equazione della retta di taratura

Campione	Abs	Concentrazione	Concentrazione effettiva
		mM	mM
GNP I diluito 1:2	0,941	0,096	0,191
GNP II diluito 1:3	0,754	0,076	0,229
GNP III diluito 1:2	0,979	0,099	0,199
GNP IV diluito 1:3	0,703	0,071	0,214
GNP V diluito 1:3	0,686	0,070	0,209
GNP Mi diluito 1:3	0,693	0,070	0,211
GNP VI diluito 1:10	0,4	0,040	0,403
GNP VIII diluito 1:10	0,591	0,060	0,598
GNP IX diluito 1:10	0,596	0,060	0,603
GNP X diluito 1:10	0,706	0,072	0,716
GNP XI diluito 1:10	0,654	0,066	0,662
GNP XII diluito 1:10	0,602	0,061	0,609
GNP XIII diluito 1:10	0,457	0,046	0,461
GNP XIV diluito 1:3	0,79	0,080	0,240
GNP XV diluito 1:3	0,798	0,081	0,243
GNP XVI diluito 1:3	0,696	0,071	0,212

Tabella 1: Esempi di letture d'assorbanza utilizzate per ricavare la concentrazione di AuNP o GNP (*Gold Nanoparticles*) prodotte.

1.2.3 Protocollo sperimentale in vivo

La distribuzione delle AuNP è stata valutata dopo iniezione delle AuNP in topo CD1 di un anno di età.

1,5mL della soluzione di AuNP è stata iniettata nella vena caudale. 3ore dopo l'iniezione, il topo è stato sacrificato e sono stati prelevati i seguenti organi: cervello, rene, fegato, milza, pancreas, intestino, cistifellea, stomaco e cuore.

1.2.4 Biodistribuzione e localizzazione subcellulare di AuNP: analisi al microscopio elettronico a trasmissione

La metodica di preparazione dei campioni è la stessa riportata nel paragrafo 1.1.4.3

2. Nanoparticelle non metalliche

2.1 Nanoparticelle di carbonato di calcio (CaCO₃NP)

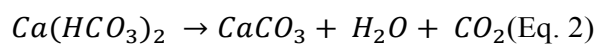
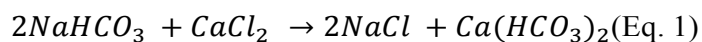
2.1.1 Sintesi di CaCO₃NP

In letteratura sono riportate diverse tecniche per la sintesi di CaCO₃NP, tra cui il metodo sol gel (Wang *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000), metodi basati sull'utilizzo di ultrasuoni (He *et al.*, 2007), e altri che utilizzano surfattanti (Guo *et al.*, 2007). Tali metodi, però, presentano numerosi limiti dovuti all'impiego di elevate temperature (1000-1100 °C), alla necessità di effettuare processi di purificazione e, in alcuni casi, ai tempi eccessivamente lunghi necessari per la sintesi. Ad esempio, Chen *et al.* (2013) hanno sintetizzato CaCO₃NP amorfe in 2-3 giorni ed hanno assistito ad una cristallizzazione, visibile con la formazione di strutture polimorfe, cineticamente controllata mediante l'uso di un solvente etanolo-acqua a diversi valori di pH.

Le CaCO₃NP utilizzate in questo lavoro sono state sintetizzate mediante la tecnica *spray drying*, che permette di sintetizzare NP in larga scala, controllandone forma e dimensione, senza l'utilizzo di surfattanti o altre sostanze chimiche nella miscela di reazione. Il processo prevede un controllo della temperatura, dell'umidità dell'aria e del flusso dei reagenti.

E' stata preparata una soluzione acquosa di NaHCO₃ (0,125 mol/L) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e CaCl₂ (0,062 mol/L)(Merck, Francoforte, Germania) utilizzando due pompe peristaltiche per controllare accuratamente la portata di ciascun reagente (temperatura di ingresso 140 ° C, aspiratore 100 %). In base all'Eq. 1 si forma così

bicarbonato di calcio ($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$) solubile. La temperatura dei gas di essiccamento trasforma il bicarbonato di calcio in carbonato di calcio (CaCO_3) (Eq. 2) e allo stesso tempo l'acqua evaporata rapidamente blocca la crescita di cristalli a dimensioni nanometriche.



Le due soluzioni vengono miscelate con due pompe che consentono un controllo fine della portata di ogni reagente. Poi sono atomizzati in un flusso d'aria calda a 140°C . L'elevata temperatura provoca una rapida evaporazione dell'acqua miscela di reazione, e permette la produzione diretta della polvere di carbonato di calcio e cloruro di sodio, che viene accumulato in un serbatoio di raccolta; il sottoprodotto (NaCl) può essere facilmente rimosso mediante lavaggi successivi in acqua e successiva centrifugazione.

Dopo qualche giorno dalla sintesi, la caratterizzazione delle CaCO_3NP ha messo in evidenza la formazione di microcristalli. Allo scopo di bloccare il processo di cristallizzazione, il nostro metodo di sintesi prevede l'utilizzo dell'isopropanolo (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), che riduce la solubilità delle NP, risospendendo le CaCO_3NP appena sintetizzate nel solvente per 7 giorni.

2.1.2 Caratterizzazione di CaCO_3NP

Microscopia elettronica a trasmissione Vd. paragrafo 1.1.3

Diffrazione ai raggi X (XRD).

La diffrazione a raggi X è una tecnica analitica versatile e non distruttiva usata per l'identificazione e la determinazione qualitativa e quantitativa delle fasi cristalline, conosciute come fasi, presenti nelle polveri e nei campioni solidi. Il risultato finale di un'analisi XRD, quindi, è costituito da uno spettro di diffrazione o diffrattogramma, costituito da una serie di picchi o riflessi aventi diverse intensità e posizioni angolari relative alle varie fasi presenti nel campione indagato. Graficando le intensità dei picchi di diffrazione in funzione della posizione angolare 2θ si ottiene un pattern che è caratteristico del campione esaminato; lo spettro di diffrazione è una caratteristica fisica fondamentale della sostanza, utile non solo per una sua rapida identificazione ma anche per una completa interpretazione della sua struttura.

La diffrazione ai raggi X per l'analisi delle NP è stato eseguita mediante un diffrattometro con geometria Bragg-Brentano (Rigaku, Tokyo, Giappone). I pattern XRD sono stati registrati nell'intervallo $2\theta = 20^\circ - 90^\circ$ mediante scansione passo, utilizzando incrementi 2θ di $0,03^\circ$ e un tempo di conteggio fisso di 2 secondi per step.

Spettroscopia infrarossa (IR)

Le CaCO_3NP sintetizzate sono state sottoposte anche ad analisi mediante spettroscopia infrarossa. Questa tecnica spettroscopica dà informazioni sui gruppi funzionali presenti nella molecola attraverso la formazione di segnali. In realtà nello spettro IR sono presenti due “tipi” di segnali, i picchi legati alla presenza di particolari gruppi funzionali e quelli considerati di *finger-print*. Questi ultimi sono segnali propri, tipici e caratteristici della molecola in questione. Questi segnali di *finger-print* fanno sì che non sia possibile che molecole diverse abbiano lo stesso spettro IR. I picchi caratteristici di gruppi funzionali cadono invece (sempre) alle stesse frequenze, a prescindere dalla struttura della molecola in cui il gruppo stesso è presente.

L'analisi mediante spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier sulle CaCO_3NP è stato effettuata mediante uno spettrofotometro FT/IR-6300 A (JASCO Inc, Easton, USA). Le NP, poste in appositi supporti, sono state sistemate in una cella di quarzo ad IR. I dati sono stati registrati con un sistema Quantachrome ASiQwin (Quantachrome, Boynton Beach, FL, USA).

Misura del potenziale ζ

Per verificare la stabilità delle NP è stato valutato il potenziale ζ delle NPs mediante *Electron Energy Loss Spectroscopy* (EELS). Le CaCO_3NP sono state sospese in acqua ultra-pura, soluzione salina tampone fosfato (pH 7.4) o in terreno di coltura.

Il potenziale ζ è stato misurato in funzione del pH e la carica di superficie delle NP è stata monitorata a diversi pH (2-10) aggiungendo 0,1 M HCl o NaOH alla sospensione. La mobilità elettroforetica delle nanoparticelle è stata misurata utilizzando un Malvern Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). L'analisi del potenziale delle NP è stata effettuata mediante Laser Doppler Velocimetry (LDV).

2.1.3 Funzionalizzazione CaCO_3NP : metodo label by label (LBL)

Le NP sono state rese fluorescenti mediante la tecnica Label By Label (LBL), che consiste nell'incubare la polvere di CaCO_3NP con soluzioni acquose (2,0 mg / ml) di

poly(sodium-4-styrene sulfonate) (PSS) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e poly allylamine hydrochloride (PAH) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Il pH delle soluzioni polimeriche è stato regolato a 6,5 mediante l'aggiunta di HCl/NaOH (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

1 mg di polvere di CaCO_3 è stato disperso in una soluzione contenente il polianione (PSS); la dispersione è stata continuamente agitata per 10 minuti e l'eccesso polianione è stato rimosso da tre fasi di centrifugazione/lavaggio con acqua deionizzata. Successivamente, è stato aggiunto 1 mL di una soluzione contenente il polielettrolita (PAH) in agitazione per 10 minuti, seguita da tre cicli di centrifugazione/lavaggio. Questa procedura è stata ripetuta diverse volte per ogni polielettrolita provocando il deposito di quattro/sei strati di polielettroliti sulla superficie delle CaCO_3NP . Allo scopo di rendere le NP fluorescenti è stato utilizzato poly(fluorescein isothiocyanate allylamine hydrochloride) (PAH-FITC), (Sigma Aldrich, USA) nell'ultimo strato.

2.1.4 Modello sperimentale in vitro

Cellule HeLa. Vd paragrafo 1.1.3

Cellule MCF7. È una linea cellulare di cancro al seno isolato nel 1970 da una donna caucasica di 69 anni. MCF-7 è l'acronimo del Michigan Cancer Foundation-7, riferito all'Istituto di Detroit in cui è stata stabilizzata la linea cellulare nel 1973 da Herbert Soule e collaboratori. Le cellule sono state acquistate dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Dell'Emilia Romagna (Brescia). Il mantenimento della coltura cellulare è lo stesso sopra riportato per le cellule HeLa.

2.1.4.1. Protocollo sperimentale. Per gli esperimenti sono state piastrate 15×10^4 cellule HeLa in 3 ml di terreno EMEM (addizionato con 100 IU/ml di Pennicillina-Streptomicina, 2mM di L-Glutamina e 10.000 IU di Anfotericina B per ml di terreno e al 10% di FCS). Dopo 24h di incubazione a 37°C in atmosfera controllata (aria + 5% CO_2) per permettere l'adesione delle cellule al substrato, le cellule HeLa sono state incubate per 2, 3, 8, 24, 48 ore con le soluzioni di NP. Le concentrazioni testate sono: 1, 25, 50, 75, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$ di NP.

2.1.4.2 Internalizzazione da parte delle linee cellulari e localizzazione subcellulare di CaCO₃NP

Microscopia confocale in fluorescenza

Per valutare l'internalizzazione delle NP all'interno delle cellule, le cellule (5×10^4) sono state piastrate e incubate per 24 ore. Dopo 24 h, le cellule sono state incubate con la soluzione di CaCO₃NP fluorescenti secondo il protocollo riportato nel paragrafo 2.1.4.1. Dopo 3, 8 e 24 ore dall'incubazione con le NP, cellule sono state lavate con PBS, fissate in glutaraldeide 0,25% in PBS per 10 minuti, e permeabilizzate con Triton X-100 (0,1% in PBS)(Sigma Aldrich, St. Louis, USA), seguita da 45 minuti di incubazione a temperatura ambiente con falloidina-TRITC (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Le cellule sono state poi lavate con PBS per 5 minuti e successivamente marcate con 1 mg/mL di Hoechst 33342 per 5 min a temperatura ambiente.

Per valutare la colocalizzazione di CaCO₃NP con mitocondri e lisosomi sono stati utilizzati dei marcatori fluorescenti secondo le istruzioni del produttore. I lisosomi sono stati marcati con LysoTracker Red ND-99 e mitocondri sono stati marcati con Mito-Tracker Red (Life technologies, Carlsbad, California, Stati Uniti).

I test di imaging sono state eseguiti con un microscopio confocale Zeiss LSM700 (Zeiss, Germania) dotato di un microscopio invertito Axio Observer Z1 (Zeiss, Germany) ad ingrandimento 100X ed apertura numerica 1,46 con lente a immersione in olio per l'imaging. I raggi laser a lunghezza d'onda 405 nm, 488 nm e 542 nm di eccitazione sono stati utilizzati per visualizzare i nuclei (blu), CaCO₃NP (verdi) e i marker commerciali (rosso).

Per valutare l'efficienza di internalizzazione da parte delle linee cellulari, il terreno di coltura è stato sostituito da PBS 1x, a pH 7, e lasciato a incubare a 37 °C per 30 minuti. Le cellule sono state incubate poi con una sospensione di NP in PBS 1x, e incubate fino a 3 ore. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate tre volte con PBS freddo 1x, dopo di che le cellule sono state lisate con Triton X-100 0,1% in una soluzione 0,2 M di NaOH (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). La fluorescenza associata alle NP è stato quantificata analizzando il lisato cellulare in un lettore di fluorescenza (λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 528 nm). L'efficienza di internalizzazione è stata quindi calcolata dal seguente formula:

$$\text{Efficienza di internalizzazione (\%)} = (W_{\text{campione}}/W_{\text{totale}}) \times 100$$

Dove W_{campione} è la quantità di fluorescenza associata alle cellule, W_{totale} è la quantità di fluorescenza di FITC associata alla sospensione iniziale.

Microscopia elettronica a trasmissione

Per l'analisi TEM, le cellule dopo il trattamento con le NP, sono state lavate con PBS, fissate con 2,5% di glutaraldeide in tampone cacodilato 0,1 M pH 7,4 in ghiaccio per 2 ore e post-fissate in tetrossido di osmio (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) all' 1% per 2 h.

Le cellule sono state disidratate in concentrazioni crescenti di etanolo (30,50, 70, 90 e 100%). Una volta completata la disidratazione, per iniziare la procedura di infiltrazione, i campioni sono stati lasciati tutta la notte a 4°C in una soluzione di resina *Spurr* (TAAB, Berks, UK) ed etanolo assoluto 1:1 .

Dopo un cambio della soluzione 1:1 di resina-alcool per 30 minuti, sono stati posti per altri 30 minuti in una soluzione di resina-alcool assoluto 2/3:1/3 e quindi in resina assoluta per 2 ore a temperatura ambiente; infine, i campioni sono stati inclusi in resina assoluta *Spurr* preparata fresca.

La polimerizzazione è stata effettuata in stufa a 60°C per 2 giorni. Sono state tagliate sezioni semifini (200 nm di spessore) e sezioni fini (50 nm) utilizzando l'ultramicrotomo PowerTome PT-PC (RMC, Arizona, USA).

Le sezioni semifini sono state colorate con Blu di Toluidina a 60°C in stufa ed osservate al microscopio ottico; mentre quelle fini, raccolte su apposite reticelle di rame di 200 *mesh*, sono state colorate con sostanze elettrondense per la microscopia elettronica: Acetato di Uranile (1% in acqua per 3 minuti) e Citrato di Piombo (0,3% in acqua per 4 minuti) e osservate con un microscopio elettronico HITACHI HT7700 (Tokyo, Giappone) a 60 KeV.

2.1.4.3 Esperimenti di inibizione del meccanismo di endocitosi delle NP

Le cellule HeLa (5×10^4 cellule) sono state piastrate su vetrini inseriti all'interno di una multiwell e incubate per 24 ore.

Sono state preparate le soluzioni contenenti gli inibitori, in terreno di coltura:

Sodio azide 200µM: inibitore di endocitosi energia dipendente

Citocalasina D 10µg/mL: inibitore di micropinocitosi

B-metilciclodestrina 5mg/mL: inibitore di endocitosi mediata da raft lipidici

Saccarosio 900µM: inibitore di endocitosi mediata da clatrina

Gli inibitori sono stati aggiunti 1 ora prima dell'esposizione a NP, 3mL per ogni pozzetto. Dopo aver rimosso il terreno contenente solo gli inibitori, si è passati all'incubazione delle cellule con il terreno di coltura contenente gli inibitori e le NP fluorescenti ad una concentrazione di 1µg/mL per 30 minuti e 2 ore.

Al termine dei trattamenti, i vetrini sono stati osservati a fresco mediante microscopio ottico a fluorescenza Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokyo, Giappone).

2.1.4.4 Valutazione degli effetti delle CaCO_3NP

Vitalità cellulare: test MTT

Sono state piastrate 15×10^4 cellule in 3 ml di terreno. Dopo 24h di incubazione a 37°C in atmosfera controllata (aria + 5%CO₂) per permettere l'adesione delle cellule al substrato, le cellule sono state incubate per 24, 48 e 72 ore con concentrazioni crescenti di NP.

Per il protocollo utilizzato per il test MTT, vedi paragrafo 1.1.3.4

RISULTATI

In questo lavoro di dottorato sono state prese in esame nanoparticelle (NP) metalliche e non metalliche, sintetizzate mediante *green chemistry* e caratterizzate dal punto di vista fisico e morfologico, e la loro interazione con sistemi biologici in vitro e in vivo. In particolare, sono stati valutati la loro biodistribuzione e gli effetti mediante tecniche spettroscopiche, biochimiche e di microscopia ottica ed elettronica.

1. Nanoparticelle metalliche

1.1 Nanoparticelle d'argento (AgNP).

1.1.1 Caratterizzazione delle AgNP.

Gli spettri di assorbimento UV-vis delle NP metalliche sono caratterizzati da bande di risonanza delle onde elettromagnetiche di superficie (*surface plasmon* SP) e si possono osservare da una a tre bande SP, corrispondenti ai loro tre assi di polarizzabilità.

Lo spettro di assorbimento UV-vis delle NP sintetizzate in una soluzione acquosa di β -D glucosio (AgNP-G) è rappresentato in Figura 1.

Lo spettro UV-visibile (Fig. 1a) delle AgNP-G appena sintetizzate mostra una forte banda di estinzione con un picco a 420 nm, lunghezza d'onda caratteristica di assorbimento di AgNP sferiche. Dopo 10 giorni dalla sintesi, lo spettro delle Np subisce un evidente spostamento della banda di estinzione e una forte diminuzione dell'intensità di assorbimento. È stato osservato infatti un secondo picco a 600-700 nm (Fig. 1a).

Le AgNP-G appena preparate sono per lo più sferiche e ben disperse in soluzione (Fig 2b). La distribuzione dimensionale varia da 20 a 40 nm e la dimensione media è $d = 30$ nm con una deviazione standard $\sigma = 5$ nm (Fig. 1b). Dopo 10 giorni in terreno di coltura, è stata osservata una differenza significativa nella forma e dimensioni delle AgNP-G rispetto a quelle appena sintetizzate. È stato osservato, infatti, un

elevato numero di *nanorods* (diametro medio longitudinale = 50 nm; deviazione standard $\sigma = 25$ nm) (Fig. 1c e 2b)

I modelli di diffrazione (Fig. 2a) delle AgNP-G appena sintetizzate mostrano la natura nanocristallina delle NP. Dopo 10 giorni in terreno di coltura, la struttura ad anello del modello SAED (Selected Area Electron Diffraction) mostra evidenti punti luminosi, che indicano il cambiamento della struttura cristallina e confermano la perdita di stabilità della soluzione di AgNP-G.

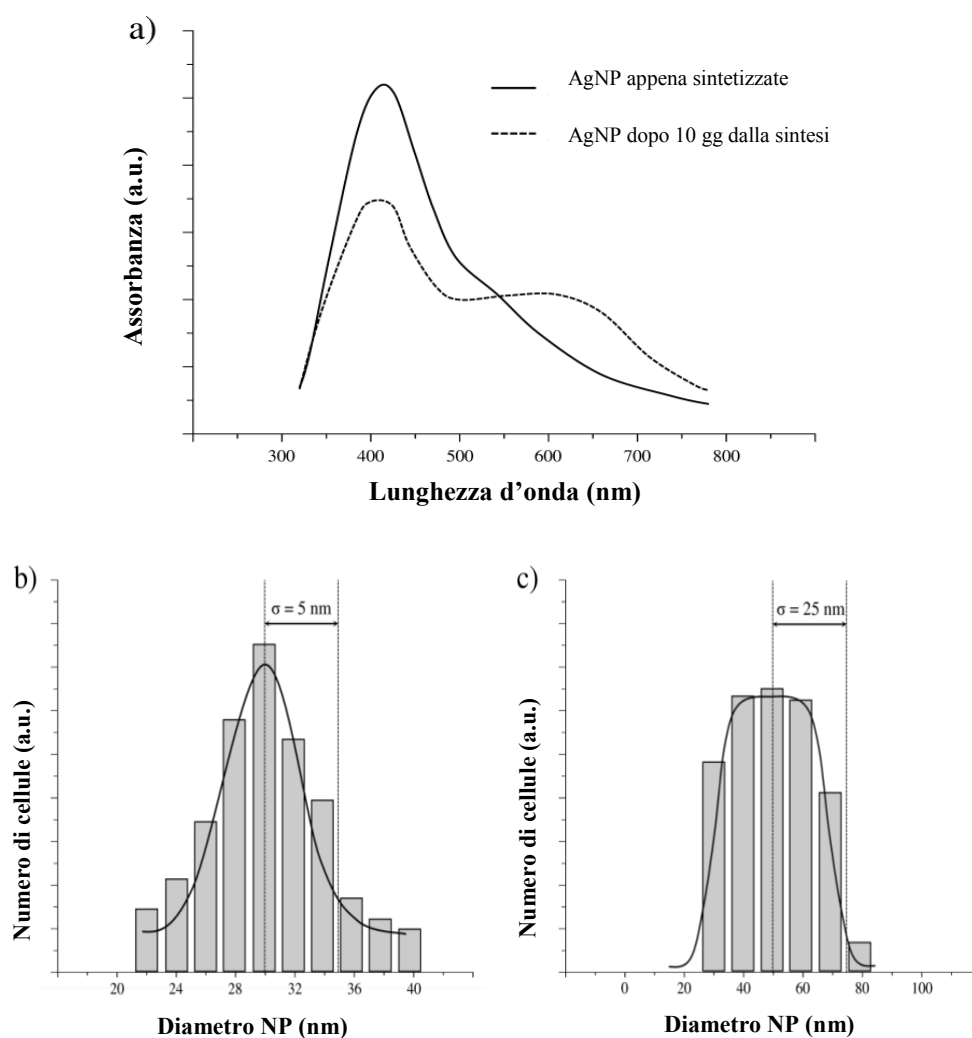


Fig. 1: stabilità delle AgNP-G appena preparate e dopo 10 giorni dalla sintesi. a) Spettro UV-Visibile di 15×10^{14} AgNP-G/ml in terreno di coltura riportato come unità arbitrarie di assorbanza (a.u., asse y) vs lunghezza d'onda (nm, asse x). Dopo 10 giorni dalla sintesi, la dimensione delle AgNP-G cambia, come indicato da un secondo picco a 600 nm e dall'aumento dell'ampiezza del picco.

b) e c) Forma e distribuzione delle dimensioni rispettivamente di AgNP-G appena preparate e AgNP-G dopo 10 giorni dalla sintesi. La distribuzione delle dimensioni di AgNP-G viene riportato come unità arbitrarie (a.u., l'asse y) vs diametro longitudinale (nm, asse x). La distribuzione dimensionale varia da 20 a 40 nm e la dimensione media è $d = 30$ nm con una deviazione standard $\sigma = 5$ nm (Fig. 1a). Dopo 10 giorni in terreno di coltura è stata osservata una differenza significativa nella forma e dimensione di AgNP-G confrontati con quelle appena sintetizzate (diametro medio longitudinale = 50 nm; la deviazione standard $\sigma = 25$ nm)

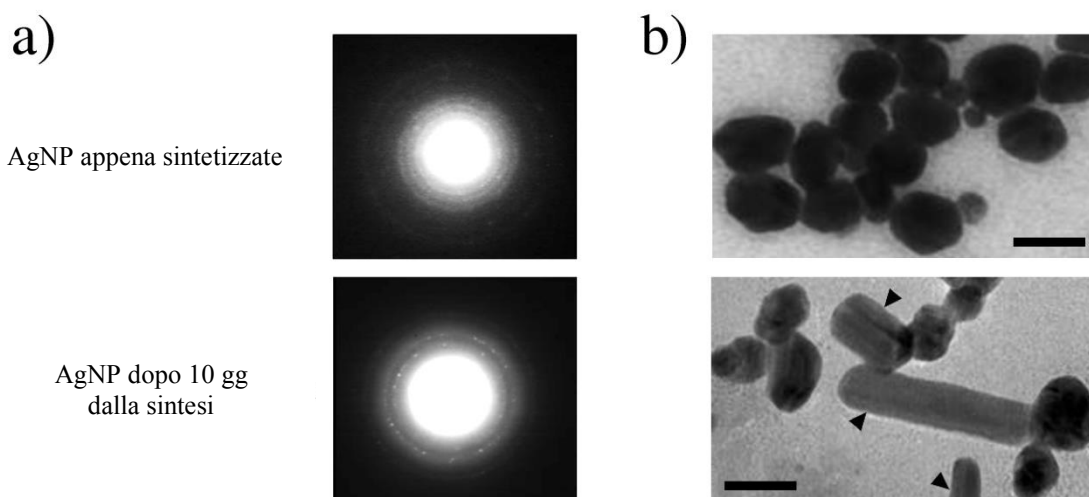


Fig. 2: morfologia delle AgNP valutata al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). a) i modelli di diffrazione TEM delle singole AgNP-G mostrano cambiamenti della natura cristallina al momento della sintesi e dopo 10 giorni. b) le micrografie TEM mostrano una differenza significativa nella forma e dimensione di AgNP-G dopo 10 gg rispetto alle NP appena sintetizzate: evidente nella formazione di un numero crescente di *nanorods* (teste di freccia). Le micrografie TEM sono state acquisite con un Hitachi 7700 a 100 kV (Hitachi High Technologies America Inc., Dallas, TX, USA); bar = 30 nm.

1.1.2 Studio *in vitro* degli effetti delle AgNP-G su diverse linee cellulari umane.

1.1.2.1 Cellule HeLa

Internalizzazione delle AgNP-G

La capacità delle cellule HeLa di internalizzare le AgNP-G è stata verificata attraverso l'uso della microscopia elettronica a scansione, abbinata alla spettroscopia EDX, ed all'analisi mediante spettroscopia ad assorbimento atomico in fornetto di grafite (GF-AAS). La prima tecnica è in grado di effettuare una caratterizzazione chimica degli elementi presenti nel campione, permettendo una visualizzazione diretta delle NP all'interno delle cellule. La spettroscopia ad assorbimento atomico

determina, invece, la concentrazione di elementi chimici liberi in soluzione. Sottraendo quindi la misura della concentrazione di argento nel mezzo di coltura delle cellule HeLa, si risale alla quantità di argento internalizzato dalle cellule.

La Figura 3a è un'immagine in *bright field* rappresentativa di una cellula HeLa in coltura per 2h in presenza di 2×10^4 NP/cell. L'osservazione è stata fatta anche in *dark field* (come mostra la Figura 3a), modalità che permette di visualizzare le parti del campione che assorbono poco ma diffondono (in questo caso i metalli). Il riquadro in rosso mette in evidenza uno spot bianco al centro della cellula corrispondente al picco relativo all'argento nello spettro EDX. Il picco, infatti, risulta assente se ci si sposta su un'area al di fuori dello spot bianco.

Ulteriori AgNP, non aggregate, di dimensioni inferiori alle precedenti sono state osservate sottoforma di spot bianchi alla periferia della cellula (Fig 3a). Si può ipotizzare che le AgNP, una volta all'interno della cellula, si muovono rapidamente all'interno del citoplasma, dove poi aggregano.

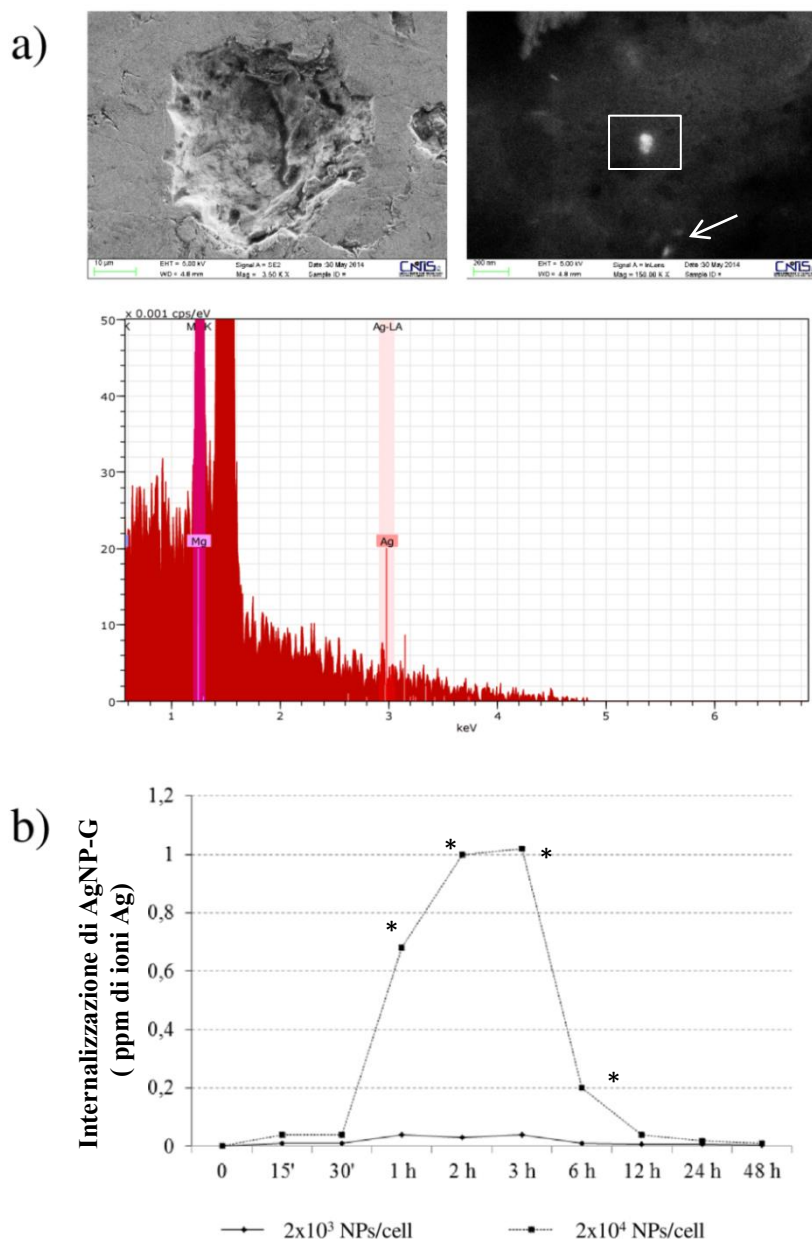


Fig. 3: internalizzazione delle AgNP. a) Analisi dell'internalizzazione di AgNP-G in cellule HeLa mediante SEM-EDX. Le cellule HeLa sono state esposte a 2×10^3 e 2×10^4 NP/cell per tempi diversi, come riportato nella sezione Materiali e Metodi. In alto, immagini SEM (sx: *bright field*, dx: *dark field*) di una cellula HeLa rappresentativa trattata con 2×10^4 NP/cell per 2h; in basso, lo spettro X-ray relativo al riquadro in bianco nell'immagine in *dark field*, contenente uno spot bianco, mostra un caratteristico picco relativo all'argento. La freccia in bianco mostra le AgNP-G non aggregate e situate alla periferia della cellula.

b) Cinetica dell'internalizzazione di AgNP dalle cellule HeLa durante 48h di trattamento. La quantità di AgNP nelle cellule è stata valutata mediante analisi GF-AAS e indirettamente calcolata come ppm dell'argento assorbito dalle cellule dal mezzo di coltura. Le cellule HeLa sono state esposte a 2×10^3 e 2×10^4 NP/cell per tempi diversi, come riportato nella sezione Materiali e Metodi. I dati sono la media $\pm$ DS di sei esperimenti, ognuno in duplicato. Gli asterischi indicano i valori significativi ($p < 0.05$) rispetto alle cellule non trattate.

La Figura 3b dimostra come la cinetica di internalizzazione delle AgNP, espressa come ppm di argento, dipenda dalla concentrazione e dal tempo di incubazione delle NP. Infatti, solo per le cellule incubate con 2×10^4 AgNP-G/cell, è stata osservato un consistente *uptake* cellulare. Quando le cellule HeLa sono trattate con la quantità inferiore di AgNP-G, l'internalizzazione risulta più bassa. Inoltre, l'internalizzazione delle NP avviene quasi esclusivamente da 30' a 3h ore; ciò suggerisce che si tratta di un evento precoce; inizia dopo 30 min di incubazione e in circa poche ore raggiunge il valore massimo, seguito da un plateau (tra 2 e 3 ore di incubazione). Da 3 h alla fine del periodo di incubazione è stata osservata una rapida diminuzione di AgNP-G internalizzate, fino a valori quasi trascurabili a circa 12 h di incubazione.

Effetti sulla vitalità cellulare

La vitalità delle cellule HeLa in presenza delle AgNP-G a tempi di incubazione di 6, 12, 24 e 48h è stata valutata mediante test spettrofotometrico MTT; come controlli dell'esperimento sono state prese in considerazione le soluzioni glucosate in cui si trovano le NP e le cellule non trattate. I dati, elaborati come descritto nel paragrafo 1.1.3.4 del capitolo Materiali e Metodi e riportati in Figura 4a, dimostrano che la vitalità cellulare in presenza delle AgNP-G si riduce in maniera tempo e dose-dipendente. In particolare, la più bassa quantità di AgNP-G (2×10^3 NP/cell) non sembra influenzare in maniera significativa la vitalità cellulare, a 6 e 12h si assiste ad una lieve diminuzione delle vitalità cellulare, ma a 12h dall'incubazione si assiste ad un recupero, raggiungendo a 24 e 48h valori paragonabili al controllo. La quantità maggiore di AgNP-G (2×10^4 NP/cell) risulta, invece, tossica. La vitalità, in questo caso, si riduce di circa il 50% rispetto al controllo già dopo 6h di trattamento; a 48h la riduzione è pari al 95%.

Per valutare l'eventuale influenza della soluzione di glucosio, in cui sono disperse le NP, sulla tossicità delle AgNP-G, le cellule sono state incubate anche in presenza della sola soluzione di β -D-glucosio, con concentrazioni equivalenti a quelle delle soluzioni contenenti le NP. Le due concentrazioni della soluzione di glucosio testate non interferiscono con la vitalità delle cellule HeLa (Fig. 4a).

E' stata effettuata, inoltre, un'analisi al microscopio ottico dopo colorazione Ematossilina-eosina dei diversi campioni per valutare le eventuali modificazioni morfologiche a carico delle cellule HeLa dopo incubazione con le diverse soluzioni di AgNP-G (Fig. 4b). In particolare, a tempi più lunghi ed in presenza della quantità

maggiore di NP, le cellule mostrano morfologia riconducibile a morte apoptotica (presenza di cromatina condensata e/o frammentata e *blebbing* della superficie cellulare) o necrotica (cellule rotte e citoplasma vacuolizzato).

Solo dopo 24h di incubazione in presenza di 2×10^4 NP/cell le cellule cominciano a staccarsi dal substrato, mentre quelle che rimangono adese mostrano evidenti caratteristiche di cellule apoptotiche e necrotiche. Rispetto alle cellule HeLa controllo, il numero di cellule con morfologia normale che rimangono adese al substrato diminuisce all'aumentare della quantità della soluzione di AgNP-G nel terreno di coltura.

Le microfotografie riportate in Figura 4b riportano immagini acquisite al microscopio ottico a contrasto di fase delle cellule HeLa in coltura per 12 e 24h in presenza delle due concentrazioni di glucosio. Dopo 12h di trattamento con la quantità minore di AgNP, le cellule HeLa cominciano a mostrare alcune modificazioni morfologiche, ma sono comunque tutte adese al substrato. Aumentando il numero di NP nel terreno di coltura le cellule HeLa diventano necrotiche; dopo 24h la forma cellulare è completamente alterata; dopo 48h le cellule si staccano dal substrato.

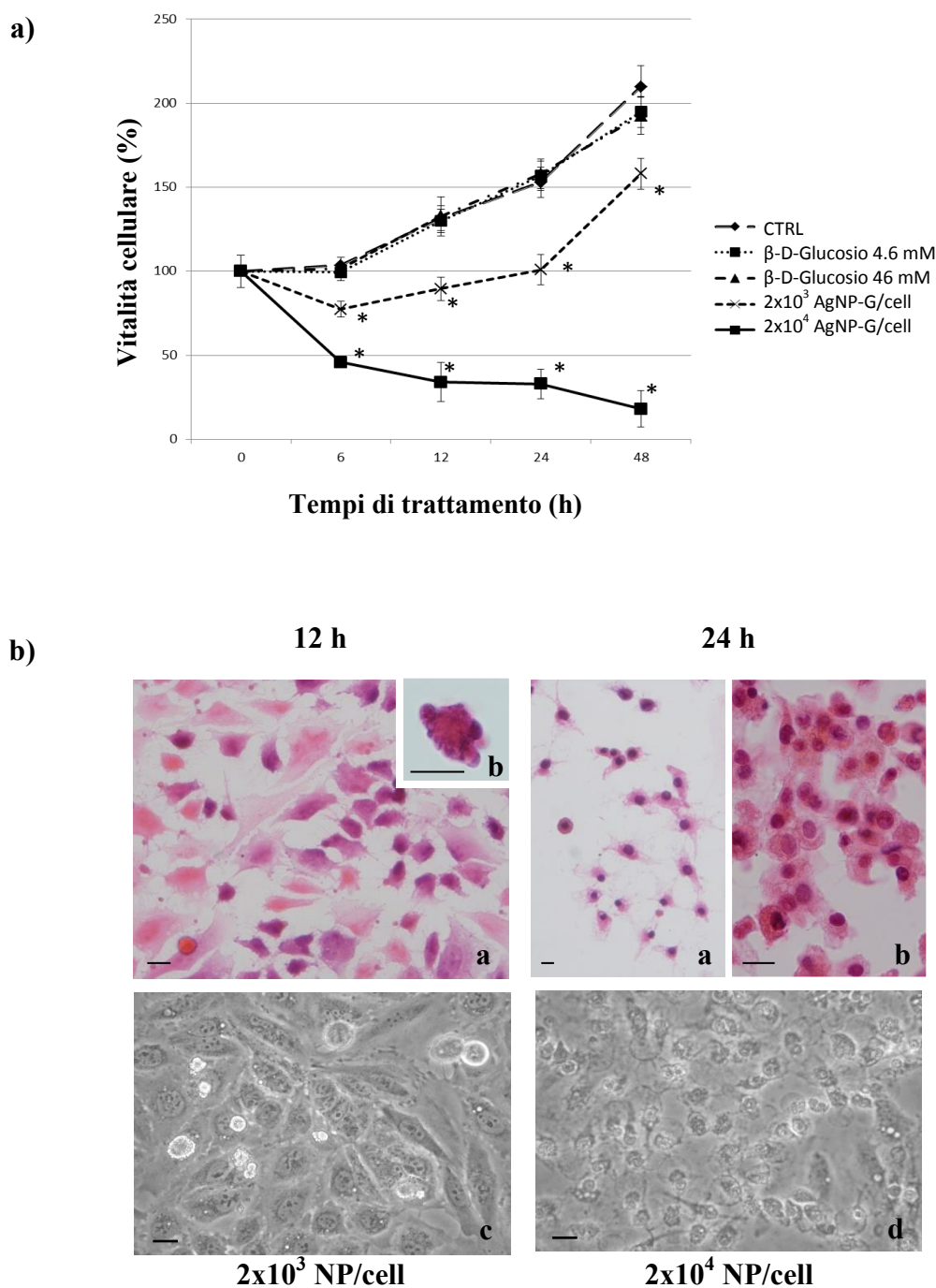


Fig 4: effetti sulla vitalità delle cellule HeLa. (a) test MTT condotto sulle cellule HeLa dopo 6, 12, 24 e 48h di trattamento in presenza di due soluzioni di Glucosio e di due soluzioni di AgNP sintetizzate in una soluzione di Glucosio. I valori (assorbanza riportata come percentuale rispetto alle cellule controllo al tempo T0, considerate come 100%) sono la media $\pm$ DS di 3 esperimenti indipendenti. * valori significativamente differenti ($p < 0,05$) dal rispettivo valore delle cellule controllo. (b) Effetti delle AgNP sulla morfologia cellulare. In alto, cellule osservate al microscopio ottico dopo colorazione con ematossilina eosina (a): cellule adese; (b) cellule non adese; in basso microfotografie (c) e (d) acquisite al microscopio invertito. bar=10 μ m.

I dati di internalizzazione sono stati comparati con quelli relativi alla vitalità cellulare (Fig. 5). L'internalizzazione delle AgNP avviene quando le cellule sono vitali, e quindi internalizzano in maniera significativa ed attiva le NP. L'ingresso di argento in cellula determina e un decremento della vitalità e quindi, con il progredire del tempo di incubazione, aumentano le cellule morte e/o sofferenti che quindi non internalizzano più le AgNP ma, anzi, le rilasciano a causa della perdita dell'integrità della membrana plasmatica.

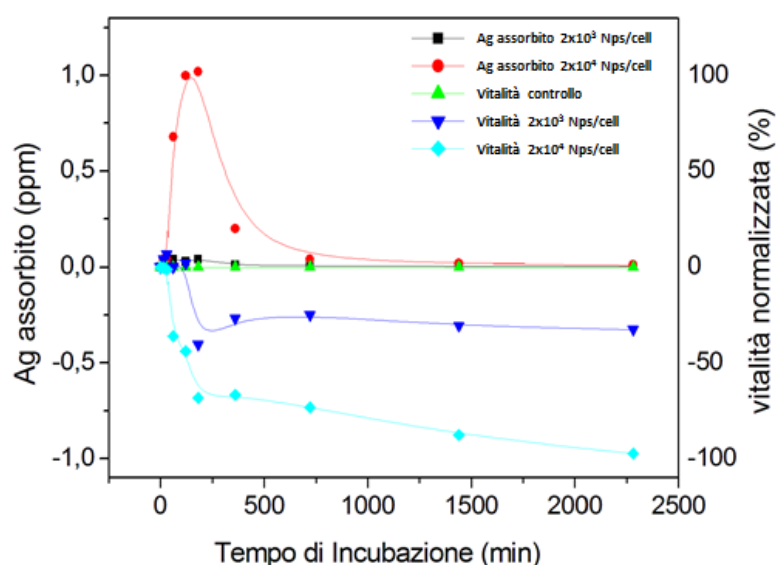


Fig. 5: confronto tra argento assorbito e vitalità delle cellule HeLa trattate con 2×10^3 e 2×10^4 NP/cell in funzione del tempo di incubazione.

Produzione di ROS nelle cellule HeLa incubate con AgNP-G.

Per valutare se la presenza di AgNP induce l'induzione della produzione di ROS da parte delle cellule HeLa, è stato eseguito il test spettrofotometrico NBT dopo 24 e 48h di coltura in presenza di 2×10^3 e 2×10^4 NP/cell delle AgNP. Come controllo dell'esperimento sono state prese in considerazione le soluzioni glucosate in cui si trovano le NP e le cellule non trattate. I dati, elaborati come descritto nel paragrafo 1.1.3.4 del capitolo Materiali e Metodi, sono riportati in Figura 6.

Seppure con efficacia differente, sia le AgNP che la soluzione glucosata inducono produzione di ROS in cellule HeLa. Infatti entrambe le concentrazioni di NP inducono una significativa produzione di ROS, con valori di D.O. in presenza di 2×10^3 NP più alti rispetto a quelli delle cellule controllo di circa il 70% sia dopo 24

che dopo 48h di trattamento; mentre la quantità di 2×10^4 NP/cell induce un aumento dei valori di D.O. e quindi dei ROS di circa l'85% dopo 24h e di circa il 95% dopo 48h (Fig. 6).

La presenza del solo glucosio favorisce la produzione di ROS da parte delle cellule HeLa in modo indipendente dalla concentrazione saccaridica nel terreno di coltura; rispetto alle cellule HeLa controllo, la D.O. misurata aumenta di circa il 20% dopo 24h di coltura e di circa il 45% dopo 48h (Fig. 6).

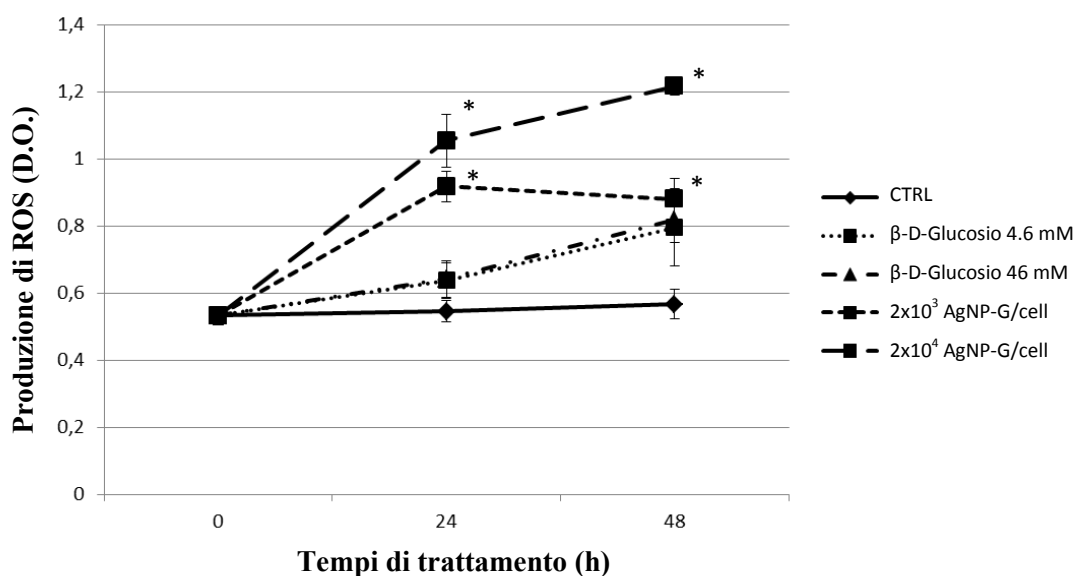


Fig. 6: produzione di ROS. Test NBT condotto sulle cellule HeLa dopo incubazione per 24 e 48h con glucosio 4.6 e 46 mM e due quantità di AgNP-G (2×10^3 e 2×10^4 NP/cell). I valori rappresentano la media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti.

*** valori significativamente differenti ($p < 0,05$) dal rispettivo valore delle cellule controllo.**

Induzione di apoptosi, autofagia e necrosi in cellule HeLa in presenza di AgNP-G.

Nella tabella 1 sono riportate percentuali di apoptosi, autofagia e necrosi in cellule HeLa trattate con AgNP. I valori sono stati ottenuti mediante osservazione al microscopio a fluorescenza di almeno 500 cellule per test dopo marcatura con Annexina V/Ioduro di propidio (cellule apoptotiche/necrotiche) e monodansilcadaverina (cellule autofagiche).

Tab 1: percentuali di cellule HeLa apoptotiche (Annexin+V/PI-), autofagiche (MDC+/PI-) e necrotiche (Annexin+V/PI+) a diversi tempi di trattamento con AgNP.

Tempo di incubazione (h)	Annexin V+/PI-	MDC +/PI -	Annexin V+ /PI +
Ctrl			
6	4.9±0.5	2.1±0.9	1.2±0.02
12	6.7±1.1	2.4±0.7	0.7±0.01
24	7.9±1.2	2.8±0.7	1.1. ±0.09
48	8.3±1.3	3.1±0.6	0.8±0.04
2x10³ AgNP-G/cell			
6	6.12±0.7*	15.3±2.1*	1.86±0.4*
12	8.7±1.2*	18.4±2.1*	1.19±0.5*
24	10.3±1.9*	29.3±2.2*	1.87±0.8*
48	10.4±1.4*	31.6±3.5*	1.44±0.09*
2x10⁴ AgNP-G/cell			
6	7.6±1.5*	N.D.	78.4±8.7*
12	11.4±1.3*	N.D.	84.3±11.2*
24	9.4±2.5*	N.D.	90.6±5.6*
48	2.6±0.5*	N.D.	97.4±9.9*

Per ogni campione sono state analizzate al microscopio ottico almeno 500 cellule. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato e per ogni campione sono state effettuate 3 valutazioni. I valori (riportati come numero percentuale rispetto al totale delle cellule contate considerate 100%) sono la media ± DS. Gli asterischi indicano i valori significativi ($p < 0.05$) rispetto alle cellule vitali (ctrl). N.D.: valori non rilevati (not detected).

Le cellule HeLa trattate con AgNP-G vanno incontro a morte cellulare in modi differenti, in termini di quantità e tipo, in relazione alla quantità di NP con cui vengono incubate.

Indipendentemente dal tipo di morte cellulare indotta, la percentuale di cellule morte è più alta in presenza di 2×10^4 NP/cell rispetto a quella in presenza di 2×10^3 NP/cell. Si registra un aumento del numero di cellule apoptotiche e necrotiche, anche in questo caso in modo tempo-dipendente.

È stato poi osservato che le cellule vanno incontro ad autofagia solo in presenza della quantità inferiore di AgNP-G. La percentuale aumenta in modo tempo-dipendente.

Effetti delle AgNP sul ciclo cellulare.

Per valutare l'influenza delle AgNP-G sul ciclo cellulare, le cellule HeLa sono state trattate con le due concentrazioni di NP a diversi tempi, 6, 12, 18 e 24h. Sono state poi analizzate, mediante citofluorimetria a flusso (FACS), tutte le fasi del ciclo cellulare: fase sub-G1 (che include cellule morte e detriti cellulari), fase G0/G1, fase S, fase G2/M.

I dati relativi all'analisi del ciclo cellulare e i relativi citogrammi sono riportati nelle Figure 7 e 8, rispettivamente. Dai dati si evince che, in generale, la quantità di NP più alta (2×10^4 NP/cell) influenza l'intero ciclo, in particolare la fase G2/M è quella più coinvolta. In quest'ultima, infatti, l'arresto del ciclo cellulare inizia a 6h di incubazione e prosegue fino a 24h. La percentuale di cellule in fase G2/M risulta essere maggiore del 50% a 6h (Fig. 7A) e del 60% a 24h (Fig. 7D) rispetto alle cellule controllo negli stessi tempi di incubazione.

Si assiste poi ad un ulteriore blocco in fase S a 12h (circa il 20% in più rispetto alle cellule controllo) (Fig. 7B) e 18h (circa il 50% in più) (Fig. 7C), mentre a 6h di incubazione la percentuale si riduce significativamente del 30% rispetto alle cellule non esposte (Fig. 7A).

A 12h di trattamento, la percentuale di cellule HeLa in fase G0/G1 diminuisce di circa il 20% (Fig. 7B), mentre a 18h arriva al 15% rispetto ai rispettivi controlli (Fig. 7C). A 24h la percentuale si riduce al 15% (Fig. 7D).

La Figura 8 riporta i citogrammi a flusso relativi agli istogrammi in Fig. 7.

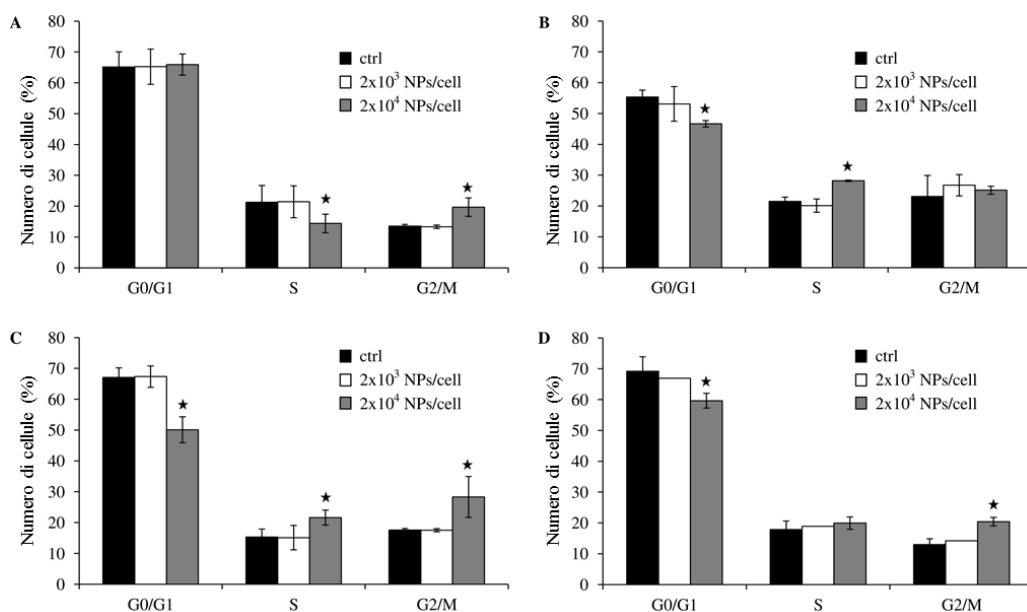


Fig. 7: analisi del ciclo cellulare. Dati relativi all'analisi mediante FACS dell'effetto di AgNP-G sulle fasi del ciclo cellulare, riportati come percentuale di cellule HeLa nelle fasi G0/G1, S e G2/M. Le cellule HeLa sono state esposte a 2x10³ e 2x10⁴ NP/cell per 6 (A), 12 (B), 18 (C) e 24h (D). I dati sono la media $\pm$ DS di sei esperimenti, ognuno in duplicato. Gli asterischi indicano i valori significativi ($p < 0.05$) rispetto alle cellule non trattate (ctrl). L'analisi FACS è stata eseguita mediante FACScan BD (Benton Dickinson Biosciences, New Jersey, USA).

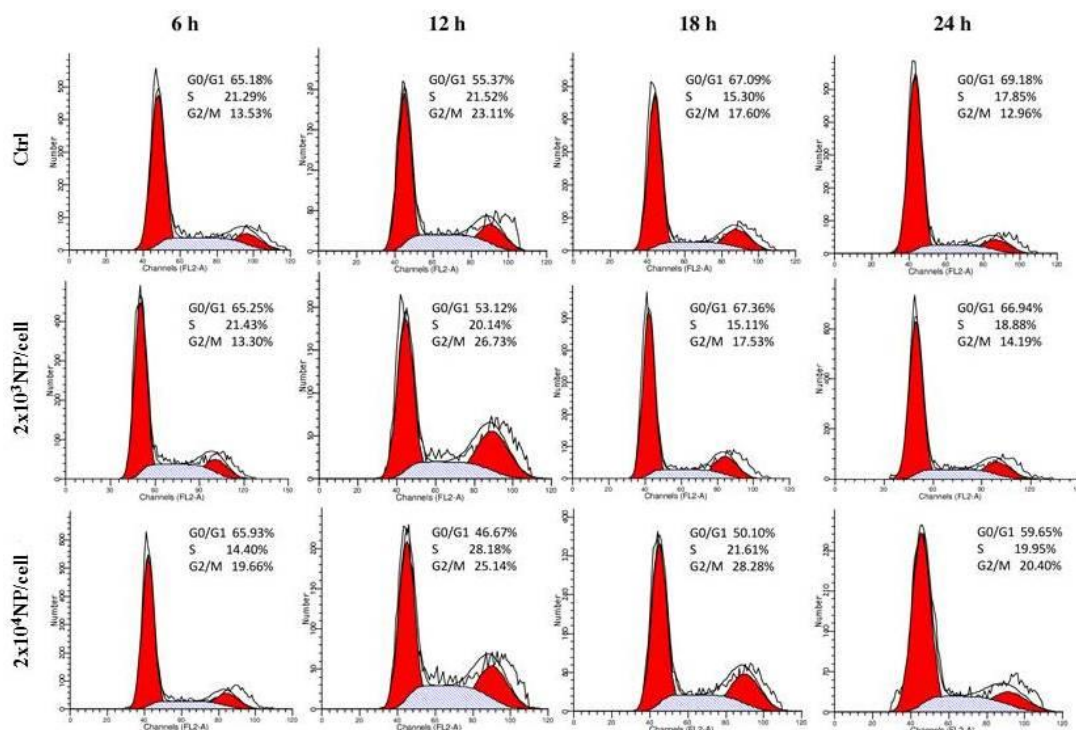


Fig. 8: citogrammi FACS rappresentativi, ottenuti mediante l'uso di FACScan BD (Benton Dickinson Biosciences, New Jersey, USA), che mostrano i cambiamenti durante il ciclo cellulare delle cellule HeLa in coltura con le due quantità di AgNP-G per 6, 12, 18 e 24h.

L'incremento significativo della popolazione in sub-G1 in modo dose e tempo-dipendente, conferma la tossicità delle AgNP-G (Fig. 9) L'incremento maggiore di cellule in sub-G1 corrisponde a circa il 30% del numero totale di cellule dopo 18h di incubazione con 2×10^4 NP/cell. L'aumento della percentuale in questa fase è alquanto significativa già dopo 30 minuti, con un aumento massimo da 1 a 18h di trattamento (90 e 95% rispettivamente rispetto alle cellule controllo).

A 24h l'incremento della popolazione è pari all'80%.

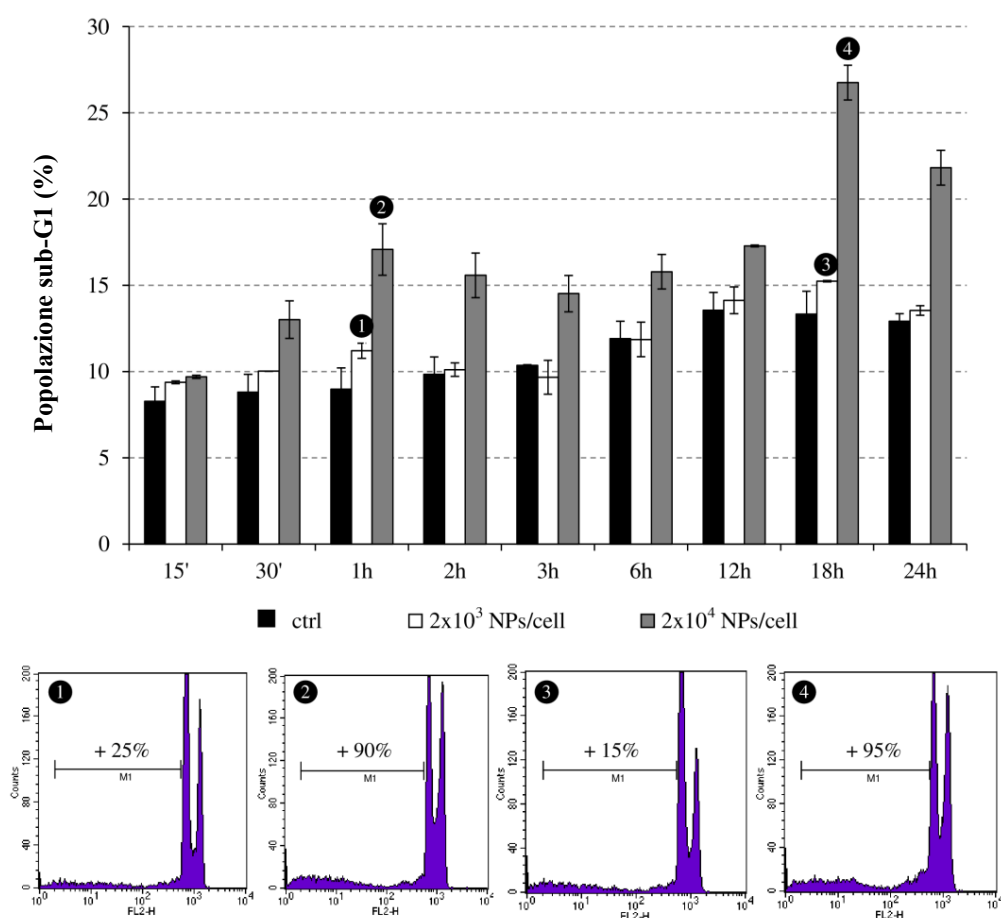


Fig. 9: valutazione delle cellule in sub-G1. Analisi mediante FACS degli effetti delle AgNP sulla porzione di cellule HeLa della popolazione sub-G1. Le cellule HeLa sono state esposte a 2×10^3 e 2×10^4 NP/cell per diversi tempi, come riportato nella sezione Materiali e Metodi. I dati sono la media $\pm$ DS di sei esperimenti, ognuno in duplicato. Tutti i valori relativi ai campioni esposti a 2×10^4 NP/cell e i campioni esposti per 1h e 18h a 2×10^3 NP/cell sono significativi rispetto al controllo ($p < 0.05$). I numeri sui citogrammi corrispondono ai picchi relativi nell'istogramma. L'aumento della popolazione sub-G1 è indicato come aumento (+) della percentuale rispetto al controllo.

L'influenza delle NP sulla fase M del ciclo cellulare è stata verificata misurando l'indice mitotico IM (valore percentuale) dopo coltura con le diverse soluzioni di NP utilizzando un marcatore specifico per cellule in fase mitotica, il Phospho-istone H3 (Fig. 10). L'anticorpo anti-Phospho H3 riconosce l'istone H3 dopo la fosforilazione della serina in posizione 10 quando i cromosomi condensano durante la profase. L'istone H3 rimane fosforilato, e quindi rilevabile dall'anticorpo, fino alla telofase. In Figura 10 sono riportati l'IM delle cellule HeLa incubate con 2×10^3 o 2×10^4 NP/cell per 24 e 48h, dopo marcatura con anticorpo anti-Phospho H3, contando 500 cellule in mitosi (considerando nel complesso le diverse fasi mitotiche, profase, metafase, anafase e telofase). In basso sono riportate immagini acquisite al microscopio a fluorescenza delle cellule HeLa che mostrano esempi delle diverse fasi della mitosi. Le cellule HeLa controllo raddoppiano dopo 24h e di nuovo dopo 48h. L'indice mitotico delle cellule HeLa non è influenzato quando le stesse sono poste in coltura con le sole soluzioni di glucosio. La proliferazione cellulare è, invece, influenzata solo dalla presenza della quantità maggiore di NP. Infatti, l'IM delle cellule HeLa si riduce di circa l'85 e 95% a 24 e 48h rispetto alle cellule controllo.

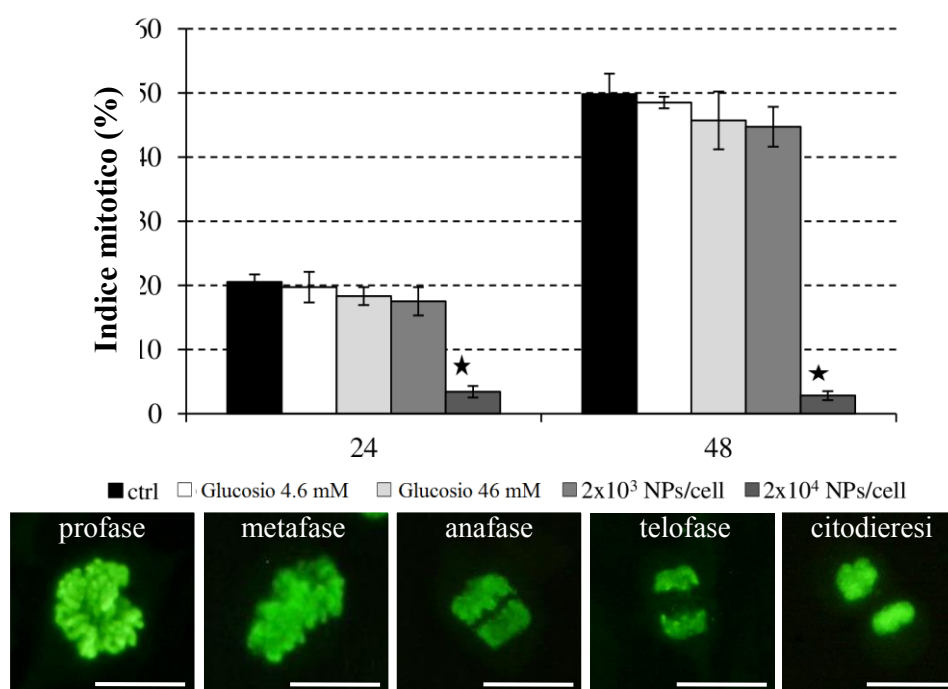


Fig. 10: valutazione dell'Indice Mitotico (IM). Effetto dell'esposizione a AgNP-G sull'indice mitotico delle cellule HeLa riportato come percentuale (%). IM è stato misurato mediante immunomarcatura con Phospho-istone H3. La frazione di cellule mitotiche è stata ottenuta contando le cellule positive relative alla fase mitotica. Per ogni campione sono state contate almeno 500 cellule al microscopio a fluorescenza Eclipse 80i (Nikon, Tokyo, Japan). I dati sono la media $\pm$ DS di sei esperimenti, ognuno in duplicato. Tutti i valori con asterisco sono significativi rispetto al controllo ($p < 0.05$).

1.1.2.2 Linfociti umani

Internalizzazione delle AgNP-G

Per valutare la cinetica di internalizzazione delle AgNP-G e la quantità di NP internalizzata, è stata effettuata un'analisi mediante GF-AAS. La Figura 11 mostra come la cinetica di internalizzazione delle AgNP, espressa come ppm di argento, dipenda dalla concentrazione e dal tempo di incubazione con le NP. Infatti, solo per le cellule incubate con 2×10^4 AgNP-G/cell, è stato osservato un consistente *uptake* cellulare, mentre con la quantità inferiore di AgNP-G, l'internalizzazione risulta molto più bassa. L'internalizzazione delle NP avviene nei tempi iniziali, con picchi a 30' per la quantità più alta e 1h per quella più bassa.

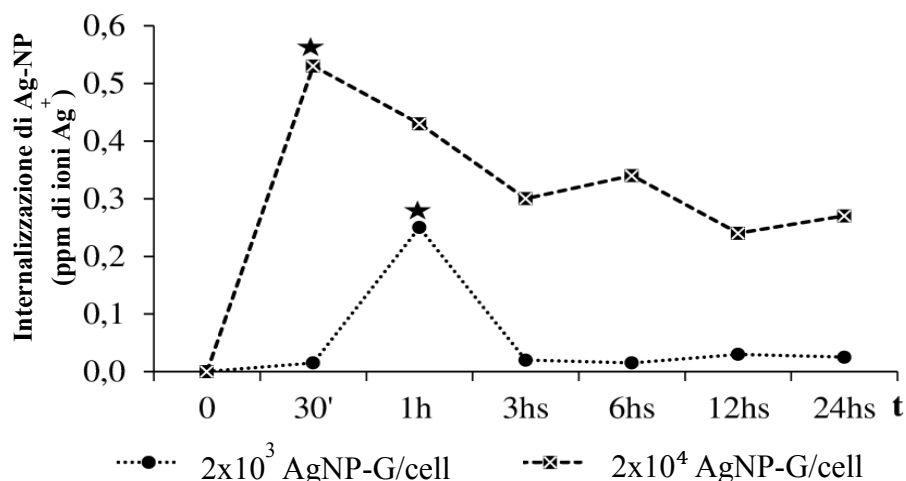


Fig. 11: cinetica dell'internalizzazione delle AgNP-G nei linfociti in 24h. L'uptake, valutato mediante GF-AAS, è stato calcolato indirettamente come ppm di ioni Ag⁺ internalizzati nelle cellule dal mezzo di coltura. I valori sono la media $\pm$ DS di 3 esperimenti indipendenti, ognuno in duplicato. * valori significativamente differenti dal rispettivo valore nello stesso tempo dei diversi trattamenti.

Effetti sulla vitalità cellulare

Gli effetti delle AgNP-G sulla vitalità cellulare sono riportati in Figura 12. Dai dati si evince che la vitalità cellulare è influenzata dalla presenza delle AgNP-G in modo tempo e dose-dipendente. Infatti è stata osservata una drastica riduzione della vitalità (90%) in presenza di 2×10^4 NP/cell. Al contrario, la quantità più bassa non è risultata tossica per i linfociti; anzi, ha portato ad un aumento della vitalità cellulare nei diversi tempi dell'esperimento, con un picco ad 1h di incubazione. In presenza delle due soluzioni glucosate i linfociti vanno incontro ad un aumento dose-dipendente della vitalità (Fig. 12a).

A causa delle sollecitazioni meccaniche dovute all'isolamento e alla spontanea apoptosi a cui vanno incontro, i linfociti presentano modificazioni morfologiche, quali allungamento, formazioni di *blebs*, nuclei picnotici, cromatina condensata, ecc. Circa il 50% dei linfociti controllo presentano, infatti, variazioni della morfologia a 24h (Fig. 12b). In presenza delle AgNP-G la percentuale di linfociti modificati aumenta significativamente; in particolare la quantità più alta di NP induce un maggiore aumento del numero di cellule modificate (circa il 70% dopo 30 minuti di incubazione e il 90% alla fine del trattamento) rispetto alla quantità più bassa (circa 20% dopo 30' e il 40% alla fine del trattamento).

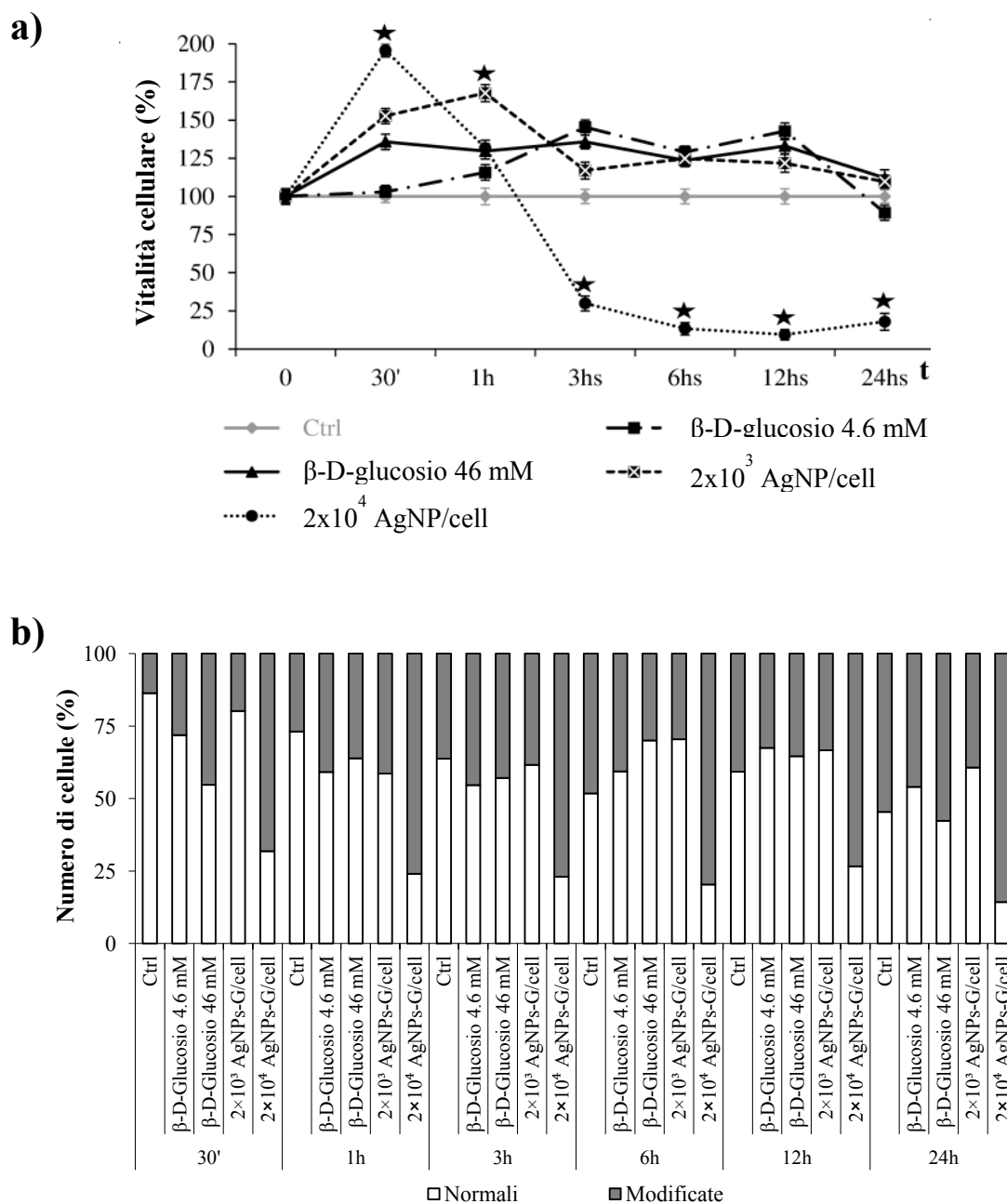


Fig. 12: valutazione della vitalità cellulare. a) La vitalità cellulare è stata valutata mediante test MTT. I valori sono riportati come percentuali rispetto ai valori controllo considerati come 100%. I valori sono la media $\pm$ DS di 3 esperimenti indipendenti, ognuno in duplicato. * valori significativamente differenti dal rispettivo valore nello stesso tempo dei diversi trattamenti. b) numero di cellule con modificazioni morfologiche, riportata come percentuale di linfociti modificati durante le 24h di esperimento. L'errore standard non supera il 3%.

Produzione di ROS nei linfociti umani incubati con AgNP-G.

L'isolamento e le procedure per il mantenimento in coltura, la presenza delle AgNP-G o dell'alta concentrazioni β -D-glucosio, sono fattori di stress per i linfociti come è risultato evidente dall'incremento della produzione di ROS (Fig. 13). Sono stati osservati livelli di ROS significativamente alti durante i primi 30-60 minuti in presenza delle due quantità di NP e delle due soluzioni glucosate rispetto ai valori dei linfociti controllo. Tali livelli rimangono alti in maniera significativa solo nei campioni incubati con la quantità più alta di NP fino alle 24h, con un picco tre volte maggiore rispetto al valore controllo a 12h.

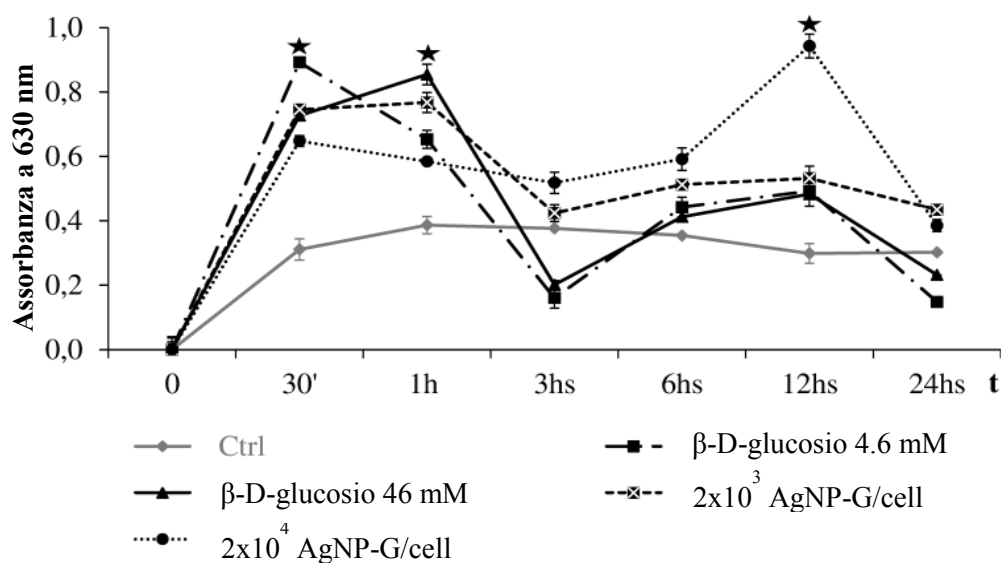


Fig.13: produzione di ROS. La produzione citoplasmatica di ROS è stata valutata mediante test NBT. I valori sono la media $\pm$ DS di 3 esperimenti indipendenti, ognuno in duplicato. * valori significativamente differenti dal rispettivo valore nello stesso tempo dei diversi trattamenti.

1.1.3 Studi *in vivo*

Il destino delle NP nell'ambiente acquatico, le loro interazioni con componenti biotiche e abiotiche, e il loro potenziale nel causare un danno sono ancora poco conosciuti, generando preoccupazioni sui rischi che possono comportare per la salute umana e ambientale.

Alla luce di quanto detto, le AgNP sono state utilizzate in uno studio di tossicità a breve e lungo termine su un organismo acquatico modello, lo Zebrafish (*Danio Rerio*), valutando la biodistribuzione delle NP nell'organismo, anche a livello subcellulare.

Sezioni di massa viscerale incluse in paraffina sono state analizzate mediante autometallografia, tecnica che permette di visualizzare i metalli come spot neri. L'analisi ha confermato l'assenza di AgNP-G nell'intestino (Fig. 14A), e nel fegato (Fig. 14B) di pesci non esposti a AgNP-G.

In individui esposti a AgNP-G, le NP sono state osservate nell'epitelio intestinale (Fig. 14C), in particolare nei microvilli degli enterociti. Nessuno spot evidente è stato rilevato nelle cellule caliciformi secretrici, né nel tessuto connettivo. Nel fegato, sono state osservate AgNP uniformemente distribuite negli epatociti (Fig. 14D).

L'intestino di pesci esposti a ioni Ag^+ presenta un discreto numero di *spot* nelle vescicole secretorie delle cellule caliciformi (Fig. 14E). Inoltre, in alcuni campioni, l'epitelio intestinale presenta una colorazione simile a quella dello stesso tessuto dopo l'esposizione alle AgNP. Nel caso del fegato di individui esposti a ioni Ag^+ , è stato osservato un elevato numero di *spot* in tutto il tessuto (Fig. 14F).

I risultati riportati in Tabella 2, relativi all'analisi semi-quantitativa, indicano un accumulo di metalli nel fegato e nell'intestino. Il tessuto più intensamente colorato dopo l'esposizione ad entrambe le forme di metallo è l'intestino di individui esposti a AgNP-G, seguito dal fegato di individui esposti agli ioni argento (Tab. 2).

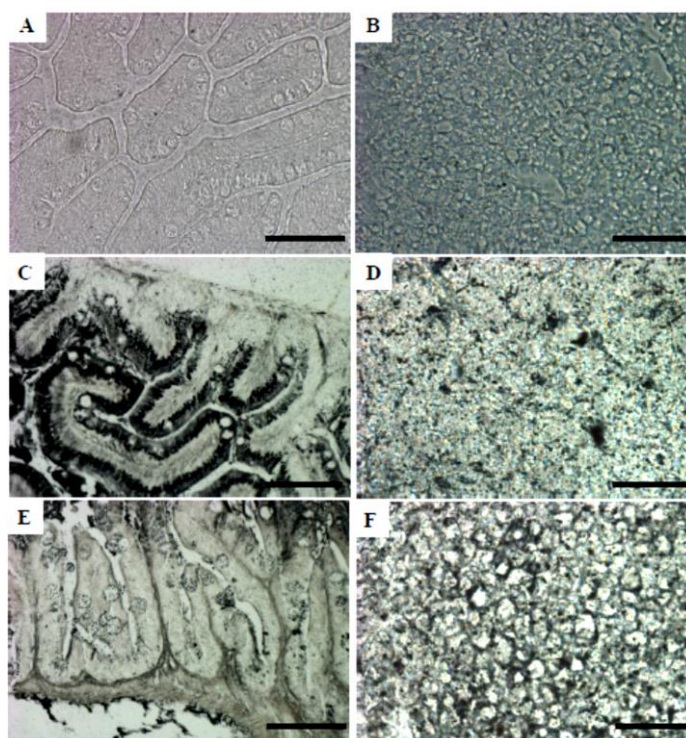


Fig. 14: Biodistribuzione delle AgNP. Micrografie di sezioni di massa viscerale in paraffina di *Zebrafish* adulti dopo autometallografia. A) Intestino controllo di *Zebrafish* adulto. B) Intestino di *Zebrafish* adulto esposto per 21 giorni a AgNP-G. C) Intestino di *Zebrafish* adulto esposto per 21 giorni a ioni Ag^+ . D) Fegato controllo di *Zebrafish* adulto. E) Fegato di *Zebrafish* adulto esposto per 21 gg a AgNP-G. F) Fegato di *Zebrafish* adulto esposto per 21 giorni a ioni Ag^+ . Bar= 100µm (A-C) e 50µm (D-F).

Tab. 2: analisi semiquantitativa della quantità di AgNP presenti nell'intestino e nel fegato di *Zebrafish* adulto esposti per 21 giorni.

Organismi	Controllo		AgNP-G		Ioni argento	
	Intestino	Fegato	Intestino	Fegato	Intestino	Fegato
1	-	-	++	++	+	++
2	-	-	+	+	++	+
3	NT	NT	++	++	++	++
4	-	-	+	+	+	NT
5	-	-	+++	++	++	++
6	NT	NT	+++	++	+	++
7	-	-	NT	+	+	++
8	-	-	+++	NT	+	++
9	-	-	++	+	++	++
10	-	-	++	-	++	NT
Media dei +	0	0	2	1.3	1.5	1.9

(-) assenza di AgNP nel tessuto; (+) presenza di piccoli spot omogeneamente distribuiti nel tessuto; (++) presenza di piccoli spot omogeneamente distribuiti nel tessuto e di grossi agglomerati; (+++) presenza di spot di grandi dimensioni omogeneamente distribuiti e di abbondanti depositi; (NT) assenza di tessuto specifico nel campione.

I campioni di branchie (Fig. 15A), fegato (Fig. 15B) e intestino (Fig. 15C) sono stati analizzati anche mediante FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) allo scopo di rilevare in modo specifico la presenza di argento all'interno degli organi. Dopo l'analisi mediante diffrazione ai raggi X delle sezioni in paraffina, è stato ottenuto uno spettro (Fig. 15 D-L) che mostra la composizione elementare di ogni campione.

Gli spettri dei campioni di branchia (Fig. 15D), fegato (Fig. 15E) e intestino (Fig. 15F) non esposti a AgNP non mostrano picchi nell'intervallo di energia corrispondente all'argento. L'analisi dei campioni relativi ai pesci esposti a AgNP ha rivelato la presenza di diversi picchi che indicano la comparsa di diverse forme d'argento. Questi picchi sono evidenti soprattutto nelle branchie (Fig. 15G), con un picco più alto al centro del range di energia e un secondo picco a sinistra (Fig. 15J). I campioni di fegato mostrano diversi picchi di intensità inferiore (Fig. 15H, K) corrispondenti alla presenza di argento. Infine, i campioni relativi all'intestino (Fig. 15I) mostrano alcuni picchi nell'intervallo di energia dell'argento di intensità più bassa rispetto a quelli degli altri due organi (Fig. 15L).

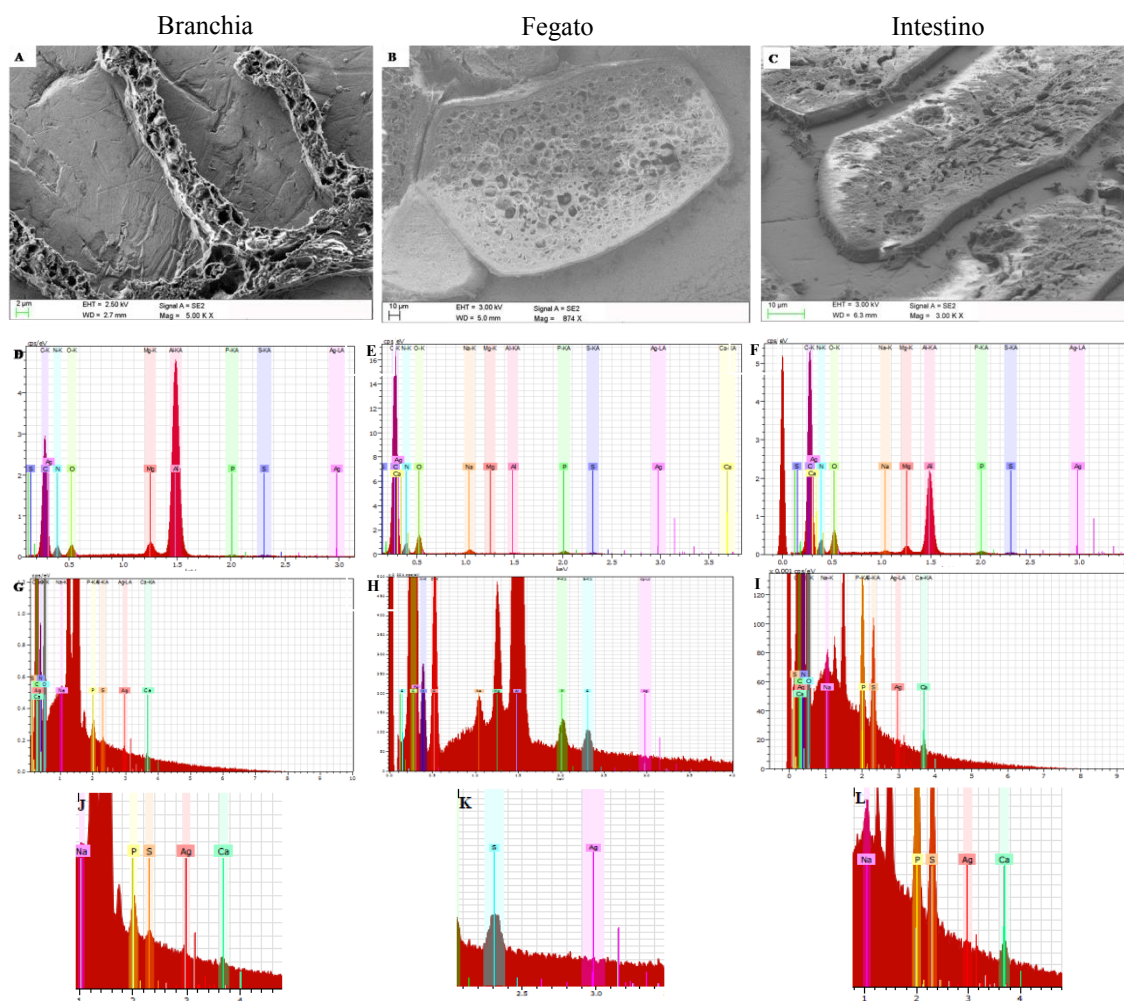


Fig. 15: localizzazione di AgNP nei tessuti di *Zebrafish* mediante FESEM. Micrografie di sezioni in paraffina di branchia (A), fegato (B) e intestino (C) di pesci esposti per 21gg a AgNP-G. Bar=10µm. Spettri ottenuti dall'analisi mediante diffrazione ai raggi X di branchia (D), fegato (E) e intestino (F) dei pesci controllo e branchia (G), fegato (H) e intestino (I) dei pesci esposti a AgNP-G per 21 giorni. In basso, dettagli degli intervalli di energia relativi all'argento dei campioni di branchia (J), fegato (K) e intestino (L) dei pesci esposti a AgNP-G per 21 giorni.

La presenza di AgNP-G nelle branchie e nel fegato e la loro distribuzione intracellulare sono stati studiati attraverso microscopia TEM. Strutture elettrondense simili a NP sono state analizzate mediante microanalisi a raggi X al fine di verificare la loro composizione chimica. Per quanto riguarda la presenza di NP nella branchia, singole AgNP sono state osservate nel citoplasma delle cellule epiteliali della lamella secondaria già a partire da 3 giorni di esposizione (Fig. 16A). Anche nel fegato, singole AgNP sono state osservate nel nucleo degli epatociti (Fig. 16B) e in altri organelli, come i mitocondri (Fig. 17C-D).

La composizione chimica delle strutture elettrondense identificate come AgNP è stata confermata come argento dopo l'analisi a raggi X (Fig. 16 A,B).

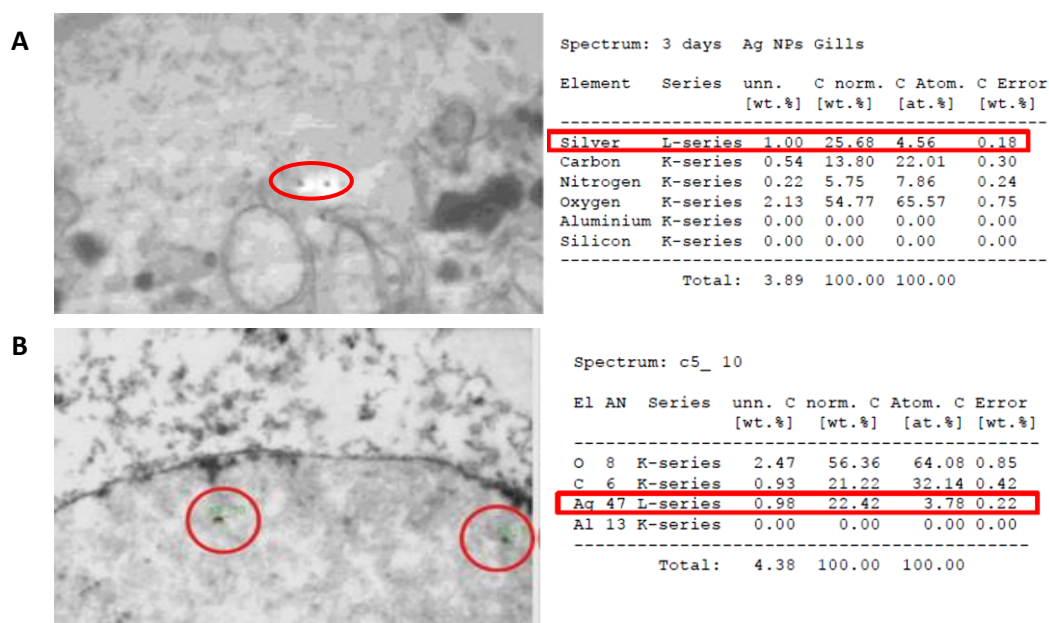


Fig. 16: distribuzione subcellulare delle AgNP. Sezioni di branchia e fegato di *Zebrafish*, esposti a AgNP-G per 3 giorni, osservate mediante TEM e relativa analisi ai raggi X. Si può osservare la localizzazione di AgNP nel citoplasma di una cellula branchiale (A) e nel nucleo di un epatocita (B), confermata dall'analisi X-Ray.

Inoltre, sono stati valutati anche gli eventuali danni ultrastrutturali delle branchie e del fegato di pesci esposti a AgNP-G. Le cellule branchiali (Fig. 17A) dei campioni controllo presentano una struttura cellulare ben conservata, con membrane cellulari e organelli ben strutturati. I diversi tipi di cellule branchiali di individui esposti a AgNP-G non sembrano presentare alcun danno istologico (Fig. 17B-C-D). Gli epatociti dei pesci controllo (Fig. 17E-F) presentano membrana cellulare integra e organelli ben strutturati (Fig. 17B), mentre gli epatociti di *zebrafish* esposti a AgNP presentano una maggiore presenza di gocce lipidiche e gocce di glicogeno (Fig. 17G). Inoltre, si possono osservare anche mitocondri danneggiati con un aumento dello spazio intermembrana (Fig. 17H).

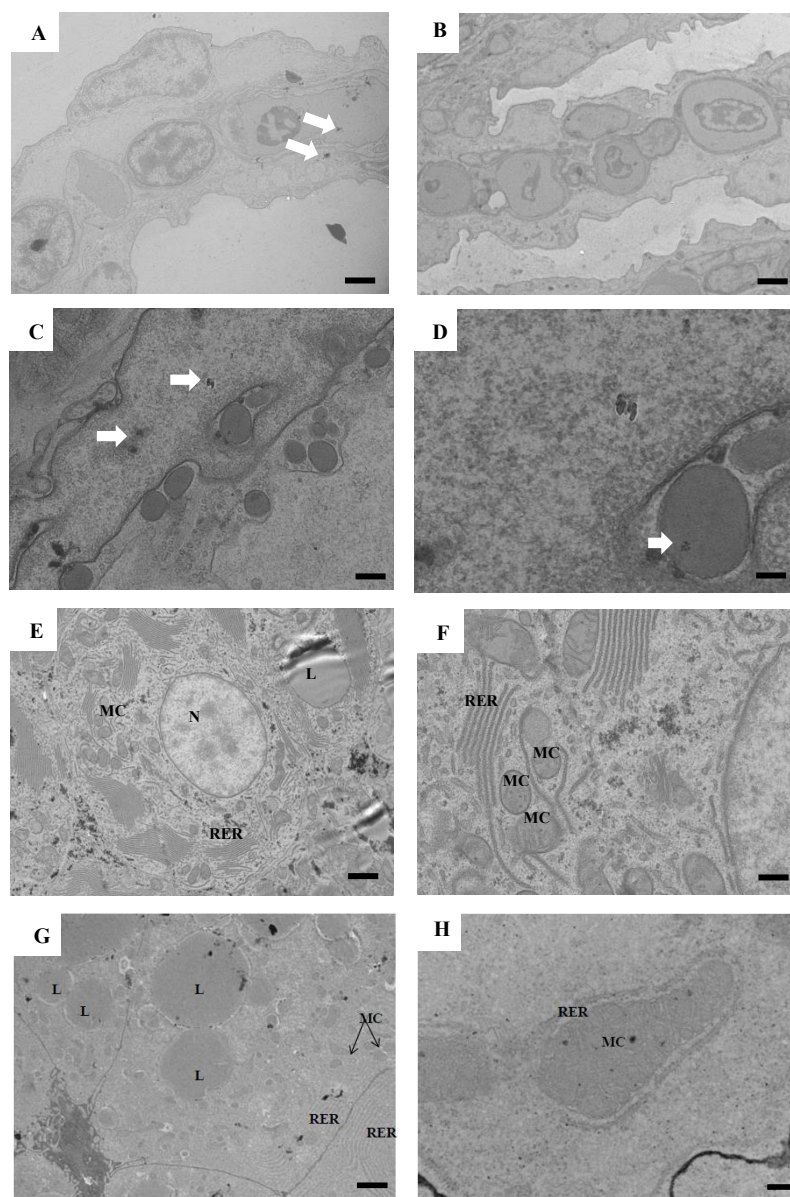


Fig. 17: micrografie di sezioni ultrafini di branchie e fegato di *Zebrafish* esposti a AgNP, osservate mediante TEM: A) lamella secondaria di branchia di *Zebrafish* controllo; B) lamella secondaria di branchia di *Zebrafish* esposti a AgNP-G per 21 giorni. Cellula pilare (PC), cellula del sangue (BC), cellula epiteliale (EC), cellula endoteliale (EnC). C) e D) branchie di *Zebrafish* esposti a AgNP per 3 giorni. Le frecce indicano la presenza di AgNP. E) e F) epatociti di *Zebrafish* controllo; G) e H) epatociti di *Zebrafish* esposti a AgNP. Nucleo (N), mitocondrio (MC), reticolo endoplasmatico rugoso (RER) gocce lipidiche (L). La freccia in (B) indica la presenza di AgNP-G, visibili come strutture elettrondense. Bar= 2 μ m (A e B), 1 μ m (E), 200nm (F, G ed H), 100nm (D).

1.2 Nanoparticelle di oro (AuNP)

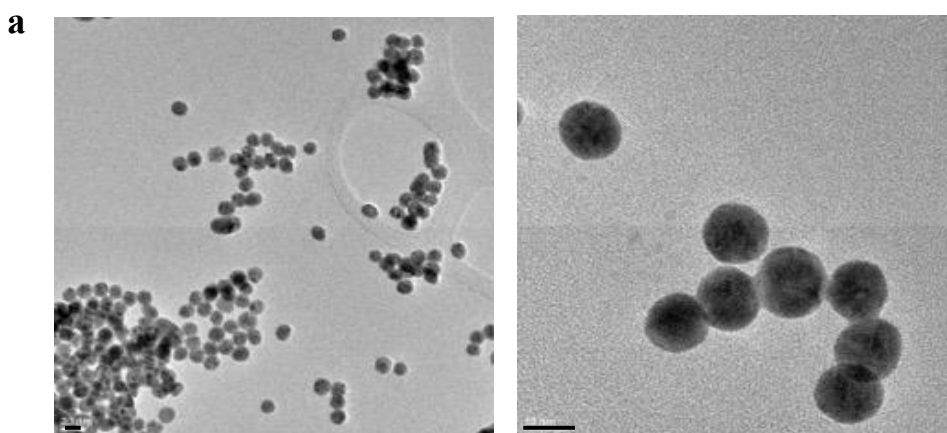
1.2.1 Caratterizzazione di AuNP.

Le AuNP presentano una caratteristica ottica particolare comunemente denominata “risonanza plasmonica superficiale localizzata” (LSPR), che rappresenta l'oscillazione collettiva di elettroni nella banda di conduzione delle AuNP in risonanza con una specifica lunghezza d'onda della luce incidente. La LSPR delle AuNP risulta in una banda di assorbanza nella regione visibile (500 nm-600 nm), che può essere verificata mediante spettroscopia UV-Vis.

Lo spettro LSPR, inoltre, dipende sia dalle dimensioni che dalla forma delle AuNP. I picchi di assorbanza aumentano con l'aumentare del diametro delle particelle.

La caratterizzazione delle dimensioni delle AuNP sintetizzate per questo lavoro è stata eseguita utilizzando la spettroscopia UV-visibile e la microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

La soluzione colloidale è stata analizzata mediante spettroscopia UV-Vis in assorbanza, osservando il caratteristico picco a 520 nm (Fig. 18b) caratteristico di NP sferiche, la cui forma e dimensione è stata confermata mediante TEM (Fig. 18a). L'analisi microscopica ha permesso di osservare delle NP omogenee e uniformi di forma sferica, con una distribuzione dimensionale monodispersa compresa nel *range* di 8-17 nm e un diametro medio di 12 nm (Fig. 18 a,c).



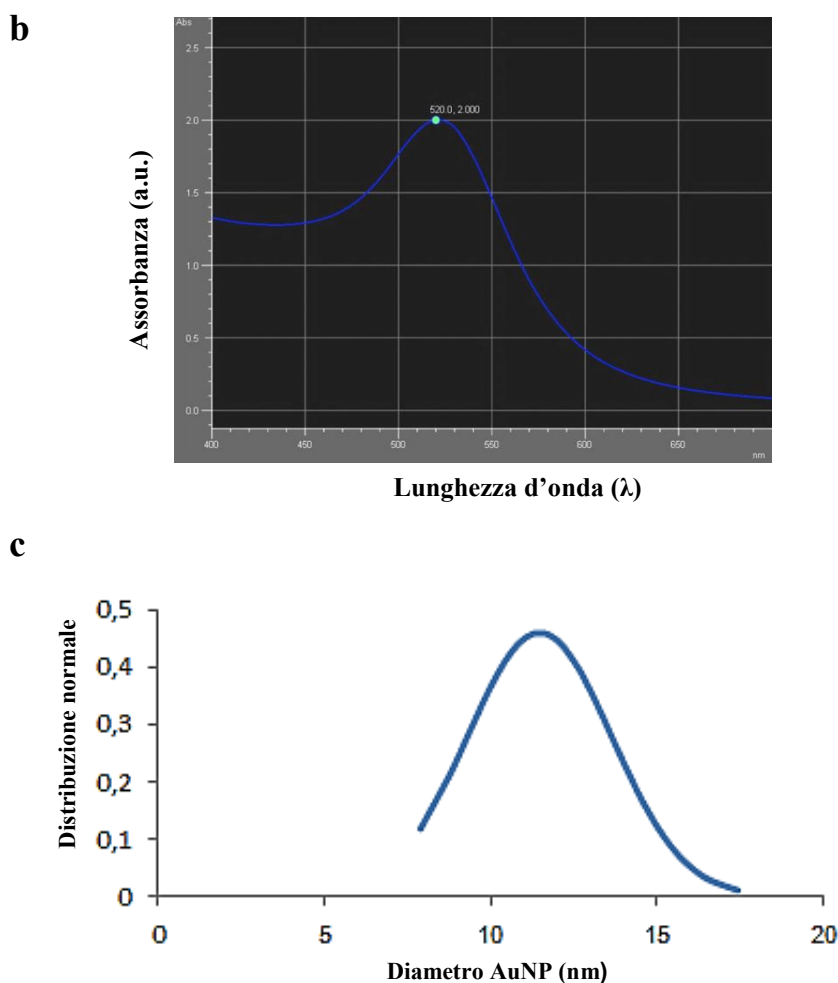


Fig. 18: caratterizzazione delle AuNP. a) Micrografie TEM di AuNP, monodisperse in soluzione acquosa e aventi un diametro di circa 12 nm. Bar = 10 nm; b) Spettro UV-Visibile riportato come assorbanza (a.u., asse y) vs lunghezza d'onda (nm, asse x) delle AuNP aventi un picco di assorbanza a 520 nm; (c) distribuzione normale delle dimensioni delle AuNP.

1.2.2 Biodistribuzione in vivo

Gli organi prelevati e processati in seguito al trattamento dell'animale come riportato nella sezione Materiali e Metodi (paragrafo 1.1.4.3) sono stati sezionati ed osservati mediante TEM e STEM con relativa microanalisi.

L'analisi mediante TEM ha permesso di verificare la biodistribuzione delle AuNP nei diversi organi di topo, valutandone anche la distribuzione a livello subcellulare.

La Tabella 3 descrive schematicamente la biodistribuzione, in termini di analisi semiquantitativa, delle AuNP osservate nei diversi organi; dati dimostrati anche mediante micrografie TEM riportate in Figura 19.

Tab. 3: analisi semiquantitativa della biodistribuzione delle AuNP osservate nei diversi organi mediante TEM.

ORGANO	QUANTITA' (semiquantitativa)	LOCALIZZAZIONE
Cervello	++	Cellule di Schwann: superavvolgimenti di mielina
Rene	++	Globuli rossi e cortex
Milza	++	Endotelio fenestrato dei vasi sanguigni Nucleo; mitocondri; RER (reticolo endoplasmatico rugoso)
Fegato	++	Cellule di Kupffer e cellule endoteliali: fagosomi, nucleo
Pancreas	+	RER
Intestino	++	Cellule di goblet: muco Spazi tra gli enterociti Connettivo dei villi: macrofagi (nei fagosomi); fibroblasti (nucleo)
Cistifellea	-	
Stomaco	-	
Cuore	++	Mitocondri; lisosomi; citoplasma vicino ai mitocondri

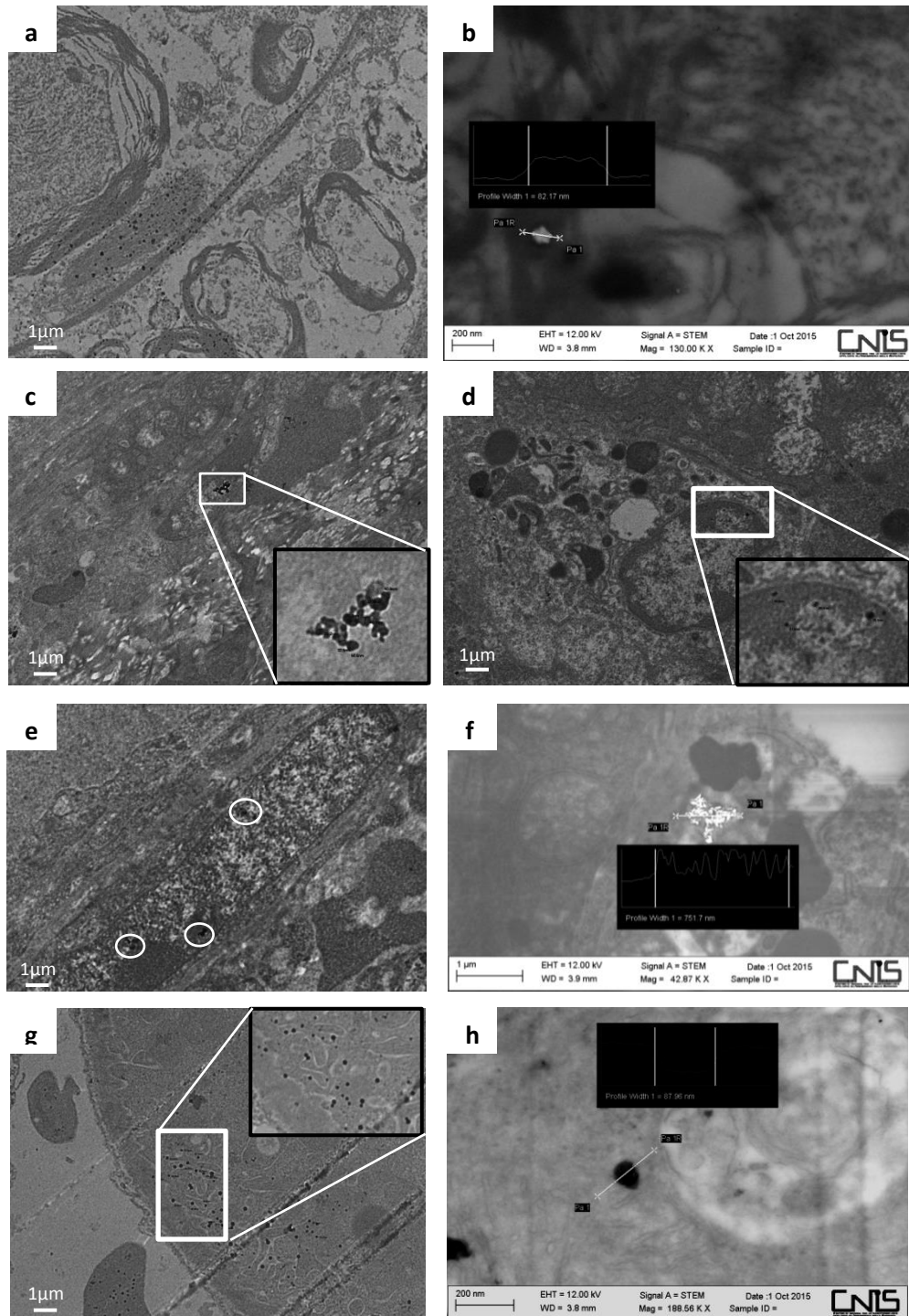
(-) assenza di AuNP nel tessuto; (+) presenza di piccoli spot omogeneamente distribuiti nel tessuto; (++) presenza maggiore di AuNP nel tessuto anche come aggregati.

L'analisi ha dimostrato che le AuNP superano le barriere biologiche localizzandosi in quasi tutti gli organi. Si localizzano nel cervello, rene, milza, fegato, pancreas, intestino e cuore. A livello cerebrale (Fig. 19 a,b), le NP sono presenti negli avvolgimenti mielinici delle cellule di Schwann. Nel fegato (Fig. 19 c-f) le AuNP sono state osservate nei vacuoli delle cellule endoteliali dei sinusoidi, in particolare nel nucleo appaiono in forma di piccoli cluster.

Nel pancreas (Fig. 19i) le NP sono state osservate a livello citoplasmatico, ad esempio tra le cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso; anche nel rene (Fig. 19g,h) è stata trovata una grande quantità di NP a livello della corticale ed, inoltre, nei globuli rossi circolanti nei vasi.

A livello intestinale (Fig. 19m,n) sono state trovate NP a livello ghiandolare, in particolare nel muco delle cellule di Goblet e negli spazi tra gli enterociti. Inoltre, a livello dei villi, le NP si sono localizzate nei fagosomi dei macrofagi e nel nucleo dei fibroblasti.

Nella milza (Fig. 19k,l) sono state osservate in diversi siti dell'endotelio fenestrato dei vasi sanguigni, nei nuclei, nei mitocondri e nel reticolo endoplasmatico rugoso. In ultimo, nel cuore (Fig. 19j) le NP si sono distribuite a livello citoplasmatico, in particolare nei mitocondri e nei lisosomi.



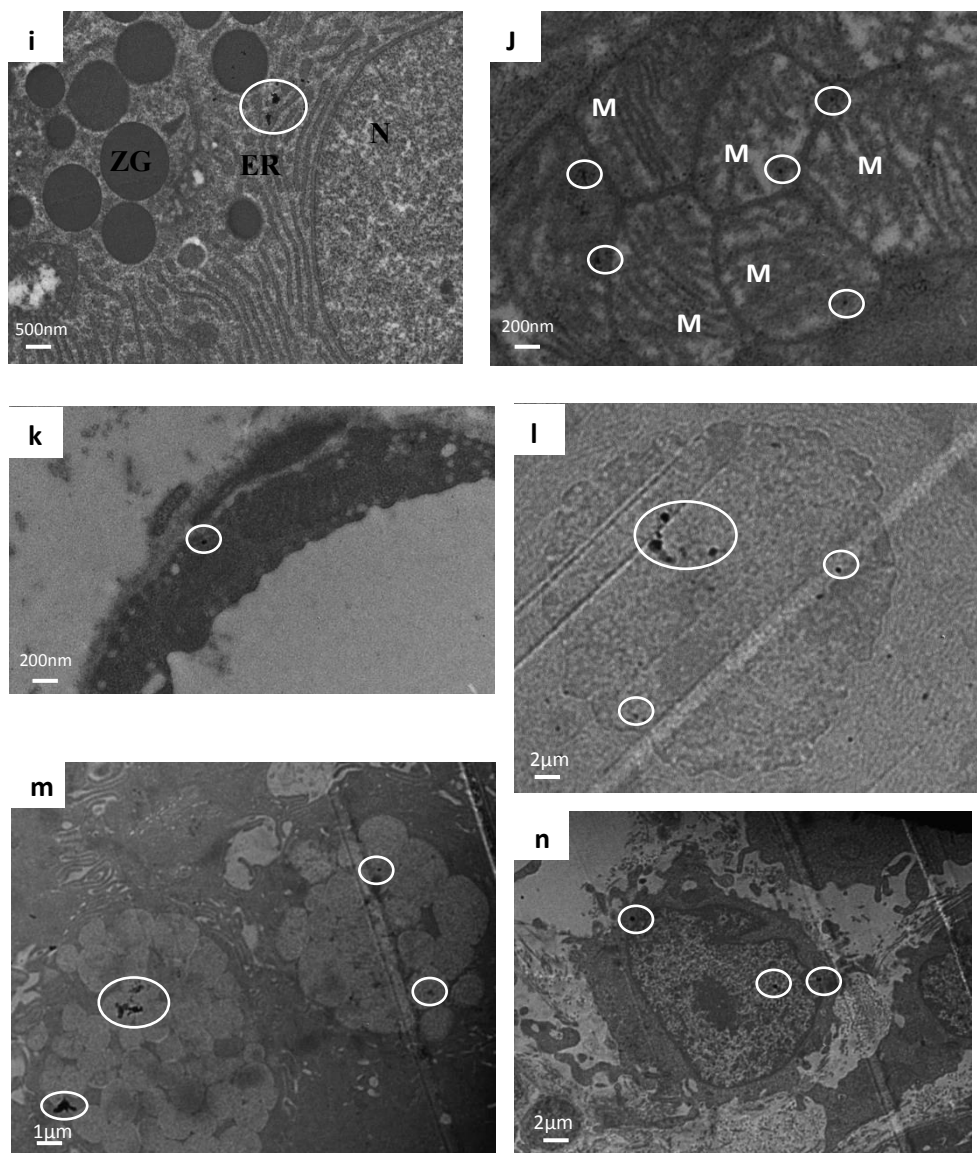


Fig. 19: biodistribuzione delle AuNP in un modello murino. Micrografie di sezioni di organi di topo, in cui sono state iniettate le AuNP, osservate mediante TEM e STEM. Nei cerchi in bianco sono evidenziate le NP presenti come unità singole o come aggregati.

(a) (b) Cervello. (c) (d) (e) (f) Fegato. (g) (h) Rene. (i) Pancreas. (J) Cuore. (k)-(l) Milza. (m) (n) Intestino.

2. Nanoparticelle NON metalliche

2.1 Nanoparticelle di carbonato di calcio (CaCO_3NP)

2.1.1 Caratterizzazione delle CaCO_3NP

TEM

Le CaCO_3NP utilizzate in questo lavoro sono state sintetizzate mediante la tecnica *spray drying* e sono state caratterizzate mediante microscopia elettronica e tecniche di spettroscopia. Come riportato in Figura 20, le NP hanno forma ellissoidale, con diametro maggiore di 80-100 nm e un diametro minore di 50 nm.

Durante le procedure di sintesi l'alta temperatura provoca una rapida evaporazione dell'acqua dalla miscela di reazione e consente la formazione di polvere di CaCO_3 e NaCl, che si accumulano in un recipiente di raccolta; il sottoprodotto della reazione (NaCl) può essere facilmente rimosso mediante successivi lavaggi in acqua.

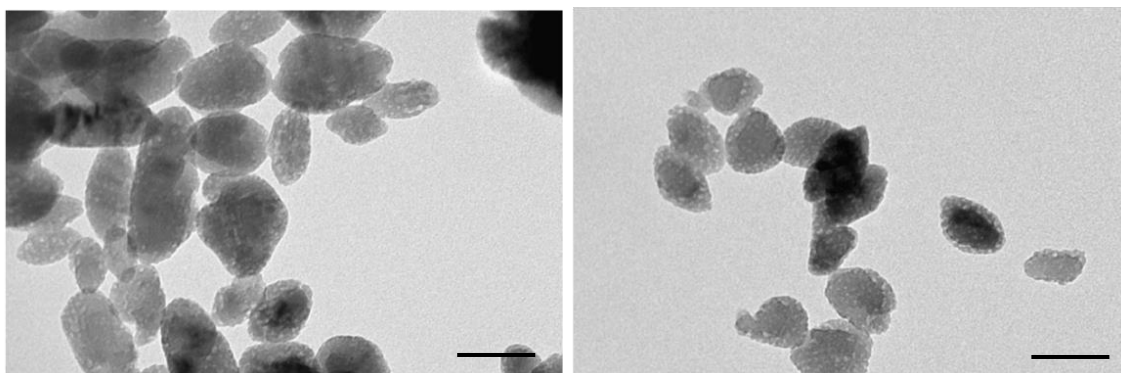


Fig. 20: micrografie TEM di CaCO_3 NP sintetizzate in soluzione acquosa. Le CaCO_3NP hanno forma ellissoidale con un diametro maggiore di 80-100 nm e uno minore di 50 nm. Bar=100nm.

L'applicazione di CaCO_3NP è strettamente legata alla loro forma cristallina e alla loro stabilità. La calcite è la forma cristallina di CaCO_3 termodinamicamente più stabile, tuttavia la costante di solubilità del carbonato di calcio dipende dalla concentrazione di elettroliti e dal pH della soluzione. Le CaCO_3NP cristallizzano, infatti, molto rapidamente in soluzione acquosa senza additivi.

Sono state testate diverse tecniche di sintesi allo scopo di controllare la reazione di cristallizzazione delle particelle di CaCO_3 per evitare la trasformazione di forme cristalline stabili in forme instabili e la loro crescita in soluzione acquosa.

La stabilità delle CaCO_3NP può essere controllata mediante l'uso di surfattanti e/o additivi organici e inorganici solubili, come sopra menzionato. La crescita dei cristalli e la loro nucleazione consiste in un processo di dissoluzione/ri-precipitazione mediata da molecole di H_2O e ioni presenti intorno alla superficie delle NP.

La cristallizzazione delle CaCO_3NP a temperatura ambiente in soluzione acquosa risulta evidente in Figura 21a. Dopo 24h in H_2O (pH 8) le NP crescono formando microcristalli. Si è pensato dunque ad una strategia per controllare la crescita mediante nucleazione delle NP. Le NP sono state risospese in isopropanolo, il quale provoca la riduzione della solubilità delle CaCO_3NP , bloccando la diffusione degli ioni e quindi la crescita di cristalli. La forma cristallina non risulta influenzata in presenza di isopropanolo, come risulta dall'immagine TEM in Figura 21b che mostra le CaCO_3NP dopo la dispersione in soluzione alcolica per 7 giorni.

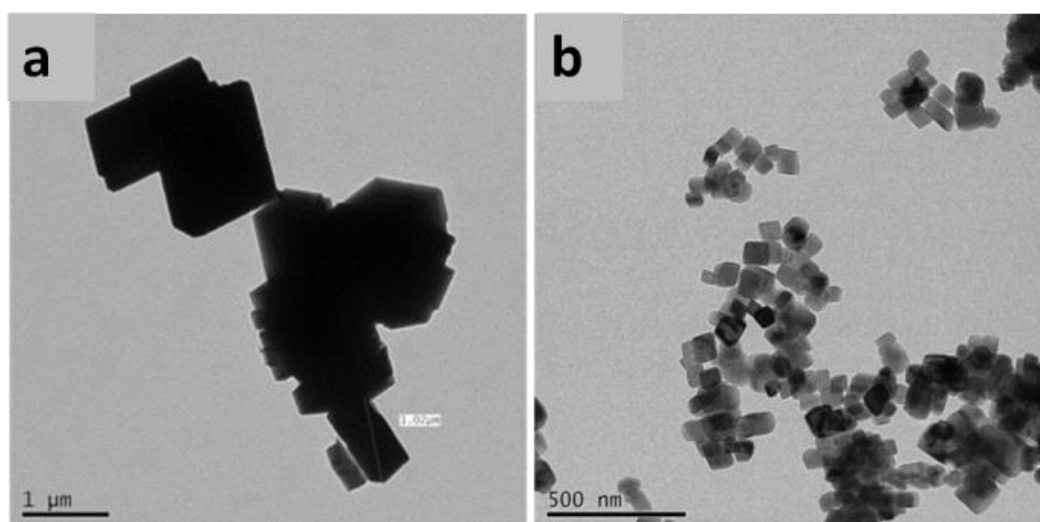


Fig. 21: a) micrografie TEM di CaCO_3NP sintetizzate in soluzione acquosa dopo 24h a temperatura ambiente. b) micrografie TEM di CaCO_3 NP dopo 7 giorni dalla risospensione in isopropanolo.

Un altro fattore che influenza la stabilità delle NP è l'umidità. La metodica, a tale scopo, prevede la rimozione di tutta la componente liquida, ottenendo una polvere bianca. Anche in questo caso, l'utilizzo o meno dell'isopropanolo influenza la stabilità delle NP in polvere. In Figura 22 a,b, infatti, si può osservare come le NP essiccate mediante rimozione di tutta l' H_2O e conservate per 15 e 30 giorni sono visibili come aggregati formati da cristalli allungati. La cristallizzazione delle NP è

fortemente inibita nel caso della polvere ottenuta mediante evaporazione dell'isopropanolo. In questo caso la forma e le dimensioni delle NP rimangono invariate fino a 6 settimane di conservazione (Fig. 22 c,d).

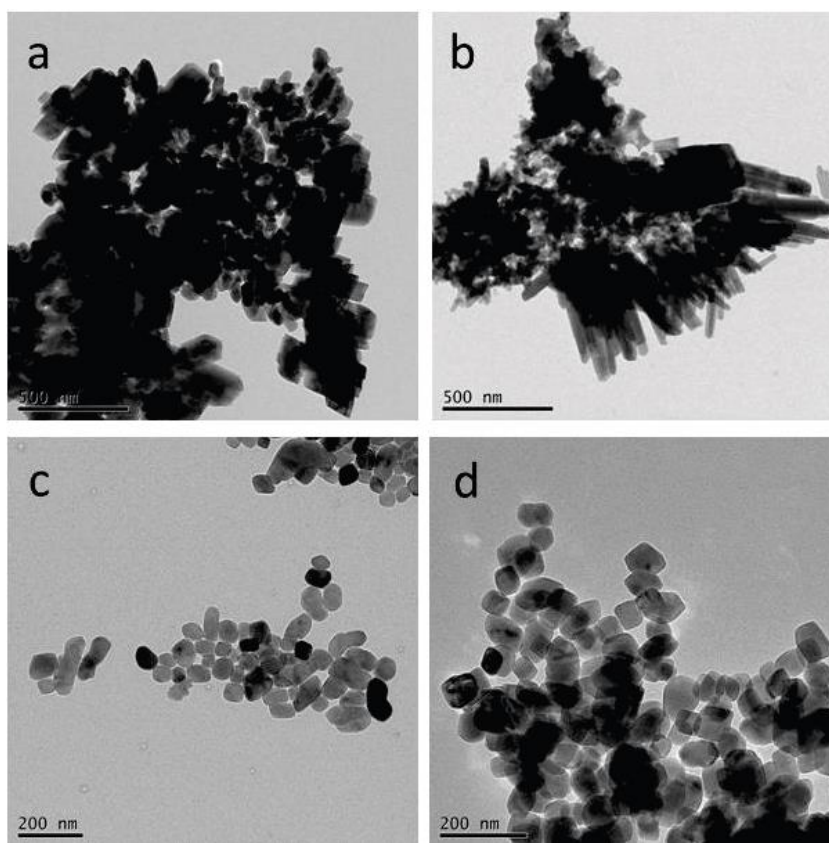


Fig. 22: micrografie TEM di polvere di CaCO_3NP dopo 15h giorni (a) e 30 giorni (b) dalla rimozione dell' H_2O e 3 settimane (c) e 6 settimane (d) dalla rimozione di isopropanolo.

Analisi elementare mediante diffrazione ai raggi X e spettroscopia infrarossa

Il diffrattogramma comprende una serie di picchi o riflessi aventi diverse intensità e posizioni angolari relative alle varie fasi presenti nel campione indagato. Il diffrattogramma riportato in Figura 23, relativo all'analisi delle polveri di CaCO_3NP in isopropanolo, mostra i caratteristici picchi che corrispondono al diffrattogramma della calcite pura.

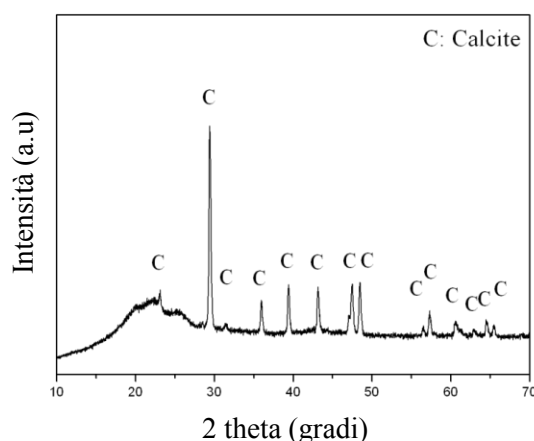


Fig. 23: grafico XRD relativo all'analisi mediante diffrazione ai raggi X delle CaCO_3NP .

Le CaCO_3 NP sintetizzate sono state sottoposte anche ad analisi mediante spettroscopia infrarossa.

Gli spettri FT-IR dei nanocristalli di CaCO_3 sono riportati in Figura 24. I dati spettrali ottenuti per i campioni rivelano un ampio picco di assorbimento relativo a CO_3^{2-} a $\sim 1455\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1082\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1786\text{ cm}^{-1}$, $\sim 855\text{ cm}^{-1}$, e $\sim 709\text{ cm}^{-1}$, che risultano essere i tratti caratteristici comuni degli ioni carbonato nel CaCO_3 e rappresentano gli stati fondamentali di vibrazione per questa molecola (Raju *et al.*, 2010). Tuttavia, le bande osservate a $\sim 1082\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 855\text{ cm}^{-1}$ sono state valutate come ν_1 *stretching* simmetrico e ν_2 *bending* fuori asse di CO_3^{2-} rispettivamente.

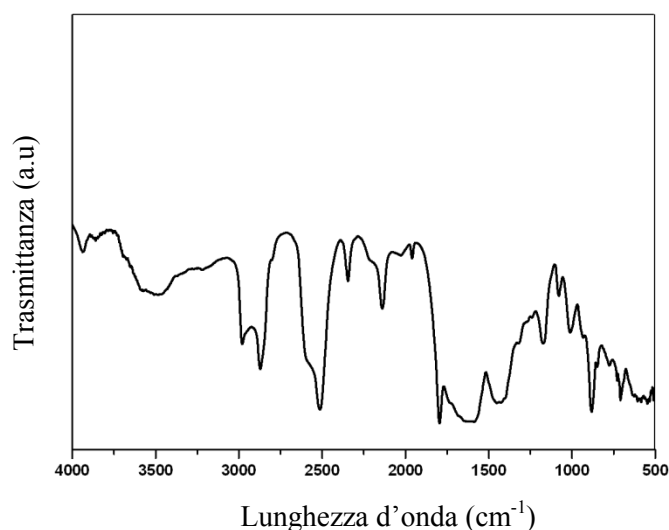


Fig. 24: spettro FT-IR delle CaCO_3NP

Analisi di stabilità mediante valutazione del potenziale ζ

Per verificare la stabilità delle NP è stato valutato il potenziale ζ delle NP mediante (Electron Energy loss spectroscopy) EELS. Le CaCO_3NP sono state risospese in acqua ultra-pura, soluzione salina tampone fosfato (pH 7.4) o in terreno di coltura.

Il potenziale ζ è stato misurato in funzione del pH e la carica di superficie delle NP è stata monitorata a diversi pH (2-10) aggiungendo 0,1 M HCl o NaOH alla sospensione. Come si può vedere dal grafico in Figura 25, la carica superficiale del CaCO_3NP si sposta verso valori positivi con la diminuzione del pH. Questo cambiamento nel potenziale è il risultato della riduzione della concentrazione di ioni carbonato, $[\text{CO}_2^-]$, causato dalla sua protonazione, dovuta all'aumento della concentrazione di Ca^{2+} . Questo profilo è in accordo con tutte le titolazioni di NP stabili.

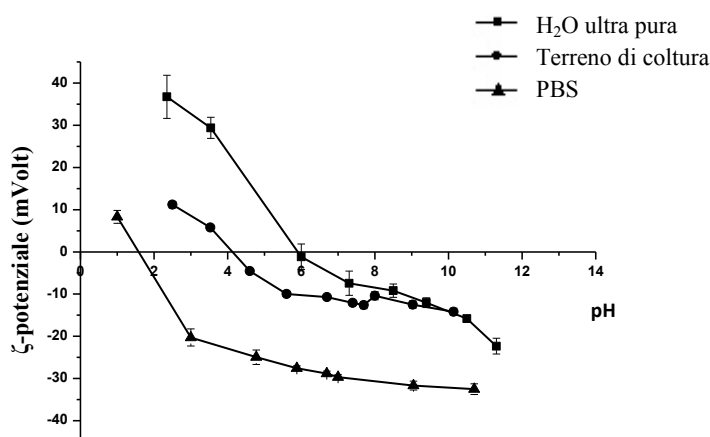


Fig. 25: variazione del potenziale ζ delle CaCO_3NP sospese in differenti solventi: acqua ultra pura (quadrato), terreno di coltura (cerchio) e tampone PBS (triangolo). Ogni valore delle tre curve è stato acquisito per tre volte.

In particolare, la superficie delle CaCO_3NP disperse in acqua ultra pura (quadrato) risulta carica a causa della presenza del gruppo idrossilico. La carica dipende dal valore di pH della sospensione e può essere stimata mediante valutazione del potenziale ζ , cioè il potenziale relativo al doppio strato di ioni intorno alle NP.

Il potenziale ζ è stato misurato sospendendo le polveri in tampone fosfato 10 mM (PBS) (triangolo). Come conseguenza dell'elevata forza ionica della sospensione e

grazie ad un forte assorbimento di ioni fosfato sulla superficie, è stata osservata una diminuzione dei valori di potenziale ζ .

Per simulare le condizioni biologiche abbiamo monitorato l'andamento del valore di ζ potenziale in funzione del pH anche in un mezzo di coltura, il terreno DMEM. L'analisi è stata eseguita sospendendo le CaCO_3NP in terreno completo integrato con siero fetale bovino al 10% (FBS). La misurazione è effettuata dopo 30 minuti, in modo da assicurare l'interazione delle proteine del siero con la superficie delle NP. I dati riportati in Figura 25 dimostrano che la presenza delle proteine contenute nel siero (che formano le cosiddette proteine corona attorno alle NP) portano ad un appiannamento della curva rispetto agli altri casi.

Tutte le misurazioni sono state eseguite a temperatura fisiologica (37°C).

2.1.2 Valutazione *in vitro* degli effetti di CaCO_3NP sulle cellule HeLa e MCF7

Internalizzazione e localizzazione intracellulare delle CaCO_3NP

Una delle caratteristiche che rendono le CaCO_3NP interessanti, è la possibilità di funzionalizzarle rendendole fluorescenti. È stata utilizzata la tecnica Layer by Layer (LBL), come riportato nel paragrafo 2.1.3 della sezione Materiali e Metodi. La deposizione di ogni strato è stata monitorata misurando il potenziale ζ della superficie delle CaCO_3 NP. In Figura 26 si può osservare l'alternanza del potenziale superficiale tra valori negativi e positivi, valori che convalidano l'efficacia del metodo.

Le CaCO_3NP , rese fluorescenti coniugando l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) al polimero PAH nell'ultimo strato, sono state utilizzate per quantificare e localizzare le NP all'interno delle cellule.

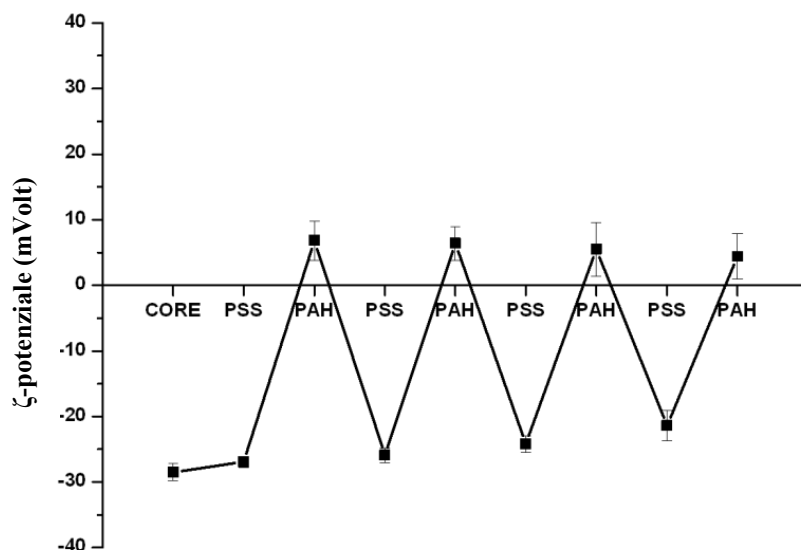


Fig. 26: efficacia del metodo di funzionalizzazione. Alternanza del potenziale ζ delle CaCO_3NP , dovuta alla deposizione, mediante la tecnica LBL, di una coppia polielettroliti sintetici e non biodegradabili (PAH e PSS).

Il tempo di internalizzazione è un fattore essenziale per valutare l'efficienza dell'entrata in cellula delle NP.

L'internalizzazione delle CaCO_3NP da parte delle cellule è stato valutato mediante uno studio quantitativo. Gli esperimenti controllo, eseguiti incubando le cellule HeLa e le cellule MCF7 con il terreno contenente il FITC rilasciato dalle NP, non hanno mostrato alcun assorbimento significativo (dati non mostrati), ciò ha dimostrato che il FITC rilasciato non può essere internalizzato direttamente dalle cellule e non pregiudica l'efficienza dell'entrata in cellula. I dati riportati in Figura 27 confermano una localizzazione intracellulare di CaCO_3NP dipendente dal tempo di incubazione. In particolare, a 3 h dall'inizio dell'esposizione alle NP, le cellule raggiungono un'efficienza di internalizzazione di oltre il 90% in entrambe le linee cellulari (Fig. 27). In particolare, le cellule HeLa internalizzano in maniera massiva e più velocemente le NP, già a partire da 40 minuti. L'*uptake* giunge poi ad una fase di *plateau* una volta che il meccanismo di assorbimento e quello di eliminazione delle NP raggiungono un equilibrio.

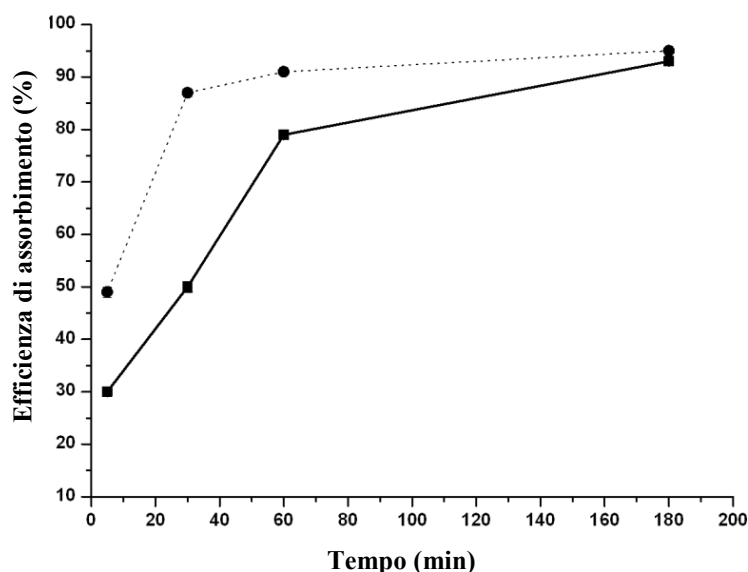


Fig. 27: cinetica di assorbimento delle CaCO_3NP fluorescenti da parte delle cellule HeLa (linea tratteggiata) e delle cellule MCF7 (linea continua). I singoli valori sono stati ottenuti calcolando la quantità di fluorescenza presente nei campioni applicando la formula: $\text{efficienza di internalizzazione (\%)} = (W_{\text{campione}}/W_{\text{totale}}) \times 100$. I dati rappresentano la media $\pm$ DS di 3 esperimenti indipendenti.

Per valutare la cinetica di internalizzazione delle CaCO_3NP fluorescenti, cariche positivamente, le cellule HeLa e MCF-7 sono state incubate in presenza di $1\mu\text{g/ml}$ di NP per 3h, 8h e 24h; l'internalizzazione è stata valutata mediante microscopia confocale.

È stata valutata la loro localizzazione mediante marcatura del citoscheletro di actina e del nucleo in entrambe le linee cellulari tumorali HeLa (Fig. 28) e MCF-7 (Fig. 29). La distribuzione delle NP è stata verificata a tempi brevi e tempi più lunghi, 3h, 8h e 24h.

Come mostrato nelle Figure 28 e 29, le NP penetrano velocemente nelle cellule e si localizzano in un primo momento a livello del citoplasma, successivamente si spostano verso la regione perinucleare e infine entrano nel nucleo. Ciò conferma che la localizzazione intracellulare delle CaCO_3NP è dipendente dal tempo di incubazione. Inoltre, come evidente nelle Figure, nonostante sia stata utilizzata la stessa concentrazione di NP ($1\mu\text{g/ml}$), la quantità di NP internalizzate risulta maggiore nel caso delle cellule HeLa rispetto alle cellule MCF7, indicando così una maggiore attività di ingestione da parte delle cellule HeLa.

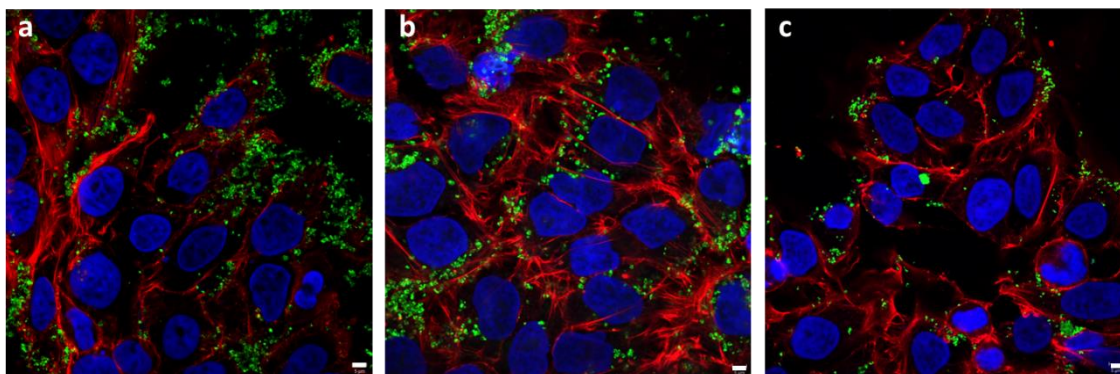


Fig. 28: analisi confocale dell'internalizzazione delle CaCO_3NP . Le cellule HeLa incubate in presenza di $1\mu\text{g/ml}$ di CaCO_3NP fluorescenti a tempi diversi: (a) 3h (b) 8 h e (c) 24h. I nuclei sono marcati con Hoechst 33342 (blu), il citoscheletro con Falloidina-TRITC (rosso) and le NP con FITC (verde). Bar= 5 μm .

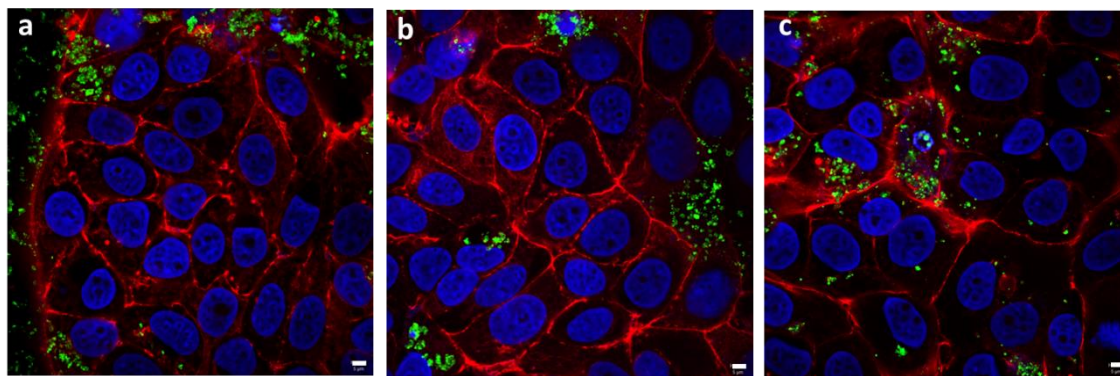


Figure 29: analisi confocale dell'internalizzazione delle CaCO_3NP . Cellule MCF7 incubate in presenza di $1\mu\text{g/ml}$ di CaCO_3NP fluorescenti a tempi diversi: (a) 3h (b) 8 h e (c) 24h. I nuclei sono marcati con Hoechst 33342 (blu), il citoscheletro con Falloidina-TRITC (rosso) and le NP con FITC (verde). Bar= 5 μm .

Per una localizzazione intracellulare più precisa è stato eseguito uno studio di co-localizzazione marcando i mitocondri e i lisosomi dei due tipi cellulari.

Inoltre, utilizzando un metodo di calcolo, le NP localizzate a livello dei due organelli cellulari sono state quantificate. In particolare, il software del microscopio confocale crea un diagramma di dispersione in cui sono visualizzati tutti i pixel dell'immagine. I due canali di fluorescenza dell'immagine (verde per le NP e rosso per i *marker* commerciali) sono stati confrontati. I pixel di entrambi i canali che hanno posizioni identiche nell'immagine potevano essere considerati come una coppia. Di conseguenza, ciascuna coppia di pixel ha due intensità, uno per ogni canale. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4.

Tab. 4: risultati dello studio di colocalizzazione, mediante microscopia confocale, delle NP con mitocondri e lisosomi in cellule HeLa e MCF7.

	Cellule HeLa			Cellule MCF7		
	Coefficiente di sovrapposizione delle CaCO ₃ NP					
	3h	8h	24h	3h	8h	24h
Mitocondri	1%	26%	80%	17%	26%	57%
Lisosomi	12%	8%	2%	12%	15%	73%

(Valori in %): coefficiente di *overlapping*, espresso in percentuale, dato dalla colocalizzazione delle NP con mitocondri o lisosomi. I dati sono stati ottenuti mediante il software del microscopio confocale Zeiss LSM700.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che, dopo 3h di trattamento, i pixel relativi alla co-localizzazione delle NP con i mitocondri sono rispettivamente l'1% e il 17% del totale nelle cellule HeLa (Fig. 30a) e nelle MCF7 (Fig. 31a); mentre i pixel dopo 8h sono il 26% in entrambe le linee cellulari (Fig. 30,31 b) e 80% (Fig. 30c) e 57% (Fig. 31c) dopo 24h. Alcune *spot* verdi erano visibili anche all'interno dei nuclei dopo 24 ore di incubazione.

Lo stesso esperimento di co-localizzazione è stato effettuato anche per i lisosomi.

In questo caso, sono stati ottenuti risultati inattesi. Nel caso delle cellule HeLa, infatti, il coefficiente di sovrapposizione alle 3h è del 12%, valore che si riduce drasticamente nei tempi successivi (Fig. 33).

Al contrario, nel caso delle cellule MCF7 (Fig. 33) si assiste ad un aumento della percentuale di sovrapposizione dei due segnali di fluorescenza da 12% (3h) fino al 73% (24 h).

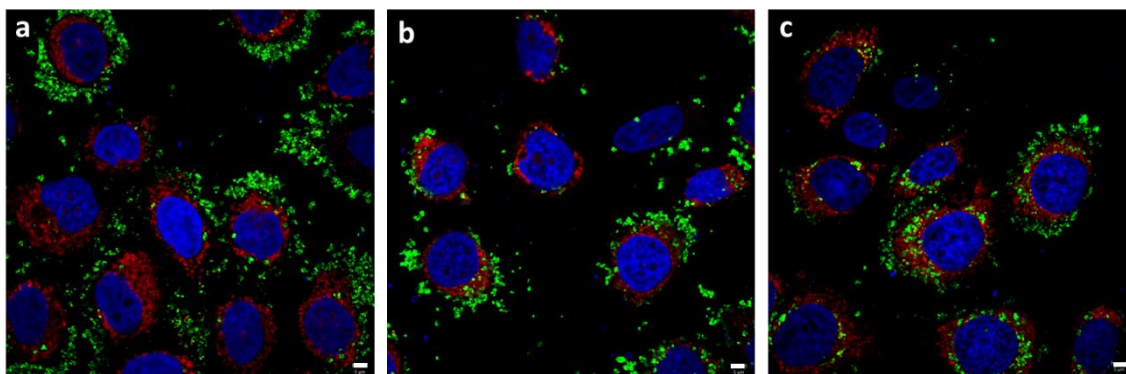


Figure 30: analisi confocale della co-localizzazione delle CaCO₃NP con i mitocondri. Cellule HeLa incubate in presenza di 1μg/ml di CaCO₃ NP fluorescenti a tempi diversi: (a) 3h (b) 8 h e (c) 24h. I nuclei sono marcati con Hoechst 33342 (blu), il mitocondri con Mitotracker (rosso) and le NP con FITC (verde). Bar= 5 μm.

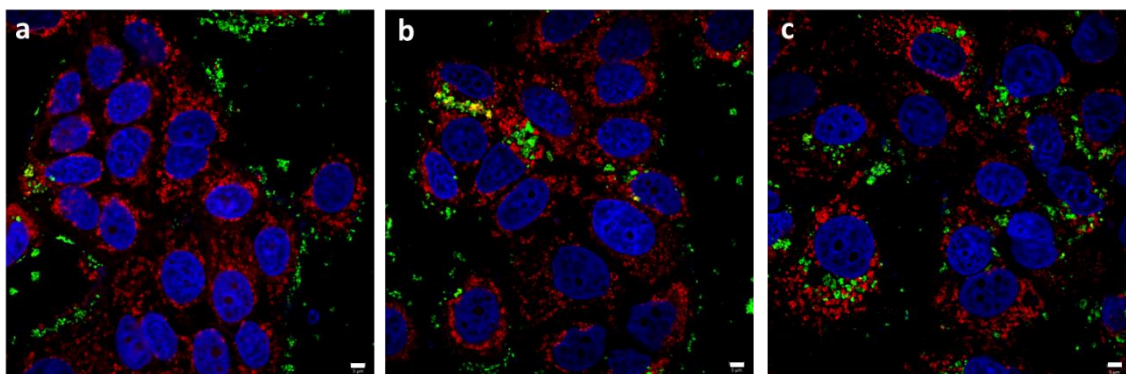


Figure 31: analisi confocale della co-localizzazione delle CaCO₃NP con i mitocondri. cellule MCF7 incubate in presenza di 1μg/ml di CaCO₃ NP fluorescenti a tempi diversi: (a) 3h (b) 8 h e (c) 24h. I nuclei sono marcati con Hoechst 33342 (blu), il mitocondri con Mitotracker (rosso) and le NP con FITC (verde). Bar= 5 μm.

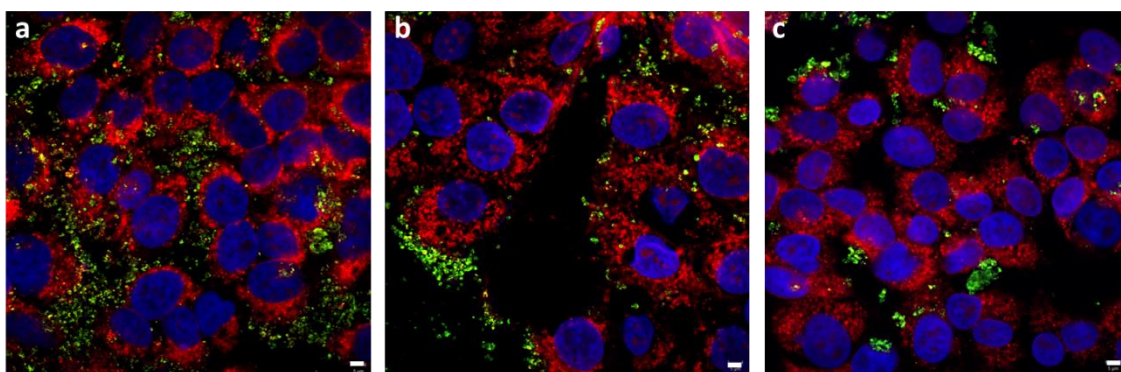


Fig. 32: analisi confocale della co-localizzazione delle CaCO₃NP con i lisosomi. Cellule HeLa incubate in presenza di 1μg/ml di CaCO₃ NP fluorescenti a tempi diversi: (a) 3h (b) 8 h e (c) 24h. I nuclei sono marcati con Hoechst 33342 (blu), il mitocondri con Lysotracker (rosso) and le NP con FITC (verde). Bar= 5 μm.

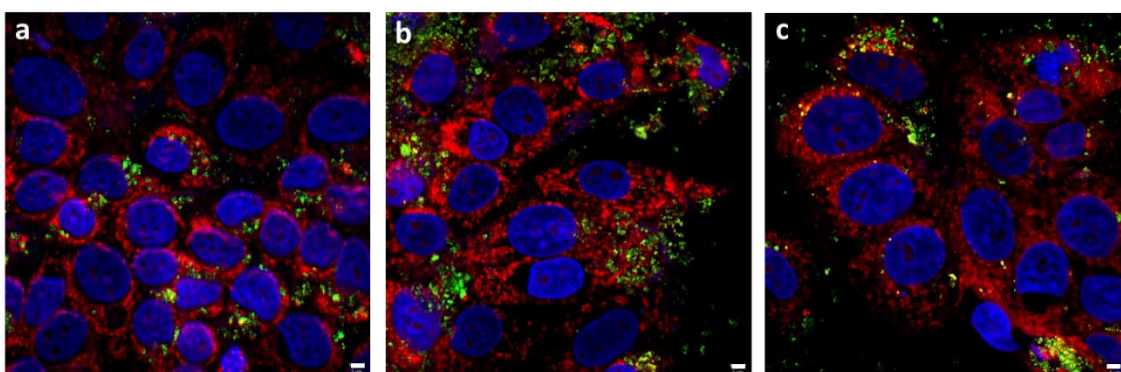


Fig. 33: analisi confocale della co-localizzazione delle CaCO₃NP con i lisosomi. Cellule MCF7 incubate in presenza di 1μg/ml di CaCO₃ NP fluorescenti a tempi diversi: (a) 3h (b) 8 h e (c) 24h. I nuclei sono marcati con Hoechst 33342 (blu), il mitocondri con Lysotracker (rosso) and le NP con FITC (verde). Bar= 5 μm.

L'*uptake* da parte delle cellule HeLa e la localizzazione intracellulare delle NP sono stati analizzati anche a livello ultrastrutturale, mediante TEM.

Le cellule HeLa e le cellule MCF7 sono state incubate con 1 μg/ml e 1 mg/ml di NP rispettivamente per 30 minuti e 24 h e per 2 e 24 h.

In entrambi i tipi cellulari sono state osservate NP adese alla membrana plasmatica. Le NP, inoltre, non sono state osservate all'interno di vescicole di endocitosi. Le Figure 34 e 35 rappresentano micrografie TEM di cellule HeLa incubate con due concentrazioni di NP (1 μg/ml e 1 mg/ml) per un tempo breve (30 min) (Fig. 34) e un

tempo più lungo (24h) (Fig. 35). Le CaCO_3NP sono state internalizzate dalle cellule HeLa principalmente in forma di piccoli agglomerati (Fig. 34b, c, f). Ciò che risulta evidente è che la quantità di CaCO_3NP internalizzate è indipendente dalla concentrazione di NP ed è legata al tempo di incubazione. Si assiste, infatti, ad un aumento progressivo della quantità di NP internalizzate all'aumentare dei tempi di incubazione.

Anche la localizzazione intracellulare di CaCO_3NP è dipendente dal tempo di incubazione. Infatti, le NP sono prevalentemente localizzate nel citoplasma, nel nucleo e nei mitocondri in tempi più brevi di incubazione, (30 minuti) (Fig. 34); in tempi più lunghi di incubazione (24h), sono state osservate NP sia all'interno che lungo la membrana dei lisosomi (Fig. 35).

Nel caso delle cellule MCF7, le NP vengono internalizzate molto più lentamente rispetto alle cellule HeLa. L'internalizzazione, infatti, è stata osservata solo dopo 2h di esposizione, fino a 24 ore. Le NP sono state osservate anche in questo caso nel citoplasma, nel nucleo e mitocondri (Fig. 36,37)

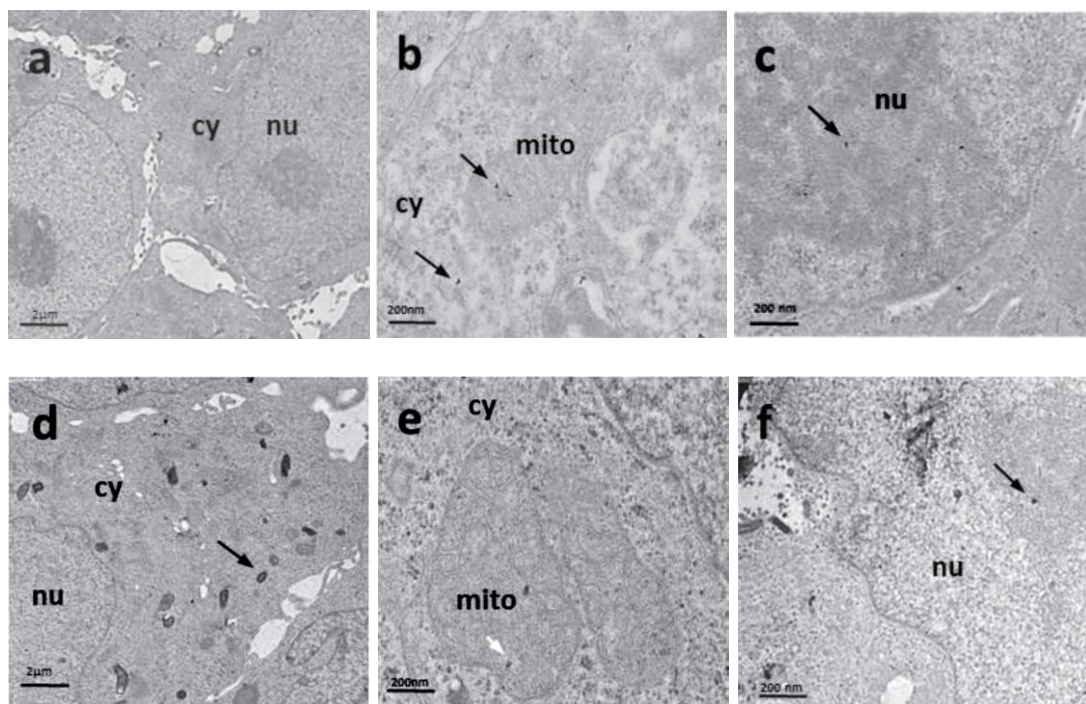


Fig. 34: internalizzazione delle CaCO_3 NP. Micrografie di sezioni osservate mediante TEM: cellule HeLa incubate per 30' con 1 $\mu\text{g/ml}$ di CaCO_3 NP (a, b, c); cellule HeLa incubate per 30' con 1 mg/ml di CaCO_3 NP (d, e, f).

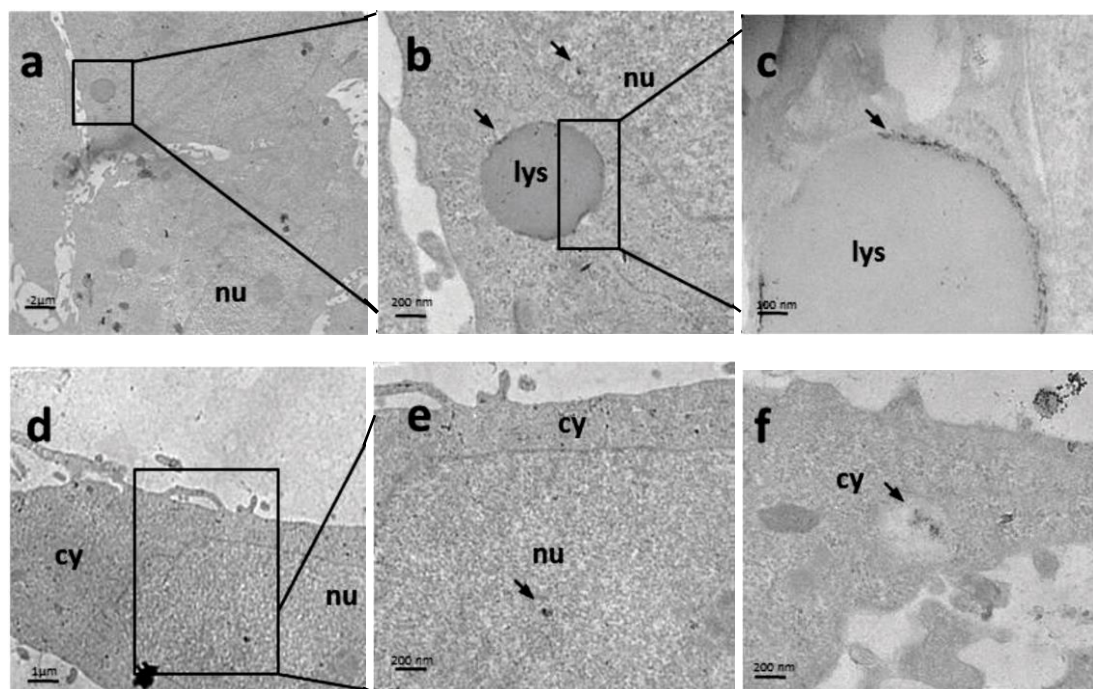


Fig. 35: internalizzazione delle CaCO_3 NP. Micrografie di sezioni osservate mediante TEM: cellule HeLa incubate per 24h con 1 $\mu\text{g/ml}$ di CaCO_3 NP (a, b, c); cellule HeLa incubate per 24h con 1 mg/ml di CaCO_3 NP (d, e, f).

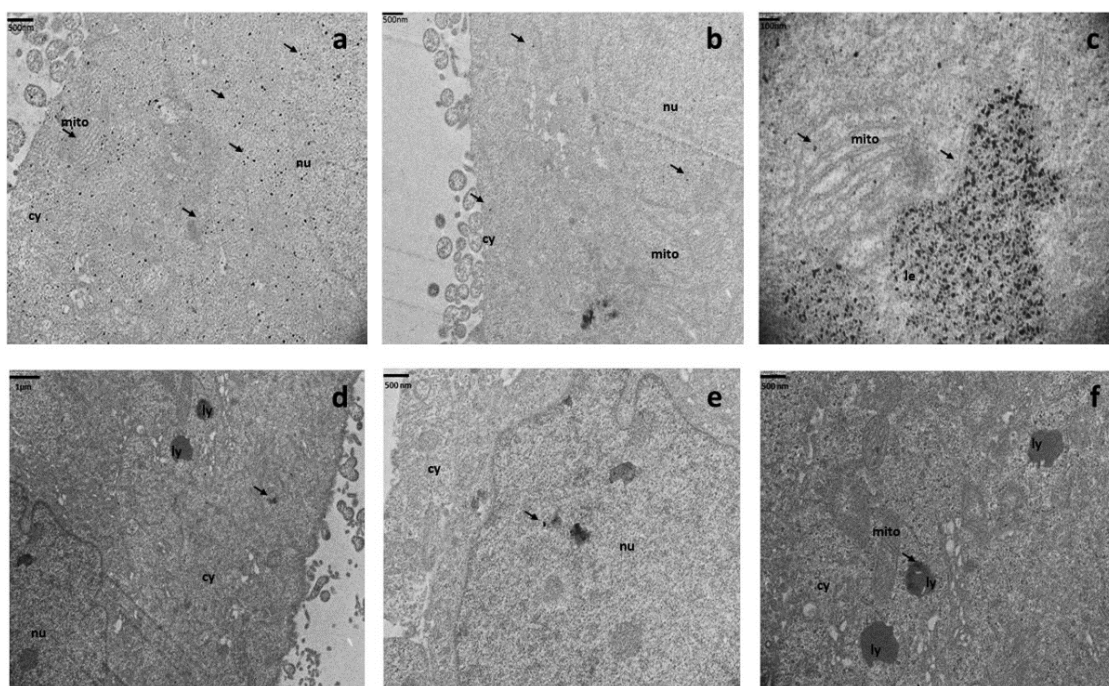


Fig. 36: internalizzazione delle CaCO_3NP . Micrografie di sezioni osservate mediante TEM: cellule MCF7 incubate per 2 h con $1\ \mu\text{g/ml}$ di $\text{CaCO}_3\text{ NP}$ (a, b, c); cellule HeLa incubate per 2h con $1\ \text{mg/ml}$ di $\text{CaCO}_3\text{ NP}$ (d, e, f).

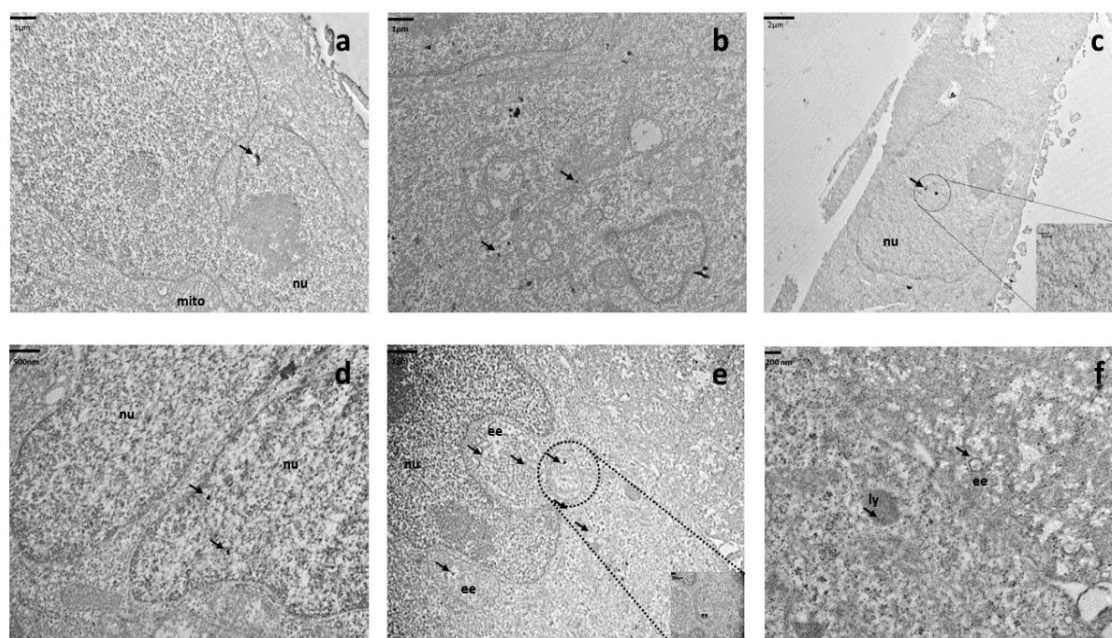


Fig. 37: internalizzazione delle CaCO_3NP . Micrografie di sezioni osservate mediante TEM: cellule MCF7 incubate per 24h con $1\ \mu\text{g/ml}$ di $\text{CaCO}_3\text{ NP}$ (a, b, c); cellule HeLa incubate per 24h con $1\ \text{mg/ml}$ di CaCO_3NP (d, e, f).

I dati ottenuti dall'analisi TEM sui campioni di cellule HeLa sono stati convalidati mediante STEM ed EDS a raggi X. L'utilizzo accoppiato delle due tecniche permettere di verificare che gli *spot* neri all'interno delle cellule HeLa, osservati nelle immagini STEM, siano realmente CaCO_3 NP. La Figura 40a è un'immagine STEM in *dark field* in cui è possibile osservare una cellula HeLa che ha internalizzato all'interno del citoplasma un piccolo gruppo di NP. La zona intorno alle NP è ingrandita in Figura 38b; la linea rossa rappresenta la zona sottoposta ad analisi spettroscopica e a microanalisi. L'analisi mediante STEM accoppiata alla microanalisi ha, quindi, confermato la presenza di CaCO_3 NP nel citoplasma della cellula (Fig. 38 c,d).

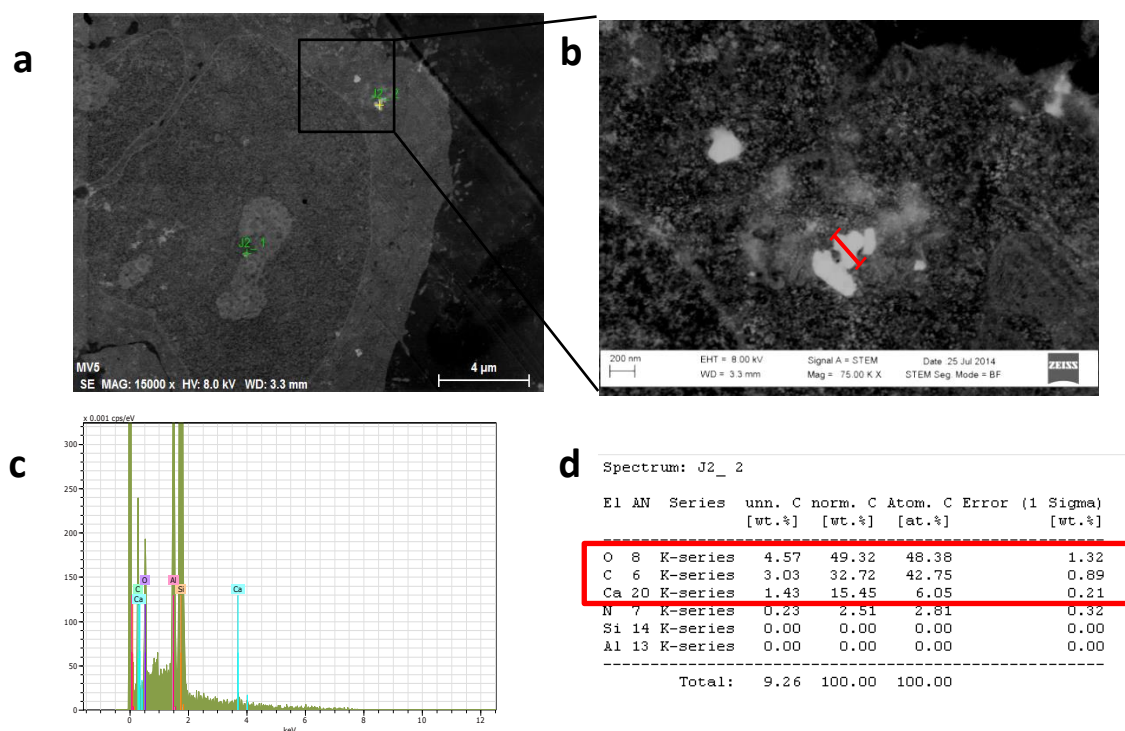


Fig. 38: internalizzazione delle CaCO_3 NP. (a-b) micrografie STEM di cellule HeLa incubate per 24h con 1 μg/ml di CaCO_3 NP. (c-d) Analisi mediante EDS e microanalisi dell'area indicata dalla linea rossa in Fig. b.

Internalizzazione delle CaCO_3NP : esperimenti di inibizione del processo di endocitosi.

Per chiarire quale sia il meccanismo specifico che media l'internalizzazione delle CaCO_3NP , sono stati eseguiti dei saggi di inibizione, utilizzando delle sostanze che bloccano selettivamente diversi tipi di endocitosi. In particolare è stata inibita l'endocitosi mediata da clatrina, l'endocitosi mediata dai raft lipidici, l'endocitosi ATP-dipendente e quella mediata dai microfilamenti di actina.

Le cellule HeLa sono state trattate con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di CaCO_3NP fluorescenti per 30' e 2h, in presenza di inibitori dei diversi tipi di endocitosi, e osservate mediante microscopia ottica a fluorescenza.

La Figura 39 riporta immagini indicative che dimostrano come le NP riescano ad essere internalizzate dalle cellule HeLa già nei primi 30 minuti fino a 2h di incubazione, senza determinare modificazioni morfologiche cellulari.

I cerchi in bianco (Fig. 39) mettono in evidenza alcune NP che vengono internalizzate come aggregati e altre che vengono internalizzate come unità singole, in entrambi i casi localizzate prevalentemente a livello citoplasmatico.

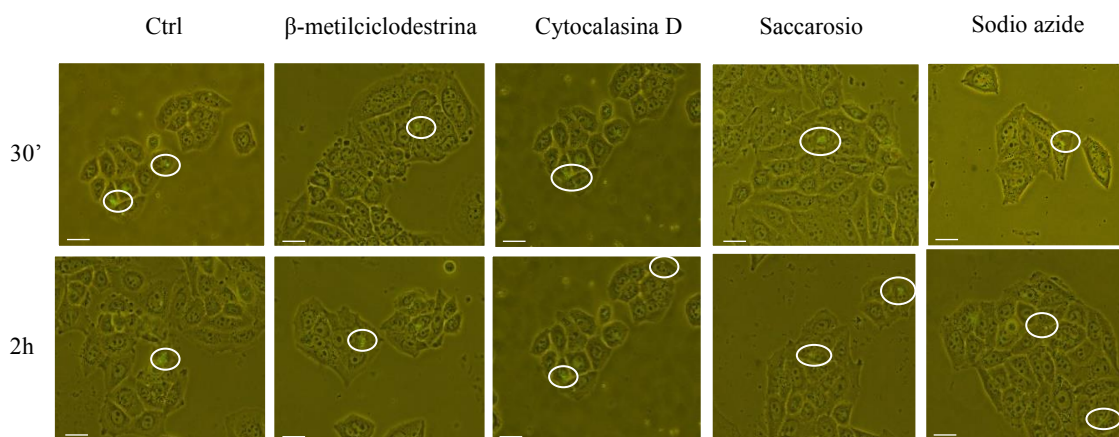


Fig. 39: internalizzazione delle CaCO_3NP . Cellule HeLa osservate al microscopio ottico a fluorescenza. Le cellule sono state trattate con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di CaCO_3NP fluorescenti in presenza di inibitori del meccanismo di endocitosi: β -metilciclodestrina, Cytocalasina D, Saccarosio e Sodio azide. I cerchi mettono in evidenza alcune NP all'interno delle cellule. Bar=10 μm .

Valutazione della vitalità cellulare.

L'effetto delle CaCO_3NP sulla vitalità cellulare è stato valutato incubando cellule HeLa e cellule MCF7 in presenza di concentrazioni crescenti di NP per 24, 48 e 72 ore.

La polvere è stata dispersa nel mezzo di coltura e questo aggiunto poi alla coltura cellulare. La vitalità cellulare è stata valutata mediante test spettrofotometrico MTT.

I dati, elaborati come descritto nel paragrafo 1.1.3.4 del capitolo Materiali e Metodi, dimostrano che la vitalità cellulare non risulta compromessa, anzi, si assiste ad un aumento della vitalità fino anche a tempi lunghi di trattamento (Fig. 40 a-b). Ciò conferma la biocompatibilità delle NP.

Nel caso delle cellule HeLa è stata effettuata anche un'analisi dei diversi campioni al microscopio ottico a contrasto di fase per valutare le eventuali modificazioni morfologiche a carico delle cellule durante l'incubazione (Fig. 40c). Sono state utilizzate due concentrazioni di CaCO_3NP (1 $\mu\text{g/ml}$ e 1 mg/ml). Anche in questo caso, l'analisi ha confermato una vitalità cellulare mantenuta nel corso dei diversi tempi di trattamento.

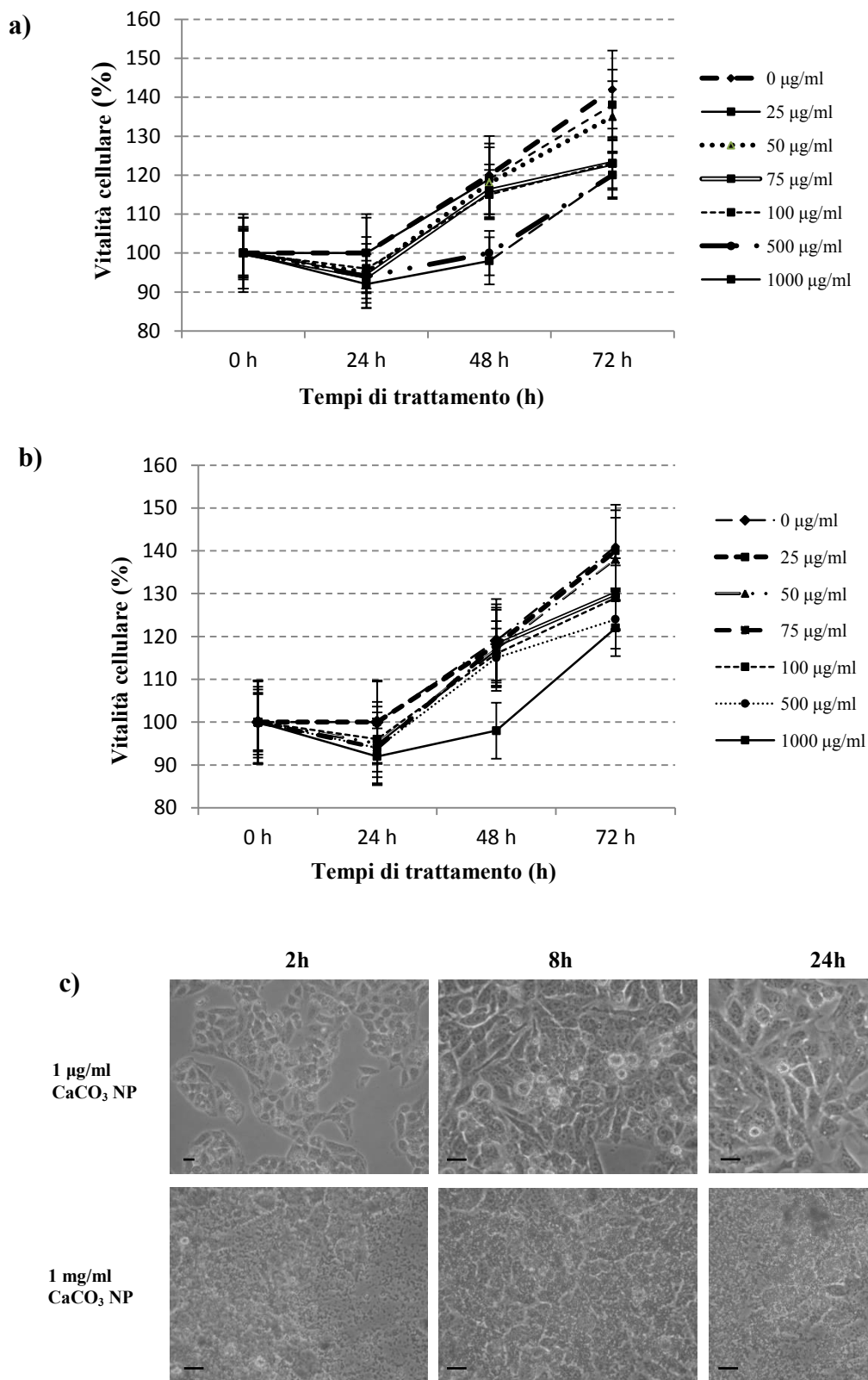


Fig. 40: valutazione degli effetti sulla vitalità cellulare. Test MTT condotto sulle cellule HeLa (a) e su cellule MCF7 (b) al tempo 0 e dopo 24, 48 e 72 h di trattamento in presenza di concentrazioni crescenti di CaCO₃ NP. I valori (assorbanza riportata come percentuale rispetto alle cellule controllo al tempo T0, considerate come 100%) sono la media $\pm$ DS di 3 esperimenti indipendenti.

(c) Effetti di due concentrazioni di CaCO₃ NP sulla morfologia delle cellule HeLa, a tempi brevi e lunghi. Micrografie acquisite al microscopio ottico invertito. Bar=10µm.

DISCUSSIONE

In questo lavoro di dottorato sono state prese in esame NP metalliche (NP di argento-AgNP e di oro-AuNP) e non metalliche (NP di carbonato di calcio-CaCO₃NP), per studiarne le interazioni con sistemi biologici al fine di utilizzarle nel campo della nanomedicina applicata alle terapie antitumorali. A tal scopo, le NP sono state sintetizzate attraverso un metodo di *green chemistry* e caratterizzate mediante tecniche di spettroscopia e microscopia elettronica a trasmissione. Il loro impatto è stato valutato *in vitro* (linee cellulari primarie e secondarie) ed *in vivo* (sistemi modello mammiferi e non-mammiferi) attraverso tecniche microscopiche e biochimiche. I risultati nel loro complesso suggeriscono che sia le NP metalliche che non metalliche vengono internalizzate dai modelli cellulari e animali presi in considerazione. Il loro ingresso in cellula innesca effetti positivi o negativi in relazione al tipo di NP, e al protocollo sperimentale (modello, concentrazione e tempi di trattamento) considerato.

Il campo delle nanotecnologie, che comprende la progettazione, la sintesi e la manipolazione, di strutture che misurano approssimativamente 1-100 nm in almeno una dimensione, è una delle aree di maggiore interesse nel campo delle scienze dei materiali; e sempre più promettenti applicazioni delle NP vengono suggerite. Le proprietà della NP sono state sfruttate nelle più svariate applicazioni: medicina, cosmetici, energie rinnovabili, rimediazione ambientale e dispositivi biomedici (Gerber and Lang, 2006; Singh *et al.*, 2009). Il loro crescente utilizzo suscita però preoccupazioni circa il loro impatto in termini di effetti tossici sui sistemi biologici. Si tratta, infatti, di materiali su scala nanometrica, le cui proprietà chimico-fisiche differiscono di gran lunga da quelle dei materiali utilizzati per la loro sintesi (Ju-Nam e Lead, 2008). Inoltre, dati in letteratura dimostrano che le NP possono permeare facilmente le membrane cellulari (Kashiwada *et al.*, 2006) e le barriere biologiche, come quella emato-encefalica (Kim *et al.*, 2006), depositandosi negli organi target e determinando tossicità cellulare. Alla luce di ciò diventa di primaria importanza avere una conoscenza approfondita delle loro interazioni con i sistemi biologici, allo scopo sia di migliorare l'efficienza del loro utilizzo che di ridurre l'effetto tossico.

Per le loro peculiari caratteristiche (attività catalitica e proprietà ottiche, elettroniche, magnetiche, ed antibatteriche), le NP metalliche suscitano grande interesse nel campo della ricerca per le loro più svariate applicazioni. In particolare, l'argento (il più studiato ed usato), l'oro, il titanio e lo zinco, sottoforma di NP sono ampiamente sfruttati per applicazioni biomediche.

Le AgNP rappresentano uno dei NM tra i più versatili e più utilizzati, nell'industria alimentare, tessile, degli articoli sportivi, dei dispositivi medici e dei cosmetici, per via delle loro proprietà antibatteriche e antimicotiche (Kim *et al.*, 2007). Recentemente, stanno suscitando enorme interesse nel campo della medicina oncologica con possibili utilizzi nel campo della diagnostica, della terapia antitumorale e della teranostica (Sharma *et al.*, 2015). La scelta del metodo di sintesi, chimico, fisico, fotochimico o biologico, è molto importante dal momento che influenza la risposta delle cellule in seguito alla loro interazione con esse. Infatti, i dati in letteratura suggeriscono che gli effetti mediati dalle AgNP sono strettamente legati al rilascio di ioni Ag^+ , tossici per le cellule, come riportato in diversi lavori (Park *et al.*, 2010; Foldbjerg *et al.*, 2009; Miura e Shinohara, 2009; Meyer *et al.*, 2010), e di altri sottoprodotti di sintesi (Tran *et al.*, 2013). Per evitare ciò, molto interessante si stanno rivelando i metodi di sintesi della *green chemistry*. In particolare, per evitare il rilascio di Ag^+ , promuovere la stabilità delle NP, prevenirne l'agglomerazione ed aumentarne la biocompatibilità, le AgNP possono essere rivestite con diversi tipi di molecole, come polimeri, citrato, chitosano, polisaccaridi, glicani, amido e poly-N-vinyl-2-pirrolidone (PVP) (Tran *et al.*, 2013) limitando l'ossidazione delle NPs e inibendo il contatto diretto della superficie delle NPs con le componenti cellulari (Ahamed *et al.*, 2010). In questo lavoro, è stato utilizzato β -D-glucosio come agente riducente allo scopo di rendere più stabili le NP, impedendo il rilascio di Ag^+ . Precedenti studi effettuati in laboratorio avevano infatti indicato che la sintesi di AgNP in soluzioni di glucosio o di glucosio-saccarosio stabilizzano le NP in terreno di coltura e inibiscono il rilascio di ioni Ag^+ (Dini *et al.*, 2011). In aggiunta, la procedura di sintesi non prevede mai la sonicazione della soluzione di glucosio/ AgNO_3 , evitando il rilascio di Ag per sollecitazione meccanica. Sulla base di questi studi preliminari, è stato deciso di utilizzare AgNP sintetizzate in una soluzione di glucosio (AgNP-G); inoltre sono state scelte 2 concentrazioni di NP che corrispondono alla concentrazione più tossica e a quella meno tossica (Dini *et al.*, 2011). In particolare, la scelta del glucosio si è basata sul ruolo del metabolismo del

glucosio nelle cellule. È stato dimostrato che il glucosio è necessario per la sopravvivenza delle cellule, l'attivazione e la produzione di citochine. Il glucosio fornisce energia alle cellule, agendo come substrato primario per la generazione di ATP, fornendo una fonte di carbonio per la sintesi dei macronutrienti e acidi nucleici e fosfolipidi, generando NADPH nella via dei pentoso fosfati (Fox *et al*, 2005). Pertanto, tutti gli effetti riportati per le AgNP sono legati alla presenza delle NP e non del glucosio o al rilascio di ioni Ag^+ . I modelli cellulari scelti per indagare gli effetti delle AgNP sono le cellule di carcinoma uterino umano HeLa, come esempio di cellula tumorale, e linfociti umani isolati da sangue periferico di donatori sani, come modello di cellula normale. Le cellule HeLa sono il modello cellulare più ampiamente conosciuto ed utilizzato in letteratura, e ne permettono quindi il confronto dei risultati ottenuti. I linfociti, invece, sono un modello per valutare gli effetti a livello ematico, dal momento che, indipendentemente dalla via di somministrazione o di entrata delle NP all'interno dell'organismo, esse sono trasportate dal sangue. La soluzione di AgNP-G sintetizzata è stabile per almeno 48h in terreno di coltura, che corrisponde alla durata massima di trattamento considerato negli esperimenti. Le NP sono di forma sferica, monodisperse e con un diametro medio di 30 ± 5 nm. Dopo 3 giorni in terreno di coltura le NP aggregano a formare *nanorods*. Le AgNP entrano all'interno sia delle cellule HeLa che dei linfociti, già a partire dai primi tempi di trattamento, con cinetiche differenti. La quantità di NP internalizzate dipende invece dalla concentrazione di NP considerata. In particolare, in presenza della quantità più alta di NPs le cellule sembrano internalizzarle in maniera consistente; una bassa quantità viene invece internalizzata in presenza della quantità minore. I dati ottenuti suggeriscono inoltre che il processo di internalizzazione per entrambi i tipi cellulari è un processo di durata limitata, cioè entro 2-3 h, e precoce. Nel caso delle cellule HeLa, l'internalizzazione comincia dopo 30 minuti dal trattamento e raggiunge un picco entro 2-3h; al contrario i linfociti sono più veloci nell'internalizzare e raggiungono un picco di quantità di NP internalizzate entro 30 minuti in presenza della concentrazione più alta ed entro 1h in presenza della concentrazione più bassa.

Il fatto che le NP possono entrare nelle cellule è ampiamente riportato in letteratura come pure i meccanismi di ingresso. In relazione alla dimensione e al tipo cellulare, le NP possono entrare nelle cellule attraverso fagocitosi, macropinocitosi ed endocitosi mediata da caveolae, caveolae-indipendente, mediata da clatrina e mediata

da recettori (RME) (Sahay *et al*, 2010), Niente si conosce circa i meccanismi di entrata delle AgNP; però ad esempio, l'assorbimento tramite RME è il meccanismo principale di entrata delle AuNP, le più utilizzate per il *drug delivery*, in fibroblasti STO, cellule HeLa e cellule tumorali del cervello SNB19 (Shukla *et al*, 2005; Chithrani e Chan, 2007; Nativo *et al*, 2008). Tuttavia, le AuNP entrano anche nei granulociti attraverso fagocitosi (Wiwanitkit *et al*, 2009) e nei linfociti attraverso penetrazione diretta nel citoplasma (Wiwanitkit *et al*, 2009) dal momento che i linfociti non hanno alcuna attività di fagocitosi. È da notare, però, che la dimensione dei pori nella membrana dei linfociti (di circa $4 \times 2,5 \text{ nm}$) è inferiore al diametro delle NP utilizzate in questo studio ($30 \pm 5 \text{ nm}$) e nei studi presenti in letteratura così come di quelle utilizzate comunemente in diagnostica. La comprensione del meccanismo esatto del loro ingresso richiede quindi ulteriori studi.

L'ingresso delle AgNPs-G all'interno delle cellule HeLa e dei linfociti provoca diversi effetti concentrazione e tempi di trattamento dipendenti: alterazione della morfologia cellulare, aumento della produzione di ROS, alterazione della vitalità cellulare e alterazione del ciclo cellulare.

In relazione ai meccanismi di induzione della tossicità, diversi dati in letteratura enfatizzano il ruolo svolto dallo stress ossidativo nella tossicità delle AgNP (Xia *et al*, 2006).

In particolare, le AgNP producono citotossicità tramite stress ossidativo legato alla generazione di ROS in diverse linee cellulari, come ad esempio HepG2 e HL-60 (Ávalos *et al*, 2013; Ávalos *et al*, 2014), monociti THP-1 [14,28], e macrofagi murini Raw 264.7 (Park *et al*, 2010). Numerosi cambiamenti legati allo stress ossidativo, i cui meccanismi non sono ancora ben chiari, sono stati osservati, infatti, in cellule di mammifero dopo l'esposizione a AgNP, come riportato in (Kim e Ryu, 2013). In particolare la deplezione dei livelli cellulari di GSH [29,30] e la stimolazione dell'espressione di eme-ossigenasi-1 (HO-1) e di metallotioneina-2A (MT) (Lee *et al*, 2014) sono effetti dovuti allo stress ossidativo mediato dalle AgNPs.

La produzione di ROS e il conseguente stress ossidativo potrebbero essere spiegati con un danneggiamento dei mitocondri dovuto alla deposizione su di essi delle AgNP, come affermato da altri studi presenti in letteratura (Derfus *et al*, 2004; Xia *et al*, 2006). I nostri dati sono, quindi, in accordo con i dati in letteratura che riportano lo stress ossidativo come uno dei principali effetti dell'entrata delle AgNP in cellula (Carlson *et al*, 2008). Allo stress ossidativo si ricollegano poi fenomeni di

danneggiamento al DNA che portano a morte cellulare per apoptosi, autofagia e necroptosi (Martindale e Holbrook, 2002) e diversi studi in letteratura hanno dimostrato che le AgNP inducono uno sbilanciamento tra i meccanismi di morte e di sopravvivenza. I risultati riportati in questo lavoro dimostrano come la presenza delle AgNP provochi un'alterazione della morfologia cellulare e un aumento della mortalità sia nei linfociti che nelle cellule HeLa. In particolare, è sempre la concentrazione maggiore considerata ad indurre la più alta percentuale di mortalità. Inoltre, i risultati ottenuti ci permettono di speculare che probabilmente il glucosio provvede, sia nei linfociti che nelle cellule HeLa, una protezione energetica contro la morte cellulare innescata da fattori xenobiotici, quali si possono considerare le AgNP, in accordo con il lavoro di Rio and Velez-Pardo (2008), avallando la scelta di usare AgNP sintetizzate in una soluzione di glucosio. Nelle cellule HeLa, inoltre, l'induzione di apoptosi, autofagia e necrosi è stata valutata mediante test biochimici. Le cellule hanno mostrato differenze significative nel tipo di meccanismo di morte innescato in relazione della quantità di NP scelta per trattare le cellule. In presenza della quantità maggiore si è osservato un aumento della percentuale di cellule necrotiche e significativi cambiamenti nella percentuale di cellule apoptotiche, mentre la quantità più bassa ha innescato il meccanismo autofagico. Diversi studi condotti utilizzando AgNP hanno dimostrato l'induzione di apoptosi in differenti tipi cellulari, come cellule tumorali del colon (Gopinath *et al*, 2010; Sanpui *et al*, 2011), cellule HepG2 (Liu *et al*, 2010), cellule HeLa (Miura e Shinohara, 2009) e fibroblasti NIH3T3 e L929 (Hsin *et al*, 2008; Wei *et al*, 2010).

Confrontando i dati relativi ai meccanismi di morte con quelli della vitalità cellulare valutata con il test MTT in cui il trend della curva relativa alla quantità più bassa di NP è paragonabile a quella del controllo, si è ipotizzato che l'autofagia potrebbe probabilmente agire come meccanismo di sopravvivenza. L'autofagia infatti può rappresentare una risposta delle cellule allo stress ossidativo (Ryter e Choi, 2010). L'autofagia può portare alla sopravvivenza o alla morte cellulare, può annullare i livelli di ROS in cellula e proteggere le cellule dai danni ROS-mediati (Kaushik *et al*, 2010). Se lo stress ossidativo raggiunge livelli che sfuggono al controllo dei meccanismi di protezione della cellula, l'autofagia diventa meccanismo di morte (Chen *et al*, 2009).

Recenti studi suggeriscono una relazione tra diverse classi di NM e l'induzione/blocco dell'autofagia, in molti modelli biologici (Panzarini *et al*, 2013;

Stern *et al*, 2012). Diversi studi riportano che quantum dots, fullerene, AuNP e nanotubi di carbonio possono indurre autofagia. Questi NM possono alterare le vie di segnalazione dell'autofagia tramite l'induzione di stress ossidativo (ad esempio, ER stress, danno mitocondriale), la soppressione della segnalazione Akt-mTOR e l'alterazione dell'autofagia legata all'espressione genica (Stern *et al*, 2012). In letteratura, l'attivazione della via autofagica è stata collegata a una varietà di malattie (Ravikumar *et al*, 2010) e potrebbe rappresentare un bioindicatore di tossicità delle NPs in linee cellulari di mammifero.

Infine, le AgNP-G, una volta all'interno delle cellule HeLa, influenzano il ciclo cellulare in modo dipendente dalla quantità e dal tempo di incubazione.

È stato osservato un arresto del ciclo cellulare delle cellule HeLa in fase S e G2 e la diminuzione dell'indice mitotico in presenza della quantità maggiore di NP. I risultati sono in accordo con i dati presenti in letteratura che dimostrano che le AgNP possono indurre l'arresto del ciclo cellulare in G2 e S nelle cellule Jurkat T (Eom *et al*, 2010) e causare un accumulo della frazione apoptotica sub G1 in macrofagi RAW 264.7 di topo (Park *et al*, 2011), in cellule umane del fegato Chang (Piao *et al*, 2011) e nelle cellule A549 di carcinoma del polmone umano (Chairuangkitti *et al*, 2013).

Inoltre, non sono solo le AgNP a interferire col ciclo cellulare, ma anche diversi tipi di NP metalliche in diversi tipi cellulari. Per esempio, NP di palladio causano un aumento significativo delle cellule mononucleate del sangue periferico nella fase G0/G1 e una riduzione significativa nelle fasi S e G2/M (Petrarca *et al*, 2014); le NP di platino bloccano le cellule HeLa in G2/M (Alshatwi *et al*, 2015); NP di molibdeno inibiscono la proliferazione dei fibroblasti della pelle di topo L929 inducendo un arresto in G2/M (Siddiqui *et al*, 2015). Allo stesso modo, il trattamento con AgNP induce un arresto del ciclo cellulare in diverse linee cellulari, come abbiamo osservato in cellule HeLa, probabilmente a causa dei tentativi della cellula di riparare i danni del DNA. È stato dimostrato, ad esempio, l'arresto in fase G2/M in fibroblasti normali del polmone umano IMR-90, cellule umane di glioblastoma U251 (Asharani *et al*, 2009) e fibroblasti L929 (Wei *et al*, 2010) esposti a AgNPs. Al contrario, le cellule di epatoma HepG2 vengono arrestate in fase S (Liu *et al*, 2010).

Al momento i dati in letteratura circa la relazione tra perturbazione del ciclo cellulare e presenza di NP sono molto contraddittori. Infatti, è stato recentemente riportato (Kim *et al*, 2011) che la progressione delle cellule attraverso il ciclo cellulare influenza l'internalizzazione delle NP e che i due processi potrebbero influenzarsi a

vicenda. In ogni caso, la perturbazione del ciclo cellulare rappresenta una risposta delle cellule ad una sollecitazione, qual è la presenza delle NP. Infatti, il ciclo cellulare è un regolatore fondamentale del processo di proliferazione cellulare, che protegge la cellula da danni al DNA.

L'aumento della produzione e dell'uso di nanoprodotto sta portando a un aumento dei livelli di scarico dei NM nell'ambiente attraverso il rilascio intenzionale o accidentale dei prodotti che li contengono. Il destino di NPs nell'ambiente acquatico, le loro interazioni con componenti biotiche e abiotiche, e il loro potenziale nel causare un danno sono ancora poco conosciuti, generando preoccupazioni sui rischi che possono comportare per la salute umana e ambientale.

Alla luce di quanto detto, le AgNP sono state utilizzate in uno studio di tossicità a breve e lungo termine su un organismo acquatico modello, lo *Zebrafish* (*Danio rerio*). Esso è un modello animale ampiamente utilizzato per valutare rischi per la salute umana. Infatti, è stato suggerito che *Zebrafish* potrebbe essere un modello correlativo e predittivo per valutare gli effetti tossici dei NM, sulla base della sua stretta omologia con il genoma umano (Fako and Ferguson, 2009). Questo parallelismo genetico impartisce similarità biologiche ed anatomiche incluse la barriera ematoencefalica, la biologia delle cellule endoteliali e le risposte immunogeniche.

Alla concentrazione utilizzata negli esperimenti riportati, è stato osservato un accumulo di AgNP nelle branchie, nel fegato e nell'intestino in accordo con altri dati presenti in letteratura (Choi *et al.*, 2010). La presenza di NP nel citoplasma delle cellule delle lamelle secondarie delle branchie indica che questo è uno delle principali vie di ingresso di NP nell'organismo. Quantità inferiori di NP sono state osservate nel fegato e nell'intestino; in particolare, l'ingresso delle NPs ha causato un aumento delle gocce lipidiche e danni mitocondriali, come suggerito dall'aumento dello spazio intermembrana mitocondriale. Queste alterazioni, dovute all'esposizione alle AgNP, avvalorano l'ipotesi che i mitocondri siano un organello bersaglio delle NP. Dati in letteratura, infatti, riportano alterazioni simili nei mitocondri della ghiandola digestiva di ostriche esposti a ZnO NP, correlati con la produzione di ROS e stress ossidativo (Trevisan *et al.*, 2014).

Sebbene l'autometallografia e la microscopia elettronica abbiano confermato l'accumulo di NP nelle branchie di organismi esposti ad entrambe le forme di metallo, non sono state osservate alterazioni dell'architettura dell'organo, dati in

accordo con quanto riportato in letteratura. Griffitt e collaboratori (2009), infatti, hanno osservato che l'esposizione per 48 ore ad una concentrazione molto più elevata di AgNP (1 mg/L) rispetto a quella considerata in questo lavoro (0.01 mg/L) non induce alcuna alterazione istologica delle branchie, anche se hanno osservato un significativo aumento di spessore dei filamenti delle lamelle secondarie dopo esposizione alla stessa concentrazione di argento nella forma ionica, suggerendo che la presenza dell'Ag sottoforma di NP potrebbe inibire o prevenire i cambiamenti morfologici prodotte dall'esposizione all'argento ionico. Risultati simili sono stati ottenuti anche dopo un'esposizione più lunga (28 giorni) ad una concentrazione inferiore di AgNP (50 mg/L) rispetto a quella qui considerata (Griffitt *et al.*, 2013).

Il lavoro riportato in questa tesi ha preso poi in considerazione un altro tipo di NP metalliche, cioè le AuNP, che i dati in letteratura riportano come le più biocompatibili. Infatti sono le NP più usate in campo medico. Hanno proprietà ottimali per il drug delivery, il trattamento antitumorale, l'imaging biomedicale, la diagnosi ecc. Hanno, inoltre, piccole dimensioni, proprietà chimico-fisiche altamente controllabili e la possibilità di legare diversi tipi di molecole. Infine, possono essere sintetizzate in molti modi, i più comuni dei quali sono quello chimico e quello biologico, con il vantaggio di poter altamente controllarne i processi.

Nell'ambito di un progetto in collaborazione con l'Istituto di Fisica Nucleare (INFN) di Torino e il Laboratorio di Fisiologia Clinica del CNR di Pisa, le AuNP sono state scelte come NM radiosensibilizzante allo scopo di utilizzarle nella adroterapia, in particolare la terapia protonica. Quest'ultima è una promettente terapia antitumorale che utilizza un fascio di protoni al posto dei convenzionali raggi X. A causa della loro massa relativamente grande, i protoni possiedono una scarsa dispersione laterale nell'attraversamento dei tessuti; il fascio quindi non si diffonde molto, rimanendo piuttosto focalizzato sulla massa tumorale e garantendo quindi solo bassi effetti collaterali ai tessuti circostanti. Tutti i protoni di una data energia hanno un dato potere di penetrazione e quindi pochissimi protoni penetrano oltre tale distanza, risparmiando i tessuti posteriori al tumore. Inoltre, la dose erogata al tessuto è massima solo negli ultimi millimetri del tragitto della particella: questo punto massimo è chiamato picco di Bragg. Inoltre, l'utilizzo delle AuNP durante un protocollo di terapia protonica è vantaggioso dal momento che le nanoparticelle di oro, a causa delle loro proprietà ottiche di risonanza plasmonica, rilasciano raggi X quando colpite dai protoni. In questo modo si verrebbero a creare raggi X

direttamente in sede tumorale. Alla luce di ciò, i dati riportati in questo lavoro di dottorato riguardano lo studio della biodistribuzione e la localizzazione ultrastrutturale delle AuNP in un modello murino valutato attraverso microscopia elettronica a trasmissione.

L'analisi ha dimostrato che le AuNP superano le barriere biologiche localizzandosi in quasi tutti gli organi. Le AuNP considerate, che hanno un diametro di circa 12 nm, si localizzano nel cervello, rene, milza, fegato, pancreas, intestino e cuore. A livello subcellulare, le AuNP si localizzano di preferenza nel reticolo endoplasmatico, nei mitocondri e nel nucleo.

La distribuzione delle NP in organi e tessuti desta grande interesse dal punto di vista clinico, a causa del loro grande potenziale nel trattamento del cancro. Diversi studi riportano che, in seguito a iniezione di NP in animali, la circolazione sistemica le distribuisce verso tutti gli organi del corpo, tra cui la milza, cuore, fegato e cervello.

Per capire come le NPs attraversino le barriere biologiche importanti sono le proprietà fisico-chimiche dei materiali; inoltre, la formazione di una “corona” di biomolecole sulla superficie delle NP potrebbe anche influenzare il passaggio delle NP da un compartimento all'altro e la capacità di essere internalizzate dalle cellule (Palchetti *et al*, 2016). Inoltre, una volta internalizzate dalle cellule, le NP possono anche uscire attraverso un processo di esocitosi (Jin *et al*, 2009; Jiang *et al*, 2010) ed essere rivestite con differenti biomolecole a seconda del fatto che abbiano subito endocitosi o esocitosi. Tuttavia, la bio-corona può anche comportare effetti indesiderati per le NP in circolo nei sistemi viventi come, ad esempio, l'attivazione del complemento e coagulazione del sangue, e quindi avere un ruolo anche in altri meccanismi diversi dall'assorbimento cellulare (Simberg *et al*, 2009). In uno studio Zhu e collaboratori (2012) riportano come diverse proprietà dei NM, come idrofobicità e idrofilia, composizione chimica, funzionalizzazione superficiale e carica, dispersione, nonché l'assorbimento di proteine sulla superficie, determinano l'attraversamento delle membrane cellulari. Per quanto riguarda il superamento di barriere biologiche, la maggior parte degli studi fino ad oggi sono legati alla esposizione da inalazione.

Tra le NP non metalliche, sono state prese in esame le CaCO_3NP , interessanti sia nella ricerca di base che nell'industria per via delle loro proprietà ben definite e controllabili, quali la morfologia, la struttura, la dimensione, l'area superficiale specifica e la purezza chimica.

Le CaCO_3NP utilizzate sono state sintetizzate mediante “spray drying technique” e stabilizzate mediante isopropanolo, per inibire il processo di cristallizzazione. Sono state caratterizzate morfologicamente mediante TEM ed è stata, inoltre, valutata la composizione chimica e la stabilità.

In generale, la forma e le dimensioni delle NP (Chithrani *et al*, 2006; Chithrani *et al* 2007) e la carica superficiale (Cho *et al*, 2009) sembrano essere fattori rilevanti nell’interazione e internalizzazione delle NP. Dati in letteratura suggeriscono che le NP con carica superficiale neutra o negativa non riescano ad interagire con le membrane cellulari, anch’esse cariche negativamente. Ci sono comunque studi che dimostrano l’entrata in cellula di particelle cariche negativamente, ad esempio le AuNP, probabilmente attraverso un legame aspecifico e una clusterizzazione delle NP su siti cationici della membrana, dove scarseggiano domini con carica positiva (Cho *et al.*, 2009).

Al contrario, particelle cariche positivamente, come le CaCO_3NPs , si possono legare a siti carichi negativamente sulla membrana e traslocare all’interno delle cellule, diventando candidati ideali per il *drug delivery*.

In questo lavoro, l’internalizzazione, la localizzazione cellulare e la biocompatibilità delle CaCO_3NP sono state valutate su cellule HeLa ed MCF7, presi in considerazione come modelli di cellule tumorali ampiamente utilizzati in letteratura.

Le NP hanno forma ellissoidale, con diametro maggiore di 80-100 nm e minore di 50 nm, sono stabili in terreno di coltura e sono costituite da calcite pura. Tra le caratteristiche che rendono le CaCO_3NP interessanti vi è anche la possibilità di essere funzionalizzate e rese fluorescenti. In questo modo è stato possibile valutare la cinetica di internalizzazione mediante analisi di immagine. Entrambe le linee cellulari considerate internalizzano le NP con una localizzazione tempo-dipendente, a livello del citoplasma, dei mitocondri, dei lisosomi e del nucleo, come dimostrato dall’analisi al microscopio confocale tramite studi di colocalizzazione NP/organuli. La cinetica di internalizzazione è tipo cellulare dipendente: le cellule HeLa internalizzano molto più velocemente raggiungendo il massimo di NP internalizzate entro 30 minuti rispetto alle MCF7 che raggiungono il massimo dell’internalizzazione entro 3h.

Le CaCO_3NP non ha evidenziato alcun effetto tossico per entrambi i tipi di cellule, probabilmente a causa delle loro proprietà inerti e di superficie.

Inoltre, le CaCO_3NP essendo facilmente funzionalizzabili possono garantire un “targeting intelligente”, allo scopo, quindi, di essere utilizzate per “bersagliare”, con un ligando specifico, organi, tessuti, cellule ed organuli specifici. In effetti, molti farmaci possono essere indirizzati a compartimenti subcellulari come il citoplasma, endosomi, lisosomi, Golgi, il reticolo endoplasmatico (ER), i mitocondri, e il nucleo. La maggior parte degli studi in letteratura, ad esempio, sono principalmente focalizzati sullo sviluppo di sistemi di *drug delivery* che possano garantire il targeting verso tessuti intesi nella loro interezza, raramente indirizzati a specifici compartimenti intracellulari.

Come detto in precedenza, per la progettazione di un vettore ottimale contenente un farmaco utilizzando CaCO_3NP , è fondamentale una comprensione globale della loro distribuzione subcellulare, che è strettamente legata al meccanismo utilizzato dalla cellula per internalizzare le NP. Come riportato in precedenza, le NP utilizzano le più svariate vie per essere internalizzate (Sahay *et al*, 2010), in relazione a tipo di NP, grandezza e tipo cellulare. L’analisi al microscopio elettronico a trasmissione aveva suggerito che le CaCO_3NP non utilizzano la via endocitotica per essere internalizzate, dal momento che le NP nelle cellule non sono state mai osservate all’interno di vescicole. A conferma di ciò sono stati effettuati esperimenti di internalizzazione in presenza di inibitori dei diversi tipi di endocitosi, che hanno dimostrato che non è l’endocitosi il meccanismo per l’entrata delle CaCO_3NP in cellula e che ci hanno permesso di speculare che probabilmente tali NP “passano” la membrana plasmatica attraverso un meccanismo tutto da investigare.

In dati riportati nel complesso ci permettono di concludere che i tipi di NP considerate possono essere potenzialmente impiegabili a diverso titolo nelle comuni pratiche in campo oncologico. Infatti, le AgNP interferendo col ciclo cellulare delle cellule potrebbero essere studiate più approfonditamente come agente citostatico o in sinergia con un farmaco citostatico. Le AuNP si confermano le NP più biocompatibili e la loro capacità di distribuirsi all’interno dell’organismo lascia presupporre un loro ottimale utilizzo in terapia oncologica. Infine, le CaCO_3NP sembrano essere ottimi candidati da utilizzare come *carrier* da funzionalizzare con biomolecole specifiche, per bersagliare specifici compartimenti subcellulari, come nucleo e mitocondri. In generale, però, resta da comprendere in maniera dettagliata i meccanismi di entrata all’interno delle cellule e, molto più importante, da valutare il destino di queste NP nel tempo una volta internalizzate.

CONCLUSIONI

In questo lavoro di dottorato sono state prese in esame NP metalliche AgNP, AuNP e non metalliche CaCO₃NP, allo scopo di valutarne l'interazione con sistemi biologici *in vitro* ed *in vivo*. Tutti i tipi di NP sono stati sintetizzati attraverso green chemistry per inibire il rilascio di sottoprodotti tossici. Sono state caratterizzate allo scopo di valutarne morfologia, dimensioni e stabilità, ed è stata valutata la loro biocompatibilità, la cinetica di internalizzazione e la biodistribuzione.

Le AgNP sono state sintetizzate in una soluzione glucosata al fine di costruire un rivestimento di glucosio che le rende stabili nel tempo e impedisce il rilascio di ioni Ag⁺, che i dati in letteratura riportano come altamente tossico per i sistemi biologici. Le NP sono di forma sferica con un diametro di 25-30 nm. Gli esperimenti effettuati hanno dimostrato che esse vengono internalizzate sia dalle cellule prese in considerazione (cellule tumorali HeLa e linfociti umani da donatori sani) che dall'organismo modello scelto (Zebrafish *Danio rerio*) e risultano tossiche in maniera dose e tempo di trattamento dipendente. I possibili meccanismi di tossicità includono l'induzione di stress ossidativo mediante aumento della produzione di ROS in cellula ed induzione di morte cellulare per apoptosi e necrosi.

Le AuNP hanno un diametro medio di 12 nm e riescono a superare le barriere biologiche nell'organismo modello scelto, il topo, localizzandosi in quasi tutti gli organi.

I dati ottenuti ci permettono di concludere che entrambi i tipi di NP metalliche possono essere potenzialmente utilizzabili in campo oncologico. Si potrebbe sfruttare, ad esempio, la citotossicità, in particolare gli effetti inibenti sul ciclo cellulare, delle AgNP per distruggere le cellule tumorali, funzionalizzandole con un ligando che le renda altamente selettive per le cellule malate. Insieme alle AuNP, le AgNP hanno proprietà ottiche uniche che le rendono impiegabili in diagnostica e in nuove terapie antitumorali, ad esempio la terapia fototermica (PTT) e quella fotodinamica (PDT). La superficie delle NP metalliche può essere facilmente modificata per legare tipi diversi di molecole (radioisotopi, sostanze fluorescenti, ecc.) permettendo anche diagnostica multimodale. Tutto ciò ne fa ipotizzare le grandi potenzialità anche in teranostica in quanto le loro caratteristiche fisiche le

rendono ottimi strumenti da utilizzare per imaging, terapia e monitoraggio *real time* del decorso terapeutico.

Inoltre, per la loro biocompatibilità ed ottima distribuzione nell'organismo e per la facilità di essere escluse dal corpo, le AuNP sono ottimi candidati da utilizzare nel *drug delivery*.

Tra le NP non metalliche, in questo lavoro di dottorato sono state prese in esame le CaCO_3NP , sulle quali sono ancora scarsi i dati in letteratura, ma che hanno la grande capacità di essere facilmente funzionalizzate. Le NP sono state sintetizzate mediante “spray drying technique” e stabilizzate nel tempo mediante isopropanolo. Le NP hanno forma ellissoidale, un diametro maggiore di 80-100 nm e uno minore di 50 nm e sono stabili in terreno di coltura. Sono facilmente internalizzate dalle cellule tumorali prese a modello, cellule HeLa e MCF7, e non interferiscono in nessun modo con la vitalità cellulare né a tempi lunghi di trattamento né ad alte concentrazioni. Dai risultati ottenuti è possibile concludere che la loro biocompatibilità, la capacità di entrare nelle cellule e di raggiungere organuli importantissimi della cellula, come i mitocondri e il nucleo, e la possibilità di funzionalizzarne la superficie, le rende ottimi candidati da utilizzare come *carrier* di farmaci o di agenti diagnostici per bersagliare specifiche cellule o addirittura specifici compartimenti subcellulari.

I risultati ottenuti nel complesso aprono ampie prospettive di indagine al fine di meglio focalizzare l'impiego di tali tipi di NP e studi più approfonditi successivi sono necessari per comprenderne nel dettaglio i meccanismi specifici di entrata nelle cellule e il destino nel tempo delle NP internalizzate per meglio sfruttarle in campo medico.

BIBLIOGRAFIA

Ahamed M, Alsalhi MS, e Siddiqui MKJ. *Silver nanoparticle applications and human health*. Clinica chimica acta 2010 411: 1841-1848.

Alshatwi AA, Athinarayanan J e VaiyapuriSubbarayan P. *Green synthesis of platinum nanoparticles that induce cell death and G2/M-phase cell cycle arrest in human cervical cancer cells*. J Mater Sci Mater Med 2015 26: 53530.

Anastas P, Warner J. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press. New York. 1998.

Arndt M; Nairz O, Voss-Andreae J, Keller C, van der Zouw G, Zeilinger A. *Wave-particle duality of C60*. Nature 1999 401 : 680–682.

Asharani PV, Hande MP e Valiyaveetil S. *Anti-proliferative activity of silver nanoparticles*. BMC Cell Biol 2009 10: 65.

Atkins P, De Paula J. *Chimica Fisica* (4th ed.), Zanichelli, Bologna, 2004.

Avalos A, Haza AI, Mateo D e Morales P. *Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells*. J Appl Toxicol 2014 34: 413-423.

Ávalos Fúnez A, Isabel Haza A, Mateo D e Morales P. *In vitro evaluation of silver nanoparticles on human tumoral and normal cells*. Toxicol Mech Meth 2013 23: 153-160.

Bai J, Li Y, Du J, Wang S, Zheng J, Yang Q, Chen X. *One-pot synthesis of polyacrylamide-gold nanocomposite*. Mater Chem Phys 2007 106, 412.

Barnard AS, Russo SP, Snook IK. *Size dependent phase stability of carbon nanoparticles: Nanodiamond versus fullerenes*. J. Chem. Phys. 2003 118: 5094-5098.

Barratt G. *Colloidal drug carriers: achievements and perspective*. Cell. Mol. Life Sci. 2002 60: 21-37

Biederbick A, Kern HF e Elsässer HP. *Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles*. European journal of cell biology, 1995 66: 3-14.

Boisseau P, and Loubaton B. *Nanomedicine, nanotechnology in medicine*. C R Phys 2011 12: 620-636.

Borm PJ e Kreyling W. *Toxicological hazards of inhaled nanoparticles potential implications for drug delivery*. J Nanosci Nanotechnol 2004 4:521-31.

Borm PJA, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. *The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC*. Particle and Fibre Toxicology 2006. 3:11.

Bouwmeester H, Dekkers S, Noordam MY, Hagens WI, Bulder AS, De Heer C, ... e Sips A J. *Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production*. Regul Toxicol Pharmacol 2009 53: 52-62.

Bystrzejewska-Piotrowska G, Golimowski J, Urban PL. *Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management*. Waste Management 2009 29: 2587-2595.

Calderon-Garciduenas L, Reed W, Maronpot RR, Henriquez-Roldan C, Delgado-Chavez R, Calderon-Garciduenas A, Dragustinovis I, Franco-Lira M, Aragon-Flores M, Solt AC, Altenburg M, Torres-Jardon R, e. Swenberg JA. *Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution*. Toxicol Pathol 2004 32: 650-8.

Campbell A, Oldham M, Becaria A, Bondy SC, Meacher D, Sioutas C, Misra C, Mendez LB, e Kleinman M. *Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain*. Neurotoxicology 2005 26: 133-40.

Canesi L, Ciacci C, Vallotto D, Gallo G, Marcomini A e Pojana G. *In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on Mytilus hemocytes*. Aquat Toxicol 2010 96: 151-158.

Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, K. Braydich-Stolle L, Hess KL, Jones RL e Schlager JJ. *Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species*. J Phys Chem B 2008 112: 13608-13619.

Chadee DN, Hendzel MJ, Tylicki CP, Allis CD, Bazett-Jones DP, Wright JA, Davie JR. *Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts*. J Biol Chem 1999 274: 24914-24920.

Chairuangkitti P, Lawanprasert S, Roytrakul S, Aueviriyavit S, Phummiratch D, Kulthong K, Chanvorachote P e Maniratanachote R. *Silver nanoparticles induce*

toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. Toxicol In Vitro 2013 27: 330-338.

Chaudhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L, ... e Watkins R. *Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. Food additives and contaminants* 2008 25: 241-258.

Chen SF, Cölfen H., Antonietti M, Yu SH. *Ethanol assisted synthesis of pure and stable amorphous calcium carbonate nanoparticles. Chem Comm* 2013 49: 9564-9566.

Chen Y, Azad MB e Gibson SB. *Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. Cell Death Differ* 2009 16: 1040-1052.

Chithrani BD e Chan WC. *Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. Nano letters* 2007 7: 1542-1550.

Cho EC1, Xie J, Wurm PA, Xia Y. *Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. Nano Lett.* 2009 9: 1080-1084.

Choi JE, Kim S, Ahn JH, Youn P, Kang JS, Park K, ... e Ryu DY. *Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. Aquatic Toxicol* 2010 100: 151-159.

Chunfang L, Dongxiang L, Gangqiang. *Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls. Nanoscale Res Lett* 2011 6: 1-10.

Cunningham BA. *Unraveling chromatin's secrets: increasing numbers of high-quality, modification-specific histone antibodies give new life to chromatin studies. The Scientist* 2002 16: 47-50.

Cushen M, Kerry J, Morris M, Cruz-Romero M, e Cummins E. *Nanotechnologies in the food industry—Recent developments, risks and regulation. Trends in Food Sci & Tech* 2012 24: 30-46.

Daemen T, Hofstede G, Ten Kate MT, Bakker-Woudenberg IA, Scherphof GL. *Liposomal doxorubicin-induced toxicity: depletion and impairment of phagocytic activity of liver macrophages. Int J Cancer* 1995; 61: 666–671.

Dahl JA, Maddux BLS, Hutchison JE. *Toward Greener Nanosynthesis. Chemical Reviews* 2007 107: 2228-2269.

Dailey LA, Jekel N, Fink L, Gessler T, Schmehl T, Wittmar M, Kissel T, Seeger W. *Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2006 215: 100-108.

Darroudi M, Ahmad MB, Zamiri R, Zak AK, Abdullah AH, Ibrahim NA. *Time dependent effect in green synthesis of silver nanoparticles*. Int J Nanomedicine 2011 6: 677-681.

Derfus AM, Warren CWC e Sangeeta NB. *Intracellular delivery of quantum dots for live cell labeling and organelle tracking*. Advanced Materials 2004 16: 961-966.

Di Girolamo G, Massaro M, Piscopiello E, Tapfer L. *Nuclear Instruments & Methods in Physics*. Research B 2010 268: 2878.

Dini L, Panzarini E, Mariano S, Passeri D, Reggente M, Rossi M, e Vergallo C. *Microscopies at the Nanoscale for Nano-Scale Drug Delivery Systems*. Current drug targets 2015 16: 1512-1530.

Dini L, Panzarini E, Serra A, Buccolieri A e Manno D. *Synthesis and in vitro cytotoxicity of glycans-capped silver nanoparticles*. Nanomater and Nanotechno 2011 1: 58-63.

Egerton RF. *Reports on Progress Physics* 2009 72: 01650.

Elsaesser A e Vyvyan Howard C. *Toxicology of nanoparticles*. Adv Drug Deliver Rev 2012 64: 129-137.

Eom HJ e Choi J. *p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells*. Environ Sci Technol 2010 44: 8337-8342.

Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf, SM, e McCullough J. *The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products*. Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine 2013 9: 1-14.

Fako VE e Furgeson DY. *Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity*. Adv drug deliv rev 2009 61: 478-486.

Farré M, Gajda-Schranz K, Kantiani L, e Barceló D. *Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2009 393: 81-95.

Feynman RP. *There's Plenty of Room at the Bottom*. Engineering and Science. 1960. 23: 22-36.

Filippo E, Serra A, Buccolieri A, Manno D. *Green synthesis of silver nanoparticles with sucrose and maltose: Morphological and structural characterization*. Journal of Non-Crystalline Solids 2010 356: 344-350.

Foged C, Brodin B, Frokjaer S., Sundblad A. *Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in a vitro model*. Int J Pharm 2005 298:315-22.

Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ e Autrup H. *PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes*. Toxicol lett 2009 190: 156-162.

Fox CJ, Hammerman PS e Thompson CB. *Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response*. Nat Rev Immunol 2005 5: 844-852.

Gardiner DJ. *Practical Raman spectroscopy*. Springer-Verlag, 1989.

Geiser M, Kreyling WG. *Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles*. Part Fibre Toxicol 2007 7:2.

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schürch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof V, Heyder J, Gehr P. *Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells*. Environ Health Perspect 2005 113: 1555-60.

Gerber C eLang HP. *How the doors to the nanoworld were opened*. Nature nanotechnology 2006 1: 3-5.

Ghadam A G J, Idrees M, Naqvi SAH. *Synthesis and modification of calcium carbonate nano-particles via reverse micro-emulsion method*. International Journal of Nano and Biomaterials 2014 5: 14-26.

Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. *Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery*. Proc Natl Acad Sci 1999 96: 5177-81.

Gole A, Kumar A, Phadtare S, Mandale AB, Sastry M. *Glucose induced in-situ reduction of chloroaurate ions entrapped in a fatty amine film: formation of gold nanoparticle-lipid composites*. Phys Chem Comm 2001 19: 1-4.

Gopinath P, Gogoi SK, Sanpui P, Paul A, Chattopadhyay A e Ghosh SS. *Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010 77: 240-245.

Guo F, Li Y, Xu HX, Zhao GQ e He XJ. *Size-controllable synthesis of calcium carbonate nanoparticles using aqueous foam films as templates*. Mater Lett 2007 61: 4937-4939.

Gupta A, Maynes M, Silver S. *Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 1998 64: 5042-5045.

Gupta AK, Gupta M. *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials 2005 26: 3995-4021.

Gupta AK e Gupta M. *Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles*. Biomaterials 2005 26: 1565-1573.

Gwinn MR, Vallyathan V. *Nanoparticles: Health Effects-Pros and Cons*. Env Health Perspect 2006 114: 1818-1824.

Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Cassee FR, Sips AJ. *What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?*. Regul Toxicol Pharmacol 2007 49: 217-229.

He M, Forssberg E, Wang Y e Han Y. *Ultrasonication-assisted synthesis of calcium carbonate nanoparticles*. Chem Eng Commun 2005 192: 1468-1481.

Hoet PHM, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV. *Nanoparticles – known and unknown health risks*. Journal of Nanobiotechnology 2004 2: 12.

Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS e Chueh PJ. *The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS-and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells*. Toxicology letters 2008 179: 130-139.

Hussain N, Jaitley V, Florence AT. *Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics*. Adv Drug Deliv Rev 2001 50:107-42.

Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. *Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency*. J Pharm Pharmacol 1990 42: 821-6.

- Jani P, McCarthy DE, Florence AT. *Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral administration*. Int J Pharm 1994 105: 157–168.
- Jendelova P, Herynek V, Urdzikova L, Glogarova K, Kroupova J, Andersson B, Bryja V, Burian M, Hajek M, e Sykova E. *Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord*. J Neurosci Res 2004 76: 232-43.
- Jiang X, Guo R, Zhang L, Zhu Z. *Direct facile approach to the fabrication of chitosan-gold hybrid nanospheres*. Langmiur 2008 24: 3459-3464.
- Jiang X1, Röcker C, Hafner M, Brandholt S, Dörlich RM, Nienhaus GU. *Endo- and exocytosis of zwitterionic quantum dot nanoparticles by live HeLa cells*. ACS Nano 2010 23: 6787-97.
- Jin H, Heller DA, Sharma R, Strano MS. *Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles*. ACS Nano 2009 27: 149-58.
- Jin Y, Kannan S, Wu M, Zhao JX. *Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells*. Chem Res Toxicol 2007 20: 1126-1133.
- Joner EJ, Hartnik T. e Amundsen CE. *Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles*. Norwegian Pollution Control Authority Report 2007 2304: 1-64.
- Ju-Nam Y e Jamie RL. *Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications*. Sci total environ 2008 400: 396-414.
- Kaegi R, Wagner T, Hetzer B, Sinnet B, Tzvetkov G, & Boller M. *Size, number and chemical composition of nanosized particles in drinking water determined by analytical microscopy and LIBD*. Water research 2008 42: 2778-2786.
- Kashiwada S. *Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (Oryzias latipes)*. Environ health persp 2006 1697-1702.
- Kaushik S, Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kiffin R, Martinez-Vicente M, Kon M, ... e Cuervo AM. *Chaperone-mediated autophagy at a glance*. J Cell Sci 2011 124: 495-499.
- Kedar NP. *Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease?* J Postgrad Med 2003 49: 236-45.

Kemp MM, Kumar A, Mousa S. *Synthesis of gold and silver nanoparticles stabilized with glycosaminoglycans having distinctive biological activities*. *Biomacromolecules* 2009 10: 589-595.

Kim J S, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, ... e Kim YK. *Antimicrobial effects of silver nanoparticles*. *Nanomedicine: NBM* 2007 3: 95-101.

Kim J S, Yoon TJ, Yu KN, Noh MS, Woo M, Kim BG, Lee KH, Sohn BH, Park SB, Lee JK. *Cellular uptake of magnetic nanoparticles is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells*. *J Vet Sci* 2006 7: 321–326.

Kim S e Ryu DY. *Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues*. *J Appl Toxicol* 2013 33: 78-89.

Klaine SJ, Alvarez PJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, ... e Lead J R. *Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects*. *Environm Toxicol Chem* 2008 27: 1825-1851.

Lee YH, Cheng FY, Chiu HW, Tsai JC, Fang CY, Chen CW e Wang YJ. *Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts*. *Biomaterials*, 2014 35: 4706-4715.

Lewinski N, Colvin V, Drezek R. *Cytotoxicity of nanoparticles*. *Small* 2008, 4: 26–49.

Liu T, Guo L, Tao Y, Wang YB, Wang WD. *Synthesis and interfacial structure of nanoparticles γ -Fe₂O₃ coated with surfactant DBS and CTAB*. *Nanostructured materials* 1999 11: 487-492.

Liu W, Wu Y, Wang C, Li HC, Wang T, Liao CY, ... e Jiang GB. *Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size*. *Nanotoxicology* 2010 4: 319-330.

Lockman P R, Koziara JM, Mumper RJ, e Allen DD. *Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability*. *J Drug Target* 2004 12:635-41.

Lomer MC, Thompson RP, Powell JJ. *Fine and ultrafine particles in the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease*. *Proc. Nutr. Soc.*, 2002 61: 123-30.

López-Serrano A, Muñoz-Olivas R, Sanz-Landaluze J, Olasagasti M, Rainieri S, Cámara C. *Comparison of bioconcentration of ionic silver and silver nanoparticle in Zebrafish eleutheroembryos*. *Environ Pollut* 2014 191: 207-214.

Mann S. *Biomimetic materials chemistry*. Wiley-VCH Verlag, New York. 1996.

Manodori L e Benedetti A. *Nanoparticles monitoring in workplaces devoted to nanotechnologies*. In Journal of Physics: Conference Series 2009 170: 012001. IOP Publishing.

Martindale JL e Holbrook NJ. *Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival*. Journal of cellular physiology 192.1 (2002): 1-15.

McGrath P. e Li C.-Q. *Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity*. Drug Discovery 2008 13: 9-10.

McNeil PL, Boyle D, Henry TB, Handy RD, Sloman KA. *Effects of metal nanoparticles on the lateral line system and behaviour in early life stages of zebrafish (Danio rerio)*. Aquatic Toxicol 2014 152: 318–323.

Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, e Radomski MW. *Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance*. British journal of pharmacology 2007 150: 552-558.

Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. *Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing*. Nature Materials, 2005 4: 435–446.

Meyer JN, Lord CA, Yang XY, Turner EA, Badireddy AR, Marinakos SM, Chilkoti A, Wiesner MR e Auffan M. Aquat Toxicol 2010 100: 140-150.

Mishra S, Sonawane SH, and Singh RP. *Studies on characterization of nano CaCO₃ prepared by the in situ deposition technique and its application in PP-nano CaCO₃ composites*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics 2005 43: 107-113.

Miura N e Shinohara Y. *Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells*. Biochem Biophys Res Commun 2009 390: 733-737.

Mohanraj VJ, Chen Y. *Nanoparticles-a review*. Trop J Pharma Res 2006; 5: 561–573.

Muller R H e Keck CM. *Drug delivery to the brain--realization by novel drug carriers*. J Nanosci Nanotechnol 2004 4: 471-83.

Mura S, Nicolas J, Couvreur P. *Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery*. Nature materials 2013 12: 991-1003.

Muskens O, Christolos D, Del Fatti N, Vallée F. *Optical response of a single noble metal nanoparticle*. J Opt A: Pure Appl Opt 2006 8 : 264-272.

Nagy A, Harrison A, Sabbani S, Munson Jr RS, Dutta PK, & Waldman WJ. *Silver nanoparticles embedded in zeolite membranes: release of silver ions and mechanism of antibacterial action*. Int J Nanomedicine 2011 6: 1833-1852.

Nanda A, Saravanan M. *Biosynthesis of silver nanoparticles from Staphylococcus aureus and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE*. Nanomed.: Nanotechnol. Biol Med 2009 5: 452-456.

Nativo P, Prior IA e Brust M. *Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles*. ACS nano 2008 2: 1639-1644.

Nel A, Xia T, Madler L, Li N. *Toxic potential of materials at the nanolevel*. Science 2006, 311:622.

Niemeyer, CM. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie International Edition* 40.22 (2001): 4128-4158.

Oberdörster G, Ferin J, Lehnert BE. *Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury*. Environ Health Perspect 1994 102 5:173-9.

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect 2005 113: 823-839.

Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W e Cox C. *Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain*. Inhal Toxicol 2004 16: 437-45.

Okuzaki A, Kida S, Watanabe J, Hirasawa Z, Tabei Y. *Efficient plastid transformation in tobacco using small gold particles (0.07–0.3µm)*. Plant Biotechnology 2013 30 65–72.

Osborne OJ, Johnston BD, Moger J, Balousha M, Lead JR, Kudoh T. e Tyler CR. *Effects of particle size and coating on nanoscale Ag and TiO₂ exposure in zebrafish (Danio rerio) embryos*. Nanotoxicology 2013 7: 1315–1324.

Oura K, Lifshits VG, Saranin AA, Zotov AV, Katayama M. *Surface Science – An Introduction*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2003.

Pagona G, Tagmatarchis N. (2006) *Carbon nanotubes: materials for medicinal chemistry and biotechnological applications*. Curr. Med. Chem. 13, 1789-1798.

Palchetti S, Pozzi D, Mahmoudi M, & Caracciolo G. *Exploitation of nanoparticle–protein corona for emerging therapeutic and diagnostic applications*. J Mater Chem B 2016.

Panté N, Kann M. *Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm*. Mol Biol Cell 2002 13: 425–34.

Panyam J, Labhasetwar V. *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cell and tissues*. Adv Drug Deliv Rev 2003 55: 329-47.

Panzarini E, Inguscio V, Tenuzzo BA, Carata E e Dini L. *Nanomaterials and autophagy: new insights in cancer treatment*. Cancers 2013 5: 296-319.

Park EJ, Yi J, Kim Y, Choi K e Park K *Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism*. Toxicol. In Vitro 2010 24: 872-878.

Park EJ, Yi J, Kim Y, Choi K e Park K, *Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism*. Toxicol In Vitro 2010 24; 872-878.

Pavagadhi S, Sathishkumar M, Balasubramanian R. *Uptake of Ag and TiO₂ nanoparticles by zebrafish embryos in the presence of other contaminants in the aquatic environment*. Water research 2014 55: 280 -291.

Pawley JB. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (3rd ed.), Springer, Berlin, 2006.

Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, Choi J e Hyun JW. *Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis*. Toxicol Lett 2011 201: 92-100.

Pietroiusti A, Massimiani M, Fenoglio I, Colonna M, Valentini F, Palleschi G, ... e Sgambato A. *Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development*. Acs Nano 2011 5.6: 4624-4633.

Pileni M. *Nanosized Particles Made in Colloidal Assemblies*. Langmuir 1997 13, 3266.

PJ Goodhew e Humphreys FJ. *Electron Microscopy and Analysis* (2nd ed.), Taylor and Francis, London, 1988.

Ratte HT. *Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review*. Environmental Toxicology & Chemistry 1999 18: 89-108.

Raveendran P, Fu J, Wallen SL. *Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles*. *J Am Chem Soc* 2003 125: 13940–13941.

Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR e Rubinsztein DC. *Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology*. *Physiol. Rev* 2010 90: 1383-1435.

Rio MJ, Velez-Pardo C. *Paraquat induces apoptosis in human lymphocytes: protective and rescue effects of glucose, cannabinoids and insulin-like growth factor-I*. *Growth Factors* 2008 26: 49–60.

Roser M, Fischer D, Kissel T. *Surface-modified-biodegradable albumin nano- and microspheres II: effects of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats*. *Eur J Pharm Biopharm* 1998 46: 255-63.

Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. *Penetration of Intact Skin by Quantum Dots with Diverse Physicochemical Properties*. *Toxicol Sci* 2006 91: 159–165.

Ryter WS e Choi MKA. *Regulation of autophagy in oxygen-dependent cellular stress*. *Curr pharm des* 2013 19: 2747-2756.

Sahay G, Alakhova DY e Kabanov AK. *Endocytosis of Nanomedicines*. *J Control Release* 2010 145: 182–195.

Sanchez C, Ribot F, Rozes L e Alonso B. *Design of hybrid organic-inorganic nanocomposites synthesized via sol-gel chemistry*. *Mol Cryst Liq Cryst* 2000 354: 143-158.

Sanpui P, Chattopadhyay A e Ghosh SS. *Induction of Apoptosis in Cancer Cells at Low Silver Nanoparticle Concentrations using Chitosan Nanocarrier*. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2011 3: 218–228.

Sanvincens N, Marco MP. *Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine*. *Trends Biotechnol.*, 2008 26: 425-33.

Satyavani K, Gurudeeban S, Ramanathan T, Balasubramanian T. *Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of Citrullus colocynthis (L.) Schrad*. *J nanobiotechnology* 2011 9.1: 1.

Savic R, Luo L, Eisenberg A, Maysinger D. *Micellar nano-containers distribute to defined cytoplasmic organelles*. *Science*, 2003 300: 615–8.

Savolainen K, Pylkkänen L, Norppa H, Falck G, Lindberg H, Tuomi T, ... e Brouwer D. *Nanotechnologies, engineered nanomaterials and occupational health and safety—a review*. Safety Sci 2010 48: 957-963.

Scown TM, Van Aerle R, e Tyler CR. *Review: do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment?* Crit Rev Toxicol 2010 40: 653-670.

Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdorster G, e Kreyling WG. *Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the Service SR. Nanotechnology. Calls rise for more research on toxicology of nanomaterials*. Science 2005 310:1609.

Semmler M, Seitz J, Erbe F, Mayer P, Heyder J, Oberdörster G e Kreyling WG. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. Inhal toxicol 2004 16: 453-459.

Sharma H, Mishra PK, Talegaonkar S e Vaidya B. *Metal nanoparticles: a theranostic nanotool against cancer*. Drug discov today 2015 20: 1143-1151.

Shatkin JA. *Nanotechnology: health and environmental risks*. CRC Press, 2012.

Shin JS e Abraham SN. *Caveolae-not just craters in the cellular landscape*. Science 2007 293:1447-8.

Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR e Sastry M. *Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview*. Langmuir 2005 21: 10644-10654.

Siddiqui MA, Saquib Q, Ahamed M, Farshori NN, Ahmad J, Wahab R, Khan ST, Alhadlaq HA, Musarrat J, Al-Khedhairi AA e Pant AB. *Molybdenum nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress, G2/M arrest, and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929)*. Colloids Surf. B Biointerfaces 2015 125: 73-81.

Simberg D, Zhang WM, Merkulov S, McCrae K, Park JH, Sailor MJ, Ruoslahti E. *Contact activation of kallikrein-kinin system by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in vitro and in vivo*. J Control Release 2009 140:301-5.

Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM., Williams PM, Maffei TG, ... e Doak SH. *NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials*. Biomaterials 2009 30: 3891-3914.

Singh R, Lillard JW. *Nanoparticle-based targeted drug delivery*. Exp Mol Pathol 2009 86: 215-223.

Singh S, Nalwa HS. *Nanotechnology and health safety: toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health*. J Nanosci Nanotechnol 2007 7: 3048-70.

Skoog DA, West DM, Holler FJ. *Fundamentals of Analytical Chemistry* (5th ed.) Saunders College Publishing, New York, 1988.

Som C, Berges M, Chaudhry Q, Dusinska M, Fernandes TF, Olsen, SI, e Nowack B. *The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts*. Toxicology 2010 269: 160-169.

Stern ST, Adiseshaiah PP e Crist RM. *Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity*. Part fibre toxicol, 2012 9: 1.

Stern ST e McNeil SE. *Nanotechnology Safety Concerns Revisited*. Toxicol Sci 2008 101: 4-21.

Strahl BD e Allis CD. *The language of covalent histone modifications*. Nature; 2000 403: 41-45.

Swanson JA e Watts C. *Macropinocytosis*. Trends Cell Biol 1995 5: 424-8.

Takei K e Haucke V. *Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger*. Trends Cell Biol 2001 11: 385-91.

Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. *Biological synthesis of metallic nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology. Biology and Medicine 2010 6: 257–262.

Theng BKG e Guodong Yuan. *Nanoparticles in the soil environment*. Elements 2008 4.6: 395-399.

Tong R, Cheng JJ. *Anticancer polymeric nanomedicines*. Polym Rev 2007 47: 345-381.

Tran QH e Le AT. *Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives*. Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol 2013 4: 033001.

Trevisan R, Delapiedra G, Mello DF, Arl M, Schmidt ED, Meder F, Monopoli M, Cargnin-Ferreira E, Bouzon ZL, Fisher AS, Sheehan D and Dafre AL. *Gills are initial target of zinc oxide nanoparticles in oysters Crassostrea gigas, leading to mitochondrial disruption and oxidative stress*. Aquatic Toxicol 2014 153: 27-38.

Turkevich J, Stevenson P, Hillier J. *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*. Discuss Faraday Soc 1951 55–75.

Turkevitch J; Stevenson PC; Hillier J. *Discussions of the Faraday Society*. 1951 11: 55-75.

Uygur F, Oncül O, Evinç R, Diktas H, Acar A, Ulkür E. *Effects of three different topical antibacterial dressings on Acinetobacter baumannii-contaminated full-thickness burns in rats*. Iran Burns 2009 35:270-273.

Wagner V, Dullaart A, Bock AK, e Zweck A. *The emerging nanomedicine landscape*. Nature biotechnology 2006 24: 1211-1217.

Wang H e Gao L. *Preparation of nanoscale α -Al₂O₃ powder by the polyacrylamide gel method*. Nanostruct mater 1999 11: 1263-1267.

Wei L, Tang J, Zhang Z, Chen Y, Zhou G e Xi T. *Investigation of the cytotoxicity mechanism of silver nanoparticles in vitro*. Biomed Mater 2010 5: 044103.

West AR. *Solid State Chemistry and Its Applications*. Wiley, New York, 1974.

Whatmore RW. *Nanotechnology-what is it? Should we be worried?* Occupational Medicine 2006 56: 295–299.

Wiwanitkit V, Sereemasapun A e Rojanathanes R. *Effect of gold nanoparticle on the microscopic morphology of white blood cell*. Cytopathology 2009 20.2: 109-110.

Wiwanitkit V, Sereemasapun A e Rojanathanes R. *Identification of gold nanoparticle in lymphocytes: a confirmation of direct intracellular penetration effect*. Turk J Hematol 2009 26: 29-30.

Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, ... e Nel AE. *Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm*. Nano letters 2006 6: 1794-1807.

Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, ... e Nel AE. *Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm*. Nano letters 2006 6: 1794-1807.

Zhu X, Zhu L, Duan Z, Qi R, Li Y. e Lang Y. *Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (Danio rerio) early developmental stage*. J Environ Sci Health A 2008 43:278–284.

Zhu ML, Nie G, Meng H, Xia T, Nel A, Zhao Y. *Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate*. Acc Chem Res 2013 46: 622-31.

Pubblicazioni scientifiche

1. Panzarini E, **Mariano S**, Vergallo C, Fimia GM, Mura F, Rossi M, Serra A, Corazzari M, Dini L. Glucose capped silver nanoparticles enter HeLa cells and induce S and G2/M arrest. *Nanotoxicology* (submitted).
2. Panzarini E, Vergallo C, **Mariano S**, Dini L. Biocompatibility of Carbon Nanoparticles in HeLa Cells is Dictated by Synthesis and Sterilization Procedures. *Nanoscience and Nanometrology* 2016 2(1): 1-7.
3. Panzarini E, **Mariano S**, Dini L. (2015) Glycans Coated Silver Nanoparticles Induce Autophagy and Necrosis in HeLa Cells. *NANOFORUM 2014, AIP Conf Proc* 2015; 1667, 020017-1–020017-8.
4. Dini L, Panzarini E, **Mariano S**, Passeri D, Reggente M, Rossi M, Vergallo C. Microscopies at the nanoscale for nano-scale drug delivery systems. *Curr Drug Targets* 2015 16:1512-1530.
5. Vergallo C, Panzarini E, Izzo D, Carata E, **Mariano S**, Buccolieri A, Serra A, Manno D, Dini L. Cytotoxicity of -D-glucose coated silver nanoparticles on human lymphocytes. *NANOFORUM 2013, AIP Conf Proc* 2014;1603:78-85.
6. Panzarini E, Dwikat M, **Mariano S**, Vergallo C, Dini L. Administration dependent antioxidant effect of Carica papaya seeds water extract. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014: 281508.

Poster e/o comunicazioni orali presentate in Congressi nazionali.

1. Panzarini E, **Mariano S**, Vergallo C, Fimia GM, Dini L, Serra A, Mura F, Rossi M, Casciaro S. Glucose capped silver nanoparticles enter HeLa cells and induce S and G2/M arrest. *NanoFIM 2015. Lecce 24-25/07/2015. Comunicazione orale*
2. Dini L, Izzo D, Carata E, Tenuzzo BA, **Mariano S**, Vergallo C, Panzarini E (2014). Interazione di nanoparticelle di argento con cellule HeLa. 1° Congresso della Società Italiana di Nanotossicologia. Napoli, 27-28/06/2014. *Poster*

Pubblicazioni scientifiche

1. Panzarini E, **Mariano S**, Vergallo C, Fimia GM, Mura F, Rossi M, Serra A, Corazzari M, Dini L. Glucose capped silver nanoparticles enter HeLa cells and induce S and G2/M arrest. *Nanotoxicology* (submitted).
2. Panzarini E, Vergallo C, **Mariano S**, Dini L. Biocompatibility of Carbon Nanoparticles in HeLa Cells is Dictated by Synthesis and Sterilization Procedures. *Nanoscience and Nanometrology* 2016 2(1): 1-7.
3. Panzarini E, **Mariano S**, Dini L. (2015) Glycans Coated Silver Nanoparticles Induce Autophagy and Necrosis in HeLa Cells. *NANOFORUM 2014, AIP Conf Proc* 2015; 1667, 020017-1–020017-8.
4. Dini L, Panzarini E, **Mariano S**, Passeri D, Reggente M, Rossi M, Vergallo C. Microscopies at the nanoscale for nano-scale drug delivery systems. *Curr Drug Targets* 2015 16:1512-1530.
5. Vergallo C, Panzarini E, Izzo D, Carata E, **Mariano S**, Buccolieri A, Serra A, Manno D, Dini L. Cytotoxicity of -D-glucose coated silver nanoparticles on human lymphocytes. *NANOFORUM 2013, AIP Conf Proc* 2014;1603:78-85.
6. Panzarini E, Dwikat M, **Mariano S**, Vergallo C, Dini L. Administration dependent antioxidant effect of Carica papaya seeds water extract. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014: 281508.

Poster e/o comunicazioni orali presentate in Congressi nazionali.

1. Panzarini E, **Mariano S**, Vergallo C, Fimia GM, Dini L, Serra A, Mura F, Rossi M, Casciaro S. Glucose capped silver nanoparticles enter HeLa cells and induce S and G2/M arrest. *NanoFIM 2015. Lecce 24-25/07/2015. Comunicazione orale*
2. Dini L, Izzo D, Carata E, Tenuzzo BA, **Mariano S**, Vergallo C, Panzarini E (2014). Interazione di nanoparticelle di argento con cellule HeLa. 1° Congresso della Società Italiana di Nanotossicologia. Napoli, 27-28/06/2014. *Poster*