



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Laurea  
Magistrale  
in Scienze Ambientali

Tesi di Laurea

# **Caratterizzazione di nanomateriali multi- compositi in mezzi (eco)tossicologici a supporto di strategie di Safe & Sustainable by Design**

**Relatrice**

Prof.ssa. Elena Badetti

**Correlatore**

Dott. Andrea Brunelli

**Laureanda**

Greta Zanta

Matricola 864774

**Anno Accademico**

2021 / 2022





## Indice

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1. NANOMATERIALI: ASPETTI GENERALI	1
1.2. NANOMATERIALI INGEGNERIZZATI	3
1.3. RILASCIO DI NANOMATERIALI INGEGNERIZZATI IN AMBIENTE	5
1.4. DESTINO E COMPORTAMENTO DEI NANOMATERIALI INGEGNERIZZATI IN AMBIENTE	9
1.5. ESPOSIZIONE E TOSSICITÀ DEI NANOMATERIALI INGEGNERIZZATI	16
1.6. PROTOCOLLI DI DISPERSIONE	19
1.7. STRATEGIE DI SAFE AND SUSTAINABLE BY DESIGN	20
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>24</b>
3.1. NANOMATERIALI STUDIATI	24
3.2. PREPARAZIONE DEI MEZZI	26
3.3. PREPARAZIONE DELLE DISPERSIONI DI NANOMATERIALI	28
3.4. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LE ANALISI	28
3.5. TECNICHE ANALITICHE	29
3.6. INDICE DI STABILITÀ GLOBALE	38
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>39</b>
4.1. CARATTERIZZAZIONE COLLOIDALE	39
4.2. INDICE DI STABILITÀ GLOBALE	46
4.3. CARATTERIZZAZIONE IN FASE SOLIDA E STUDI DI DISSOLUZIONE	50
<b>5. CONCLUSIONI</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>60</b>
<b>APPENDICE</b>	<b>69</b>





## Abstract

Negli ultimi decenni, è aumentato notevolmente l'utilizzo di nanomateriali ingegnerizzati (ENMs) in diversi settori (ad es. medico, edile, tessile). Tra i materiali più recenti troviamo i nanomateriali multi-compositi (MCNMs), caratterizzati dalla presenza di due o più componenti di dimensioni nanometriche in unico sistema, in grado di conferire al prodotto finale proprietà innovative aggiuntive rispetto a quelli a componente singola. Il potenziale rischio che tali materiali possono rappresentare per la salute umana e per l'ambiente ha però suscitato notevoli preoccupazioni, in quanto il comportamento e gli effetti degli MCNMs non sono ancora del tutto chiari. Tali materiali infatti possono trasformarsi per interazione con altri composti e degradarsi, combinando in maniera sinergica o antagonista gli effetti legati alle singole componenti, al nanomateriale intero o a parti di esso.

In questo contesto, il lavoro di tesi comprende lo studio del comportamento di MCNMs in mezzi sia biologici sia ambientali, al fine di supportare i risultati dei test (eco)tossicologici eseguiti nell'ambito del progetto H2020 SUNSHINE (Safe and sUstainable by design Strategies for High performance multi-component NanomatErials). Nello specifico si sono studiate: i) la stabilità colloidale degli MCNMs in mezzi (eco)tossicologici opportunamente selezionati, ii) l'interazione di tali materiali con varie componenti dei mezzi, e iii) il potenziale rilascio di specie ioniche (ad es. Zn(II)) dagli MCNMs investigati.





# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. NANOMATERIALI: ASPETTI GENERALI

L'uso dei nanomateriali è tutt'altro che nuovo. Sin dalla storia antica, infatti, l'uomo li utilizza e li produce. Ne è un esempio la produzione del blu egiziano, il più antico pigmento sintetico conosciuto (Accorsi et al., 2009). Tuttavia è solo nel 1959 che Richard P. Feynman menziona la manipolazione dei materiali su scala nanometrica, introducendo per la prima volta, ad una conferenza scientifica, il concetto di nanotecnologia (Feynman, 1959). Il termine nanotecnologia venne coniato solo più tardi da Norio Taniguchi, nel 1974, per descrivere i processi ed i meccanismi coinvolti nella creazione di materiali su scala nanometrica. L'interesse verso questa scienza e le sue applicazioni è cresciuto notevolmente dagli anni '80 tanto da diventare una delle tecnologie più promettenti del XXI secolo. Il principale motivo della diffusione della nanotecnologia a livello globale deriva dal fatto che, a dimensioni comprese tra 1 e 100 nm avvengono fenomeni unici che consentono nuove applicazioni in diversi campi (Dowling, 2004; Patil et al., 2016). Su scala nanometrica (Figura 1), infatti, i materiali cambiano in modo significativo le loro caratteristiche rispetto ai corrispettivi materiali bulk (Saleh, 2020). In particolar modo essi presentano proprietà fisiche e chimiche nuove o migliorano quelle già presenti, a seguito della maggiore superficie per unità di volume.

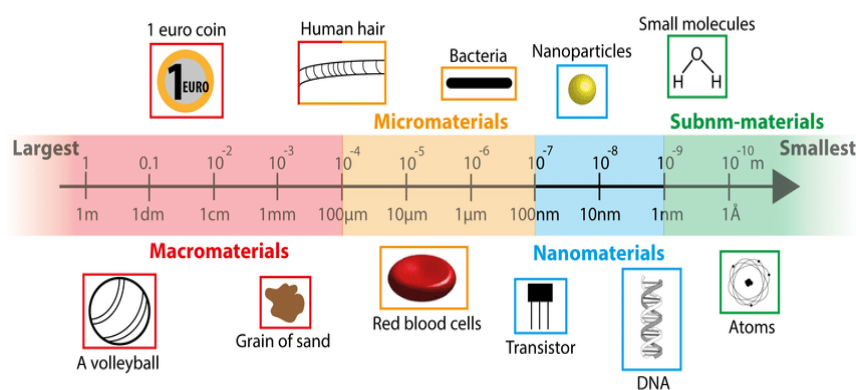


Figura 1 - Scala dimensionale dei materiali (Brullot, 2014).

La Commissione Europea nella raccomandazione del 2011 definisce un nanomateriale come un materiale naturale, prodotto accidentalmente od intenzionalmente dall'uomo, costituito da particelle solide presenti allo stato libero o come particelle aggregate o agglomerate, per cui almeno il 50% delle particelle nella distribuzione dimensionale una o più dimensioni esterne della particella sono comprese tra 1 nm e 100 nm. In casi specifici ed ove giustificato da preoccupazioni per l'ambiente, la salute o la sicurezza la soglia del

50% può essere sostituita da una soglia compresa tra l'1% ed il 50% (Potocnik, 2011). Fanno parte della definizione anche i fullereni, fiocchi di grafene (o graphene flakes) ed i nanotubi di carbonio a parete singola, aventi una o più dimensioni esterne inferiori di 1 nm, a causa dei loro potenziali effetti sulla salute umana e l'ambiente.

Sono noti due approcci che consentono la sintesi dei nanomateriali: (i) il metodo dall'alto verso il basso (o top-down) e (ii) il metodo dal basso verso l'alto (o bottom-up) (Saleh, 2020; Salem and Fouda, 2021). Nel primo metodo, materiali di dimensione macroscopica vengono frammentati in particelle di dimensione nanometrica. Nel secondo i nanomateriali sono formati assemblando atomi o molecole. Esistono anche approcci ibridi in cui i nanomateriali sono prodotti utilizzando entrambi gli approcci (Barhoum et al., 2022).

I nanomateriali possono essere classificati in diversi modi. In accordo con Barhoum et al., (2022) possono essere distinti in base alla loro origine, dimensione, composizione chimica, porosità, fase cristallina e dispersibilità. La distinzione in base all'origine permette di poterli suddividere in naturali, generati da processi biogeochimici o meccanici (ad es. eruzioni vulcaniche, erosione del suolo o incendi boschivi), ed antropici. Le sorgenti artificiali possono essere accidentali, prodotte attraverso l'influenza diretta o indiretta dell'uomo (ad es. gas di scarico dei veicoli, riscaldamento, combustioni) ed intenzionali (nanomateriali ingegnerizzati). Su base dimensionale si possono identificare nanomateriali 0D (ad es: nanoparticelle), 1D (ad es. nanotubi e nanofili), 2D (ad es. nanoplastre) ed infine 3D (ad es. materiali nanostrutturati). Secondo la composizione chimica i nanomateriali possono essere suddivisi in organici, ad esempio, lipidi e nanoparticelle (NPs) polimeriche, inorganici come NPs di metalli e di ossidi metallici, ibridi come bimetalli e *core-shell* ed infine carbonacei ad esempio fullereni e grafene. In base alla porosità possono essere microporosi (diametro dei pori inferiore a 2 nm), mesoporosi (diametro dei pori compreso tra 2 e 50 nm), e macroporosi (diametro dei pori maggiore di 50 nm). In funzione delle loro fasi cristalline si possono avere nanomateriali monofase (NPs di metalli e di ossidi metallici) e multifase (NPs *core-shell*). Possono infine essere dispersi, aggregati, disomogenei e isometrici. Altre caratteristiche utili per la caratterizzazione di un nanomateriale includono: l'area, la carica e la reattività superficiale.

## 1.2. NANOMATERIALI INGEGNERIZZATI

### Applicazioni

I nanomateriali ingegnerizzati (ENMs) sono prodotti intenzionalmente dall'uomo al fine di ottenere nuovi materiali con specifiche proprietà (forma, dimensione, carica, area e rivestimento superficiale) richieste per le applicazioni desiderate. Alcuni esempi sono rappresentati dai nanomateriali a base di carbonio che sono impiegati in applicazioni biomediche e come sensori. Il nano ferro zero valente viene impiegato in acqua, nei sedimenti e nei suoli per il risanamento ambientale. Gli ossidi metallici sono utilizzati nella somministrazione dei farmaci, nella diagnostica medica, come protettori UV nelle creme solari, nei pigmenti e come fotocatalizzatori. I nanomateriali compositi sono impiegati nel rilascio dei farmaci, per ottimizzare le proprietà meccaniche e come ritardanti di fiamma. Infine, i nanomateriali di argento possono essere utilizzati per applicazioni mediche, per purificare l'acqua e come agenti antimicrobici. Sono noti anche ENMs le cui proprietà imitano quelle dei nanomateriali naturali o della materia vivente (Sudha et al., 2018).

### Produzione industriale globale

Dal 2010 al 2015, a livello globale, la produzione di ENMs è incrementata notevolmente. L'entità di tale crescita è descritta nel dettaglio da Janković and Plata, (2019). I dati ottenuti hanno dimostrato che la maggior parte degli ENMs registra tassi di crescita annui compresi tra il 2 e il 20%. Nello specifico, i nanomateriali di ossido di ferro, grafene e cellulosa hanno registrato tassi di crescita annui del 14-28%, 36-78%, 60-84% rispettivamente.

Conoscere le quantità di ENMs prodotti è importante in quanto durante l'intero ciclo di vita, che va dai processi di sintesi degli ENMs stessi e dei prodotti che li contengono, alla fase d'uso e di smaltimento tali materiali potrebbero essere rilasciati nell'ambiente (Hendren et al., 2011), rappresentando un potenziale rischio sia per la salute umana che per l'ambiente. A tal proposito i risultati ottenuti dal gruppo di studio di Griffitt et al., (2008) mostrano che dopo 48 ore di esposizione di adulti di *Daphnia pulex*, le NPs di argento e rame causano tossicità a concentrazioni di 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 60  $\mu\text{g L}^{-1}$  rispettivamente.

Quantificare la produzione di ENMs rappresenta però un compito difficile in quanto spesso i dati sono difficili da reperire o non sono confrontabili tra di loro. Il gruppo di Piccinno et al., (2012) riporta le stime di produzione globale degli ENMs nel 2010. Da tale studio

emerge che i nanomateriali inorganici, e in particolare gli ossidi di metallo quali biossido di titanio ( $\text{TiO}_2$ ), ossido di zinco ( $\text{ZnO}$ ), ossido di ferro ( $\text{Fe}_x\text{O}_y$ ), ossido di alluminio ( $\text{Al}_x\text{O}_y$ ) ed ossido di cerio ( $\text{CeO}_x$ ) assieme ai nanotubi di carbonio, si collocano ai primi posti in termini di stima di produzione globale nel 2010.  $\text{TiO}_2$  mostra i valori di produzione più alti (10000 t/anno) mentre gli altri sono prodotti tra 100 t/anno e 1000 t/anno.  $\text{SiO}_2$  copre un intervallo da meno di 10 t/anno a più di 10000 t/anno. Una stima della produzione globale di ENMs è stata presentata anche da Keller et al., (2013) e i risultati ottenuti dimostrano anche in questo caso che nel 2010  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ , Fe e ossidi di ferro,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CeO}_2$  e i nanotubi di carbonio si collocano ai primi posti.  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$  mostrano i valori di produzione più elevati con 95000 t/anno e 88000 t/anno prodotte rispettivamente, seguiti da Fe e ossidi di ferro (42000 t/anno).  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e i nanotubi di carbonio sono prodotti rispettivamente in quantità pari a 34000 t/anno, 35000 t/anno e 32000 t/anno.  $\text{CeO}_2$  invece ha una produzione di 10000 t/anno. Dai due studi emergono delle differenze rispetto ai quantitativi prodotti dovute al fatto che nel campo dei nanomateriali i sondaggi forniti alle aziende presentano un'elevata incertezza. Inoltre, anche la distinzione tra particelle legate, aggregate ed agglomerate è cruciale per stimarne l'effettiva produzione (Piccinno et al., 2012). Secondo lo studio di Janković and Plata, (2019)  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ , nano argille,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e i nanotubi di carbonio sono i nanomateriali maggiormente prodotti nel 2015.  $\text{SiO}_2$  ha registrato i volumi di produzione più alti (210000 t/anno – 1600000 t/anno). I restanti sono prodotti tra 550 t/anno a 160000 t/anno. Alcuni nanomateriali come  $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$  rappresentano mercati relativamente piccoli (9.2 – 54 t/anno). Per il periodo 2015-2025 si prevede che i tassi di crescita rimangano tali o diminuiscano per la maggior parte dei nanomateriali rispetto al periodo 2010-2015. Alcune eccezioni sono rappresentate dal mercato dei dendrimeri e da  $\text{ZnO}$ , la cui stima dei tassi di crescita annuali prevede un aumento del 10-20% e del 6-8% nel periodo considerato (Janković and Plata, 2019).

### *Nanomateriali multi-compositi*

La ricerca di nanomateriali sempre più innovativi e performanti ha recentemente portato allo sviluppo di nanomateriali multi-compositi (MCNMs). Tali nanomateriali sono materiali ibridi formati dalla combinazione di più di una componente di dimensioni nanometriche in un unico sistema, uniti da forti legami molecolari o macromolecolari o da altre forze chimico-fisiche o sono nanomateriali modificati in superficie da rivestimenti di tipo "hard" o "soft" (Saleh et al., 2015). Le combinazioni più usate sono carbonio e metallo/ossido di metallo (Li et al., 2022). Le particelle bimetalliche comprendono diverse combinazioni, tra

cui i) strutture di tipo *core-shell*, in cui uno dei due componenti è il *core*, rivestito dal secondo componente (*shell*), ii) miscele di due solidi o, iii) materiali in cui le due componenti sono legate chimicamente ma che mantengono ognuna la loro individualità (Figura 2) (Marinkovic et al., 2018).

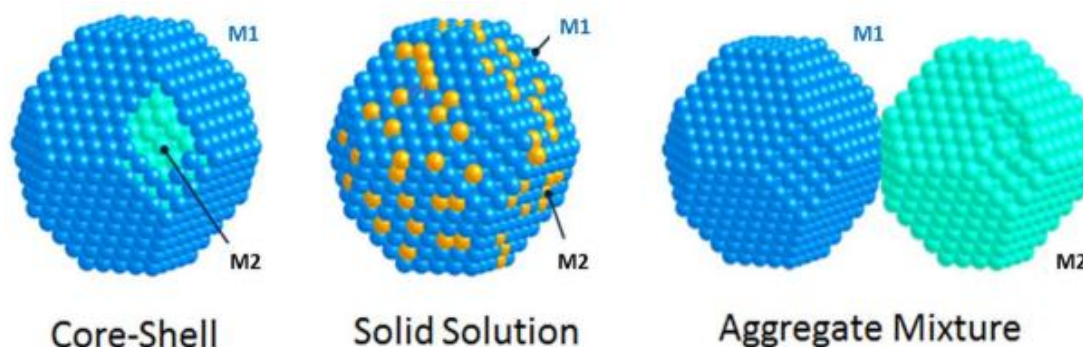


Figura 2 - Strutture delle particelle bimetalliche (fonte: Marinkovic et al., 2018).

Combinare opportunamente i nanomateriali ha lo scopo di migliorarne le funzionalità esistenti, e/o di ottenere nuove proprietà che sono diverse dalla somma delle proprietà delle singole componenti. Tali combinazioni provocano variazioni nelle interazioni elettrostatiche e di van der Waals (Saleh et al., 2015).

Grazie alle loro prestazioni, i MCNMs trovano una vasta gamma di applicazioni, che vanno dall'energia, all'elettronica, passando per il campo biomedico ed ambientale. A tal proposito Devi et al., (2019) hanno dimostrato che la combinazione di NPs di argento (Ag) con carbone attivo migliora le proprietà antimicrobiche rispetto ai risultati ottenuti utilizzando solamente le Ag NPs. I MCNMs possono inoltre migliorare le proprietà meccaniche, chimiche e magnetiche dei materiali in cui vengono inclusi, preservandoli dai processi di degradazione (particolarmente utile nel caso di materiali costosi) e favorendo il loro utilizzo in diverse applicazioni.

### 1.3. RILASCIO DI NANOMATERIALI INGEGNERIZZATI IN AMBIENTE

Il crescente utilizzo di ENMs in prodotti di largo consumo, sia da un punto di vista quantitativo che in termini di diversità di materiali prodotti, ne influenza l'emissione in ambiente. Di fatto, il rilascio di ENMs da tali prodotti in ambiente può derivare sia da fonti puntiformi sia da sorgenti diffuse. L'emissione da fonti puntiformi avviene in un dato istante ed esattamente localizzato nello spazio (ad es. inceneritori, impianti di trattamento delle acque reflue, sversamento accidentale). Le fonti diffuse, che sono generalmente le più difficili da controllare rispetto a quelle puntiformi, producono emissioni non localizzabili, ma

distribuite sul territorio. Oltre alle fonti di emissione, è anche possibile distinguere il rilascio di ENMs in rilascio diretto, se avviene direttamente in ambiente ed indiretto, se avviene attraverso altri comparti (ad es. discariche, impianti di trattamento delle acque reflue). Le emissioni possono inoltre essere intenzionali (per le quali si conoscono le fonti e le entità in ambiente) e non intenzionali.

Rispetto alla grande quantità di studi eseguiti sugli effetti degli ENMs a scala di laboratorio, le ricerche sulle emissioni sono molto limitate a seguito della mancanza di tecniche adeguate per poterle monitorare quantitativamente (von der Kammer et al., 2012). Solo il 20% degli ENMs utilizzati in campo industriale e il 36% delle categorie di prodotti coinvolte sono stati utilizzati in studi di rilascio e sono stati descritti solo alcuni scenari di rilascio rilevanti (Caballero-Guzman and Nowack, 2016). Per valutare l'emissione degli ENMs sono stati utilizzati diversi modelli ed approcci, le cui metodologie variano da modelli più generali a modelli utilizzati per uno scenario più specifico. I modelli comunemente usati sono l'analisi di flusso dei materiali, utilizzati per prevedere le emissioni del prodotto nei comparti tecnici (ad es. discariche, impianti di riciclaggio, impianti di trattamento delle acque reflue) e poi nell'ambiente, ed i modelli di destino ambientale, che descrivono il trasporto e la distribuzione attraverso i diversi comparti ambientali (aria, acqua e terra) (Figura 3). Nel 2010 è stato stimato che tra il 63-91% degli ENMs prodotti a livello mondiale ha raggiunto le discariche. Una percentuale compresa tra l'8-28% è stata rilasciata nel suolo mentre lo 0.4-7% nei corpi idrici. Infine, è stato stimato che lo 0.1-1.5% ha raggiunto l'atmosfera (Keller et al., 2013).

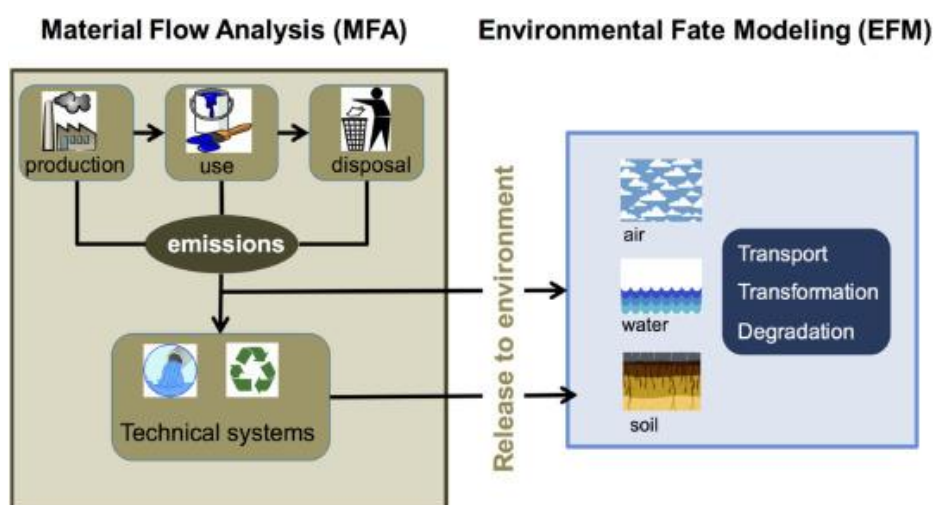


Figura 3 - Relazione tra l'analisi del flusso di materiale ed i modelli di destino ambientale (fonte: Nowack, 2017).

Oltre a conoscere le quantità di nanoparticelle ingegnerizzate rilasciate nell'ambiente, è importante anche indagare in quali forme sono rilasciate in seguito ai vari processi di trasformazione a cui sono soggette. La forma infatti in cui sono presenti nei prodotti influisce sulle quantità di sostanze potenzialmente rilasciate (Klaine et al., 2008).

La valutazione e la quantificazione degli ENMs richiede una ricerca esauriente dell'intero ciclo di vita (Figura 4), a partire dai processi di produzione fino alle procedure di riciclo e smaltimento. Per tutte e tre le tipologie di scenari si devono conoscere le condizioni e le concentrazioni che portano al rilascio e in quali comparti tecnici (ad es. discariche, impianti di riciclaggio, impianti di trattamento delle acque reflue) o ambientali (aria, acqua e terra) tali ENMs sono rilasciati.

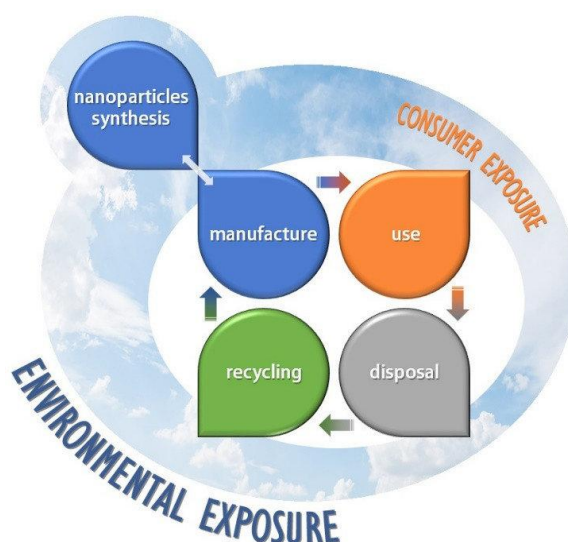


Figura 4 - Ciclo di vita dei prodotti contenenti nanoparticelle (fonte: Martínez et al., 2020).

### Rilasci durante la fase di produzione

Il rilascio di ENMs durante la produzione può verificarsi a seguito di emissioni dirette e indirette. L'esposizione dei lavoratori durante la manipolazione e la produzione è una possibile via di emissione nell'ambiente, nonostante la sua rilevanza non sia ancora del tutto nota (Sørensen et al., 2020). Il gruppo di studio di Keller et al., (2013) stima che le emissioni globali nel 2010, derivanti dalla produzione, vanno dallo 0.1 al 2%. Durante il rilascio a concentrazione inferiore (stimata attorno allo 0.1%), si ha una ripartizione del 10% sia in aria che in acqua. Raggiunge la discarica invece l'80% degli ENMs. Considerando invece la concentrazione di rilascio maggiore (stimata attorno al 2%), si assiste ad una distribuzione sia in aria che in acqua pari al 40% mentre il restante 20% raggiunge la discarica.

### Rilasci durante la fase d'uso

Le emissioni degli ENMs durante l'impiego del prodotto che li contiene possono verificarsi intenzionalmente o accidentalmente. A seconda del tipo di prodotto e delle sue proprietà, l'emissione è diversa (Gottschalk and Nowack, 2011). Le particelle contenute nei prodotti fluidi vengono quasi totalmente rilasciate a seguito dell'impiego del prodotto (Medhi et al., 2020). Dai prodotti solidi le particelle contenute sono rilasciate gradualmente durante l'impiego (Veksha et al., 2020). Dai prodotti spray l'emissione è immediata (Tada et al., 2020). Dalle sospensioni (ad es. creme solari e cosmetici) l'emissione totale avviene nelle prime ore di utilizzo. Le particelle possono anche rimanere stabili per diversi anni in vestiti e coloranti. Keller et al., (2013) riportano le stime delle emissioni globali nel 2010 suddivise in base alla tipologia di prodotti. Per semplicità sono considerate tre applicazioni principali che possono costituire implicazioni ambientali importanti. Per quanto riguarda il settore dei rivestimenti, vernici e pigmenti, le stime di rilascio globale considerano che le emissioni totali vadano dal 10 al 90%, con una distribuzione negli impianti di trattamento delle acque reflue del 60% (di cui il 4% nei corpi idrici tramite l'acqua piovana), nell'aria dell'1% mentre nel suolo del 35%. Il settore dei cosmetici registra un rilascio globale tra il 75 e il 95%, con una distribuzione negli impianti di trattamento delle acque reflue del 90% (di cui l'8% nei corpi idrici tramite il nuoto o il bagno), nell'aria e nel suolo dell'1%. Il settore tessile presenta un rilascio globale del 10-95%, con una distribuzione del 95% in acqua e del 5% in aria.

### Rilasci durante la fase di smaltimento e riciclo

Il trattamento dei rifiuti influisce sulla quantità e sul modo in cui gli ENMs sono rilasciati dai prodotti. La discarica rappresenta il luogo dove si trova la maggior parte dei nanomateriali (Nowack, 2017). Questa, a seconda della resistenza dei prodotti e al degrado dei sistemi di controllo, può rilasciare ENMs nell'ambiente (Nowack et al., 2013). I prodotti inceneriti provocano il rilascio di particelle di cenere nell'aria (Nowack, 2017), la cui concentrazione però viene limitata grazie all'utilizzo di opportuni sistemi filtranti (Koivisto et al., 2017). Nei prodotti riciclati l'emissione può verificarsi a seguito di processi di riciclo secondo la loro resistenza (Nowack et al., 2013). In accordo con Keller et al., (2013), nel 2010 le percentuali di rilascio globale dagli impianti di incenerimento sono dello 0.05-1% in aria, dell'1-50% nelle scorie e del 50-98% circa catturate dai filtri. Gli impianti di trattamento



delle acque reflue rilasciano globalmente tra il 75 e il 97% degli ENMs nei fanghi e tra il 3-25% negli effluenti. Non sono noti tassi di riciclo dei prodotti compatibili con gli ENMs.

#### 1.4. DESTINO E COMPORTAMENTO DEI NANOMATERIALI INGEGNERIZZATI IN AMBIENTE

Gli ENMs sono ampiamente presenti nell'ambiente a seguito del rilascio sia volontario che involontario in ogni fase del ciclo di vita dei prodotti. Una volta rilasciati, essi possono potenzialmente interagire con le varie componenti dell'ambiente, subendo diversi processi di trasformazione (Figura 5), che ne possono modificare le proprietà fisiche e chimiche (Mudunkotuwa and Grassian, 2015).

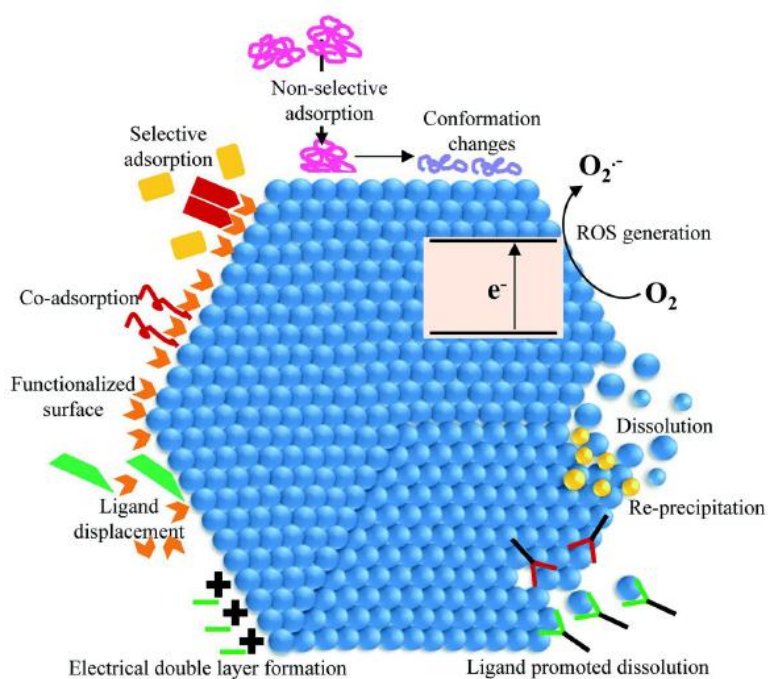


Figura 5 - Interazioni sulla superficie delle nanoparticelle (fonte: Mudunkotuwa and Grassian, 2015).

In atmosfera i processi chiave che riguardano gli ENMs sono la coagulazione, l'aggregazione-disaggregazione e la deposizione umida e secca. Negli ambienti acquatici e terrestri l'agglomerazione/aggregazione o disaggregazione, la sedimentazione, le reazioni redox e la dissoluzione sono i principali processi in grado di alterare il destino, il trasporto, la biodisponibilità e la tossicità degli ENMs. Anche la biodegradazione e le biomodifiche svolgono un ruolo determinante nella regolazione della stabilità, del destino e della tossicità degli ENMs. Tutte queste interazioni sono influenzate dalle proprietà intrinseche degli ENMs (ad es. dimensione delle particelle, area e carica superficiale, solubilità in acqua, stabilità colloidale, reattività) e dalle proprietà ambientali (ad es. forza ionica, pH, temperatura) (Abbas et al., 2020).

Nonostante alcuni studi (Peters et al., 2018; J.-L. Wang et al., 2020) si siano concentrati sulla misura delle concentrazioni degli ENMs in matrici ambientali complesse, come i fiumi, esistono ancora limitazioni tecniche importanti (ad es. la capacità di discriminare gli ENMs dai nanomateriali naturali) per quantificare in modo accurato la loro presenza nell'ambiente. Negli ultimi anni sono stati sviluppati dei modelli basati sui volumi di produzione e sul rilascio di ENMs per stimare i flussi di materiale e identificare i comparti finali dove i diversi tipi di ENMs si accumulano nel tempo (Gottschalk et al., 2013; Mueller and Nowack, 2008). Grazie a questi modelli, è stato individuato che le discariche, il suolo e i sedimenti sono i principali comparti in cui si depositano maggiormente gli ENMs. Questi modelli però sono progettati per quantificare i flussi che entrano nei comparti ambientali e tecnici e non forniscono alcuna informazione sul destino e sull'impatto degli ENMs una volta emessi nell'ambiente. L'alto grado di complessità dei suoli e dei sedimenti complica gli studi sulle trasformazioni e il trasporto degli ENMs in queste matrici ambientali (Levard et al., 2012; Sun et al., 2015).

Come per qualsiasi ENMs, anche i MCNMs sono oggetto di diversi processi nell'ambiente e il loro destino e comportamento dipende dai fattori chimici e fisici delle matrici (ad es. pH, forza ionica, densità porosità e tessitura del suolo) nonché dalle loro proprietà fisico-chimiche (Li et al., 2022).

I principali processi che avvengono in ambiente acquatico sono riportati in Tabella 1. In accordo con quanto riportato da Abbas et al., (2020) e Bathi et al., (2021) sono raggruppati in tre principali categorie: 1) trasformazioni fisiche, 2) chimiche e 3) biologiche.

Tabella 1 – Principali processi di trasformazione negli ambienti acquatici.

<b>Trasformazione ambientale</b>	<b>Descrizione</b>
<b>Trasformazioni fisiche</b>	
Agglomerazione	Unione reversibile tra le particelle attraverso forze deboli di van der Waals.
Aggregazione	Unione irreversibile tra le particelle attraverso interazioni elettrostatiche.
Sedimentazione	Flocculazione e sedimentazione delle particelle in sospensione
<b>Trasformazioni chimiche</b>	
Reazioni redox	Perdita o acquisto di un elettrone.
Dissoluzione	Rilascio di ioni o molecole solubili dagli ENMs.
<b>Trasformazioni biologiche</b>	
Biodegradazione	Trasformazioni ad opera di batteri ed altri microrganismi.

Il destino degli ENMs in ambiente acquatico dipende dai fenomeni di trasporto, legati a processi ad es. di agglomerazione/aggregazione e sedimentazione, e di trasformazione dei materiali (ad es. dissoluzione). Di seguito ci focalizzeremo sui processi di agglomerazione/aggregazione, sedimentazione e dissoluzione.

### Processi di agglomerazione ed aggregazione

Particelle con dimensioni minori del micron, disperse in una soluzione liquida, sono in un costante stato di movimento casuale, denominato moto Browniano. Durante il loro movimento possono entrare in collisione tra di loro. Quando la somma delle forze in gioco (forza attrattiva di van der Waals e forza elettrostatica) tra le particelle si bilancia, si osservano fenomeni di agglomerazione o aggregazione. Gli agglomerati sono particelle legate insieme mediante forze di van der Waals. Ne risulta quindi che l'agglomerazione è un processo reversibile e le particelle esistono ancora come singole entità. Gli aggregati sono invece particelle unite sia attraverso le interazioni elettrostatiche sia mediante legami forti. Ne risulta quindi che l'aggregazione è un processo irreversibile. La differenza tra agglomerati ed aggregati è riportata in Figura 6. Quando tali processi avvengono tra particelle della stessa natura si parla di omo agglomerazione/aggregazione, mentre se le interazioni avvengono tra particelle e/o composti differenti (ad es. con colloidali organici o inorganici) si osserva il fenomeno di etero agglomerazione/aggregazione (Lei et al., 2018). Nella letteratura scientifica, i termini agglomerazione e aggregazione vengono spesso utilizzati indistintamente perché risulta difficile distinguere sperimentalmente i due processi.

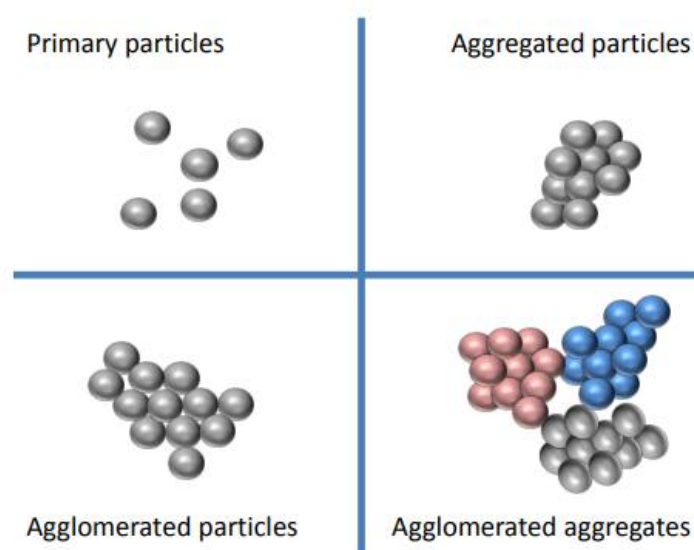


Figura 6 - Differenza tra agglomerati ed aggregati (Hartmann et al., 2014).

I fattori chiave che influenzano tali processi sono il pH, la forza ionica e lo stato di valenza dell'elettrolita, oltre alla concentrazione iniziale, al tipo e alle caratteristiche fisico-chimiche (ad es. forma, dimensione, rivestimento superficiale) delle NPs (Amde et al., 2017; Lowry et al., 2012; Römer et al., 2011). Il pH riveste un ruolo fondamentale in quanto regola la carica superficiale delle particelle (Lin et al., 2010). Particelle con carica elevata ( $\pm 30$  mV per NPs di ossidi metallici per esempio) si respingono e le dispersioni vengono in generale definite stabili. Avvicinandosi invece al punto isoelettrico (carica netta pari a 0), la carica superficiale e la mobilità delle particelle sono pari a zero. Ciò diminuisce drasticamente la loro stabilità colloidale dando luogo alla formazione di agglomerati/aggregati che sedimentano velocemente nel mezzo di dispersione. Anche la forza ionica regola il grado di agglomerazione/aggregazione delle NPs e quindi la loro stabilità colloidale; la presenza di cationi divalenti nel mezzo di dispersione, per esempio, aumenta la destabilizzazione delle dispersioni. A seconda della tipologia di rivestimento delle NPs, inoltre, si possono osservare comportamenti colloidali distinti. La presenza di un *coating*, infatti, può favorire o altresì ostacolare il processo di agglomerazione/aggregazione e quindi la conseguente sedimentazione. Anche la materia organica naturale svolge un ruolo importante nei processi di agglomerazione/aggregazione che influenzano la stabilità colloidale delle dispersioni. Determinate concentrazioni di materia organica naturale infatti possono formare un *coating* attorno alle NPs, modificandone la carica superficiale e favorendo processi di disagglomerazione. In ambiente acquatico, la stabilità di nanoparticelle ingegnerizzate come ad esempio CuO e ZnO diminuisce con l'aumentare del pH, della forza ionica e della concentrazione di nanoparticelle ingegnerizzate (Parsai and Kumar, 2019). È stato inoltre dimostrato che la stessa miscela è influenzata dalla concentrazione di particolato solido sospeso (ad esempio argilla) e di acido umico (Parsai and Kumar, 2020).

In un sistema colloidale stabile i processi di agglomerazione sono trascurabili e le singole NPs rimangono disperse finché il sistema non viene perturbato. Tra i metodi più utilizzati per mantenere la stabilità di NPs in un mezzo disperdente troviamo l'impiego di stabilizzanti a catena lunga (si legano alla superficie delle NPs ed evitano che le particelle entrino in contatto tra di loro) o l'aggiunta di elettroliti che aumentino la carica superficiale e di conseguenza la repulsione elettrostatica (Figura 7). In assenza di leganti che stabilizzino le NPs per interazioni steriche, l'energia potenziale totale in gioco quando due particelle si avvicinano o si allontanano è descritta dalla teoria DLVO (Deryaguin, Landau, Verwey e Overbeek).

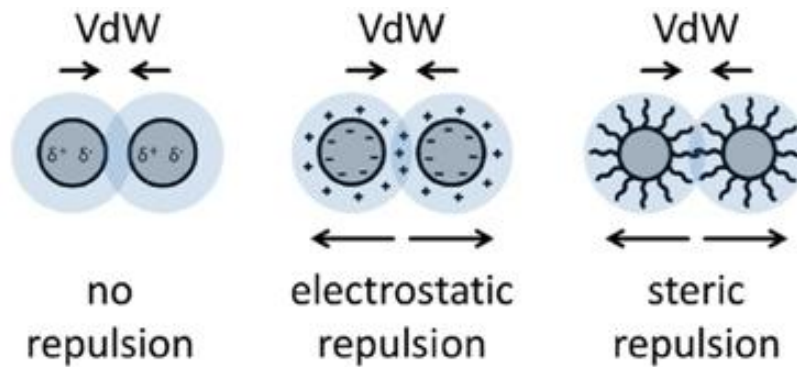


Figura 7 - Stabilizzazione delle dispersioni di nanoparticelle (Matter et al., 2019).

La teoria DLVO assume che le forze più significative per la maggior parte dei sistemi colloidali, siano due: i) le forze di van der Waals (attrattive) e ii) le forze elettrostatiche di Coulomb (repulsive) (Figura 8).

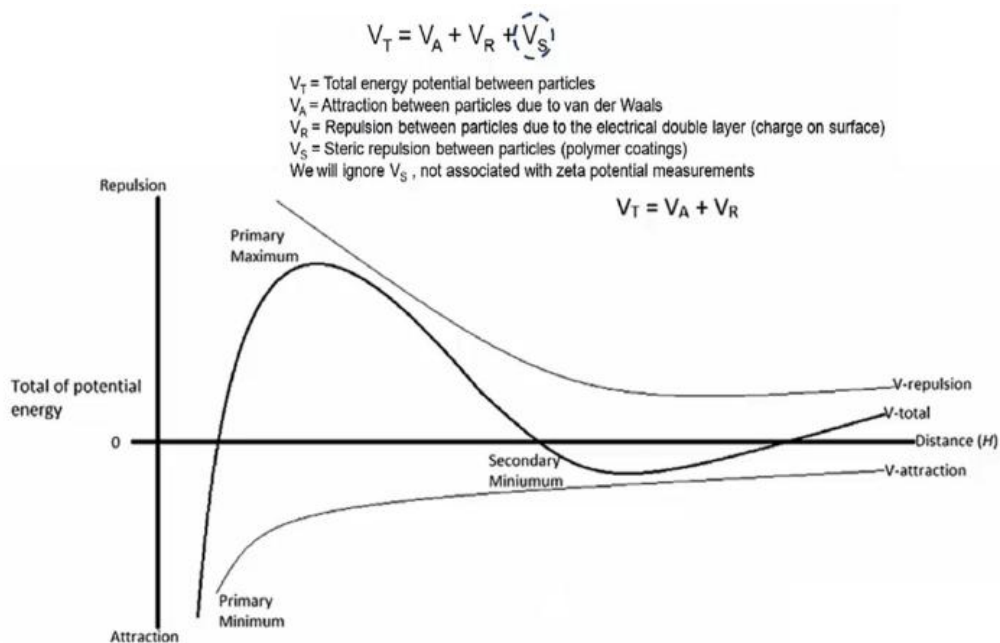


Figura 8 – Rappresentazione schematica della teoria DLVO (Tadros, 2013).

Le forze attrattive di van der Waals possono essere trascurabili quando le particelle sono distanti, ma diventano più importanti per distanze inferiori a 10 nm. Le forze elettrostatiche si formano all'interfaccia tra le particelle e il mezzo acquoso circostante. Queste forze sono dovute alla presenza del doppio strato elettrico (EDL) (Figura 9) formato dallo strato stazionario e dallo strato diffuso. Lo strato stazionario è costituito da ioni immobili negativi aderenti alla superficie della particella grazie alle forze elettrostatiche (Bhattacharjee, 2016). Lo strato diffuso è costituito da ioni mobili sia positivi che negativi. Il doppio strato elettrico crea una controcarica che rende il sistema EDL-ENM elettricamente neutro.

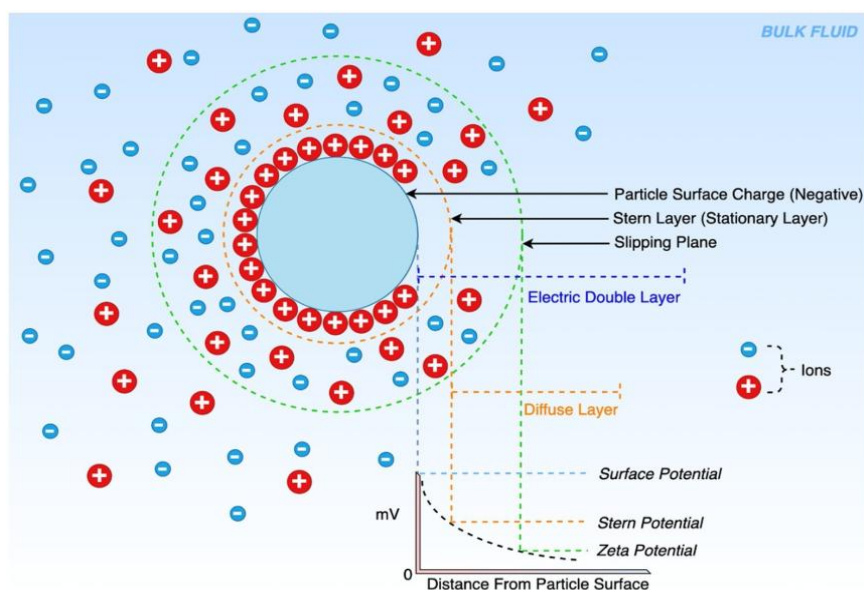


Figura 9 – Doppio strato elettrico (fonte: Yakasai et al., 2021).

Il potenziale zeta (carica superficiale) è un metodo indiretto per stimare il grado di aggregazione tra le particelle. È calcolato come la differenza di potenziale elettrico tra l'EDL e il mezzo circostante. Può essere quindi utilizzato come indicatore della stabilità della dispersione e dell'agglomerazione degli ENMs. Ad un basso valore di potenziale zeta le forze di van der Waals prevalgono rispetto a quelle elettrostatiche e quindi si verifica agglomerazione. Al contrario, a valori di potenziale zeta elevati in valore assoluto (~30 mV nel caso di ossidi metallici per esempio), le forze elettrostatiche sono più forti e quindi il sistema rimarrà più stabile (Hartmann et al., 2014).

### Processi di sedimentazione

La sedimentazione è il processo attraverso cui le particelle sospese in un fluido si muovono a seguito della presenza della forza di gravità. La velocità che ne deriva è chiamata velocità di sedimentazione ed è un importante processo di rimozione degli ENMs dalla fase acquosa. In generale, esiste una certa relazione tra i processi di agglomerazione/aggregazione e la sedimentazione. Questa relazione determina infatti un aumento delle dimensioni delle particelle (che non sono più in grado di muoversi di moto browniano e per le quali quindi la forza di gravità non è più trascurabile), favorendone la precipitazione (Klaine et al., 2008). Le particelle e gli agglomerati più grandi si depositano più velocemente sotto la forza di gravità e catturano le particelle e gli agglomerati di minori dimensioni. La sedimentazione e l'agglomerazione avvengono più rapidamente in acqua salata a causa della destabilizzazione che ne deriva dalla presenza di un'elevata forza ionica, mentre in acqua dolce si osserva una maggiore probabilità che le particelle

rimangono sospese per lunghi periodi di tempo (Garner and Keller, 2014). Inoltre, le collisioni tra le particelle sospese come le argille, che presentano cariche esposte sulla superficie, danno luogo a processi di agglomerazione e sedimentazione più veloci. A tal proposito Zhou et al., (2012) riportano che le particelle di argilla cariche superficialmente riducono la stabilità delle nanoparticelle ingegnerizzate di Ag e TiO<sub>2</sub>. Il comportamento di sedimentazione di una miscela di nanoparticelle ingegnerizzate come ad esempio CuO e ZnO in ambiente acquatico, così come quello di aggregazione, dipende dal pH, dalla forza ionica e dalla concentrazione delle nanoparticelle.

La sedimentazione delle particelle può essere descritta dalla legge di Stokes (Eq. 1).

$$v_s = \frac{2(\rho_p - \rho_f)r^2g}{9\mu} \quad (\text{Eq. 1})$$

dove  $v_s$  è la velocità di sedimentazione gravitazionale,  $\rho_p$  è la densità della particella,  $\rho_f$  è la densità del fluido,  $r^2$  è il raggio della particella,  $\mu$  è la viscosità del fluido e  $g$  l'accelerazione di gravità.

### Processi di dissoluzione

La dissoluzione è un processo di trasformazione chimica che implica il rilascio di ioni o molecole idrosolubili. Questi possono formare complessi disciolti nei mezzi o formare una fase solida e sedimentare (Figura 10).

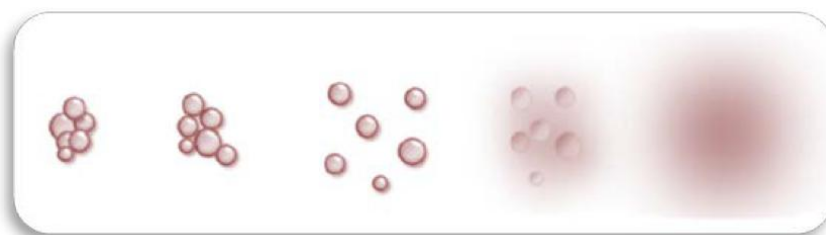


Figura 10 – Dissoluzione nei sistemi acquatici (Hartmann et al., 2014).

È funzione delle proprietà intrinseche degli ENMs (ad es. composizione chimica, agente di rivestimento, fase cristallina, morfologia, area superficiale) e dei costituenti del mezzo disperdente (ad es. pH, forza ionica, reazioni redox, temperatura) (Amde et al., 2017; Misra et al., 2012). Le proprietà degli ENMs (ad es. la dimensione, il rapporto area superficiale : volume, la forma, la carica superficiale) sono in grado di influenzare il processo di dissoluzione. Infatti, un elevato rapporto area superficiale : volume determina



l'esposizione di un numero di atomi maggiore rispetto al corrispettivo materiale di dimensioni maggiori, favorendo così il processo di dissoluzione. Anche il tipo di rivestimento può influire sui tassi di dissoluzione. Angel et al., (2013) riportano che le NPs di Ag stabilizzate con citrato mostrano una velocità di dissoluzione più alta rispetto alle NPs di Ag stabilizzate con polivinilpirrolidone. Oltre alle proprietà intrinseche delle NPs, anche i parametri chimico-fisici quali il pH e la forza ionica del mezzo influenzano il processo di dissoluzione. Bian et al., (2011) hanno dimostrato un'alta dissoluzione a pH acido. Nello specifico a  $\text{pH} = 1$  è stata osservata la completa dissoluzione di NPs di ZnO. Nell'intervallo di pH compreso tra 6 e 11 è stata registrata una dissoluzione inferiore rispetto ai valori individuati a pH bassi. Un valore di forza ionica elevato riduce il rilascio di ioni mediante il processo di precipitazione e sedimentazione (Bian et al., 2011). La presenza di materia organica naturale ha un impatto importante sulla dissoluzione e sulla tossicità dei nanomateriali metallici nell'ambiente acquatico (Sharma et al., 2019). A causa dell'elevata presenza di sali, la dissoluzione può avvenire più rapidamente in acqua salata rispetto all'acqua dolce (Garner and Keller, 2014). La dissoluzione di una miscela di nanoparticelle ingegnerizzate come ad es. CuO e ZnO è influenzata da un cambiamento del pH.

### **1.5. ESPOSIZIONE E TOSSICITÀ DEI NANOMATERIALI INGEGNERIZZATI**

Il crescente utilizzo degli ENMs a livello globale ha sollevato preoccupazioni sul fatto che il rilascio di questi materiali nell'ambiente possa presentare un importante impatto negativo sull'ambiente e sulla salute umana. La loro presenza in ambiente può infatti dare origine ad interazioni con i sistemi biologici e causare tossicità. Gli effetti di tali interazioni si esplicano a seguito dell'assorbimento, successivo all'esposizione, mediante il raggiungimento degli organi bersaglio e in funzione della natura tossica degli ENMs stessi.

In questo contesto, è importante studiare anche le potenziali vie di esposizione e la tossicità degli MCNMs in quanto l'elevata complessità di questi ultimi potrebbe comportare aggiuntivi nuovi problemi per l'ambiente e per la salute umana (Peijnenburg et al., 2021).

#### *Esposizione e tossicità in ambiente*

Ci sono diversi tipi di test che si possono realizzare per studiare la tossicità degli ENMs in ambiente. I batteri sono il punto di partenza per gli studi sulla potenziale tossicità ambientale degli ENMs (Maurer-Jones et al., 2013). Sono stati osservati alcuni effetti quali cambiamenti morfologici e generazione di specie reattive dell'ossigeno. La tossicità è stata



misurata anche in base ai cambiamenti nella bioluminescenza batterica (Schiavo et al., 2018). Oltre a tali cambiamenti sono stati effettuati anche studi di correlazione tra la dissoluzione delle NPs e la tossicità batterica. A tal proposito Xiu et al., (2012) riportano che l'esposizione alle NPs di argento conferisce tossicità ai batteri attraverso la dissoluzione di  $\text{Ag}^+$  in quanto la tossicità dell'Ag nei confronti di *Escherichia coli* è direttamente correlata alla concentrazione di ioni argento. Anche le alghe sono organismi modello utili nell'identificare la tossicità ambientale. I nanomateriali possono mostrare tossicità attraverso meccanismi di inibizione del tasso di crescita algale, di perossidazione lipidica e di generazione di specie reattive dell'ossigeno (Du et al., 2019; F. Wang et al., 2020). L'inibizione della crescita cellulare o della fotosintesi dopo l'esposizione agli ossidi metallici ( $\text{ZnO}$  e  $\text{TiO}_2$ ) è stata riportata negli studi di Schiavo et al., (2018) e di Wang et al., (2016). In entrambi gli studi, la tossicità è stata attribuita alla formazione di aggregati che intrappolano le cellule algali e rilasciano ioni zinco. Anche i pesci sono stati utilizzati come modelli per valutare l'impatto ecotossicologico dei nanomateriali in quanto possono contribuire al loro trasferimento agli esseri umani a seguito della loro capacità di accumulare gli ENMs. Gli ossidi di metallo, le NPs di plastica, i nanotubi ed il grafene possono causare differenti effetti avversi, tra cui l'alterazione della vitalità, del comportamento e della morfologia degli organismi testati.

I test *in vitro*, tuttavia, sono da preferire in fase di screening in quanto non richiedono l'utilizzo di organismi. Questi permettono di ottenere informazioni sulla citotossicità, sulla genotossicità e sugli effetti che si manifestano su funzioni specifiche della cellula. A tal proposito cambiamenti nell'attività di diversi enzimi sono stati osservati in tessuti di linee cellulari di pesci. L'utilizzo di linee cellulari di pesci è apparsa utile anche nell'identificare la citotossicità degli ENMs (Bermejo-Nogales et al., 2017).

I MCNMs determinano un'azione tossica che potrebbe essere diversa dalle modalità di azione di un nanomateriale a singola componente. A tal proposito i MCNMs possono esercitare una tossicità superiore o inferiore di quella dei nanomateriali singoli. Yang et al., (2017) hanno evidenziato che l'aumento dell'attività battericida di  $\text{Au@Ag}$  era il risultato dell'effetto sinergico dei singoli componenti. Lo studio dell'ecotossicità degli MCNMs è oggetto di controversie in quanto alcuni studi indicano che gli MCNMs non mostrano effetti avversi per le specie ecologiche. A tal proposito lo studio di Silva et al., (2018) riporta che la combinazione tra  $\text{TiO}_2$  e i nanotubi di carbonio a parete multipla non esercita alcuna tossicità acuta sugli embrioni di pesce zebra. Tuttavia la maggior parte degli studi riporta

che i MCNMs mostrano diversi gradi di tossicità su diverse specie ecologiche (Medeiros et al., 2021; Sellami et al., 2017).

### Esposizione e tossicità per la salute umana

Le vie di esposizione dell'uomo agli ENMs sono rappresentate dall'inalazione, dall'ingestione e dal contatto dermico. L'inalazione rappresenta la principale via di esposizione. È stato riscontrato che una volta inalate, le particelle si depositano lungo tutto il tratto respiratorio, dal naso ai polmoni. Questi ultimi sono il principale sito di ingresso e di deposizione delle particelle inalate a seguito dell'ampia area superficiale. Buzea et al., (2007) hanno osservato che il tasso di deposizione delle particelle inalate è dipendente dalla dimensione. In base alle loro dimensioni infatti, le particelle più piccole penetrano più in profondità rispetto a quelle di dimensioni più grandi (Oberdörster et al., 2005). L'Organizzazione Mondiale della Sanità fa una chiara distinzione tra le particelle inalabili, toraciche e respirabili (Occupational and Team, 1999), definendone le diverse classi dimensionali. La frazione inalabile (diametro aerodinamico inferiore a 10  $\mu\text{m}$ ) è in grado di raggiungere le vie aeree superiori; la frazione toracica (diametro aerodinamico inferiore a 2.5  $\mu\text{m}$ ) è in grado di penetrare nei bronchi e nei bronchioli superiori mentre le particelle respirabili (diametro aerodinamico inferiore a 0.1  $\mu\text{m}$ ) sono in grado di entrare negli alveoli (Organization, 2022). La seconda via di esposizione è l'ingestione, a seguito del consumo di acqua e cibo contenenti NPs. Infine, un'ulteriore via di esposizione è costituita dal contatto dermico con la pelle ferita (Oberdörster et al., 2005) o con i follicoli piliferi (Toll et al., 2004). Una volta entrate nel corpo umano, le particelle possono raggiungere altri organi bersaglio (come milza, cuore, cervello, fegato, reni) e causare ulteriori effetti avversi. La tossicità è funzione delle proprietà fisico-chimiche tra cui le più rilevanti sono la dimensione, la forma, la carica superficiale e la composizione chimica (Sharifi et al., 2012). Oberdörster et al., (1994) hanno riportato che le particelle più piccole generano una reazione infiammatoria maggiore nei polmoni rispetto alle particelle di dimensioni più grandi. Le dimensioni, la forma e la carica superficiale possono influenzare l'assorbimento nel tratto gastrointestinale (Hillyer and Albrecht, 2001).

Studi *in vitro* e *in vivo* riportano diversi effetti tossicologici avversi tra cui stress ossidativo, citotossicità, genotossicità e risposte infiammatorie. A tal proposito Gaiser et al., (2012) hanno individuato che le Ag NPs riportano effetti di citotossicità e stress ossidativo in studi *in vitro* su epatociti umani e *in vivo* sul fegato dei ratti, evidenziando come i risultati ottenuti

siano piuttosto simili. La similarità dei risultati ottenuti, conclude lo studio, dimostra che il modello di epatociti utilizzato è adeguato a rispecchiare molte risposte *in vivo*, rappresentando così un importante contributo alla riduzione dell'impiego di test su animali.

Nei MCNMs i meccanismi che guidano la tossicità sono incerti rispetto a quelli che descrivono la tossicità negli ENMs. Nonostante ciò, alcuni studi riportano tossicità oltre che una riduzione della vitalità delle cellule e la generazione di specie reattive dell'ossigeno (Jin et al., 2014; Khan et al., 2016).

### **1.6. PROTOCOLLI DI DISPERSIONE**

Al fine di ottenere risultati il più possibile robusti in merito alla tossicità degli ENMs e dei MCNMs, grazie a numerosi progetti e cooperazioni internazionali, sono state sviluppate diverse metodologie standard per la dispersione dei nanomateriali. La selezione di un protocollo di dispersione ai fini dei test tossicologici dovrebbe garantire di non alterare le proprietà di un materiale relative alla sua funzionalità e, allo stesso tempo, di ottenere una dispersione il più possibile omogenea (sia dal punto di vista della concentrazione che della stabilità colloidale) per fornire la dose di esposizione pianificata durante il disegno sperimentale. I protocolli possono essere opportunamente adattati in base alle caratteristiche dei materiali testati.

In primo luogo, la dispersione e la sonicazione devono essere eseguite in acqua ultrapura o deionizzata, piuttosto che nei mezzi (eco)tossicologici da testare, al fine di ridurre o evitare la formazione di specie reattive dell'ossigeno, a seguito, ad esempio, della denaturazione delle proteine (Jensen et al., 2011). La dispersione deve essere quindi diluita nei mezzi di interesse. In secondo luogo, per ottenere una maggiore qualità della dispersione, è consigliato utilizzare: i) una bassa energia di sonicazione, se possibile, per ridurre al minimo l'eventuale degrado dei nanomateriali durante la sonicazione e ii) un approccio che possa evitare possibili situazioni di contaminazione (ad es. il rilascio di particelle dalla sonda del sonicatore) (Betts et al., 2013). A tal proposito i metodi che non richiedono il contatto diretto della sonda con il campione (ad es: bagno ad ultrasuoni, agitazione) sono da preferire, in quanto utilizzano una bassa energia di sonicazione e riducono la potenziale contaminazione. Alcune considerazioni da tenere presente durante la sonicazione riguardano: i) l'uso di un bagno di ghiaccio per raffreddare le dispersioni e ii) la determinazione dell'energia e delle tempistiche necessarie per acquisire la maggiore stabilità delle particelle. In terzo luogo, al fine di ottenere una dispersione stabile nel tempo, è possibile aggiungere delle sostanze stabilizzanti al mezzo (eco)tossicologico di

interesse (Jensen et al., 2011). Va però tenuto presente che qualsiasi materiale aggiunto potrebbe interagire con le NPs in dispersione e, conseguentemente, variare i risultati dei test. L'energia di sonicazione utilizzata dovrebbe essere riportata per permettere di ottenere dati riproducibili (Taurozzi et al., 2011). Al fine di facilitare le procedure di dispersione, in alcuni casi è prevista una fase di "pre-wetting" delle NPs o l'aggiunta di sostanze disperdenti (Ji et al., 2010).

### **1.7. STRATEGIE DI SAFE AND SUSTAINABLE BY DESIGN**

Nonostante i buoni risultati tecnologici ottenuti mediante l'utilizzo di nanomateriali, restano tuttavia delle lacune in merito alla conoscenza dei potenziali impatti degli ENMs sulla salute umana e sull'ambiente (Musazzi et al., 2017). In seguito, infatti, alle preoccupazioni sollevate sulla sicurezza degli ENMs e all'uso estensivo di prodotti commerciali contenenti ENMs si è iniziato a prendere in considerazione il concetto di "Safe by Design" (SbD) anche nel contesto delle nanotecnologie. Tale approccio mira a descrivere le misure di sicurezza – per la prevenzione di incidenti, malattie o danni ambientali – che vengono applicate durante la fase di progettazione di una struttura, processo, materiale o prodotto (Kraegeloh et al., 2018). L'idea alla base delle strategie SbD è quella di progettare prodotti o processi che presuppongano un potenziale rischio, intrinsecamente basso, invece di limitarlo applicando sistemi di protezione. Nel complesso, le strategie SbD mirano ad integrare gli impatti previsti sulla sicurezza dei materiali o dei prodotti nelle fasi di progettazione e produzione, per aumentare la sicurezza degli ENMs, pur mantenendo le loro prestazioni funzionali. Ciò richiede di combinare prima le informazioni sulla funzionalità e sicurezza dei materiali all'inizio del processo di innovazione e poi durante l'intero ciclo di vita del prodotto, quindi identificare le azioni di SbD che potrebbero consentire di ottimizzare entrambi questi aspetti (Tavernaro et al., 2021). Tale approccio dovrebbe aiutare a supportare la classificazione, l'assegnazione delle priorità e quindi la selezione delle opzioni più promettenti, per rispettare i requisiti normativi e per comunicare eventuali rischi rimanenti (Soeteman-Hernández et al., 2019). Nonostante il concetto di SbD sia piuttosto nuovo nel contesto della nanotecnologia (Nath and Banerjee, 2013), ha acquisito un ruolo sempre più centrale nella maggior parte dei progetti europei legati alla "nanosafety" (Hjorth et al., 2017; Lynch, 2017) così come nell'Unione Europea la strategia chimica per la sostenibilità (o Chemicals strategy (europa.eu)) (Gottardo et al., 2021), con un'evoluzione del concetto SbD verso il "Safe and Sustainable by Design" (S&SbD). Tuttavia, considerando le difficoltà nel predire il destino ambientale e il comportamento dei nanomateriali (soprattutto quelli a base di metalli), a causa delle numerose trasformazioni

che questi materiali possono subire una volta dispersi nei mezzi biologici o ambientali, gli sforzi in questa direzione sono ancora necessari (Mudunkotuwa and Grassian, 2015).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi rientra nell'ambito del progetto Europeo H2020 SUNSHINE (Safe and sUstainable by desigN Strategies for HIgh performance multi-component NanomatErials). Nello specifico SUNSHINE è un progetto orientato al mondo industriale, in cui vari enti di ricerca cooperano sia con piccole-medie imprese che con grandi industrie al fine di sviluppare prodotti innovativi contenenti nanomateriali multi-compositi (MCNMs), secondo un approccio di "Safe and Sustainable by Design" (SSbD). Secondo tale approccio quindi, incentrato su strategie semplici, robuste ed economiche, lo scopo è quello di ottenere materiali e prodotti, sicuri e sostenibili. Le strategie di SSbD devono partire già dalla fase iniziale di *design* del materiale e devono supportare tutte le fasi del ciclo di vita del prodotto stesso, partendo dalla sintesi fino al fine vita (<https://www.h2020sunshine.eu/>).

Nell'ambito del progetto europeo SUNSHINE, lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare una specifica tipologia di MCNMs in matrici complesse di interesse (eco)tossicologico a supporto di strategie di SSbD. In primo luogo, il lavoro di tesi ha riguardato la caratterizzazione chimico-fisica del materiale nel suo complesso e dei singoli componenti, sia in fase solida sia in dispersione (caratterizzazione colloidale e valutazione della dissoluzione di specie ioniche nel tempo).

Più nel dettaglio: i) sono state ottimizzate le procedure di dispersione del MCNM nel suo complesso e dei singoli componenti in molteplici mezzi acquosi caratterizzati da diverse concentrazioni di sali, e altre sostanze quali ad es., amminoacidi e proteine, al fine di supportare la realizzazione dei test (eco)tossicologici, fondamentali per stimare la potenziale tossicità del MCNM oggetto di studio; ii) sono state studiate le interazioni di tali materiali con le varie componenti dei mezzi come il siero fetale bovino (FBS, miscela contenente proteine, fattori di crescita, oligoelementi) tramite tecniche di diffusione della luce e di spettroscopia in quanto tali interazioni potrebbero alterare i risultati dei test (eco)tossicologici facendo sotto – o sovrastimare la tossicità del materiale analizzato; iii) si è investigato il potenziale rilascio di specie ioniche (ad es. Zn(II)) sia da NPs a singola componente (NPs di ZnO) sia dal MCNM, in acqua ultrapura e nei vari mezzi (eco)tossicologici utilizzati, al fine di valutare il potenziale effetto avverso degli ioni all'interno del mezzo di coltura cellulare.

Infine, una parte dei dati è stata combinata matematicamente attraverso un indice di stabilità colloidale sviluppato all'interno del gruppo di ricerca. L'applicazione di tale indice ha permesso di interpretare il comportamento di questi nanomateriali nei mezzi considerati.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. NANOMATERIALI STUDIATI

I materiali oggetto di tale studio sono stati forniti sotto forma di polvere dalla ditta CIAC (Cordoba, Spagna), e consistono in un nanomateriale multi-composito di tipo *core-shell*, SiO<sub>2</sub>@ZnO, costituito da un nucleo interno di SiO<sub>2</sub> (80%) e rivestito da un guscio esterno di ZnO (20%). Le caratteristiche dei nanomateriali fornite dai produttori sono riportate in Tabella 2. Le NPs di SiO<sub>2</sub> sono state acquistate da NanoAmor (Houston, USA) mentre il guscio esterno deriva da un sale di acetato di zinco di-idrato (Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, ITW Reagents, S.R.L.) depositato sul *core* attraverso un processo di calcinazione a 600 °C. Per confronto sono state prodotte NPs di ZnO a partire da Zn(Ac)<sub>2</sub> (purezza al 99.5% Merk, Aldrich) mediante la stessa metodologia utilizzata per sintetizzare il materiale multicomposito.

Tabella 2 – Caratteristiche di ZnO e SiO<sub>2</sub>.

Caratteristiche	Materiali		
	SiO <sub>2</sub> @ZnO	ZnO	SiO <sub>2</sub>
Purezza (%)	-	99.5	99.5
Morfologia	Mesoporoso	-	Mesoporoso
Dimensione media delle particelle (nm)	-	< 200	20
Morfologia delle particelle	-	-	Sferica
Area superficiale specifica m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	49	5	640
Struttura cristallina	-	-	Amorfo
Densità (g cm <sup>-3</sup> )	-	-	2.2 – 2.6
Volume dei pori	0.142 ± 0.007	-	0.170 ± 0.008

#### Potenziati applicazioni

Le NPs di SiO<sub>2</sub> vengono ampiamente utilizzate in vari settori. Trovano largo impiego in applicazioni biomediche e nell'industria farmaceutica ed alimentare. Sono impiegate come additivo nel settore edile per migliorare le proprietà meccaniche e di durabilità del calcestruzzo (P et al., 2021) ed in campo ambientale nella bonifica delle acque e del suolo. Per quanto riguarda il nano ZnO esso è ampiamente utilizzato in campo biomedico. A seguito delle sue proprietà di assorbimento dei raggi UV trova impiego in prodotti per la cura della persona come ad esempio creme solari (Serpone et al., 2007). In campo



ambientale sia  $\text{SiO}_2$  che  $\text{ZnO}$  vengono utilizzati nella bonifica delle acque e del suolo contaminati (Mensah et al., 2021) .

Nella struttura *core-shell* di  $\text{SiO}_2@ZnO$  lo  $\text{ZnO}$ , che è un semiconduttore, genera specie reattive dell'ossigeno in seguito all'esposizione alla luce solare, all'acqua e all'ossigeno. Nell'ambito del progetto SUSNHINE tale materiale è stato scelto in quanto considerato un'alternativa più sicura del  $\text{TiO}_2$ . La combinazione tra NPs di  $\text{ZnO}$  e  $\text{SiO}_2$  nel materiale multi-composito  $\text{SiO}_2@ZnO$  ne migliora le prestazioni, la stabilità, la compatibilità e la dispersibilità del prodotto finale. Esso viene poi miscelato con la malta (< 5% nel prodotto finale) ed applicato come intonaco sulla superficie esterna di edifici per la decontaminazione fotocatalitica (Figura 11). In particolar modo  $\text{SiO}_2@ZnO$  sfrutta la radiazione luminosa per ossidare i gas  $\text{NO}_x$  ( $\text{NO}$  e  $\text{NO}_2$ ) e trasformarli in nitrati ( $\text{NO}_3^-$ ). Come noto, l'ossido di azoto è un gas incolore ed inodore e si forma in qualsiasi processo di combustione in cui si impiega l'aria come comburente, per reazione tra ossigeno e azoto ad alte temperature. Successivamente, una volta che l'ossido di azoto entra in atmosfera, circa il 10% viene trasformato in biossido di azoto per azione della radiazione solare. In condizioni di forte irraggiamento, inoltre, gli ossidi di azoto partecipano a reazioni radicaliche che originano inquinanti secondari (come i perossilacetilnitrati o l'ozono troposferico), risultando quindi dannosi per la salute umana (Harrison, 2005). Inoltre, gli ossidi di azoto contribuiscono alla formazione delle piogge acide e favoriscono l'accumulo di nitrati al suolo che possono, a loro volta, alterare significativamente gli equilibri ecologici ambientali.

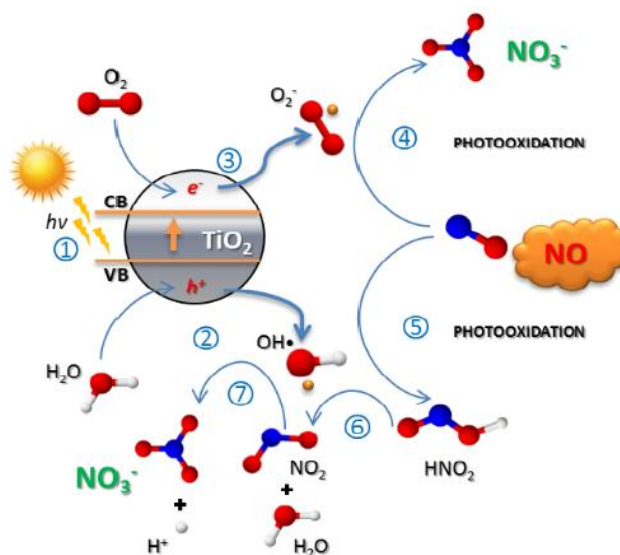


Figura 11 - Decontaminazione fotocatalitica.

### 3.2. PREPARAZIONE DEI MEZZI

L'acqua deionizzata (DW) è stata prodotta da un sistema di purificazione dell'acqua MilliQ® (Millipore, Bedford Stati Uniti,  $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ,  $\text{TOC} \leq 3 \text{ ppb}$ ) e utilizzata come mezzo di riferimento.

Le dispersioni di nanoparticelle a diversi pH (2,4,6,8) sono state ottenute da soluzioni di HCl (Merk, Aldrich) al 33% ed NaOH (Merk, Aldrich) al 30%.

#### Mezzi per saggi ecotossicologici

L'M7 è stato preparato secondo la composizione riportata in Elendt, (1990) ed è usato come acqua dolce artificiale per svolgere i test con la *Daphnia Magna*. L'acqua dolce artificiale (AFW) e l'acqua marina artificiale (AMW) sono state preparate rispettivamente secondo i protocolli standard (OECD, 2019) e (Standard, 2013). Tutti i sali inorganici (Merck, Darmstadt Germania) utilizzati sono di grado analitico. La composizione dei mezzi è riportata in Tabella 3.

Tabella 3 - Composizione dei mezzi ecotossicologici.

Componenti	M7	(Elendt,	AFW	(OECD,	AMW	(Standard,
	1990)	2019)	2013)	Concentrazione		
	mg L <sup>-1</sup>	g L <sup>-1</sup>	g L <sup>-1</sup>	g L <sup>-1</sup>		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	293.8	11.76	1.16			
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	123.3	4.93	-			
NaHCO <sub>3</sub>	864.8	2.59	0.201			
KCl	5.8	0.23	0.695			
NaCl	-	-	24.53			
MgCl <sub>2</sub>	-	-	5.20			
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	4.09			
KBr	-	-	0.101			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.715	-	0.027			
SrCl <sub>2</sub>	-	-	0.025			
NaF	-	-	0.003			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.184	-	-			
NaNO <sub>3</sub>	0.274	-	-			
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	10.0	-	-			
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.625	-	-			
<b>Forza ionica (I)</b>	<b>8.3 mM</b>	<b>2 mM</b>	<b>630 mM</b>			

Mezzi per saggi di coltura cellulare utilizzati in test in vitro

Il mezzo biologico utilizzato è l'RPMI 1640, GlutaMAX™ supplement, HEPES (GIBCO™, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) al quale è stato aggiunto il 10% di siero fetale bovino, (FBS) (GIBCO™, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) e l'1% di penicillina/streptomina (GIBCO™, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia). L'FBS e la penicillina/streptomina vengono notoriamente utilizzati per la crescita cellulare per i test in *vitro* mentre il BSA è un additivo accettato dalla comunità scientifica (menzionato nel protocollo di dispersione NANOGENOTOX, descritto di seguito) per incrementare la stabilità colloidale. La composizione del mezzo RPMI è riportata in Tabella 4. RPMI(FBS\_ps) ha la stessa composizione di RPMI al quale è stato però aggiunto siero fetale bovino (FBS) e penicillina/streptomina.

Tabella 4 – Composizione di RPMI.

	Concentrazione (mg L <sup>-1</sup> )		Concentrazione (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Amminoacidi</b>		<b>Sali</b>	
Glicina	10	Nitrato di calcio	100
Alanina-Glutamina (L)	446	Solfato di magnesio	100
Arginina (L)	200	Cloruro di potassio	400
Asparagina (L)	50	Bicarbonato di sodio	2000
Acido aspartico (L)	20	Cloruro di calcio	5500
Cisteina (L)	50	Fosfato di sodio	800
Acido glutammico (L)	20		
Istidina (L)	15	<b>Vitamine</b>	Totali: 45
Idrossiprolina (L)	20	<b>Altri componenti</b>	
Isoleucina (L)	50	Glutazione	1
Leucina (L)	50	Glucosio	2000
Lisina idrocloridrato (L)	40	HEPES	5958
Metionina (L)	15	Phenol red	5
Fenilalanina (L)	15		
Prolina (L)	20		
Serina (L)	30		
Treonina (L)	20		
Triptofano (L)	5		
Tirosina (L)	20		
Valina (L)	20		

### 3.3. PREPARAZIONE DELLE DISPERSIONI DI NANOMATERIALI

La procedura utilizzata segue le indicazioni riportate nel protocollo NANOGENOTOX Jensen et al., (2011) opportunamente adattato in base alle caratteristiche dei materiali testati. Per la caratterizzazione colloidale e in solido sono state preparate delle dispersioni stock di NPs di SiO<sub>2</sub>, ZnO e SiO<sub>2</sub>@ZnO in acqua deionizzata ad una concentrazione di 2.56 mg mL<sup>-1</sup> e sonicate mediante una sonda ad ultrasuoni (UP-200S Hielscher Ultrasonics GmbH, Germania) per 4 minuti (potenza 80% e frequenza 0.5), utilizzando una potenza nominale di 100 W in un bagno ghiacciato per prevenire il surriscaldamento e i processi di trasformazione e degradazione dei nanomateriali. Le dispersioni stock sono state quindi diluite nei mezzi tossicologici ed ecotossicologici desiderati ad una concentrazione di 500 mg L<sup>-1</sup>. Per quanto riguarda i test di dissoluzione di Zn (II), le dispersioni stock di NPs di ZnO e SiO<sub>2</sub>@ZnO sono state preparate in acqua deionizzata ad una concentrazione di 500 mg L<sup>-1</sup> e sonicate per 15 minuti (potenza 20% e frequenza 0.5) con la medesima sonda descritta precedentemente. Tali dispersioni stock state quindi diluite nei mezzi tossicologici ed ecotossicologici desiderati ad una concentrazione di 100 mg L<sup>-1</sup> per le successive analisi tramite la spettroscopia ottica. I tempi di campionamento ed analisi per lo studio della dissoluzione di Zn (II) sono stati selezionati in accordo con la durata dei test di tossicità acuta come segue: 0, 1, 3 e 24 ore dopo la preparazione dei campioni a 100 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.4. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LE ANALISI

Per la caratterizzazione colloidale è stata prelevata un'aliquota dalle dispersioni precedentemente sonicate e diluite quindi analizzata mediante la determinazione delle velocità di sedimentazione, del diametro idrodinamico e del potenziale zeta.

Per caratterizzare il solido presente nella dispersione, le dispersioni sono state centrifugate per 5 minuti a 1664 RCF con la centrifuga analitica Centrisart<sup>®</sup> G-16 (Sartorius, Göttingen Germania) (Figura 12). Il surnatante è stato rimosso e il solido è stato lavato con 1 mL di acqua e centrifugato. La procedura è stata eseguita per 3 volte. Dopodichè i campioni sono stati essiccati in stufa a 40°C per almeno 24 h e analizzati mediante spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR).



Figura 12 - Centrisart® G-16.

La caratterizzazione colloidale di un'aliquota delle diverse dispersioni precedentemente sonicate e diluite a  $500 \text{ mg L}^{-1}$  è stata effettuata mediante le tecniche di DLS, ELS e CSA che hanno permesso di ottenere informazioni relative al diametro idrodinamico, al potenziale zeta ed alla velocità di sedimentazione.

Per eseguire i test di dissoluzione i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 8422 RCF con la medesima centrifuga analitica descritta precedentemente (Figura 12). Sono stati quindi prelevati 2.5 mL di surnatante. I campioni così ottenuti sono stati acidificati con 2.5 mL di acido nitrico al 2% (2021 Merck KGaA, Darmstadt, Germania) prima di essere analizzati all'ICP-OES.

### 3.5. TECNICHE ANALITICHE

#### Centrifuga analitica - CSA

L'analisi tramite la centrifuga analitica (Centrifugal Separation Analysis, CSA) è utilizzata per determinare la velocità di sedimentazione delle particelle. Il principio di base consiste nella trasmissione continua di una sorgente di luce attraverso il campione (Lerche and Sobisch, 2007). Nello specifico la luce parallela illumina l'intera cella in cui è contenuto il campione e la luce trasmessa è rilevata dai sensori posizionati lungo tutta la cuvetta in cui è inserito il campione. L'intensità della luce trasmessa è misurata in funzione del tempo e della posizione lungo la cuvetta (Figura 13). I valori dell'intensità della luce trasmessa nel tempo, sono maggiori in prossimità del rotore e diminuiscono verso il fondo della cuvetta, a seguito della sedimentazione delle particelle in soluzione.

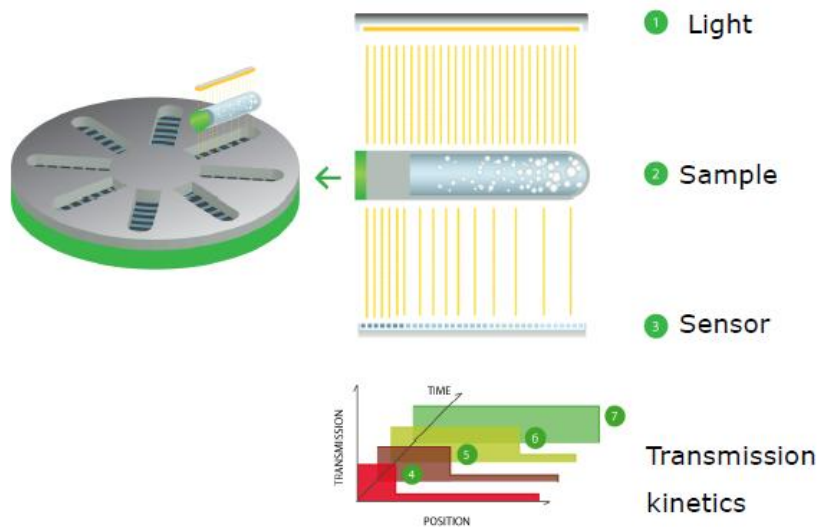


Figura 13 - Schema di funzionamento della centrifuga.

Tali valori vengono riportati dallo strumento sotto forma di profili di trasmissione (Figura 14) che riportano l'intensità della luce trasmessa in funzione della posizione radiale dal centro del rotore.

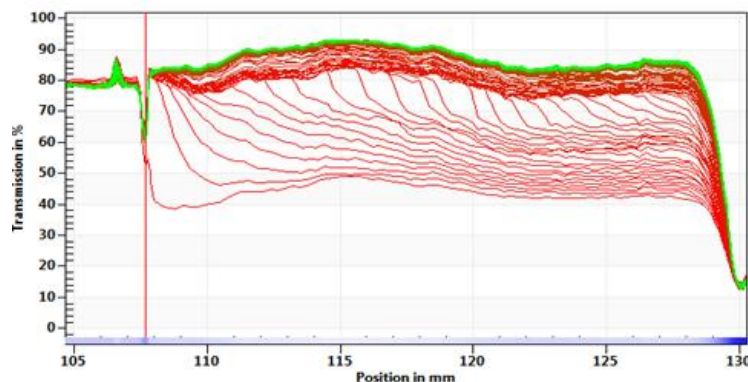


Figura 14 - Esempio di profilo di trasmissione (in verde quelli più recenti).

Lo strumento utilizzato è la centrifuga LUMiSizer® 651 (L.U.M. GmbH, Berlino Germania) (Figura 15) che permette di analizzare 12 campioni alla volta velocizzando il processo naturale di separazione della dispersione applicando una forza centrifuga relativa (Eq. 2):

$$RCF = r (RPM)^2 (1.118 \cdot 10^{-5}) \quad (\text{Eq. 2})$$

dove  $RCF$  = forza centrifuga relativa,  $r$  = raggio del rotore,  $RPM$  = giri al minuto. I dati registrati in base ai giri al minuto sono divisi per la forza centrifuga relativa ( $RCF$ ) al fine di ottenere la velocità di sedimentazione in relazione alla gravità. La lunghezza d'onda della luce trasmessa è stata fissata a 470 nm. I profili di trasmissione sono registrati ogni 5 s a 470 nm,  $T = 25^\circ\text{C}$  e  $RPM = 2000$  che corrispondono a 537  $RCF$ .



Figura 15 - LUMiSizer® 651.

### Tecniche per lo studio dello scattering della luce dinamica - DLS

Lo studio dell'interazione tra una sorgente di luce e la materia, analizzando la luce diffusa che ne deriva, può fornire utili indicazioni circa le proprietà fisiche di un campione di NPs disperse in un mezzo liquido. Sono note diverse modalità di diffusione (o scattering) della luce, ma le più importanti sono la diffusione di Rayleigh e la diffusione di Mie (Figura 16). Lo scattering di Rayleigh è provocato da particelle che hanno dimensioni inferiori alla lunghezza d'onda della luce incidente ( $\lambda/10$ ). Poiché la diffusione è elastica (la luce diffusa trasporta la medesima energia alla luce incidente), la radiazione diffonde in tutte le direzioni e senza un angolo di preferenza. Al contrario lo scattering di Mie si applica nel caso in cui le dimensioni delle particelle sono maggiori di  $\lambda/10$ . In questo caso la diffusione è anelastica (la luce diffusa non trasporta la medesima energia) e la luce dipende dall'angolo. Per particelle ancora più grandi la dipendenza dall'angolo aumenta.

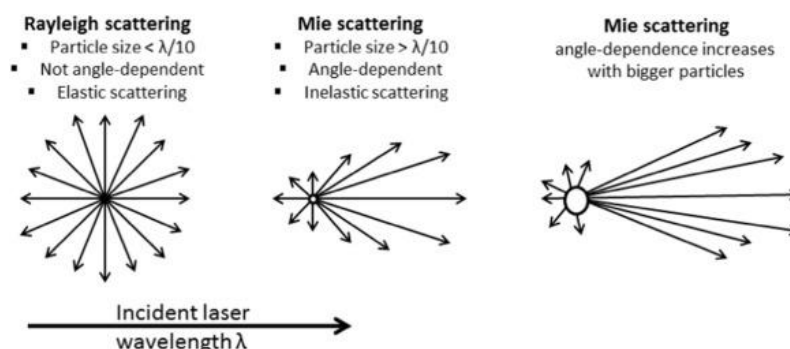


Figura 16 - Diffusione della luce (fonte: Bhattacharjee, 2016).

La diffusione dinamica della luce (Dynamic Light Scattering, DLS) utilizza un fascio di luce monocromatica per irradiare il campione e un rivelatore per registrare l'intensità della luce diffusa (Figura 17). La tecnica è utilizzata per determinare la distribuzione dimensionale



delle particelle, sfruttando lo scattering di Rayleigh. Nello specifico misura le variazioni dell'intensità della luce diffusa nel tempo delle particelle che si muovono di moto browniano.

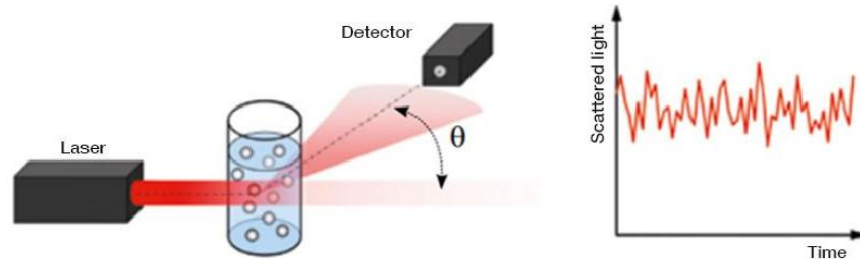


Figura 17 - Schema di funzionamento della tecnica DLS (fonte: Babick, 2020).

Quando la luce monocromatica colpisce le particelle contenute nel campione induce gli elettroni ad oscillare alla stessa frequenza del campo elettrico della luce incidente, dando luogo ad un nuovo campo elettrico che si irradia in tutte le direzioni con un certo angolo. La luce laser incidente è attenuata da un filtro al fine di ottenere un segnale sufficiente ed elaborabile al rivelatore. L'oscillazione luminosa che deriva dall'interazione tra le particelle e l'intensità della luce diffusa è ottenuta analizzando l'andamento nel tempo di queste fluttuazioni attraverso un autocorrelatore che utilizza una serie di algoritmi per confrontare diversi segnali provenienti dal rivelatore posto dopo il campione. La funzione di autocorrelazione permette di determinare la media pesata del coefficiente di diffusione delle particelle e quindi il diametro idrodinamico medio delle particelle attraverso l'equazione di Stokes-Einstein (Eq. 3):

$$d_H = \frac{kT}{3\pi \eta D} \quad (\text{Eq. 3})$$

dove  $d_H$  = diametro idrodinamico,  $k$  = costante di Boltzmann,  $T$  = temperatura assoluta,  $\eta$  = viscosità,  $D$  = coefficiente di diffusione. Il diametro misurato corrisponde al diametro di una particella sferica che ha lo stesso coefficiente di diffusione della particella reale (Jiang et al., 2009). Va precisato che, poiché tramite l'approssimazione di Rayleigh l'intensità della luce è direttamente proporzionale al diametro elevato alla sesta ( $I \propto d^6$ ) e direttamente proporzionale al reciproco della lunghezza d'onda del laser elevato alla quarta ( $I \propto 1/\lambda^4$ ), sfruttando la tecnica DLS, un'ipotetica particella di 10 nm diffonderà la luce un milione di volte in più ( $10^6$ ) rispetto ad una di 1nm. Ciò comporta che il contributo alla luce totale diffusa dalle particelle piccole sarà estremamente minore rispetto a quello di particelle con



un diametro maggiore. La relazione inversa tra intensità della luce e lunghezza d'onda del laser significa che si ottiene una maggiore intensità di diffusione della luce al diminuire della lunghezza d'onda del laser utilizzato. In questa tesi è stato utilizzato lo strumento Nicomp Z3000<sup>®</sup> (PSS, Port Richey USA) (Figura 18) avente un angolo di 90° ( $W = 25 \text{ mV}$  e  $\lambda = 639 \text{ nm}$ ).

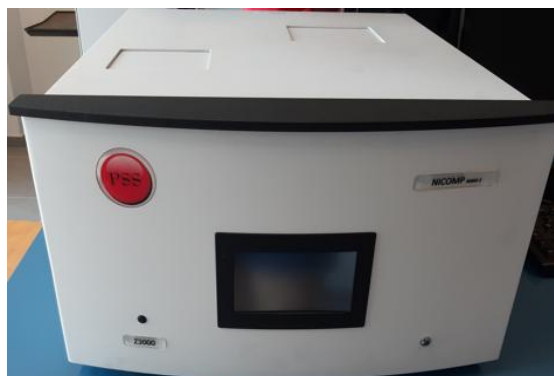


Figura 18 - Nicomp Z3000<sup>®</sup>.

### Tecnica per misurare la mobilità elettroforetica di particelle in dispersione - ELS

La diffusione elettroforetica della luce (Electrophoretic Light Scattering, ELS) consente di misurare la mobilità elettroforetica di particelle sospese in un liquido. Il principio fisico su cui si basa è l'elettroforesi (Figura 19). Per misurare la mobilità elettroforetica delle particelle si applica un campo elettrico tra due elettrodi e il campione. Se un raggio laser passa attraverso il campione le particelle cariche si spostano verso l'elettrodo di segno opposto, creando una variazione di frequenza della luce diffusa dal campione proporzionale alla mobilità elettroforetica.

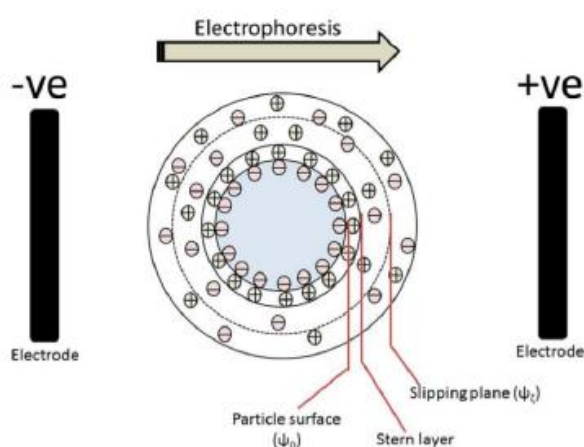


Figura 19 - Processo di elettroforesi (fonte: Bhattacharjee, 2016).

La mobilità può quindi essere determinata conoscendo la lunghezza d'onda del laser e l'angolo di diffusione. Dalla mobilità è possibile determinare il potenziale zeta attraverso l'equazione di Smoluchowski (Eq. 4) come di seguito descritto:

$$\zeta = \frac{\eta U}{\varepsilon} \quad (\text{Eq. 4})$$

dove  $\zeta$  = potenziale zeta,  $\eta$  = viscosità,  $U$  = mobilità elettroforetica,  $\varepsilon$  = permittività elettrica. La conversione della mobilità in potenziale zeta avviene per confrontare materiali in diverse condizioni sperimentali (ad es. variazioni di pH, di forza ionica o di concentrazione). Nicomp Z3000<sup>®</sup> (PSS, Port Richey USA) è stato utilizzato per misurare il potenziale zeta oltre che per la determinazione del diametro idrodinamico (Figura 18). Il campo elettrico è stato impostato a 5 V.

#### Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier - FT-IR

La spettroscopia ad infrarosso (IR) misura l'assorbimento dei gruppi funzionali a lunghezze d'onda dell'infrarosso (780 nm – 1 mm). La spettroscopia IR è chiamata anche spettroscopia di vibrazione in quanto la radiazione infrarossa cede energia sotto forma di energia vibrazionale. La vibrazione può avvenire per stiramento (stretching) lungo l'asse di legame o per piegamento (bending) a seguito della variazione di legame. Il principio fisico su cui si basa consiste nell'assorbimento della luce infrarossa a frequenze specifiche che corrispondono ai livelli energetici vibrazionali dei legami presenti nella molecola. I diversi legami infatti vibrano a diversi livelli energetici e assorbono lunghezze d'onda diverse.

La tecnica utilizzata è la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR). La spettroscopia FT-IR sfrutta l'utilizzo di un interferometro per cogliere contemporaneamente tutte le frequenze e di un rivelatore che le trasforma in uno spettro infrarosso (Figura 20).

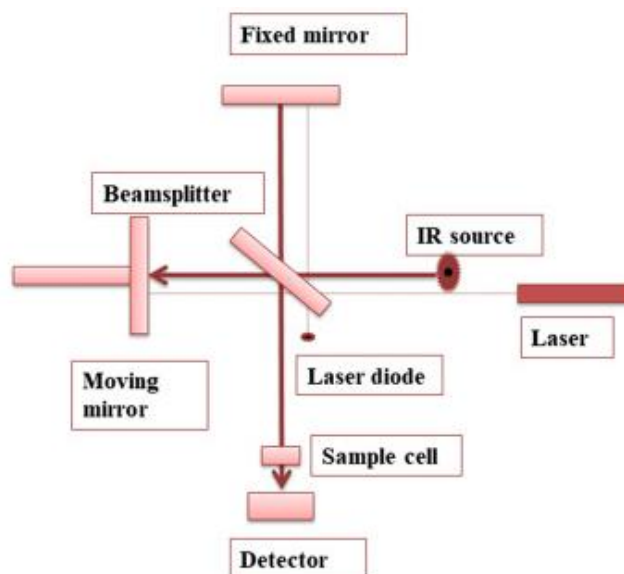


Figura 20 - Schema di funzionamento dello spettrometro FT-IR (fonte: Titus et al., 2019).

Una sorgente luminosa ad incandescenza emette un raggio luminoso nel campo dell'infrarosso. Questo raggio giunge all'interferometro che viene scomposto in uno specchio semiriflettente (beamsplitter), uno specchio fisso e uno specchio mobile. Lo specchio semiriflettente divide il raggio in due, verso lo specchio fisso e lo specchio mobile. I raggi riflessi ritornano allo specchio semiriflettente che li ricongiunge. La radiazione così trattata passa attraverso il campione e raggiunge il rivelatore. Il diverso cammino ottico che i due raggi percorrono porta ad interferenze che creano un segnale proporzionale alla posizione dello specchio mobile e al cammino ottico. Sulla base del movimento dello specchio le radiazioni monocromatiche contenute nella luce emessa dalla sorgente generano un'interferogramma. La trasformata di Fourier, effettuata dopo che il raggio raggiunge il rivelatore, trasforma l'interferogramma in uno spettro infrarosso in funzione della frequenza. Un laser è comunemente utilizzato per controllare lo specchio mobile. Anche il laser è suddiviso e ricombinato dall'interferometro come la radiazione infrarossa. Lo strumento utilizzato in questa tesi è lo spettrometro portatile Alpha II (Bruker, USA) (Figura 21).



Figura 21 - FT-IR Alpha II.

### Spettroscopia di emissione ottica al plasma accoppiata induttivamente - ICP-OES

La spettroscopia di emissione ottica al plasma accoppiata induttivamente (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy, ICP-OES) sfrutta una sorgente al plasma per produrre atomi e ioni eccitati che emettono radiazioni elettromagnetiche a lunghezze d'onda caratteristiche di un particolare elemento (Figura 22).

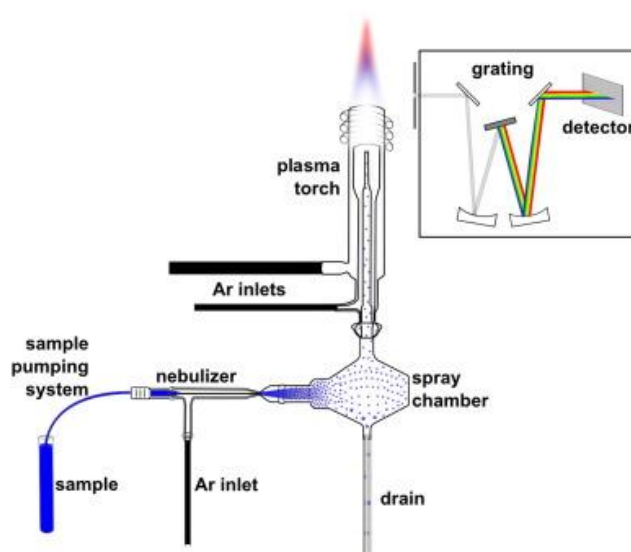


Figura 22 - Schema di funzionamento dell' ICP-OES (fonte: Caruso et al., 2017).

Il campione liquido è nebulizzato all'interno di una camera di nebulizzazione (spray chamber). La camera di nebulizzazione utilizzata in questo lavoro è in quarzo. Il campione nebulizzato viene spinto nel plasma (gas altamente ionizzato ma elettricamente neutro generato all'interno della torcia) tramite il gas argon. Una volta raggiunto il plasma il campione subisce una serie di processi fisici, ovvero, desolvatazione, vaporizzazione, atomizzazione e ionizzazione. La formazione di una scintilla all'interno della torcia dà il via

al processo di ionizzazione degli atomi di argon con conseguente formazione di ioni  $\text{Ar}^+$ . Il fenomeno è ottenuto grazie alla presenza di un campo magnetico originato da un generatore di radiofrequenza. Gli urti tra gli atomi di Ar neutri e gli elettroni favoriscono il mantenimento del plasma. La torcia impiegata è composta da due tubi concentrici in quarzo per il trasporto dell'argon e da un iniettore in allumina per l'iniezione del campione nebulizzato. La torcia utilizzata è in posizione verticale, con la possibilità di scegliere tra la configurazione radiale o assiale<sup>a</sup>. La temperatura del plasma crea le condizioni per cui gli elettroni raggiungono un livello energetico superiore del loro stato fondamentale. Quando questi ultimi ritornano ad un livello energetico inferiore emettono una radiazione elettromagnetica che genera uno spettro di emissione a diverse lunghezze d'onda. La luce policromatica emessa dal campione eccitato è raccolta da un sistema ottico dove viene selezionata in funzione della lunghezza d'onda. Le intensità di ciascuna lunghezza d'onda sono quindi convertite in segnali elettrici mediante il rivelatore. Lo strumento utilizzato è l'ICP-OES Optima™ 5300 DV (Perkin-Elmer, Waltham USA) (Figura 23) caratterizzato da un sistema a doppio rivelatore che lavora nel campo dell'ultravioletto (UV) e del visibile (VIS). Il rivelatore UV lavora ad una lunghezza d'onda compresa tra 165 nm e 403 nm, mentre quello VIS tra 404 nm e 782 nm.



Figura 23 - Optima™ 5300 DV.

La procedura analitica prevede l'utilizzo di standard di taratura esterni per ottenere delle rette di taratura. Per calibrare lo strumento sono state preparate soluzioni standard a concentrazione nota tra  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  e  $25 \text{ mg L}^{-1}$ .

Le lunghezze d'onda prese in considerazione per lo zinco tramite l'analisi con l'ICP-OES sono 202.548 nm, 206.200 nm e 213.857 nm.

---

<sup>a</sup> La configurazione radiale è utilizzata per matrici complesse mentre quella assiale è utilizzata per matrici semplici.

### 3.6. INDICE DI STABILITÀ GLOBALE

Al fine di determinare in maniera più esaustiva la stabilità colloidale delle dispersioni di nanomateriali è stato impiegato il metodo elaborato dal gruppo di studio di Badetti et al., (2021) che prevede l'utilizzo di un indice di stabilità globale. Più nello specifico l'approccio prevede che i risultati, di ciascuna dispersione siano analizzati per studiare la correlazione lineare tra le tecniche CSA, DLS, ELS e combinati per sviluppare tre indicatori di stabilità relativa per ognuna delle tre tecniche utilizzate ( $I_{CSA}$ ,  $I_{DLS}$ ,  $I_{ELS}$ ). È stato quindi determinato l'indice di stabilità globale ( $I_G$ ). I valori rappresentativi l'indice di stabilità globale sono stati visualizzati mediante l'utilizzo di una *heatmap* in cui ad una variazione di colore corrisponde una variazione di stabilità. Man mano, infatti, che le dispersioni sono più stabili l'intensità di colore aumenta.

In accordo con quanto detto precedentemente, CSA fornisce approfondimenti sulla propensione alla sedimentazione delle NPs, DLS fornisce informazioni sullo stato di aggregazione, mentre ELS indica la propensione alla stabilità elettrostatica. In generale, le dispersioni colloidali mostrano che ad un aumento della velocità di sedimentazione corrisponde la formazione di aggregati di maggiori dimensioni ed una minore carica superficiale (in valore assoluto) che porta ad una minore repulsione elettrostatica. In base a questo, i valori fisici sono stati convertiti in indice mediante l'utilizzo di una funzione logistica (Figura A1). Tale funzione fornisce una classifica di stabilità delle dispersioni attraverso una taratura per ottenere una curva avente un'asse y con valori compresi tra 0 (massima instabilità) e 1 (massima stabilità) e quindi individuazione del punto di transizione per ognuna delle tecniche utilizzate. Il punto di transizione di 0.1 è stato selezionato per  $I_{CSA}$  corrispondente a valori di velocità di sedimentazione di  $1.5 \pm 0.2 \mu\text{m s}^{-1}$ . Un valore di 0.3 è stato invece scelto per  $I_{DLS}$  che corrisponde a valori di diametro idrodinamico di  $1000 \pm 200 \text{ nm}$  per DLS. Per  $I_{ELS}$  è stato invece selezionato un punto di transizione di 0.9 che corrisponde a valori di potenziale zeta di  $20 \pm 5 \text{ mV}$  (Badetti et al., 2021).

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1. CARATTERIZZAZIONE COLLOIDALE

#### Concentrazione ottimale per la caratterizzazione colloidale

La concentrazione ottimale da utilizzare per studiare la stabilità colloidale delle dispersioni mediante DLS, ELS e CSA è stata scelta attraverso la tecnica CSA. Nel dettaglio sono state studiate 4 concentrazioni ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $200 \text{ mg L}^{-1}$  e  $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) di  $\text{SiO}_2@ZnO$ ,  $ZnO$  e  $\text{SiO}_2$  in DW. Dal confronto tra i profili di trasmissione alla concentrazione più bassa ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) e più alta ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Figura 24) è emerso che, a concentrazioni inferiori a  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , il segnale ottenuto è troppo basso (cioè, numero troppo esiguo di profili di trasmissione) per ottenere dei valori di velocità di sedimentazione affidabili. Pertanto, per la caratterizzazione colloidale si è scelto di lavorare ad una concentrazione di  $500 \text{ mg L}^{-1}$ .

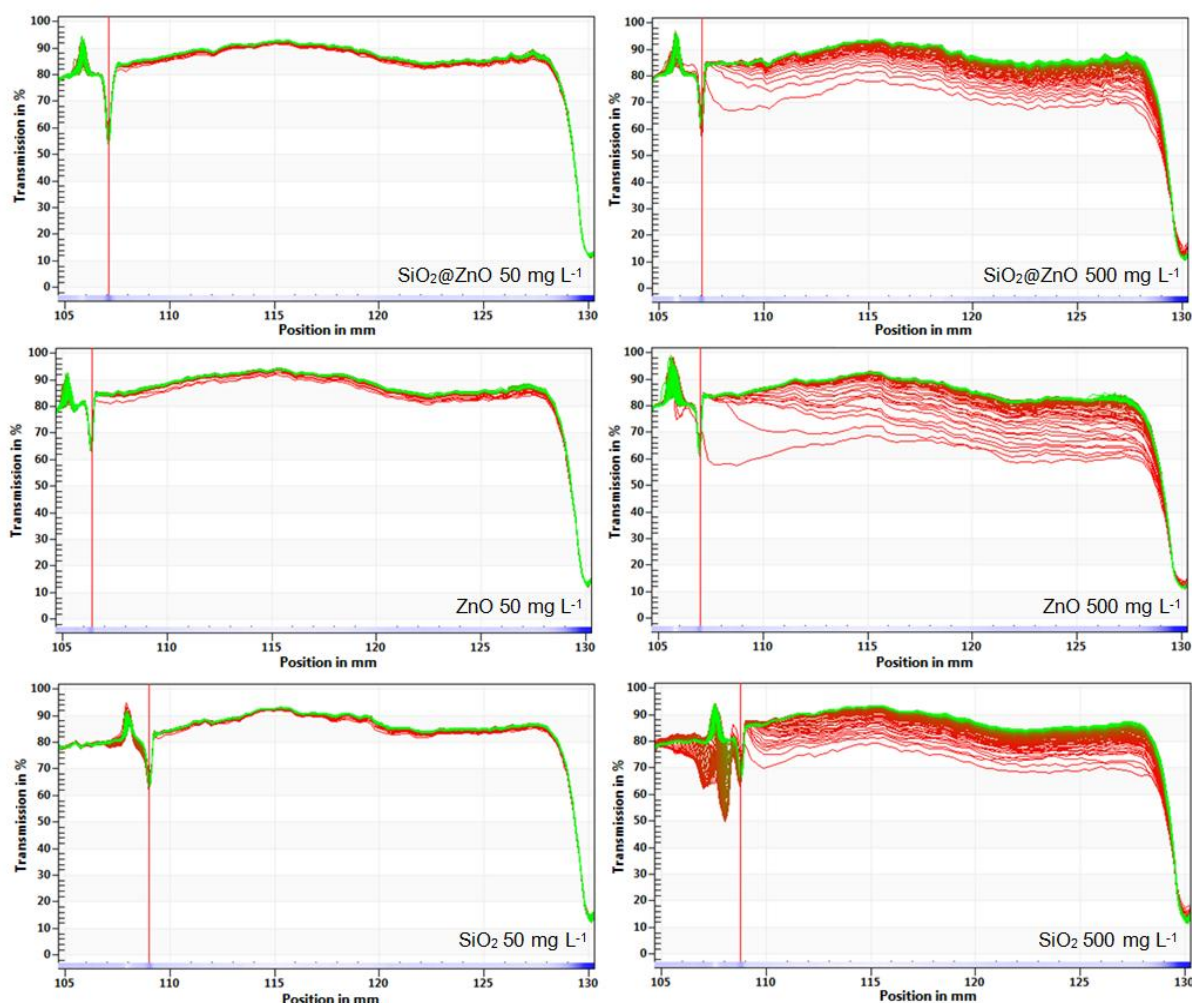


Figura 24 - Profili di trasmissione nel tempo (in verde quelli più recenti).

### Carica superficiale in funzione del pH

Per ottenere informazioni sulla stabilità colloidale delle dispersioni contenenti i tre nanomateriali investigati in funzione del pH, e poter interpretare il loro comportamento nei vari mezzi (eco)tossicologici, si è studiata la variazione del potenziale zeta nell'intervallo di pH compreso tra 2 e 8. Si è ottenuta quindi una curva di potenziale zeta vs. pH (Figura 25) per ognuna delle tre dispersioni. In accordo con quanto riportato da altri partner del progetto, le NPs di SiO<sub>2</sub>@ZnO e SiO<sub>2</sub> hanno mostrato un aumento (in valore assoluto) del potenziale zeta da pH 2 a pH 8. Nel caso delle NPs di ZnO si è osservato un aumento del potenziale zeta da circa 0 mV a pH 2 fino a circa +20 mV a pH 6, con un'inversione del potenziale a pH 7, ed il raggiungimento di valori negativi elevati a pH 8 (circa -26 mV). L'andamento osservato per ZnO è in accordo con quanto riportato da Mohd Omar et al., (2014). In generale si osservano valori di potenziale zeta bassi (attorno a 0 mV) a pH estremamente acidi (pH = 2) per tutte e tre le dispersioni, indicativi della vicinanza al punto isoelettrico. Inoltre, dal profilo di potenziale zeta delle NPs di ZnO (linea rossa) si nota che ci sono 2 punti isoelettrici, cioè ci sono 2 punti in cui la dispersione è altamente instabile. Questo comportamento è probabilmente legato a fenomeni di dissoluzione indotti dalla variazione di pH.

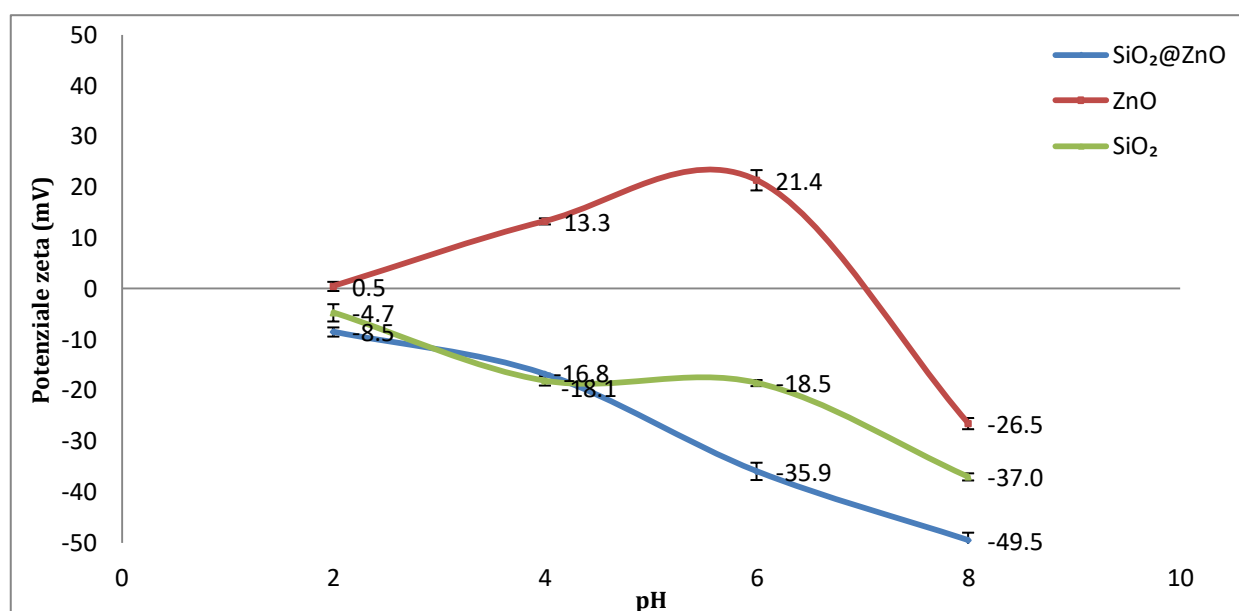


Figura 25 – Carica superficiale in funzione del pH.

### Valutazione della stabilità colloidale

Le informazioni ottenute dagli esperimenti preliminari relativi alla i) determinazione ottimale della concentrazione alla quale studiare la stabilità colloidale di SiO<sub>2</sub>@ZnO, ZnO e SiO<sub>2</sub> e



alla ii) variazione della carica superficiale in funzione del pH sono state impiegate per valutarne la loro stabilità colloidale in vari mezzi di interesse ecotossicologico (M7, AFW e AMW) e tossicologico (RPMI ed RPMI con l'aggiunta di proteine, vitamine e antibiotici). La caratterizzazione delle dispersioni in tali mezzi ha previsto l'utilizzo delle tecniche analitiche CSA, DLS ed ELS. I dati complessivi sono riportati di seguito mentre una rappresentazione grafica è riportata nelle Figure A2, A3 e A4.

#### Acqua deionizzata - DW

In primo luogo, la caratterizzazione colloidale è stata studiata in acqua deionizzata (pH = 6), scelta come mezzo di riferimento rispetto ai mezzi di interesse tossicologico ed ecotossicologico, perché priva di ioni, in particolare di cationi bivalenti che possono influenzare la stabilità colloidale (Baalousha et al., 2013). Come riportato in Tabella 5, il nanomateriale multi-composito di tipo *core-shell* (SiO<sub>2</sub>@ZnO) presenta un diametro idrodinamico simile a quello determinato per il *core* (SiO<sub>2</sub>), maggiore rispetto a quello delle NPs di ZnO. Nel dettaglio, sono stati determinati valori di ca. 1600 nm per i due nanomateriali a base di SiO<sub>2</sub> mentre per ZnO è stato osservato un valore di ca. 900 nm. Per quanto riguarda la carica superficiale, ZnO mostra un valore abbastanza elevato e positivo (ca. 21 mV), mentre SiO<sub>2</sub> presenta un valore simile (in valore assoluto) ma con segno negativo (ca. -19 mV). Nel caso del *core-shell*, il valore osservato risulta essere maggiore rispetto a quello di SiO<sub>2</sub>, a seguito dell'influenza dello ZnO, ma mantiene lo stesso segno negativo. Le velocità di sedimentazione sono molto simili per le tre dispersioni (ca. 0.5-0.6 μm s<sup>-1</sup>).

Tabella 5 - Caratterizzazione colloidale in DW.

<b>DW</b>			
<b>Campione</b>	<b>Velocità di sedimentazione (μm s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Diametro idrodinamico (nm)</b>	<b>Potenziale zeta (mV)</b>
SiO <sub>2</sub> @ZnO	0.64 ± 0.01	1505 ± 191	-35.9 ± 1.5
ZnO	0.59 ± 0.03	874 ± 109	21.4 ± 2.0
SiO <sub>2</sub>	0.48 ± 0.06	1711 ± 214	-18.5 ± 0.6

Studio della stabilità colloidale in mezzi utilizzati nei saggi ecotossicologici

- Acqua dolce artificiale - M7 (pH 8)

L'insieme dei dati di caratterizzazione colloidale per i campioni di nanoparticelle disperse in M7 sono riportati in Tabella 6. I risultati ottenuti per la dispersione di SiO<sub>2</sub>@ZnO in M7 sono simili a quelli registrati in DW, sia in termini dimensionali sia di velocità di sedimentazione. Per quanto riguarda i dati relativi alla dispersione di SiO<sub>2</sub>, si nota un aumento della velocità di sedimentazione, mentre i valori del diametro idrodinamico rimangono simili a quelli osservati in DW. Per quanto riguarda la carica superficiale, la dispersione di SiO<sub>2</sub>@ZnO ha registrato un valore inferiore (in valore assoluto) in M7 rispetto al valore in DW. Osservando i dati ottenuti per la dispersione di ZnO, si nota un aumento della velocità di sedimentazione e del diametro idrodinamico, suggerendo quindi una generale destabilizzazione passando da DW a M7. La carica superficiale inoltre presenta un valore inferiore in termini assoluti e un'inversione nel segno della carica, che potrebbe indicare da un lato un'interazione con cationi bivalenti quali Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (Brunelli et al., 2022) e dall'altro la presenza di processi di dissoluzione.

Tabella 6 - Caratterizzazione colloidale in M7.

Campione	M7		
	Velocità di sedimentazione (μm s <sup>-1</sup> )	Diametro idrodinamico (nm)	Potenziale zeta (mV)
SiO <sub>2</sub> @ZnO	0.66 ± 0.09	1322 ± 200	-21.1 ± 1.1
ZnO	0.84 ± 0.05	1375 ± 192	-12.5 ± 0.9
SiO <sub>2</sub>	0.65 ± 0.03	1673 ± 217	-20.4 ± 2.1

- Acqua dolce artificiale - AFW (pH 7.5)

I dati di caratterizzazione colloidale per i campioni di nanoparticelle disperse in AFW sono riportati in Tabella 7. La dispersione contenente le NPs di SiO<sub>2</sub>@ZnO in AFW ha mostrato un comportamento simile a quello osservato in DW ed M7, sia in termini di diametro idrodinamico sia di velocità di sedimentazione. Nel caso delle dispersioni di SiO<sub>2</sub> in AFW, nonostante il valore di velocità di sedimentazione sia simile a quello registrato in DW, si è osservata una riduzione del diametro idrodinamico. Per quanto riguarda la carica

superficiale, il valore di potenziale zeta delle NPs di ZnO disperse in AFW risulta inferiore (in valore assoluto). Per la dispersione di ZnO si è osservato lo stesso comportamento osservato in M7, ovvero, si è registrata una generale destabilizzazione rappresentata da un aumento della velocità di sedimentazione e del diametro idrodinamico accompagnata da una riduzione del potenziale zeta probabilmente legato alla presenza di elettroliti bivalenti (in particolare cationi:  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) che determinano la formazione di agglomerati che sedimentano più velocemente.

Tabella 7 – Caratterizzazione colloidale in AFW.

Campione	AFW		
	Velocità di sedimentazione ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	Diametro idrodinamico (nm)	Potenziale zeta (mV)
$\text{SiO}_2@\text{ZnO}$	$0.67 \pm 0.04$	$1302 \pm 184$	$-18.1 \pm 1.2$
ZnO	$0.83 \pm 0.04$	$1423 \pm 223$	$1.7 \pm 0$
$\text{SiO}_2$	$0.52 \pm 0.05$	$338 \pm 58$	$-19.4 \pm 0.8$

- Acqua marina artificiale - AMW (pH 8.5)

La sintesi dei risultati della caratterizzazione colloidale delle dispersioni in AMW è riportata in Tabella 8. In generale, la dispersione di nanoparticelle di  $\text{SiO}_2@\text{ZnO}$  ha mostrato una velocità di sedimentazione inferiore rispetto a quella determinata in DW ed un aumento del diametro idrodinamico mentre la dispersione di nanoparticelle di ZnO in AMW mostra un comportamento simile a quello osservato in DW sia dal punto di vista della velocità di sedimentazione sia del diametro idrodinamico. Per quanto riguarda la carica superficiale, entrambe le dispersioni di  $\text{SiO}_2@\text{ZnO}$  e ZnO presentano un valore di potenziale zeta vicino al punto isoelettrico, che potrebbe essere indicativo di una maggiore instabilità colloidale. Per quanto concerne le dispersioni di  $\text{SiO}_2$  si osserva una generale destabilizzazione, rappresentata da un aumento della velocità di sedimentazione e del diametro idrodinamico, oltre che da valori di potenziale zeta vicini a 0 mV. Questo comportamento potrebbe essere dovuto all'elevata forza ionica del mezzo (630 mM). È noto, infatti, che una soluzione con forza ionica elevata porta alla riduzione del doppio strato elettrico delle particelle, diminuendo la repulsione inter-particellare, causando

agglomerazione (dimensioni del raggio idrodinamico maggiori) e successivamente sedimentazione.

Tabella 8 - Caratterizzazione colloidale in AMW.

Campione	AMW		
	Velocità di sedimentazione ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	Diametro idrodinamico (nm)	Potenziale zeta (mV)
SiO <sub>2</sub> @ZnO	0.37 ± 0.04	1824 ± 254	0.6 ± 0.3
ZnO	0.71 ± 0	775 ± 112	0.5 ± 0.3
SiO <sub>2</sub>	0.94 ± 0.08	2085 ± 284	-0.1 ± 0.6

Studio della stabilità colloidale in mezzi di coltura cellulare utilizzati in test in vitro

- RPMI

I risultati della caratterizzazione colloidale delle dispersioni nel mezzo di coltura cellulare RPMI, effettuata a 0, 1, 3 e 24 ore, sono riportati in Tabella 9. Confrontando i dati relativi alle dispersioni di nanoparticelle di SiO<sub>2</sub>@ZnO in RPMI da 0 a 24 ore, si nota una diminuzione sia della velocità di sedimentazione sia del diametro idrodinamico, mentre il valore del potenziale zeta rimane pressoché costante. Un comportamento simile è stato osservato anche per le dispersioni di NPs di SiO<sub>2</sub>. Al contrario invece, per le dispersioni di NPs di ZnO si osserva un aumento sia della velocità di sedimentazione sia della dimensione, passando da 0 a 24 ore. I valori di potenziale zeta dei tre materiali, simili e vicini al punto isoelettrico, sono probabilmente legati alle caratteristiche del mezzo di dispersione (RPMI), che è principalmente composto da sali e amminoacidi. La presenza di sali può infatti indurre una contrazione del doppio strato elettrico ma, al contempo, la presenza degli amminoacidi potrebbe portare alla formazione di un *coating* neutro attorno alla superficie delle NPs, le quali non saranno più stabilizzate da forze di repulsione elettrostatica ma di impedimento sterico. Tale comportamento è confermato dai risultati ottenuti in DW.

Tabella 9 - Caratterizzazione colloidale in RPMI.

Campione	RPMI			
	Tempo (ore)	Velocità di sedimentazione ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	Diametro idrodinamico (nm)	Potenziale zeta (mV)
SiO <sub>2</sub> @ZnO	0	0.29 ± 0.01	2021 ± 304	-4.6 ± 0.5
	1	0.27 ± 0.01	2254 ± 355	-1.8 ± 0.5
	3	0.22 ± 0.01	1994 ± 316	1.4 ± 0.6
	24	0.26 ± 0.01	1076 ± 316	-5.2 ± 0.4
ZnO	0	0.46 ± 0.03	632 ± 92	-2.7 ± 1.0
	1	0.40 ± 0.02	869 ± 140	-6.3 ± 0.6
	3	0.46 ± 0.03	1183 ± 158	-2.5 ± 1.6
	24	0.73 ± 0.25	1324 ± 184	-1.5 ± 0.4
SiO <sub>2</sub>	0	0.50 ± 0.05	1217 ± 201	-1.3 ± 0.8
	1	0.36 ± 0.03	2078 ± 205	-0.4 ± 0.7
	3	0.33 ± 0.02	1539 ± 243	-4.0 ± 1.4
	24	0.25 ± 0.09	699 ± 106	-3.4 ± 0.7

- RPMI(FBS\_ps)

I risultati della caratterizzazione colloidale (a 0, 1, 3 e 24 ore) delle dispersioni nel mezzo di coltura cellulare RPMI con l'aggiunta di FBS e di penicillina/streptomina sono riportati in Tabella 10. La velocità di sedimentazione delle dispersioni di SiO<sub>2</sub>@ZnO rimane costante nel tempo e il valore del diametro non subisce variazioni rispetto a quello osservato in DW; la carica superficiale si riduce invece notevolmente, assumendo valori sempre più negativi. Questo comportamento è probabilmente legato alla presenza di FBS che contiene amminoacidi liberi, oltre che alla presenza di antibiotici (penicillina e streptomina), che formano un *coating* neutro attorno alle NPs, stabilizzando in questo modo la dispersione non più attraverso forze di repulsione elettrostatica ma di impedimento sterico. Un effetto simile è stato osservato per SiO<sub>2</sub> e ZnO, i quali rimangono stabili nel tempo (come dimostrato dai valori di velocità di sedimentazione) mostrando come nel caso del materiale multicomponente un aumento del diametro idrodinamico a 24 ore. Tale comportamento è confermato dai risultati ottenuti dalle dispersioni in assenza di FBS e penicillina/streptomina e in DW.

Tabella 10 - Caratterizzazione colloidale in RPMI(FBS\_ps).

RPMI(FBS_ps)				
Campione	Tempo (ore)	Velocità di sedimentazione ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	Diametro idrodinamico (nm)	Potenziale zeta (mV)
<b>SiO<sub>2</sub>@ZnO</b>	0	0.58 ± 0.05	1107 ± 154	-1.6 ± 0.7
	1	0.55 ± 0.05	1529 ± 187	-4.6 ± 0.6
	3	0.52 ± 0.03	1009 ± 146	-5.1 ± 0.5
	24	0.58 ± 0.04	1788 ± 283	-11.7 ± 1.4
<b>ZnO</b>	0	0.40 ± 0.02	708 ± 102	-5.3 ± 1.4
	1	0.50 ± 0.05	768 ± 117	-4.8 ± 0.6
	3	0.47 ± 0.04	659 ± 85	-3.3 ± 0.8
	24	0.40 ± 0.02	1732 ± 272	-3.5 ± 0.5
<b>SiO<sub>2</sub></b>	0	0.38 ± 0.04	1423 ± 216	-5.3 ± 0.7
	1	0.45 ± 0.10	1421 ± 213	-4.8 ± 0.6
	3	0.58 ± 0.06	1249 ± 194	-7.6 ± 0.6
	24	0.41 ± 0.02	1756 ± 277	-4.3 ± 0.8

#### 4.2. INDICE DI STABILITÀ GLOBALE

I dati relativi alla stabilità colloidale di ciascuna dispersione sono stati matematicamente tradotti in tre indicatori di stabilità relativi a ciascuna delle tecniche utilizzate, dai quali è stato infine calcolato un indice di stabilità globale ( $I_G$ ). I valori dell'indice di stabilità globale e quelli degli indicatori relativi ad ogni singola tecnica sono riportati in Tabella A1 e nelle Figure 26 e 28, mentre le rappresentazioni grafiche dei valori di  $I_G$  sono riportate nelle Figure 27 e 29.

##### Valori dell'indice di stabilità globale in mezzi acquosi utilizzati nei saggi ecotossicologici

In base ai valori di  $I_G$  ottenuti nei mezzi di interesse ecotossicologico (Figura 26), si osserva che le dispersioni di nanoparticelle presentano valori molto simili sia in termini assoluti ( $I_G$ ), sia in termini parziali (valori degli indicatori parziali, relativi alle diverse tecniche analitiche), mostrando che il contributo maggiore ai valori finali di  $I_G$  è rappresentato dai dati di potenziale zeta ottenuti tramite la tecnica ELS. I risultati relativi ad AFW invece presentano differenze sia in termini di  $I_G$  che in termini di valori degli indicatori parziali, mostrando un elevato  $I_G$  per le dispersioni di nanoparticelle di SiO<sub>2</sub> mentre un basso valore di  $I_G$  per le dispersioni di nanoparticelle di ZnO. A causa dell'elevata forza ionica invece, per quanto riguarda i dati ottenuti in AMW si osserva sia un valore di  $I_G$  inferiore rispetto ai valori ottenuti negli altri mezzi di dispersione, sia che il contributo

maggiore al valore di  $I_G$  deriva dai dati della tecnica CSA. Lo scarso contributo dei dati di ELS in AMW sottolinea la presenza di un'elevata concentrazione di sali. La *heatmap* con i valori di  $I_G$  per ciascun mezzo di interesse ecotossicologico (Figura 27) mostra che, in DW, la dispersione di nanoparticelle di ZnO è più stabile rispetto a quella caratterizzata dalle nanoparticelle di SiO<sub>2</sub> e di SiO<sub>2</sub>@ZnO ( $I_G = 0.58, 0.51$  e  $0.52$ , rispettivamente). Per quanto riguarda le acque analizzate per i test ecotossicologici considerati, la dispersione di nanoparticelle di SiO<sub>2</sub>@ZnO presenta la stessa stabilità in M7 ed AFW mentre la dispersione di nanoparticelle di ZnO è maggiormente stabile in M7 e SiO<sub>2</sub> in AFW. Per quanto riguarda AMW, che presenta una maggiore forza ionica rispetto ai mezzi precedenti, la stabilità colloidale è ridotta per tutti e tre i materiali ( $I_G$  medio = 0.22). Il più instabile è risultato essere SiO<sub>2</sub> ( $I_G = 0.11$ ).

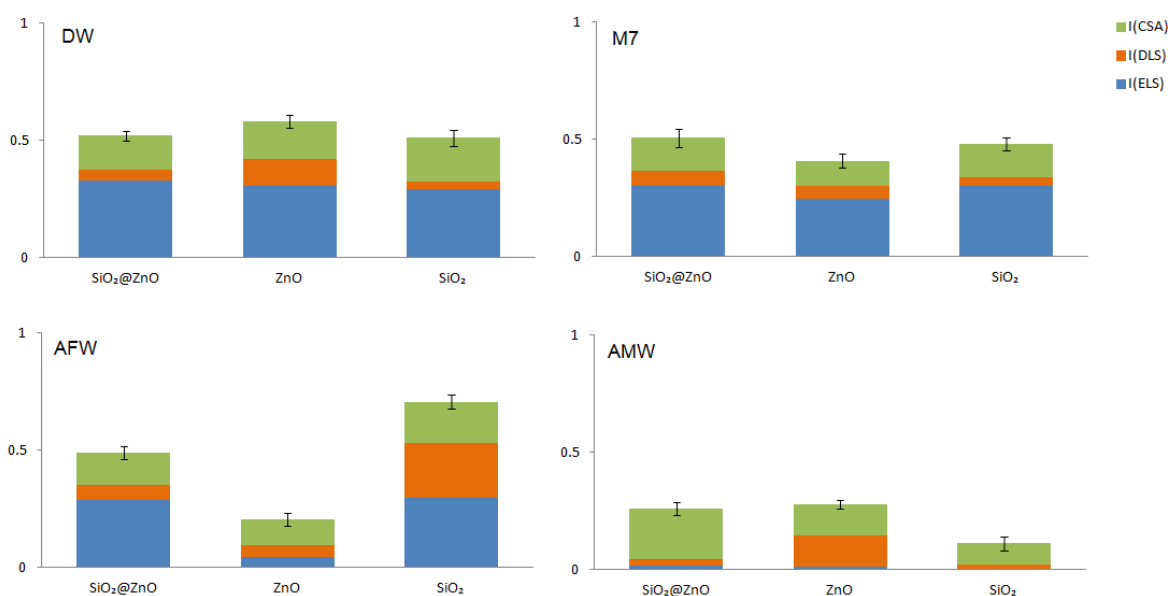


Figura 26 - Valori di  $I_G$  nel mezzo di riferimento (DW) e nei mezzi di interesse ecotossicologico (M7, AFW e AMW).

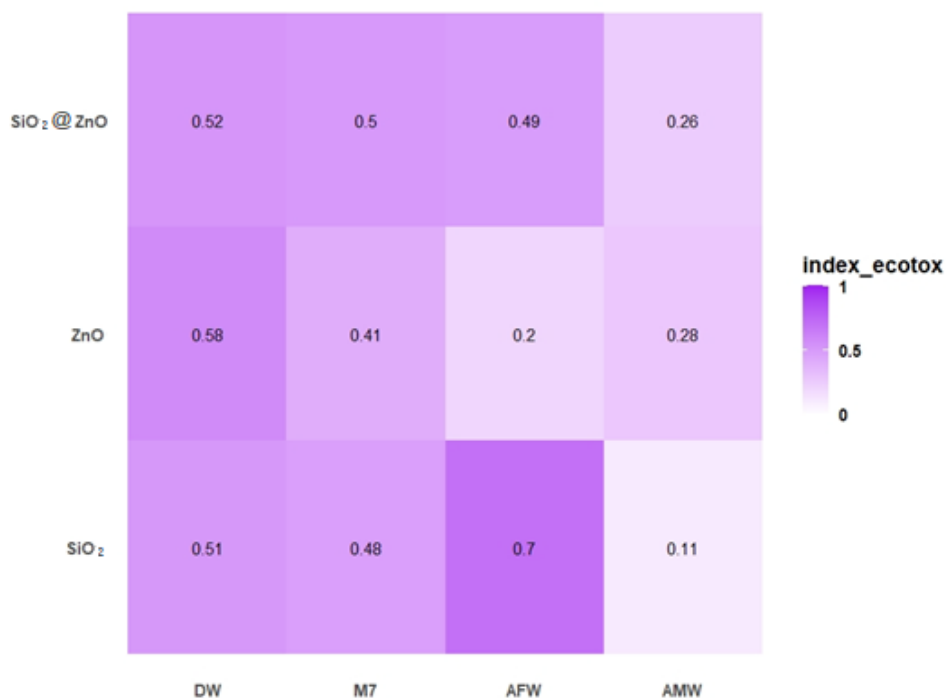


Figura 27 - *Heatmap* rappresentante i valori di  $I_G$  nel mezzo di riferimento (DW) e nei mezzi di interesse ecotossicologico (M7, AFW e AMW).

#### Valori dell'indice di stabilità globale in mezzi di coltura cellulare utilizzati in test in vitro

Per quanto riguarda i mezzi di interesse tossicologico (Figura 28), si evidenzia che, in linea generale, in RPMI ed RPMI(FBS\_ps), il contributo maggiore ai valori finali di  $I_G$  è rappresentato dai valori ottenuti tramite la tecnica CSA. La *heatmap* con i valori di  $I_G$  per ciascun mezzo biologico è riportata in Figura 29. Confrontando i dati ottenuti in DW e nei due mezzi di coltura cellulare, si nota che tutti e tre i nanomateriali presentano un valore di  $I_G$  inferiore (quindi minore stabilità colloidale) in RPMI ed RPMI(FBS\_ps) ai diversi tempi di analisi rispetto a DW. Questo risultato si ipotizza sia dovuto al fatto che gli aminoacidi formino un *coating* attorno alle NPs, riducendo il potenziale zeta vicino al punto isoelettrico. Confrontando i dati di  $I_G$  nei due mezzi di interesse tossicologico, in generale si nota una maggiore stabilità colloidale in RPMI(FBS\_ps) rispetto ad RPMI.



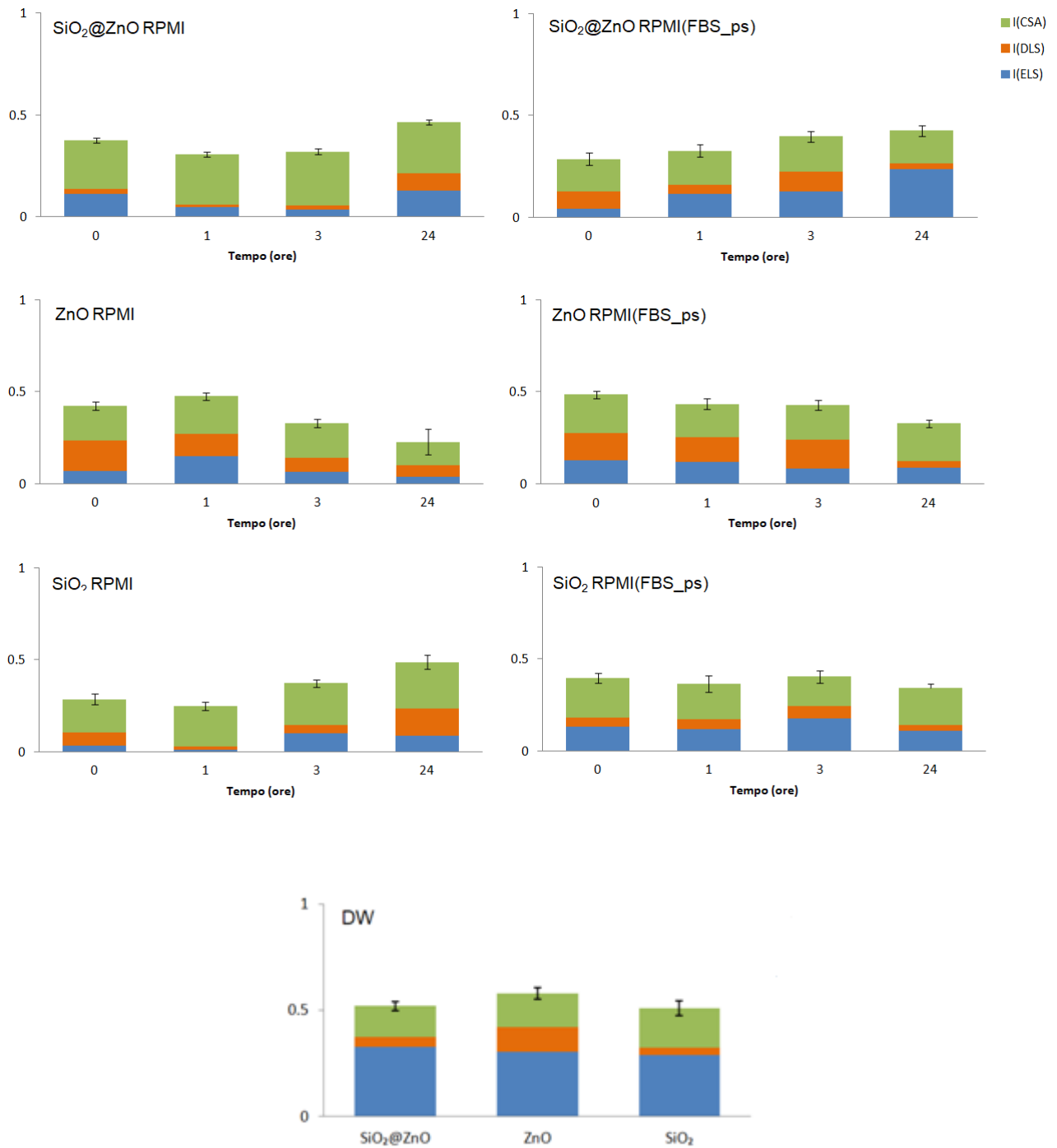


Figura 28 - Valori di  $I_G$  nel mezzo di riferimento (DW) e nei mezzi di interesse tossicologico (RPMI ed RPMI(FBS<sub>ps</sub>)) dopo 0, 1, 3 e 24 ore dalla preparazione del campione.

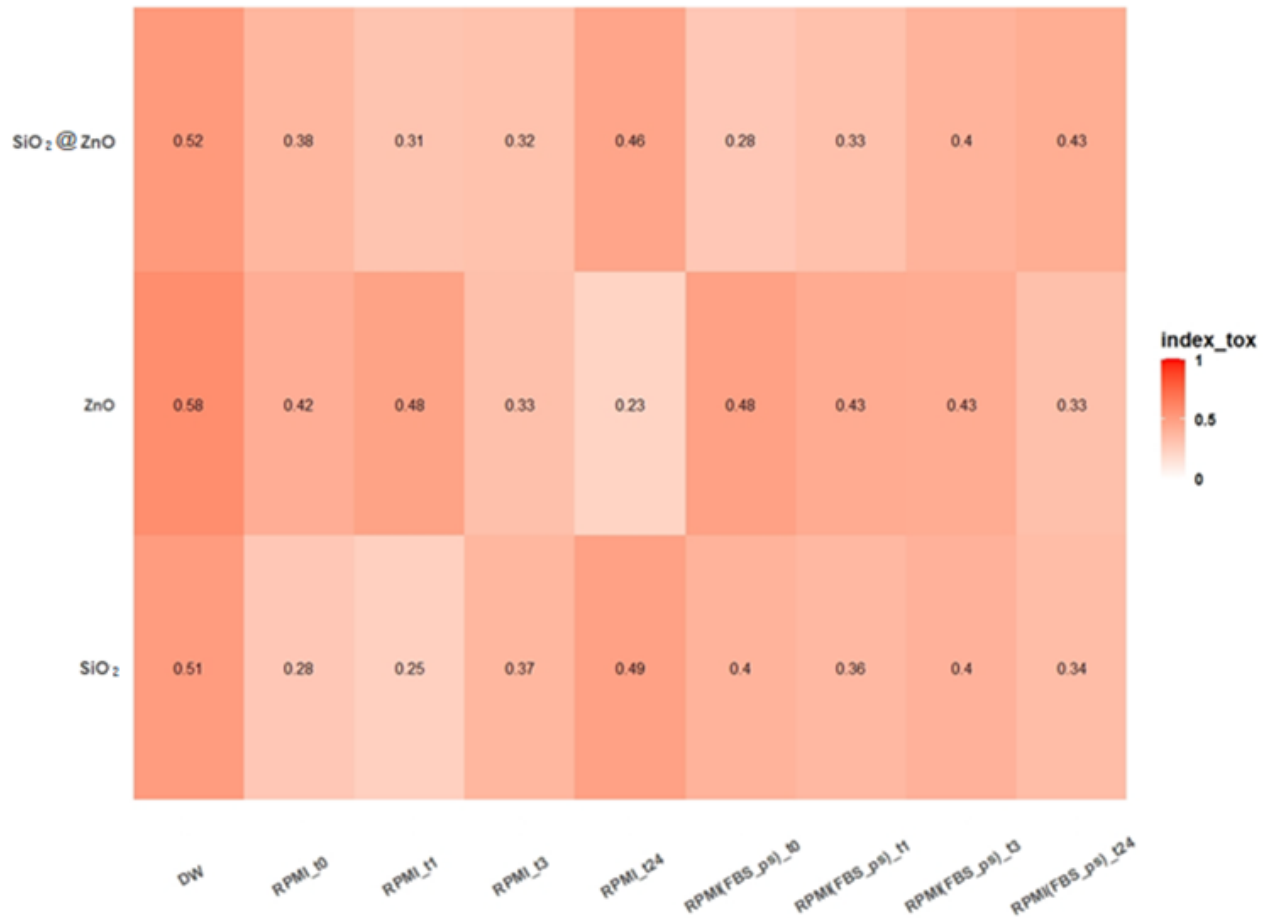


Figura 29 - Heatmap rappresentante i valori di  $I_G$  nel mezzo di riferimento (DW) e nei mezzi di interesse tossicologico (RPMI ed RPMI(FBS\_ps)) dopo 0, 1, 3 e 24 ore dalla preparazione del campione.

#### 4.3. CARATTERIZZAZIONE IN FASE SOLIDA E STUDI DI DISSOLUZIONE

Al fine di fornire un quadro esaustivo sul comportamento dei nanomateriali dispersi in un mezzo acquoso e supportare, non solo la realizzazione dei test tossicologici ma anche i relativi risultati, si è studiata, oltre alla stabilità colloidale dei nanomateriali investigati, la loro potenziale interazione con alcune delle componenti dei mezzi di dispersione. In seguito a tali interazioni, infatti, si potrebbero osservare delle modifiche sulla superficie dei nanomateriali a contatto con il mezzo disperdente. Amminoacidi e proteine presenti nei mezzi biologici, ad esempio, potrebbero i) legarsi alla superficie dei suddetti nanomateriali coordinandosi alla superficie (*coatings*), ii) potrebbero strappare ioni metallici dalla superficie e portarli in soluzione o dispersione (favorendo processi di dissoluzione), o iii) si potrebbe osservare la formazione di un *protein corona* attorno alla superficie delle NPs. Tutti questi processi ovviamente sono legati al tipo di nanomateriale, alla composizione del mezzo di dispersione ed ovviamente al tempo di contatto.

### Caratterizzazione in fase solida mediante FT-IR

In questo contesto, sono stati realizzati degli studi preliminari per andare ad indagare le potenziali variazioni della superficie mediante spettroscopia FT-IR. Come descritto nella sezione di materiali e metodi, i campioni, dopo essere stati dispersi nei vari mezzi di interesse tossicologico sono stati lavati con DW ed essiccati. I mezzi ecotossicologici non sono stati considerati in questa parte dello studio in quanto contenenti solo sali inorganici che, come spiegato precedentemente, influenzano principalmente lo spessore del doppio strato elettrico.

Gli spettri ottenuti dall'analisi FT-IR dei vari campioni sono riportati a continuazione (dettagli in Figura A5), dove troviamo, in ordine dall'alto verso il basso, le NPs a) pristin, e dopo essere state disperse in b) DW a cui sono stati aggiunti FBS e penicillina/streptomycin, in c) RPMI e, in d) RPMI a cui sono stati aggiunti FBS e penicillina/streptomycin. Come si può osservare in Figura 30, lo spettro relativo alle NPs di SiO<sub>2</sub>@ZnO pristin (in blu) mostrano 4 bande caratteristiche a 447 cm<sup>-1</sup> (attribuibile a Si-O-Si bending e a Zn-O), 802 cm<sup>-1</sup> (Si-O-Si stretching), 965 cm<sup>-1</sup> (Si-OH) e 1055 cm<sup>-1</sup> (Si-O). L'aggiunta di FBS e penicillina/streptomycin (ps) in DW porta alla comparsa di due nuove bande, una a 1530 cm<sup>-1</sup>, che potrebbe corrispondere i) a gruppi N-H e/o C-N presenti in amminoacidi e proteine (Song et al., 2016), o ii) essere un segnale relativo alle NPs di SiO<sub>2</sub> (come verrà spiegato in seguito), e una banda a 1645 cm<sup>-1</sup> che potrebbe corrispondere al gruppo C=O (sempre legato alla presenza di amminoacidi/proteine). Le stesse bande FT-IR si osservano anche dopo la dispersione in RPMI (in rosso) e in RPMI contenente sia FBS sia ps, RPMI(FBS\_ps). Le variazioni osservate negli spettri FT-IR, come la presenza di nuove bande, il loro spostamento o alcuni cambiamenti nella loro forma sono indicativi dell'interazione tra le componenti dei mezzi (ad es. amminoacidi, proteine, vitamine) e le NPs.

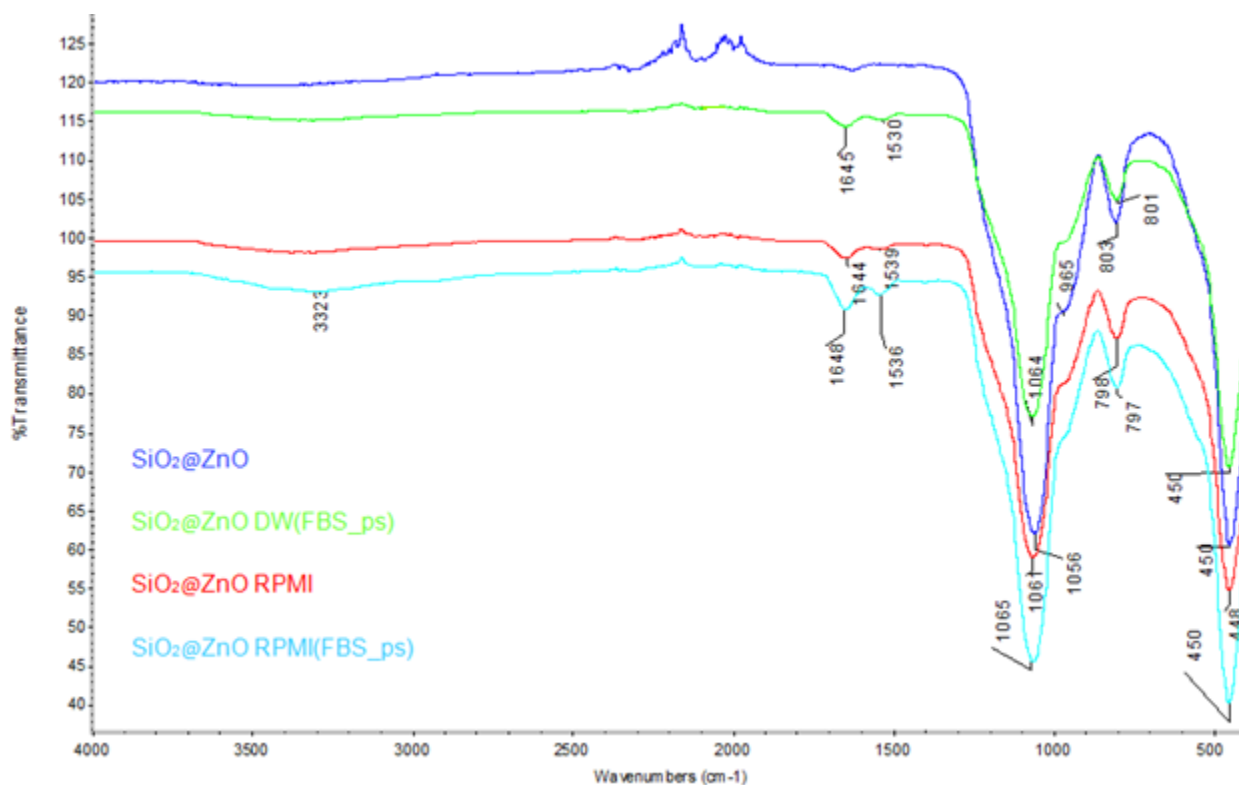


Figura 30 –Spettro FT-IR per  $\text{SiO}_2@ZnO$ .

Per capire meglio le interazioni osservate per il nanomateriale multi-composito, siamo andati a studiare le interazioni delle componenti dei mezzi con le singole componenti del nanomateriale multi-composito, rispettivamente il *core* ( $\text{SiO}_2$ ) e lo *shell* ( $\text{ZnO}$ ).

Per quanto riguarda lo spettro FT-IR delle NPs di  $\text{ZnO}$  pristin (Figura 31), la banda relativa allo stretching Zn-O appare sotto i  $430\text{ cm}^{-1}$  (Bauermann et al., 2006; S et al., 2020), pertanto nel caso del materiale multi-composito tale banda è nascosta da quella relativa al Si-O-Si. Lo spettro delle NPs di  $\text{ZnO}$  dopo dispersione in DW, a cui sono stati aggiunti FBS e penicillina/streptomicina, mostra in aggiunta alla banda Zn-O le due bande osservate precedentemente per il sistema multi-composito, a  $1530\text{ cm}^{-1}$  (N-H bending e/o C-N stretching) e a  $1653\text{ cm}^{-1}$  (C=O stretching).

Dopo dispersione in RPMI invece, in aggiunta a tali bande si osserva la presenza di una banda a  $1020\text{ cm}^{-1}$ , attribuibile allo stretching del gruppo C-N, che non si è potuta osservare nel caso precedente in quanto probabilmente coperta dai segnali relativi al Si-O (Song et al., 2016). Non si osservano invece variazioni tra lo spettro ottenuto dopo dispersione in RPMI e RPMI con FBS e penicillina/streptomicina, indicando che le componenti del mezzo (RPMI) interagiscono con la superficie di Zn in maniera più significativa rispetto a FBS e penicillina/streptomicina.

Considerando la propensione delle NPs di ZnO alla dissoluzione, è importante tenere in conto di questo tipo di interazioni nell'interpretazione dei dati derivanti dagli studi di dissoluzione mediante spettroscopia di emissione al plasma (ICP-OES).

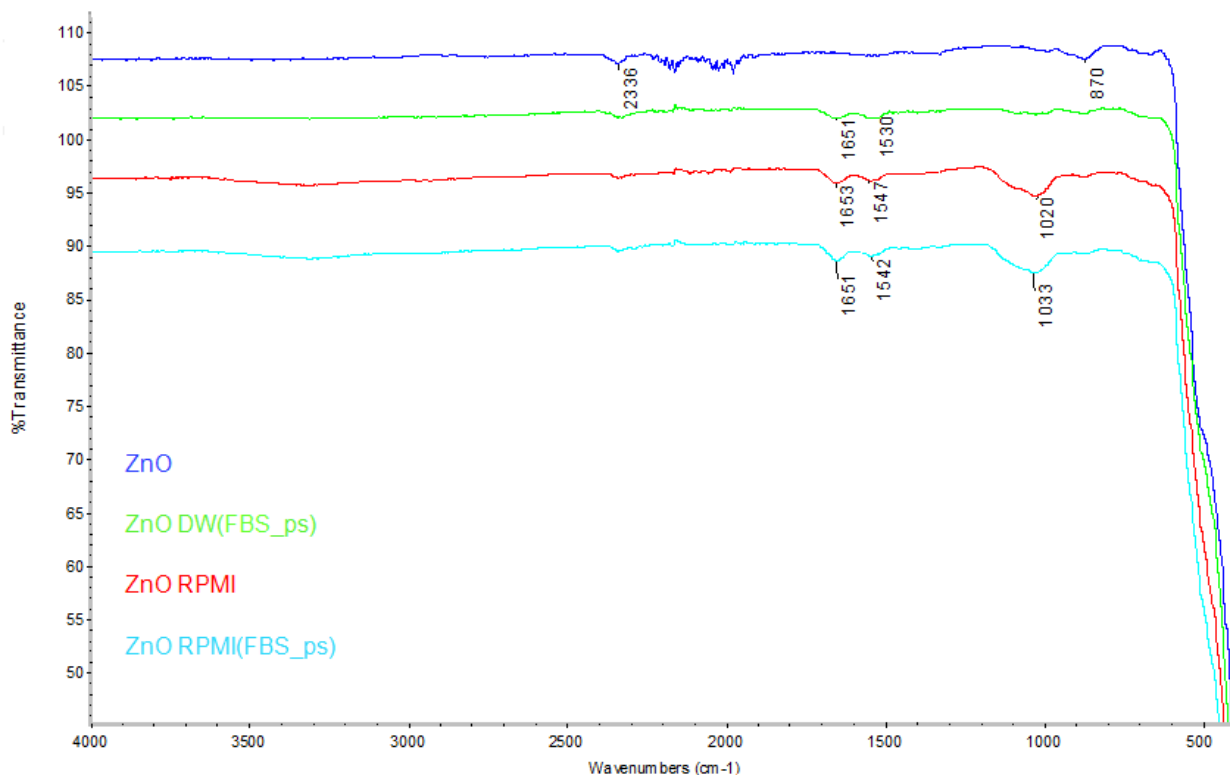


Figura 31- Spettro FT-IR per ZnO.

Infine, per quanto riguarda il *core*, le bande tipiche di SiO<sub>2</sub> (Figura 32) si trovano a 426 cm<sup>-1</sup> (Si-O-Si bending), a 794 cm<sup>-1</sup> (Si-O-Si stretching), a 1040 cm<sup>-1</sup> (Si-O), e sono le stesse bande che troviamo nel caso del materiale multi-composito. Si osserva poi una piccola banda a 1633 cm<sup>-1</sup> che non si osserva nel materiale *core-shell*, probabilmente dovuta alla presenza di gruppi C=O che potrebbero essere rimasti sulla superficie delle NPs dopo il processo di sintesi e che nel caso di SiO<sub>2</sub>@ZnO risulta coperta dallo ZnO.

Dopo dispersione nei vari mezzi, si osserva in tutti i casi la presenza di una nuova banda a 1539 cm<sup>-1</sup>, attribuibile, come nei casi precedenti a stretching e bending di N-H e/o C-N, e una piccola variazione nella forma/intensità della banda a 1647 cm<sup>-1</sup> (C=O stretching) probabilmente dovuta al contributo dei gruppi carbossilici degli aminoacidi.

I risultati ottenuti suggeriscono che le componenti dei mezzi interagiscono con la superficie dei nanomateriali investigati e in particolare, nel caso dei nanomateriali contenenti ZnO, che ha un'elevata propensione alla dissoluzione, ci si aspetta che tale tipo di interazione

favorisca la formazione di complessi favorendo il processo di dissoluzione (Badetti et al., 2019).

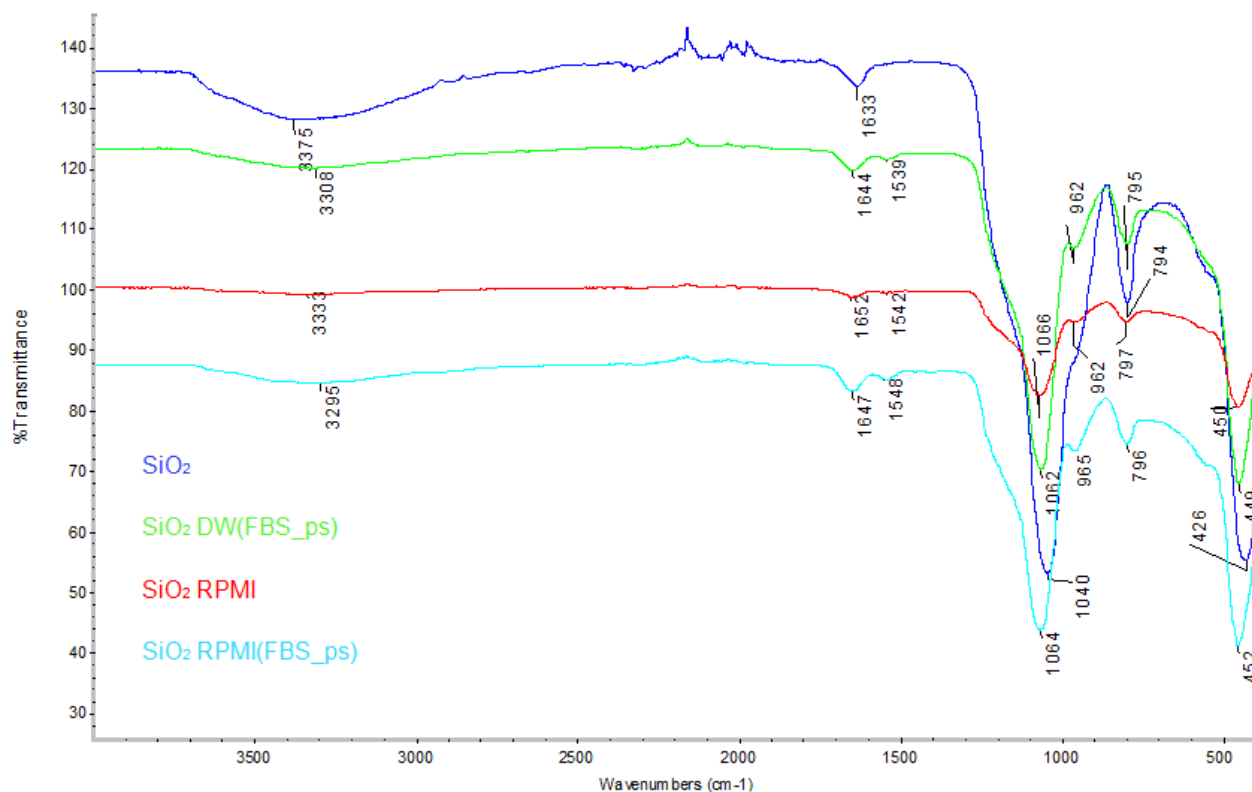


Figura 32 – Spettro FT-IR per SiO<sub>2</sub>

### Studi di dissoluzione mediante ICP-OES

Alcuni tra i mezzi più rilevanti per i test (eco)tossicologici sono stati scelti per effettuare gli studi di dissoluzione dello Zn(II) dalle NPs oggetto di studio (ZnO e SiO<sub>2</sub>@ZnO). Nel dettaglio la DW è stata scelta come mezzo di riferimento, M7 come mezzo rappresentativo per i test ecotossicologici (ad es. *Daphnia magna*) e l'RPMI (senza e con FBS e ps) per i test tossicologici *in vitro*.

Lo studio è stato effettuato prelevando aliquote di campione a diversi intervalli temporali (0, 1, 3 e 24 ore dopo la preparazione delle dispersioni) in accordo con la durata dei saggi di tossicità acuta (24 ore) al fine di fornire delle indicazioni per l'interpretazione dei risultati (eco)tossicologici. I risultati relativi sono stati rappresentati nelle Figure 33, 34, 35 e 36 mentre l'insieme dei valori sono riportati in Tabella A2. La percentuale di dissoluzione di Zn(II) è stata calcolata in base alla composizione chimica delle NPs di partenza (ovvero, 80% di SiO<sub>2</sub> e 20% di ZnO per SiO<sub>2</sub>@ZnO). In linea generale si osserva che la % di dissoluzione di Zn(II) aumenta nel tempo in tutti i mezzi studiati e che tale % è sempre

circa il doppio per le dispersioni contenenti le nanoparticelle di  $\text{SiO}_2@\text{ZnO}$  rispetto a quelle di  $\text{ZnO}$ . Questo risultato potrebbe essere dovuto alla struttura chimica e morfologica delle due nanoparticelle: lo  $\text{ZnO}$  presenta una geometria semisferica, con una dimensione  $<200$  nm, mentre le NPs di  $\text{SiO}_2@\text{ZnO}$  sono caratterizzate da un sottile strato di  $\text{ZnO}$  che potrebbe comportare maggiore dissoluzione rispetto alle singole nanoparticelle di  $\text{ZnO}$ .

Per quanto riguarda il confronto tra le dispersioni in DW e in M7 (Figure 33 e 34), si osserva una maggiore % di dissoluzione di  $\text{Zn}$  (II) in DW, probabilmente dettata dalla maggiore acidità della soluzione (pH 6 vs pH 8) e dall'assenza di sali, invece presenti in M7, i cui cationi (specialmente quelli divalenti) potrebbero svolgere un'azione schermante sulla superficie delle NPs (Badetti et al., 2021).

Nel caso delle NPs di  $\text{ZnO}$  disperse nei mezzi di interesse tossicologico, RPMI ed RPMI(FBS\_ps), non si osserva una dissoluzione significativa nel tempo per entrambi i mezzi (Figure 35 e 36). Si osserva invece dissoluzione ( $<$  del 10%) per le NPs di  $\text{SiO}_2@\text{ZnO}$  dopo 24 ore, indipendentemente dall'aggiunta di FBS e penicillina/streptomycin.

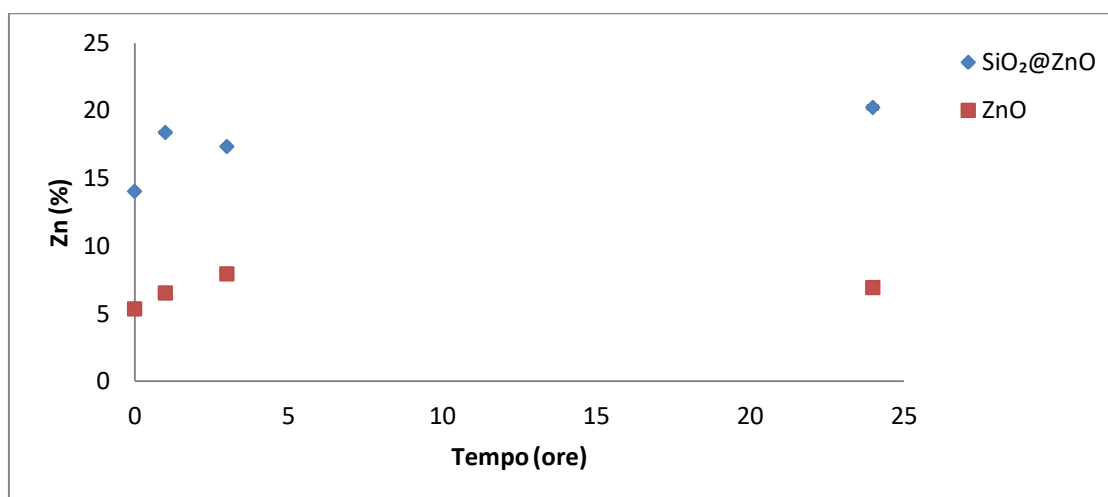


Figura 33 - Dissoluzione in DW.

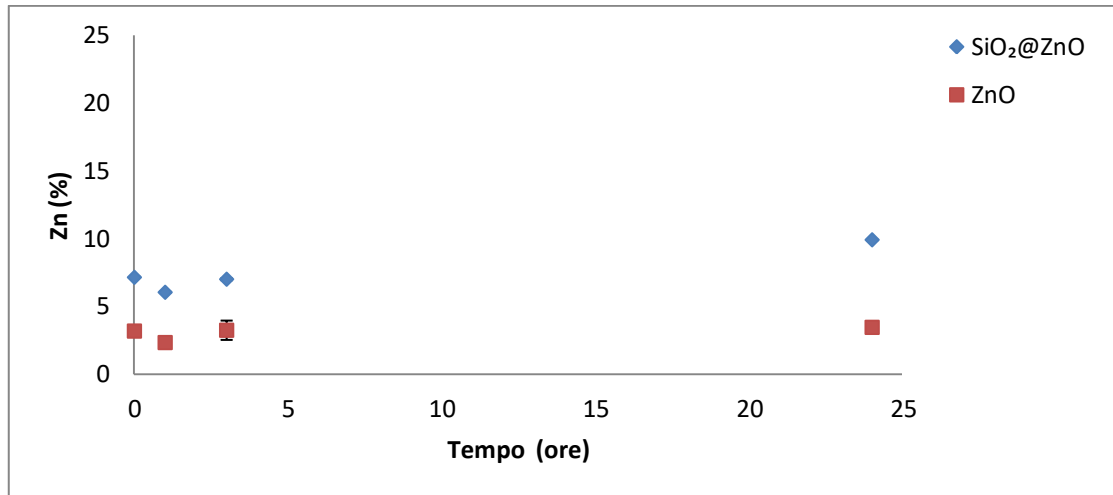


Figura 34 - Dissoluzione in M7.

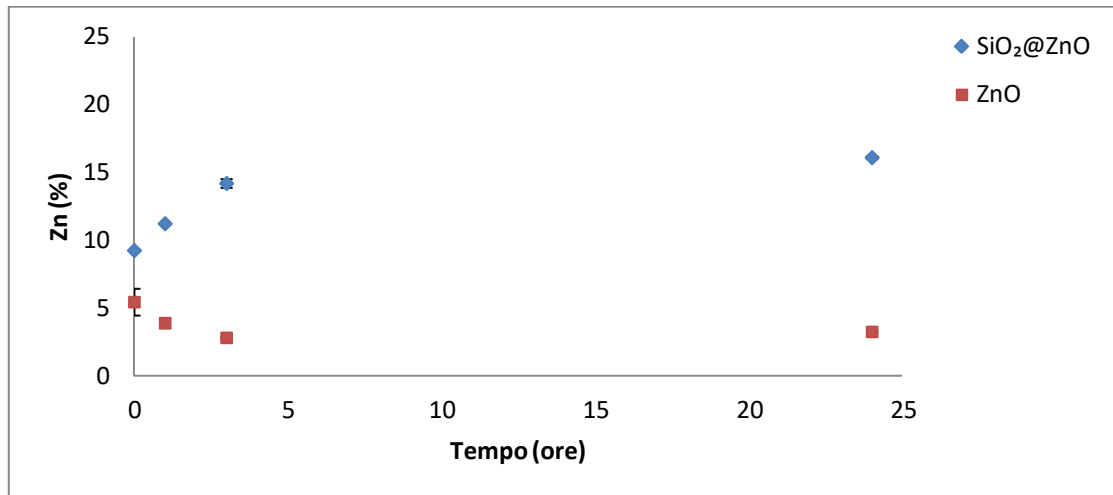


Figura 35 - Dissoluzione in RPMI.

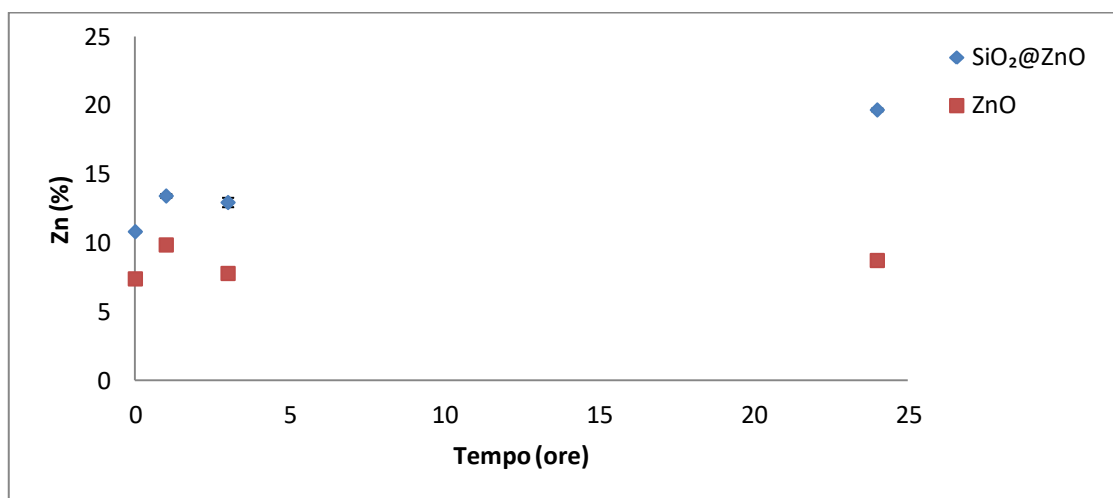


Figura 36 - Dissoluzione in RPMI(FBS\_ps).



## 5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti attraverso la caratterizzazione chimico-fisica delle NPs di SiO<sub>2</sub>, ZnO e SiO<sub>2</sub>@ZnO riportati in questo lavoro di tesi, si stanno utilizzando nell'ambito del progetto H2020 SUNSHINE al fine di supportare la valutazione della tossicità di tali nanomateriali sia per la salute umana sia per l'ambiente. In particolare, la caratterizzazione colloidale è servita a trovare le condizioni ottimali per disperdere ciascun nanomateriale in maniera corretta. Avere dispersioni stabili nel tempo (almeno per la durata dei test (eco)tossicologici acuti, cioè 24-48 ore) permette di avere risultati più robusti e riproducibili in quanto processi di sedimentazione potrebbero generare dei gradienti di concentrazione che potrebbero alterare i risultati dei test e portare a conclusioni errate. Stimare correttamente la tossicità dei nanomateriali è fondamentale nelle strategie di SbD in quanto, nonostante gli aspetti relativi alla sicurezza debbano essere presi in considerazione nella fase iniziale del processo di innovazione (pertanto nella fase di design del prodotto), tali aspetti tossicologici devono essere verificati sperimentalmente. Inoltre, i dati raccolti possono essere sfruttati nel design di altri prodotti sicuri (ad esempio prodotti che contengono componenti simili a quelle testate) e possono permettere di ridurre il numero di test (eco)tossicologici (specialmente quelli *in vivo*) secondo l'approccio delle 3R (sostituzione, riduzione e perfezionamento della sperimentazione animale).

In questo contesto, test di citotossicità *in vitro* utilizzando il colorante AlamarBlue su linee cellulari umane di tipo THP-1 sono stati eseguiti da alcuni dei partner di progetto per valutare gli effetti sulla vitalità cellulare sia delle NPs a singola componente che del materiale multi-composito. Il mezzo utilizzato per tali test è l'RPMI addizionato di FBS e penicillina/streptomycin. Dai risultati ottenuti da questi studi è emersa una significativa riduzione della vitalità cellulare alla concentrazione di 100 µg mL<sup>-1</sup> di SiO<sub>2</sub>@ZnO alle 24h, dimostrando una maggiore tossicità del materiale multi-composito rispetto ai corrispettivi materiali a singola componente.

Questo effetto potrebbe essere dovuto alla maggior dissoluzione di ioni Zn(II) da SiO<sub>2</sub>@ZnO rispetto allo ZnO alle 24h, osservata in RPMI con FBS e ps (Figura 36) mediante ICP-OES. In ogni caso, si può affermare che le NPs di SiO<sub>2</sub>@ZnO causano citotossicità solo a dosi elevate e, secondo altri test condotti nell'ambito del progetto, non sono stati registrati effetti infiammatori significativi, generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) o genotossicità. Pertanto, considerando che tali nanomateriali vengono inclusi in intonaci per il rivestimento di edifici, questi risultati preliminari

suggeriscono che tali materiali rispecchiano i requisiti di “safety” richiesti negli approcci di tipo SbD, mantenendo un corretto equilibrio tra tossicità e funzionalità del prodotto finale. Per quanto riguarda invece la tossicità ambientale, non sono disponibili informazioni in quanto i test sono ancora in fase di sviluppo.

All'interno del gruppo di ricerca si stanno realizzando dei test di rilascio di NPs e ioni potenzialmente tossici dal materiale finale (intonaco contenente NPs di  $\text{SiO}_2@ZnO$  tra 1 e 5 %) al fine di supportare la “safety” di questi prodotti lungo tutto il ciclo di vita.



## BIBLIOGRAFIA

- Abbas, Q., Yousaf, B., Amina, Ali, M.U., Munir, M.A.M., El-Naggar, A., Rinklebe, J., Naushad, M., 2020. Transformation pathways and fate of engineered nanoparticles (ENPs) in distinct interactive environmental compartments: A review. *Environment International* 138, 105646. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105646>
- Accorsi, G., Verri, G., Bolognesi, M., Armaroli, N., Clementi, C., Miliani, C., Romani, A., 2009. The exceptional near-infrared luminescence properties of cuprorivaite (Egyptian blue). *Chem. Commun.* 3392–3394. <https://doi.org/10.1039/B902563D>
- Amde, M., Liu, J., Tan, Z.-Q., Bekana, D., 2017. Transformation and bioavailability of metal oxide nanoparticles in aquatic and terrestrial environments. A review. *Environmental Pollution* 230, 250–267. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.064>
- Angel, B.M., Batley, G.E., Jarolimek, C.V., Rogers, N.J., 2013. The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere* 93, 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.096>
- Baalousha, M., Nur, Y., Römer, I., Tejamaya, M., Lead, J.R., 2013. Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. *Science of The Total Environment* 454–455, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.093>
- Babick, F., 2020. Chapter 3.2.1 - Dynamic light scattering (DLS), in: Hodoroaba, V.-D., Unger, W.E.S., Shard, A.G. (Eds.), *Characterization of Nanoparticles, Micro and Nano Technologies*. Elsevier, pp. 137–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00010-9>
- Badetti, E., Brunelli, A., Basei, G., Gallego-Urrea, J.A., Stoll, S., Walch, H., Praetorius, A., Kammer, F. von der, Marcomini, A., 2021. Novel multimethod approach for the determination of the colloidal stability of nanomaterials in complex environmental mixtures using a global stability index: TiO<sub>2</sub> as case study. *Science of The Total Environment* 801, 149607. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149607>
- Badetti, E., Calgaro, L., Falchi, L., Bonetto, A., Bettiol, C., Leonetti, B., Ambrosi, E., Zendri, E., Marcomini, A., 2019. Interaction between Copper Oxide Nanoparticles and Amino Acids: Influence on the Antibacterial Activity. *Nanomaterials* 9. <https://doi.org/10.3390/nano9050792>
- Barhoum, A., García-Betancourt, M.L., Jeevanandam, J., Hussien, E.A., Mekkawy, S.A., Mostafa, M., Omran, M.M., S Abdalla, M., Bechelany, M., 2022. Review on Natural, Incidental, Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market, Toxicities, Risks, and Regulations. *Nanomaterials (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/nano12020177>
- Bathi, J.R., Moazeni, F., Upadhyayula, V.K.K., Chowdhury, I., Palchoudhury, S., Potts, G.E., Gadhamshetty, V., 2021. Behavior of engineered nanoparticles in aquatic environmental samples: Current status and challenges. *Sci Total Environ* 793, 148560. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148560>
- Bauermann, L.P., Bill, J., Aldinger, F., 2006. Bio-friendly Synthesis of ZnO Nanoparticles in Aqueous Solution at Near-Neutral pH and Low Temperature. *The Journal of Physical Chemistry B* 110, 5182–5185. <https://doi.org/10.1021/jp056830m>
- Bermejo-Nogales, A., Fernández-Cruz, M.L., Navas, J.M., 2017. Fish cell lines as a tool for the ecotoxicity assessment and ranking of engineered nanomaterials. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 90, 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.09.029>

- Betts, J.N., Johnson, M.G., Rygielwicz, P.T., King, G.A., Andersen, C.P., 2013. Potential for metal contamination by direct sonication of nanoparticle suspensions. *Environ Toxicol Chem* 32, 889–893. <https://doi.org/10.1002/etc.2123>
- Bhattacharjee, S., 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bian, S.-W., Mudunkotuwa, I.A., Rupasinghe, T., Grassian, V.H., 2011. Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments: Influence of pH, Ionic Strength, Size, and Adsorption of Humic Acid. *Langmuir* 27, 6059–6068. <https://doi.org/10.1021/la200570n>
- Brulot, W., 2014. Development, synthesis and characterization of multifunctional nanomaterials (PhD Thesis).
- Brunelli, A., Foscari, A., Basei, G., Lusvardi, G., Bettiol, C., Semenzin, E., Marcomini, A., Badetti, E., 2022. Colloidal stability classification of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in artificial and in natural waters by cluster analysis and a global stability index: Influence of standard and natural colloidal particles. *Science of The Total Environment* 829, 154658. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154658>
- Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2, MR17-71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Caballero-Guzman, A., Nowack, B., 2016. A critical review of engineered nanomaterial release data: Are current data useful for material flow modeling? *Environmental Pollution* 213, 502–517. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.028>
- Caruso, F., Mantellato, S., Palacios, M., Flatt, R.J., 2017. ICP-OES method for the characterization of cement pore solutions and their modification by polycarboxylate-based superplasticizers. *Cement and Concrete Research* 91, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2016.10.007>
- Devi, T.B., Mohanta, D., Ahmaruzzaman, M., 2019. Biomass derived activated carbon loaded silver nanoparticles: An effective nanocomposites for enhanced solar photocatalysis and antimicrobial activities. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 76, 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.03.032>
- Dowling, A.P., 2004. Development of nanotechnologies. *Materials Today* 7, 30–35. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00628-5](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00628-5)
- Du, J., Guo, R., Li, K., Ma, B., Chen, Y., Lv, Y., 2019. Contributions of Zn Ions to ZnO Nanoparticle Toxicity on *Microcystis aeruginosa* During Chronic Exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 103, 802–807. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02725-8>
- Elendt, B.-P., 1990. Selenium deficiency in Crustacea. *Protoplasma* 154, 25–33. <https://doi.org/10.1007/BF01349532>
- Feynman, R.P., 1959. There's Plenty of Room at the Bottom, in: American Physical Society Meeting in Pasadena CA.
- Gaiser, B.K., Hirn, S., Kermanizadeh, A., Kanase, N., Fytianos, K., Wenk, A., Haberl, N., Brunelli, A., Kreyling, W.G., Stone, V., 2012. Effects of Silver Nanoparticles on the Liver and Hepatocytes In Vitro. *Toxicological Sciences* 131, 537–547. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs306>
- Garner, K.L., Keller, A.A., 2014. Emerging patterns for engineered nanomaterials in the environment: a review of fate and toxicity studies. *Journal of Nanoparticle Research* 16, 2503. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2503-2>
- Gottardo, S., Mech, A., Drbohlavová, J., Małyska, A., Bøwadt, S., Sintes, J.R., Rauscher, H., 2021. Towards safe and sustainable innovation in nanotechnology: State-of-play for smart nanomaterials. *NanoImpact* 21, 100297. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100297>

- Gottschalk, F., Nowack, B., 2011. The release of engineered nanomaterials to the environment. *J. Environ. Monit.* 13, 1145–1155. <https://doi.org/10.1039/C0EM00547A>
- Gottschalk, F., Sun, T., Nowack, B., 2013. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. *Environ Pollut* 181, 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.003>
- Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.-C., Barber, D.S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem* 27, 1972–1978. <https://doi.org/10.1897/08-002.1>
- Harrison, R.M., 2005. AIR ANALYSIS | Outdoor Air, in: Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C. (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. Elsevier, Oxford, pp. 43–48. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00008-X>
- Hartmann, N.B., Skjolding, L.M., Hansen, S.F., Baun, A., Kjølholt, J., Gottschalk, F., 2014. Environmental fate and behaviour of nanomaterials: New knowledge on important transformation processes.
- Hendren, C.O., Mesnard, X., Dröge, J., Wiesner, M.R., 2011. Estimating Production Data for Five Engineered Nanomaterials As a Basis for Exposure Assessment. *Environmental Science & Technology* 45, 2562–2569. <https://doi.org/10.1021/es103300g>
- Hillyer, J.F., Albrecht, R.M., 2001. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci* 90, 1927–1936. <https://doi.org/10.1002/jps.1143>
- Hjorth, R., van Hove, L., Wickson, F., 2017. What can nanosafety learn from drug development? The feasibility of “safety by design”. *Nanotoxicology* 11, 305–312. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1299891>
- Janković, N.Z., Plata, D.L., 2019. Engineered nanomaterials in the context of global element cycles. *Environ. Sci.: Nano* 6, 2697–2711. <https://doi.org/10.1039/C9EN00322C>
- Jensen, K.A., Kembouche, Y., Christiansen, E., Jacobsen, N.R., Wallin, H., NRCWE, 2011. WP 4: Physicochemical Characterisation of Manufactured Nanomaterials (MNs) and Exposure Media (EMs) Deliverable 3: Final protocol for producing suitable MN exposure media Deliverable leader:NRCWE.
- Ji, Z., Jin, X., George, S., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Suarez, E., Zhang, H., Hoek, E.M.V., Godwin, H., Nel, A.E., Zink, J.I., 2010. Dispersion and stability optimization of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture media. *Environ Sci Technol* 44, 7309–7314. <https://doi.org/10.1021/es100417s>
- Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P., 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research* 11, 77–89. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9446-4>
- Jin, C., Wang, F., Tang, Y., Zhang, X., Wang, J., Yang, Y., 2014. Distribution of Graphene Oxide and TiO<sub>2</sub>-Graphene Oxide Composite in A549 Cells. *Biological Trace Element Research* 159, 393–398. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0027-3>
- Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research* 15, 1692. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>
- Khan, Merajuddin, Khan, Mujeeb, Al-Marri, A.H., Al-Warthan, A., Alkhathlan, H.Z., Siddiqui, M.R.H., Nayak, V.L., Kamal, A., Adil, S.F., 2016. Apoptosis inducing ability of silver decorated highly reduced graphene oxide nanocomposites in A549 lung cancer. *Int J Nanomedicine* 11, 873–883. <https://doi.org/10.2147/IJN.S100903>
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the

- environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem* 27, 1825–1851. <https://doi.org/10.1897/08-090.1>
- Koivisto, A.J., Jensen, A.C.Ø., Kling, K.I., Nørgaard, A., Brinch, A., Christensen, F., Jensen, K.A., 2017. Quantitative material releases from products and articles containing manufactured nanomaterials: Towards a release library. *NanoImpact* 5, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.02.001>
- Kraegeloh, A., Suarez-Merino, B., Sluijters, T., Micheletti, C., 2018. Implementation of Safe-by-Design for Nanomaterial Development and Safe Innovation: Why We Need a Comprehensive Approach. *Nanomaterials* 8. <https://doi.org/10.3390/nano8040239>
- Lei, C., Sun, Y., Tsang, D.C.W., Lin, D., 2018. Environmental transformations and ecological effects of iron-based nanoparticles. *Environ Pollut* 232, 10–30. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.052>
- Lerche, D., Sobisch, T., 2007. Consolidation of concentrated dispersions of nano- and microparticles determined by analytical centrifugation. *Powder Technology* 174, 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2006.10.020>
- Levard, C., Hotze, E.M., Lowry, G.V., Brown, G.E.J., 2012. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environ Sci Technol* 46, 6900–6914. <https://doi.org/10.1021/es2037405>
- Li, S., Xue, M., Huang, N., Lin, L., Guo, X., Xia, T., 2022. Potential behavior, implication and risk of nanohybrids in the environment: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* 18, 100693. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100693>
- Lin, D., Tian, X., Wu, F., Xing, B., 2010. Fate and transport of engineered nanomaterials in the environment. *J Environ Qual* 39, 1896–1908. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0423>
- Lowry, G.V., Gregory, K.B., Apte, S.C., Lead, J.R., 2012. Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environmental Science & Technology* 46, 6893–6899. <https://doi.org/10.1021/es300839e>
- Lynch, I., 2017. EU NanoSafety Cluster Compendium of Projects - 2017 Edition. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.28153.26720>
- Marinkovic, N.S., Sasaki, K., Adzic, R.R., 2018. Determination of Single- and Multi-Component Nanoparticle Sizes by X-ray Absorption Spectroscopy. *Journal of The Electrochemical Society* 165, J3222. <https://doi.org/10.1149/2.0281815jes>
- Martínez, G., Merinero, M., Pérez-Aranda, M., Pérez-Soriano, E.M., Ortiz, T., Begines, B., Alcludia, A., 2020. Environmental Impact of Nanoparticles' Application as an Emerging Technology: A Review. *Materials (Basel)* 14. <https://doi.org/10.3390/ma14010166>
- Matter, F., Luna Barron, A., Niederberger, M., 2019. From colloidal dispersions to aerogels: How to master nanoparticle gelation. *Nano Today* 30. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.100827>
- Maurer-Jones, M.A., Gunsolus, I.L., Murphy, C.J., Haynes, C.L., 2013. Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Analytical Chemistry* 85, 3036–3049. <https://doi.org/10.1021/ac303636s>
- Medeiros, A.M.Z. de, Khan, L.U., Silva, G.H. da, Ospina, C.A., Alves, O.L., Castro, V.L. de, Martinez, D.S.T., 2021. Graphene oxide-silver nanoparticle hybrid material: an integrated nanosafety study in zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 209, 111776. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111776>
- Medhi, S., Chowdhury, S., Gupta, D.K., Mazumdar, A., 2020. An investigation on the effects of silica and copper oxide nanoparticles on rheological and fluid loss property of drilling fluids. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology* 10, 91–101. <https://doi.org/10.1007/s13202-019-0721-y>

- Mensah, M.B., Lewis, D.J., Boadi, N.O., Awudza, J.A.M., 2021. Heavy metal pollution and the role of inorganic nanomaterials in environmental remediation. *R Soc Open Sci* 8, 201485. <https://doi.org/10.1098/rsos.201485>
- Misra, S.K., Dybowska, A., Berhanu, D., Luoma, S.N., Valsami-Jones, E., 2012. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Science of The Total Environment* 438, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.066>
- Mohd Omar, F., Aziz, H., Stoll, S., 2014. Stability of ZnO Nanoparticles in Solution. Influence of pH, Dissolution, Aggregation and Disaggregation Effects. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* 3, 1–10. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2014.1072>
- Mudunkotuwa, I.A., Grassian, V.H., 2015. Biological and environmental media control oxide nanoparticle surface composition: the roles of biological components (proteins and amino acids), inorganic oxyanions and humic acid. *Environ. Sci.: Nano* 2, 429–439. <https://doi.org/10.1039/C4EN00215F>
- Mueller, N.C., Nowack, B., 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ Sci Technol* 42, 4447–4453. <https://doi.org/10.1021/es7029637>
- Musazzi, U.M., Marini, V., Casiraghi, A., Minghetti, P., 2017. Is the European regulatory framework sufficient to assure the safety of citizens using health products containing nanomaterials? *Drug Discovery Today* 22, 870–882. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.016>
- Nath, D., Banerjee, P., 2013. Green nanotechnology – A new hope for medical biology. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, 997–1014. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.002>
- Nowack, B., 2017. Evaluation of environmental exposure models for engineered nanomaterials in a regulatory context. *NanoImpact* 8, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.06.005>
- Nowack, B., David, R.M., Fissan, H., Morris, H., Shatkin, J.A., Stintz, M., Zepp, R., Brouwer, D., 2013. Potential release scenarios for carbon nanotubes used in composites. *Environment International* 59, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.04.003>
- Oberdörster, G., Ferin, J., Lehnert, B.E., 1994. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 5, 173–179. <https://doi.org/10.1289/ehp.102-1567252>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113, 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Occupational, W.H.O., Team, E.H., 1999. Hazard prevention and control in the work environment: : airborne dust. Occupational and environmental health series.
- OECD, 2019. Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test.
- Organization, W.H., 2022. Dietary and inhalation exposure to nano- and microplastic particles and potential implications for human health.
- P, A.P., Nayak, D.K., Sangoju, B., Kumar, R., Kumar, V., 2021. Effect of nano-silica in concrete; a review. *Construction and Building Materials* 278, 122347. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.122347>
- Parsai, T., Kumar, A., 2020. Stability and characterization of mixture of three particle system containing ZnO-CuO nanoparticles and clay. *Science of The Total Environment* 740, 140095. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140095>
- Parsai, T., Kumar, A., 2019. Understanding effect of solution chemistry on heteroaggregation of zinc oxide and copper oxide nanoparticles. *Chemosphere* 235, 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.171>



- Patil, S.S., Shedbalkar, U.U., Truskewycz, A., Chopade, B.A., Ball, A.S., 2016. Nanoparticles for environmental clean-up: A review of potential risks and emerging solutions. *Environmental Technology & Innovation* 5, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2015.11.001>
- Peijnenburg, W., Oomen, A.G., Soeteman-Hernández, L.G., Groenewold, M., Sips, A.J.A.M., Noorlander, C.W., Kettelarij, J.A.B., Bleeker, E.A.J., 2021. Identification of emerging safety and sustainability issues of advanced materials: Proposal for a systematic approach. *NanoImpact* 23, 100342. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100342>
- Peters, R.J.B., van Bommel, G., Milani, N.B.L., den Hertog, G.C.T., Undas, A.K., van der Lee, M., Bouwmeester, H., 2018. Detection of nanoparticles in Dutch surface waters. *Sci Total Environ* 621, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.238>
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research* 14, 1109. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>
- Potocnik, J., 2011. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Off. J. Eur. Communities Legis* 275, 38–40.
- Römer, I., White, T.A., Baalousha, M., Chipman, K., Viant, M.R., Lead, J.R., 2011. Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. *J Chromatogr A* 1218, 4226–4233. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.034>
- S, M., N, H., P.P, V., 2020. In Vitro Biocompatibility and Antimicrobial activities of Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) Prepared by Chemical and Green Synthetic Route—A Comparative Study. *BioNanoScience* 10, 112–121. <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00698-w>
- Saleh, N.B., Aich, N., Plazas-Tuttle, J., Lead, J.R., Lowry, G.V., 2015. Research strategy to determine when novel nanohybrids pose unique environmental risks. *Environ. Sci.: Nano* 2, 11–18. <https://doi.org/10.1039/C4EN00104D>
- Saleh, T.A., 2020. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation* 20, 101067. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101067>
- Salem, S.S., Fouda, A., 2021. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview. *Biol Trace Elem Res* 199, 344–370. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02138-3>
- Schiavo, S., Oliviero, M., Li, J., Manzo, S., 2018. Testing ZnO nanoparticle ecotoxicity: linking time variable exposure to effects on different marine model organisms. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 4871–4880. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0815-3>
- Sellami, B., Mezni, A., Khazri, A., Bouzidi, I., Saidani, W., Sheehan, D., Beyrem, H., 2017. Toxicity assessment of ZnO-decorated Au nanoparticles in the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology* 188, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.005>
- Serpone, N., Dondi, D., Albini, A., 2007. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta* 360, 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2005.12.057>
- Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Laird Forrest, M., Stroeve, P., Mahmoudi, M., 2012. Toxicity of nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 41, 2323–2343. <https://doi.org/10.1039/C1CS15188F>
- Sharma, V.K., Sayes, C.M., Guo, B., Pillai, S., Parsons, J.G., Wang, C., Yan, B., Ma, X., 2019. Interactions between silver nanoparticles and other metal nanoparticles under

- environmentally relevant conditions: A review. *Science of The Total Environment* 653, 1042–1051. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.411>
- Silva, G.H.D., Clemente, Z., Khan, L.U., Coa, F., Neto, L.L.R., Carvalho, H.W.P., Castro, V.L., Martinez, D.S.T., Monteiro, R.T.R., 2018. Toxicity assessment of TiO<sub>2</sub>-MWCNT nanohybrid material with enhanced photocatalytic activity on *Danio rerio* (Zebrafish) embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 165, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.093>
- Soeteman-Hernández, L.G., Bekker, C., Groenewold, M., Jantunen, P., Mech, A., Rasmussen, K., Sintes, J.R., Sips, A.J.A.M., Noorlander, C.W., 2019. Perspective on how regulators can keep pace with innovation: Outcomes of a European Regulatory Preparedness Workshop on nanomaterials and nano-enabled products. *NanoImpact* 14, 100166. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100166>
- Song, C., Li, X., Wang, S., Meng, Q., 2016. Enhanced conversion and stability of biosynthetic selenium nanoparticles using fetal bovine serum. *RSC Adv.* 6, 103948–103954. <https://doi.org/10.1039/C6RA22747C>
- Sørensen, S.N., Wigger, H., Zabeo, A., Semenzin, E., Hristozov, D., Nowack, B., Spurgeon, D.J., Baun, A., 2020. Comparison of species sensitivity distribution modeling approaches for environmental risk assessment of nanomaterials - A case study for silver and titanium dioxide representative materials. *Aquat Toxicol* 225, 105543. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105543>
- Standard, A., 2013. D1141-98: Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water. ASTM International, West Conshohocken.
- Sudha, P.N., Sangeetha, K., Vijayalakshmi, K., Barhoum, A., 2018. Chapter 12 - Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market, in: Barhoum, A., Makhlof, A.S.H. (Eds.), *Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures, Micro and Nano Technologies*. Elsevier, pp. 341–384. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51254-1.00012-9>
- Sun, T.Y., Conroy, G., Donner, E., Hungerbühler, K., Lombi, E., Nowack, B., 2015. Probabilistic modelling of engineered nanomaterial emissions to the environment: a spatio-temporal approach. *Environ. Sci.: Nano* 2, 340–351. <https://doi.org/10.1039/C5EN00004A>
- Tada, S., Fujiwara, K., Yamamura, T., Nishijima, M., Uchida, S., Kikuchi, R., 2020. Flame spray pyrolysis makes highly loaded Cu nanoparticles on ZrO<sub>2</sub> for CO<sub>2</sub>-to-methanol hydrogenation. *Chemical Engineering Journal* 381, 122750. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122750>
- Tadros, T., 2013. Dispersion Stability, in: Tadros, T. (Ed.), *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 249–250. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20665-8\\_67](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20665-8_67)
- Taurozzi, J.S., Hackley, V.A., Wiesner, M.R., 2011. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment – issues and recommendations. *Nanotoxicology* 5, 711–729. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.528846>
- Tavernaro, I., Dekkers, S., Soeteman-Hernández, L.G., Herbeck-Engel, P., Noorlander, C., Kraegeloh, A., 2021. Safe-by-Design part II: A strategy for balancing safety and functionality in the different stages of the innovation process. *NanoImpact* 24, 100354. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100354>
- Titus, D., Samuel, E.J.J., Roopan, S.M., 2019. Chapter 12 - Nanoparticle characterization techniques, in: Shukla, A.K., Iravani, S. (Eds.), *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles, Micro and Nano Technologies*. Elsevier, pp. 303–319. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5>

- Toll, R., Jacobi, U., Richter, H., Lademann, J., Schaefer, H., Blume-Peytavi, U., 2004. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *J Invest Dermatol* 123, 168–176. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22717.x>
- Veksha, A., Latiff, N.M., Chen, W., Ng, J.E., Lisak, G., 2020. Heteroatom doped carbon nanosheets from waste tires as electrode materials for electrocatalytic oxygen reduction reaction: Effect of synthesis techniques on properties and activity. *Carbon* 167, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.05.075>
- von der Kammer, F., Ferguson, P.L., Holden, P.A., Masion, A., Rogers, K.R., Klaine, S.J., Koelmans, A.A., Horne, N., Unrine, J.M., 2012. Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): general considerations and conceptual case studies. *Environ Toxicol Chem* 31, 32–49. <https://doi.org/10.1002/etc.723>
- Wang, F., Wang, B., Qu, H., Zhao, W., Duan, L., Zhang, Y., Zhou, Y., Yu, G., 2020. The influence of nanoplastics on the toxic effects, bioaccumulation, biodegradation and enantioselectivity of ibuprofen in freshwater algae *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Pollution* 263, 114593. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114593>
- Wang, J.-L., Alasonati, E., Tharaud, M., Gelabert, A., Fisicaro, P., Benedetti, M.F., 2020. Flow and fate of silver nanoparticles in small French catchments under different land-uses: The first one-year study. *Water Res* 176, 115722. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115722>
- Wang, Y., Zhu, X., Lao, Y., Lv, X., Tao, Y., Huang, B., Wang, J., Zhou, J., Cai, Z., 2016. TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the marine environment: Physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricornutum*. *Science of The Total Environment* 565, 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.164>
- Xiu, Z., Zhang, Q., Puppala, H.L., Colvin, V.L., Alvarez, P.J.J., 2012. Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Nano Letters* 12, 4271–4275. <https://doi.org/10.1021/nl301934w>
- Yakasai, F., Jaafar, M.Z., Bandyopadhyay, S., Agi, A., 2021. Current developments and future outlook in nanofluid flooding: A comprehensive review of various parameters influencing oil recovery mechanisms. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 93, 138–162. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.10.017>
- Yang, L., Yan, W., Wang, H., Zhuang, H., Zhang, J., 2017. Shell thickness-dependent antibacterial activity and biocompatibility of gold@silver core-shell nanoparticles. *RSC Adv* 7, 11355–11361. <https://doi.org/10.1039/C7RA00485K>
- Zhou, D., Abdel-Fattah, A.I., Keller, A.A., 2012. Clay Particles Destabilize Engineered Nanoparticles in Aqueous Environments. *Environmental Science & Technology* 46, 7520–7526. <https://doi.org/10.1021/es3004427>



## APPENDICE

### Calcolo dell'indice di stabilità globale

L'indice è stato calcolato in accordo con la funzione logistica generale (a forma di S), semplificata ed adattata tra 0 e 1 per i valori ottenuti tramite ELS (Eq. 1).

$$Y(x) = \frac{2}{1 + e^{-Bx}} - 1 \quad (\text{Eq. 1})$$

Tale funzione è stata ulteriormente modificata per rappresentare il fatto che all'aumentare dei valori di CSA e DLS, diminuisce il valore dell'indice corrispettivo (Eq. 2).

$$Y(x) = 1 - \left( \frac{2}{1 + e^{-Bx}} - 1 \right) = 2 - \frac{2}{1 + e^{-Bx}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Per stimare il fattore di crescita  $B$ , calcolato sia per il limite superiore (UL) che inferiore (LL) dei punti di transizione si è posto i)  $x$  uguale a  $20 \pm 5$  mV per il potenziale zeta,  $1000 \pm 200$  nm per il diametro idrodinamico e  $1.5 \pm 0.2 \mu\text{m s}^{-1}$  per la velocità di sedimentazione e ii)  $Y(x)$  uguale a 0.1 per la velocità di sedimentazione, 0.3 per il diametro idrodinamico e 0.9 per il potenziale zeta. Tale procedura è stata applicata per ciascun indice ( $I_{CSA}$ ,  $I_{DLS}$ ,  $I_{ELS}$ ). A questo punto gli indici di ciascuna tecnica ( $I_{CSA}$ ,  $I_{DLS}$ ,  $I_{ELS}$ ) sono stati calcolati come media tra i valori corrispondenti ai valori dei limiti superiori ed inferiori in accordo con le equazioni (Eq. 3, Eq. 4, Eq. 5) descritte in Badetti et al., (2021)<sup>b</sup>.

$$I_{CSA}(x) = \text{avg}(I_{CSA}^{LL}, I_{CSA}^{UL}) = \text{avg} \left( 2 - \frac{2}{1 + e^{-2.265x}}, 2 - \frac{2}{1 + e^{-1.732x}} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

$$I_{DLS}(x) = \text{avg}(I_{DLS}^{LL}, I_{DLS}^{UL}) = \text{avg} \left( 2 - \frac{2}{1 + e^{-0.00217x}}, 2 - \frac{2}{1 + e^{-0.00145x}} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

$$I_{ELS}(x) = \text{avg}(I_{ELS}^{LL}, I_{ELS}^{UL}) = \text{avg} \left( \frac{2}{1 + e^{-0.118|x|}} - 1, \frac{2}{1 + e^{-0.196|x|}} - 1 \right) \quad (\text{Eq. 5})$$

Le curve relative sono riportate in Figura A1.

<sup>b</sup> Badetti, E., Brunelli, A., Basei, G., Gallego-Urrea, J.A., Stoll, S., Walch, H., Praetorius, A., Kammer, F. von der, Marcomini, A., 2021. Novel multimethod approach for the determination of the colloidal stability of nanomaterials in complex environmental mixtures using a global stability index: TiO<sub>2</sub> as case study. Science of The Total Environment 801, 149607. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149607>

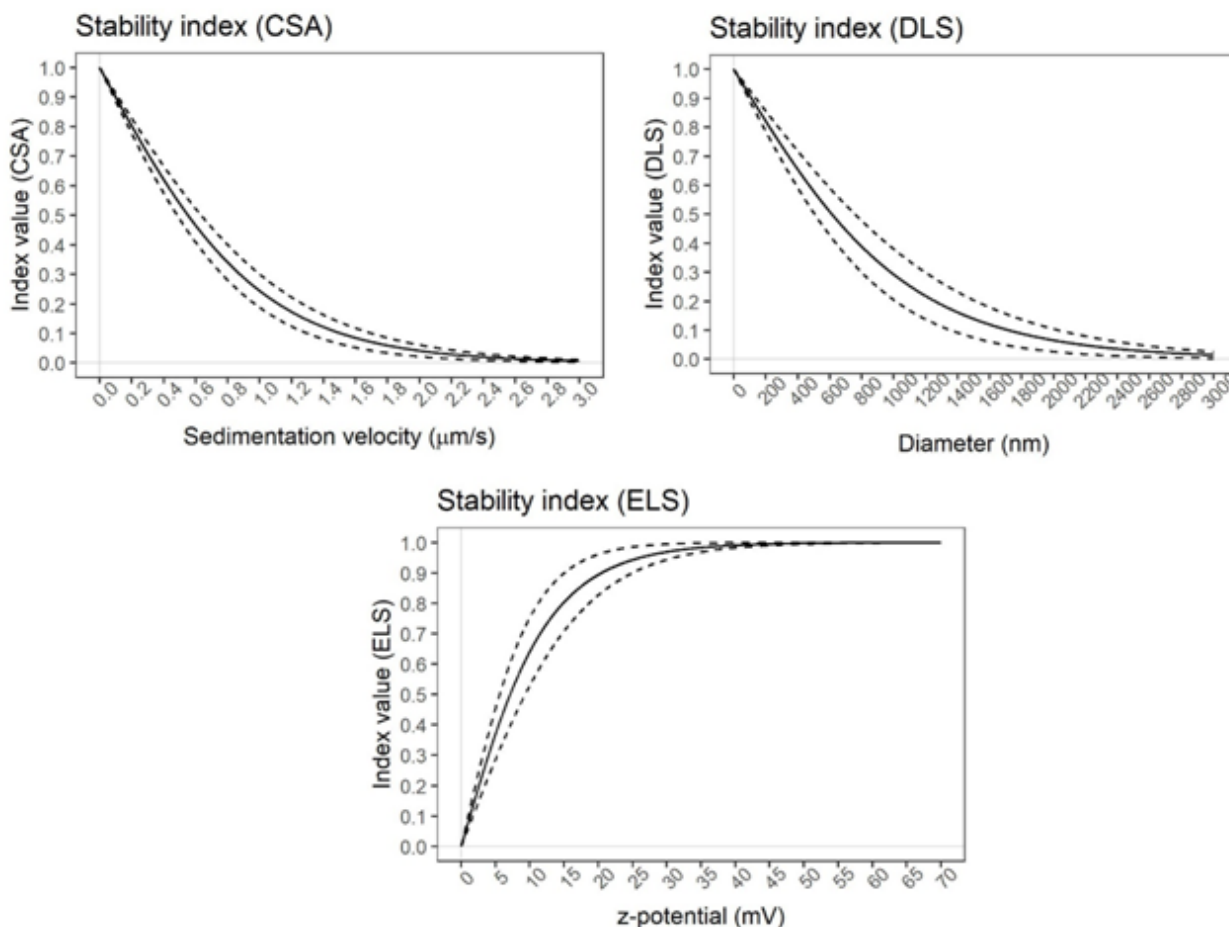


Figura A1 – Funzioni logistiche utilizzate per calcolare l'indice di stabilità (le linee continue corrispondono agli indici calcolati come media mentre le linee tratteggiate corrispondono ai limiti superiori ed inferiori).

È stato infine calcolato l'indice di stabilità globale ( $I_G$ ) definito come media dei tre indici associati a ciascuna tecnica (Eq. 6).

$$I_G = avg(I_{ELS}, I_{DLS}, I_{CSA}) \quad (\text{Eq. 6})$$

È stata determinata anche l'incertezza relativa ai valori ottenuti tramite una singola tecnica come differenza tra il limite superiore ed inferiore dell'indice diviso due e l'incertezza associata all'indice di stabilità globale, calcolata come la media delle incertezze relative ai valori derivanti dalle tre tecniche analitiche. Si riporta qui di seguito un esempio del calcolo dell'incertezza:

1) Incertezza Limite Superiore  $ULS_{CSA}$  per il valore di  $\text{SiO}_2$  in DW ottenuta attraverso la tecnica CSA:

$$ULS_{CSA} = 2 - \left( \frac{2}{1 + e^{-1.732(0.48-0.06)}} \right) \quad (\text{Eq. 7})$$

2) Incertezza Limite Inferiore  $ULI_{CSA}$ :

$$ULI_{CSA} = 2 - \left( \frac{2}{1 + e^{-2.265(0.48+0.06)}} \right) \quad (\text{Eq. 8})$$

3) Incertezza associata alla tecnica  $U_{CSA}$ :

$$U_{CSA} = \left( \frac{ULS_{CSA} - ULI_{CSA}}{2} \right) \quad (\text{Eq. 9})$$

Infine l'incertezza globale ( $U_G$ ) è stata calcolata come segue:

$$U_G = \left( \frac{U_{G_{CSA}} + U_{G_{DLS}} + U_{G_{ELS}}}{3} \right) \quad (\text{Eq. 10})$$

Valori dell'indice di stabilitàTabella A1 – Valori degli indici di stabilità relativa per ogni tecnica ed indice di stabilità globale  $I_G$  con la relativa incertezza.

Campione	Mezzo	$I_{CSA}$	Inc.	$I_{DLS}$	Inc.	$I_{ELS}$	Inc.	$I_G$	Inc.
SiO <sub>2</sub> @ZnO	DW	0.15	0.02	0.05	0.03	0.15	0	0.52	0.06
ZnO	DW	0.16	0.03	0.12	0.05	0.16	0.03	0.58	0.10
SiO <sub>2</sub>	DW	0.19	0.03	0.03	0.03	0.19	0.03	0.51	0.09
SiO <sub>2</sub> @ZnO	M7	0.14	0.04	0.06	0.04	0.30	0.02	0.51	0.11
ZnO	M7	0.11	0.03	0.06	0.04	0.25	0.05	0.41	0.12
SiO <sub>2</sub>	M7	0.14	0.03	0.04	0.03	0.30	0.03	0.48	0.09
SiO <sub>2</sub> @ZnO	AFW	0.14	0.03	0.06	0.04	0.29	0.03	0.50	0.10
ZnO	AFW	0.11	0.03	0.05	0.04	0.04	0.01	0.20	0.08
SiO <sub>2</sub>	AFW	0.18	0.03	0.24	0.03	0.30	0.03	0.71	0.09
SiO <sub>2</sub> @ZnO	AMW	0.22	0.03	0.03	0.03	0.02	0.01	0.26	0.07
ZnO	AMW	0.13	0.02	0.13	0.02	0.01	0.01	0.28	0.08
SiO <sub>2</sub>	AMW	0.09	0.03	0.02	0.03	0	0.02	0.11	0.07
Campione	Mezzo	$I_{CSA}$	Inc.	$I_{DLS}$	Inc.	$I_{ELS}$	Inc.	$I_G$	Inc.
SiO <sub>2</sub> @ZnO	RPMI t0	0.24	0.01	0.02	0.02	0.12	0.04	0.38	0.07
	RPMI t1	0.25	0.01	0.02	0.02	0.05	0.03	0.31	0.06
	RPMI t3	0.26	0.01	0.02	0.02	0.04	0.02	0.32	0.06
	RPMI t24	0.25	0.01	0.09	0.05	0.13	0.04	0.46	0.10
ZnO	RPMI t0	0.19	0.02	0.16	0.05	0.07	0.04	0.42	0.11
	RPMI t1	0.21	0.02	0.12	0.05	0.15	0.04	0.48	0.12
	RPMI t3	0.19	0.02	0.10	0.04	0.06	0.05	0.33	0.12
	RPMI t24	0.13	0.07	0.06	0.04	0.04	0.03	0.23	0.14
SiO <sub>2</sub>	RPMI t0	0.18	0.03	0.07	0.05	0.03	0.03	0.29	0.11
	RPMI t1	0.22	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.25	0.06
	RPMI t3	0.23	0.02	0.04	0.04	0.1	0.05	0.37	0.11
	RPMI t24	0.25	0.04	0.1	0.05	0.1	0.04	0.49	0.12
SiO <sub>2</sub> @ZnO	RPMI (FBS_ps)_t0	0.16	0.03	0.08	0.05	0.04	0.03	0.29	0.10
	RPMI (FBS_ps)_t1	0.17	0.03	0.04	0.03	0.12	0.04	0.33	0.10
	RPMI (FBS_ps)_t3	0.18	0.03	0.10	0.05	0.13	0.04	0.40	0.12
	RPMI (FBS_ps)_t24	0.16	0.03	0.03	0.03	0.24	0.05	0.43	0.11
ZnO	RPMI (FBS_ps)_t0	0.21	0.02	0.15	0.05	0.13	0.06	0.49	0.13
	RPMI (FBS_ps)_t1	0.18	0.03	0.14	0.05	0.12	0.04	0.43	0.12
	RPMI (FBS_ps)_t3	0.19	0.03	0.16	0.05	0.08	0.04	0.43	0.11
	RPMI (FBS_ps)_t24	0.21	0.02	0.03	0.03	0.09	0.03	0.33	0.08
SiO <sub>2</sub>	RPMI (FBS_ps)_t0	0.21	0.03	0.052	0.04	0.13	0.04	0.36	0.11
	RPMI (FBS_ps)_t1	0.19	0.04	0.052	0.04	0.12	0.04	0.37	0.12
	RPMI (FBS_ps)_t3	0.16	0.03	0.068	0.05	0.18	0.05	0.40	0.13
	RPMI (FBS_ps)_t24	0.20	0.02	0.031	0.03	0.11	0.04	0.34	0.01



### Risultati derivanti dalla caratterizzazione colloidale dei mezzi ambientali

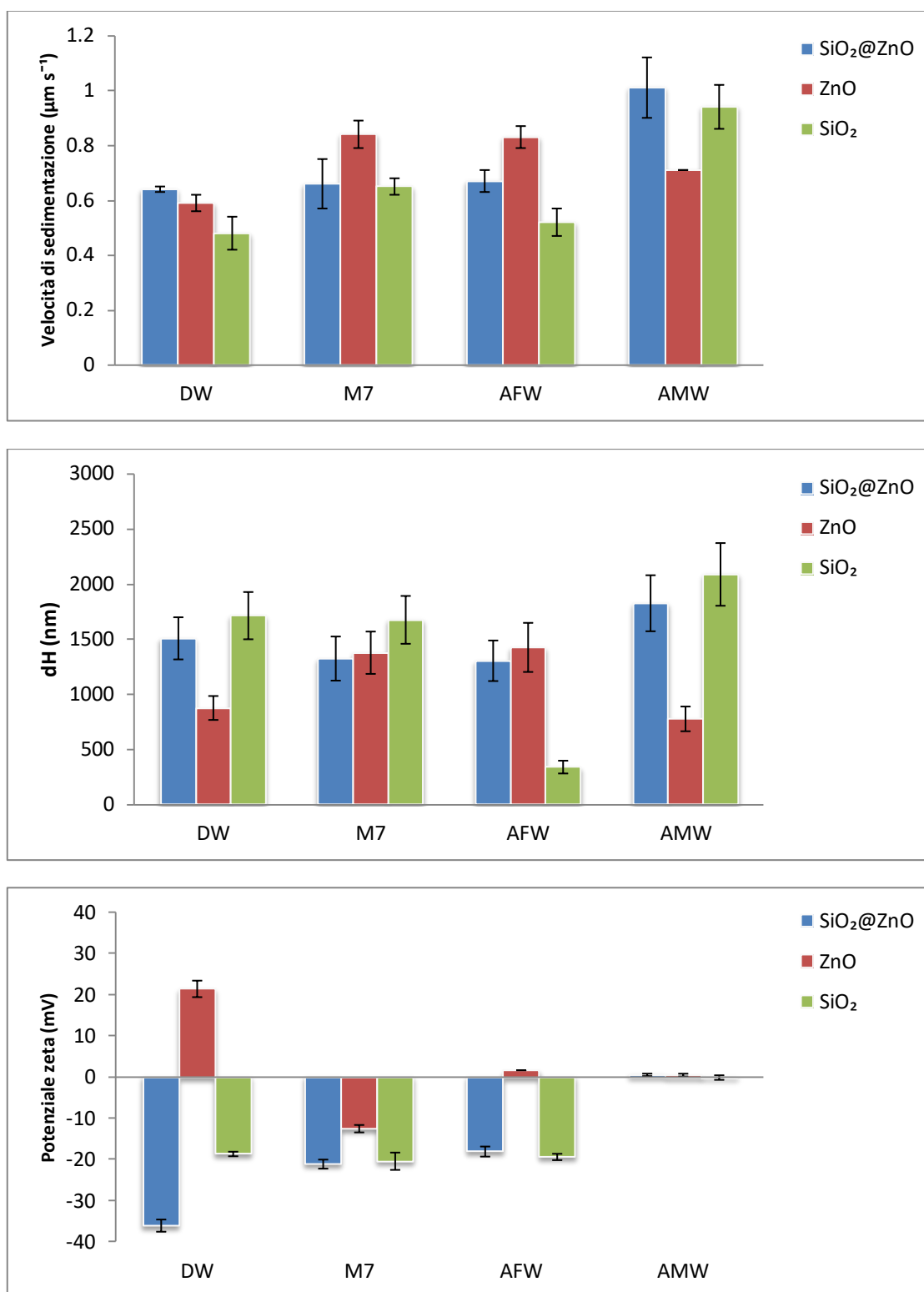


Figura A2 – Velocità di sedimentazione, diametro idrodinamico e potenziale zeta per i mezzi ambientali.

### Risultati derivanti dalla caratterizzazione colloidale dei mezzi biologici

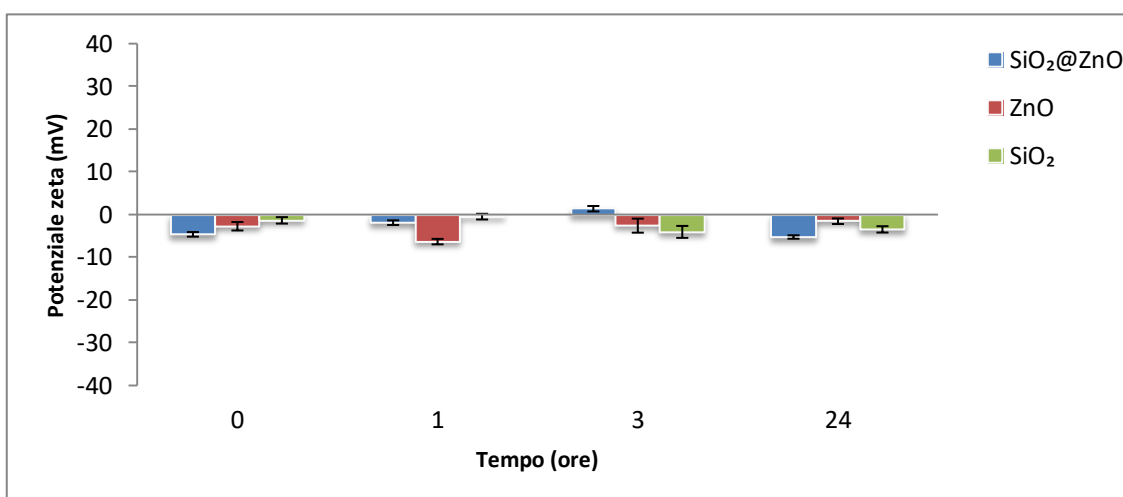
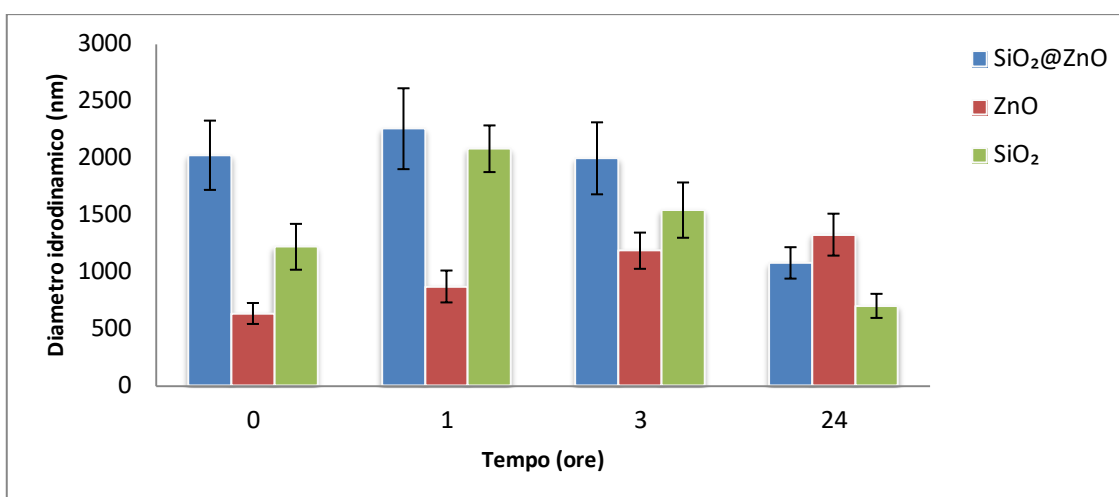
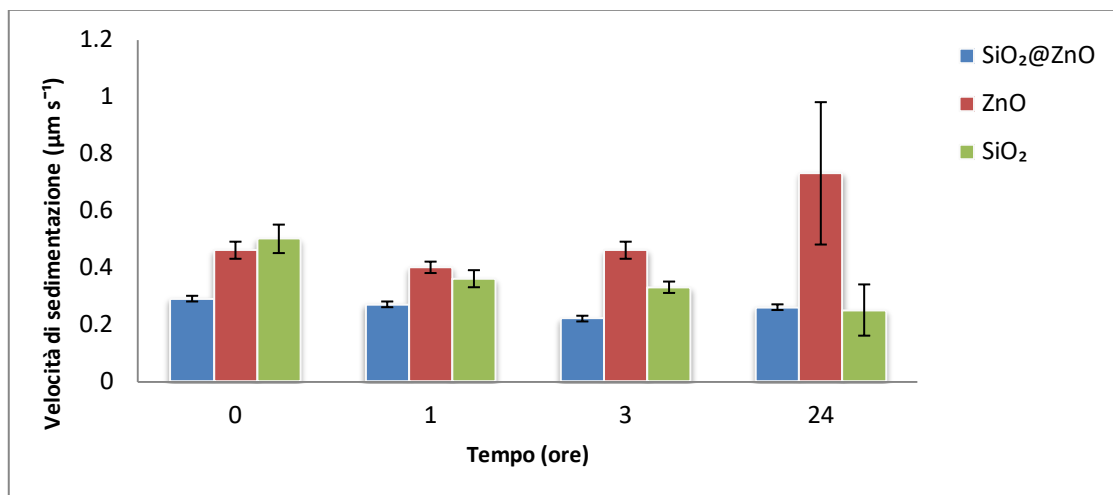


Figura A3 - Velocità di sedimentazione, diametro idrodinamico e potenziale zeta in RPMI.

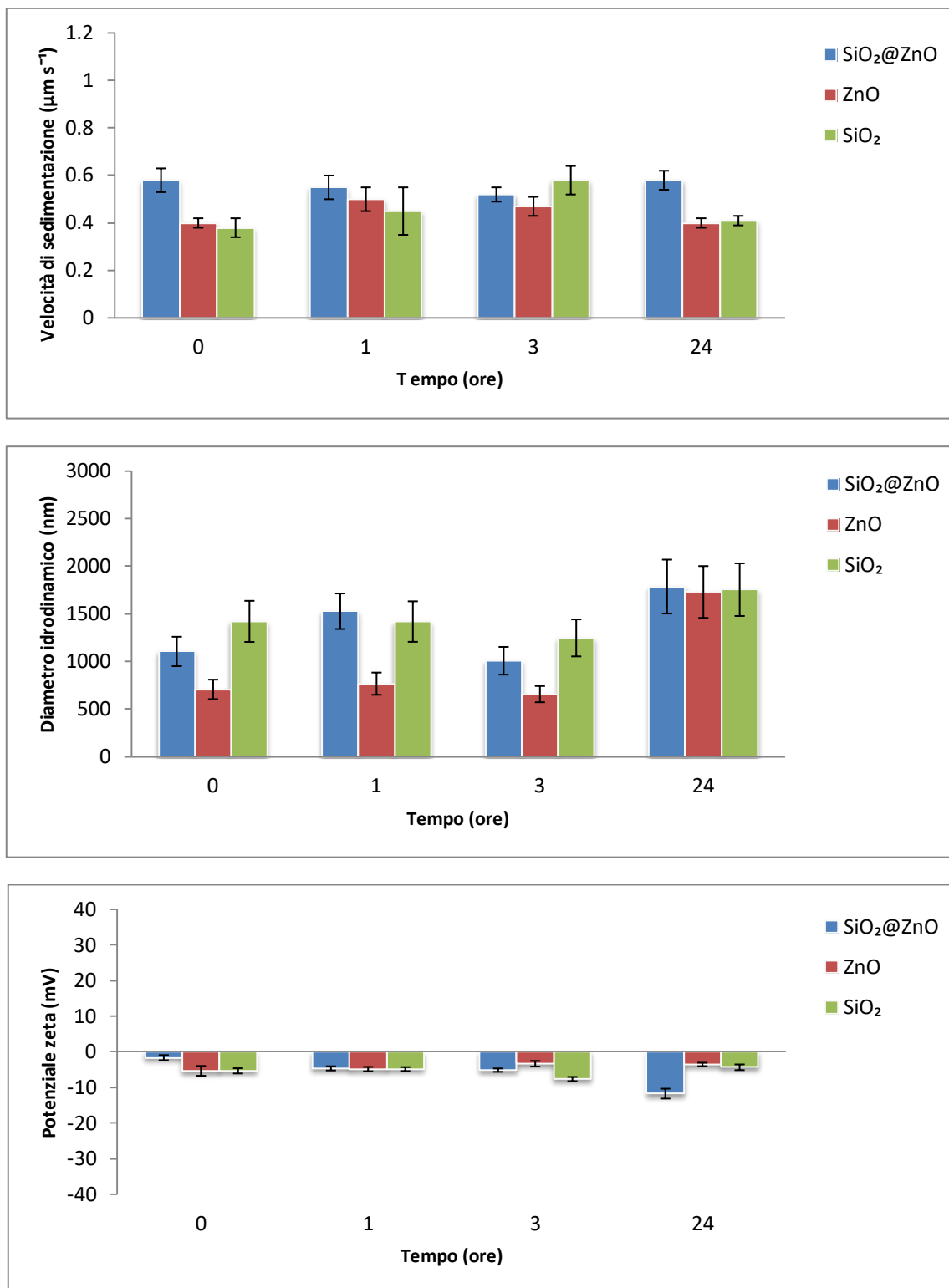


Figura A4 - Velocità di sedimentazione, diametro idrodinamico e potenziale zeta in RPMI(FBS\_ps).

**Spettri FT-IR**

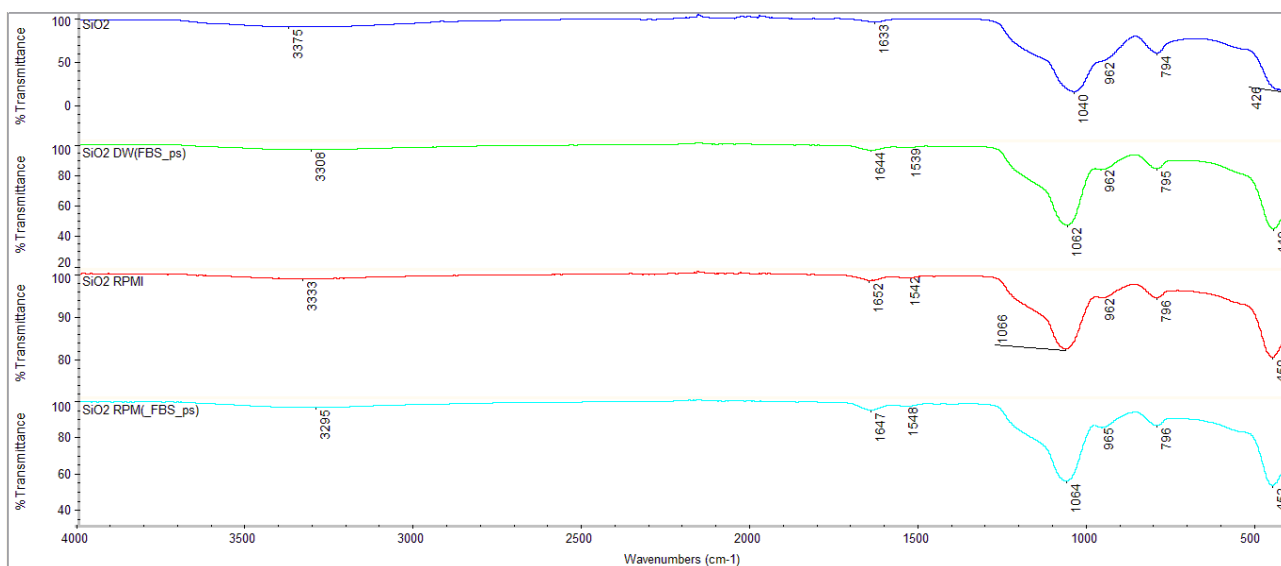
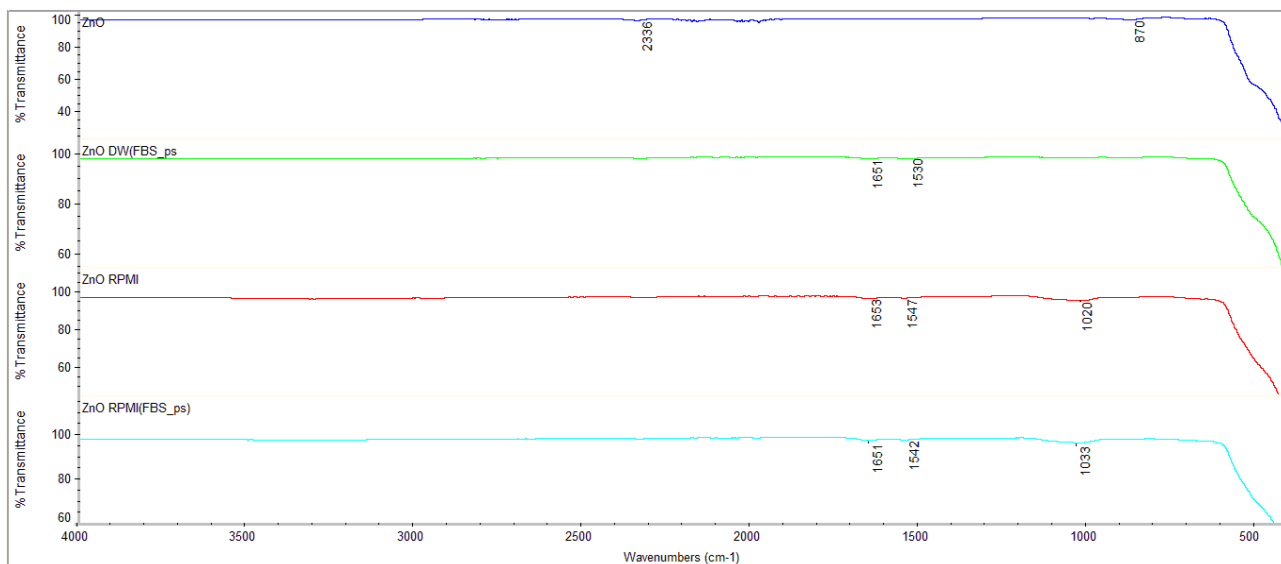
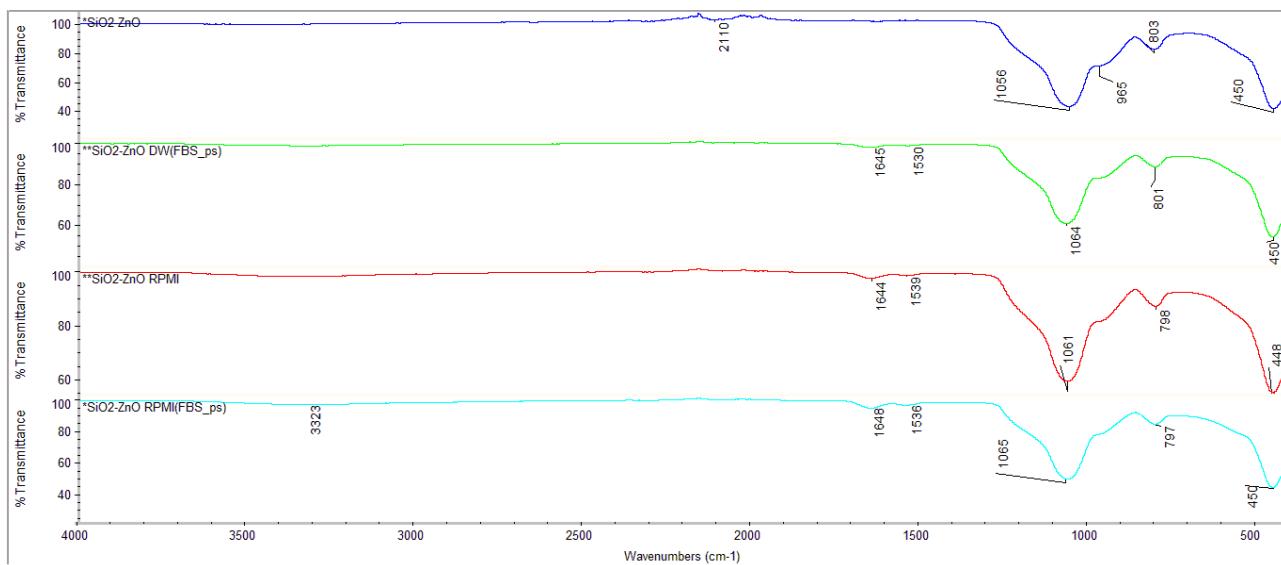


Figura A5 – Spettri IR per SiO<sub>2</sub>@ZnO, ZnO e SiO<sub>2</sub>.

Risultati derivanti dalla dissoluzione dello Zn(II)

Tabella A2 – Valori di dissoluzione dello Zn (II).

Campione	Mezzo	Tempo (ore)	Dissoluzione (%)
SiO <sub>2</sub> @ZnO	DW	0	14.0 ± 0
	DW	1	18.4 ± 0.1
	DW	3	17.3 ± 0.1
	DW	24	20.2 ± 0
ZnO	DW	0	5.4 ± 0.3
	DW	1	6.5 ± 0
	DW	3	6.9 ± 0.1
	DW	24	8.8 ± 0.5
SiO <sub>2</sub> @ZnO	M7	0	7.2 ± 0
	M7	1	6.1 ± 0.1
	M7	3	7.0 ± 0.1
	M7	24	9.9 ± 0
ZnO	M7	0	3.2 ± 0
	M7	1	2.4 ± 0
	M7	3	3.3 ± 0.7
	M7	24	3.5 ± 0.1
SiO <sub>2</sub> @ZnO	RPMI	0	9.2 ± 0
	RPMI	1	11.2 ± 0
	RPMI	3	14.2 ± 0.3
	RPMI	24	16.1 ± 0.1
ZnO	RPMI	0	5.4 ± 1
	RPMI	1	3.9 ± 0.4
	RPMI	3	2.8 ± 0.1
	RPMI	24	3.2 ± 0
SiO <sub>2</sub> @ZnO	RPMI(FBS_ps)	0	10.8 ± 0.1
	RPMI(FBS_ps)	1	13.4 ± 0.1
	RPMI(FBS_ps)	3	19.7 ± 0.1
	RPMI(FBS_ps)	24	18.1 ± 0.1
ZnO	RPMI(FBS_ps)	0	7.4 ± 0.3
	RPMI(FBS_ps)	1	9.9 ± 0.2
	RPMI(FBS_ps)	3	7.8 ± 0.1
	RPMI(FBS_ps)	24	8.7 ± 0.1