

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

Idrogel nanocompositi biocompatibili a base di nanotubi di
carbonio per applicazioni biomediche

Relatore: Prof. Enzo Menna

Controrelatore: Prof. Carla Marega

LAUREANDO: Velasquez Edoardo

ANNO ACCADEMICO 2021/22

Contenuti

Abbreviazioni	III
Abstract	V
Riassunto	VII
1. Introduzione	1
1.1 Materiali nanocompositi	1
1.2 Medicina rigenerativa ed Ingegneria dei tessuti	2
1.3 Idrogel	6
1.4 Alginato	7
1.5 Idrogel peptidici.....	10
1.6 Peptidi corti auto-assemblanti	11
1.7 Reologia.....	13
1.7 Sintesi peptidica in fase solida (SPPS)	14
1.8 Nanostrutture di carbonio	18
1.9 Nanotubi di carbonio	18
1.10 Reattività delle nanostrutture di carbonio	20
1.11 Reazione di Tour	21
1.12 Grado di funzionalizzazione	22
2. Risultati e discussione	25
2.1 Funzionalizzazione di nanotubi	25
2.1.1 NT-S: nanotubi funzionalizzati a carica negativa	27
2.1.2 NT-P: nanotubi funzionalizzati a carica positiva	31
2.1.3 NT-N: nanotubi a funzionalizzazione neutra	33
2.2 Purificazione termica	36
2.2.1 Esperimenti di controllo	36
2.2.2 Purificazione derivati a carica negativa	41
2.3 Idrogel nanocompositi di alginato	44
2.3.1 Alginato a bassa viscosità (LV) e ad alta viscosità (HV)	45
2.3.2 Prove reologiche	47
2.4 Idrogel di peptidi	49
2.4.1 Progettazione razionale della sequenza peptidica	49
2.4.2 Sintesi e caratterizzazione di AcO-Ala-Lys-Phe-Lys-Ala-NH ₂ (P1).....	51
2.4.3 Sintesi e caratterizzazione di HO-Trp-Lys-Trp-Glu-Lys-H (P2)	54

2.4.4 Prove di gelificazione peptide AcO-AKFKA-NH ₂	57
2.4.5. Prove gelificazione peptide HO-WKWEW-H.....	59
2.5 Prove cellulari	71
2.5.1 Prove cellulari utilizzando Idrogel di Alginato	72
2.5.3 Prove cellulari su idrogel di peptidi	74
Conclusioni.....	76
3. Parte sperimentale	78
3.1 Reagenti	78
3.2 Strumentazione.....	79
3.3 Funzionalizzazione nanotubi di carbonio	81
3.3.1 Sintesi di NT-S1: funzionalizzazione con acido solfanilico.....	81
3.3.2 Sintesi di NT-S2: Funzionalizzazione con acido solfanilico	82
3.3.4 Sintesi di NT-S3: funzionalizzazione con acido solfanilico, 0.5 equivalenti.....	84
3.3.5 Sintesi NT-P: funzionalizzazione nanotubi con 4-ammino-N,N,N-trimetilanilinio ioduro.....	85
3.3.6 NT-N1 funzionalizzazione di nanotubi con 4-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etossi) anilina.....	86
3.4 Sintesi peptidiche	87
3.4.1 Sintesi AcO-AKFKA-NH ₂	89
3.4.2 Sintesi H-WKWEW-OH	90
3.5 Prove su alginato	92
3.5.1 Idrogel di alginato senza fCNTs.....	92
3.5.2 Idrogel di alginato + fCNTs	92
3.6 Idrogel di peptidi	93
3.6.1 Metodo 1.....	93
3.6.2 Metodo 2.....	93
Bibliografia.....	96

Abbreviazioni

CNTs: Nanotubi di carbonio

SWCNTs: Nanotubi di carbonio a singola parete

MWCNTs: Nanotubi di carbonio a parete multipla

f-CNTs: Nanotubi di carbonio funzionalizzati

f-MWCNTs: Nanotubi di carbonio a parete multipla funzionalizzati

CVD: Deposizione chimica da vapore

CHP: 1-cicloesil-2-pirrolidone

DMF: N,N-dimetilformammide

GdL: Acido D-(+)-gluconico δ -lattone

ECM: matrice extracellulare

PLLA: acido poli-L-lattico

NMR: Risonanza magnetica nucleare

ESI-MS: Spettroscopia di massa a ionizzazione elettrospray

TGA: Analisi termogravimetrica

FD: grado di funzionalizzazione

DLS: dynamic light scattering

UV-Vis-NIR: spettroscopia ultravioletta-visibile-vicino infrarosso

TEM: microscopia elettronica a trasmissione

PVA: alcool polivinilico

M: Acido β -D-mannuronico

G: Acido α -L-guluronico

AA Amminoacido

2-CTC: 2-clorotritil cloruro

ACN: Acetonitrile

Ala: Alanina

Boc: Terz-butilossicarbonile

DCM: Diclorometano

DIPEA: Diisopropiletilenammina

DMSO-d₆: Dimetilsolfossido deuterato

Fmoc: 9-fluorenilmetilossicarbonile

Glu: Acido glutammico

HBTU: (O-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio

esafluorofosfato

HOBt :1-idrossibenzotriazolo

Lys: Lisina

Phe: Fenilalanina

PBS: tampone fosfato salino

SPPS: Sintesi peptidica in fase solida

tBu: Terz-butile

TFA: Acido trifluoroacetico

TIS: Triisopropilsilano

Trp: Tryptofano

Abstract

The thesis project aims to deepen preliminary studies on the possibility of functionalizing carbon nanostructures, and in particular nanotubes (CNT), to obtain three-dimensional scaffolds with promising characteristics for regenerative medicine and tissue engineering. For this purpose, three different carbon nanotube derivatives were tested, decorated with different functional groups that prevent aggregation in water. We intend to prepare scaffolds with different mechanical and porosity characteristics using as matrix hydrogels obtained with known commercial gelling agents, such as alginate, or specifically synthesized peptides. In the case of alginate, efforts were made to improve cell adhesion to a basically refractory system, both through the introduction of functionalized nanotubes and through the use of generic cell adhesion factors. The same attempts have been made using hydrogels obtained from self-assembling short peptides, known for their biomimetic properties and for a better propensity for cell adhesion. These peptides have been designed so that they can interact with the nanotubes through weak interactions, incorporating them in the gelling process. The functionalized CNTs will be dispersed in the matrices as nanofillers to modify their physical properties (mechanical, electrical, etc.) and to modulate the interactions with cells. Organic residues that allow specific interactions with the matrix and/or cells, such as positively or negatively charged functional groups, or able to form hydrogen bonds, have been introduced on the CNTs. The work consists in the synthesis of water-soluble CNT derivatives for the preparation of alginate hydrogels and peptide hydrogels in which the CNTs are homogeneously dispersed. The obtained materials have been studied from the rheological point of view. Furthermore, biocompatibility and eventually cell growth studies have been performed in collaboration with a research group of the Department of Biology.

Riassunto

Il progetto di tesi si propone di approfondire studi preliminari sulla possibilità di funzionalizzare nanostrutture di carbonio, ed in particolare nanotubi (CNT), per ottenere scaffold tridimensionali con caratteristiche promettenti per la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale. A tale scopo sono stati testati tre diversi derivati di nanotubi di carbonio, decorati con diversi gruppi funzionali che impediscono l'aggregazione in acqua. Si intende preparare scaffold con diverse caratteristiche meccaniche e di porosità utilizzando come matrice idrogeli ottenuti con noti agenti gelificanti commerciali, come l'alginato, o peptidi appositamente sintetizzati. Nel caso dell'alginato si è cercato di migliorare l'adesione cellulare ad un sistema sostanzialmente refrattario, sia attraverso l'introduzione di nanotubi funzionalizzati sia attraverso l'utilizzo di fattori di adesione cellulare generici. Gli stessi tentativi sono stati fatti utilizzando idrogel ottenuti da peptidi corti autoassemblanti, noti per le loro proprietà biomimetiche e per una migliore propensione all'adesione cellulare. Questi peptidi sono stati progettati in modo da poter interagire con i nanotubi attraverso interazioni deboli, incorporandoli nel processo di gelificazione. I CNT funzionalizzati saranno dispersi nelle matrici come nanoriempitivi per modificarne le proprietà fisiche (meccaniche, elettriche, ecc.) e per modulare le interazioni con le cellule. Sui CNT sono stati introdotti residui organici che consentono specifiche interazioni con la matrice e/o le cellule, come gruppi funzionali caricati positivamente o negativamente, o in grado di formare legami idrogeno. Il lavoro consiste nella sintesi di derivati CNT solubili in acqua per la preparazione di idrogel alginati e idrogel peptidici in cui i CNT sono omogeneamente dispersi. I materiali ottenuti sono stati studiati dal punto di vista reologico. Inoltre, studi di biocompatibilità ed eventualmente di crescita cellulare sono stati condotti in collaborazione con un gruppo di ricerca del Dipartimento di Biologia.

1. Introduzione

1.1 Materiali nanocompositi

Nella chimica dei materiali è nota da tempo l'importanza e la versatilità dei materiali compositi. Essi sono caratterizzati da almeno due fasi distinte: una matrice che fornisce la struttura e uno o più materiali che fungono da riempitivi. Il loro punto di forza risiede nel fatto che le proprietà del prodotto finale risultano notevolmente migliorate rispetto a quelle delle sostanze che lo compongono, quando prese da sole. In particolare, i miglioramenti riguardano le proprietà fisiche del materiale. Vengono definiti nanocompositi i materiali i cui riempitivi hanno dimensioni nanometriche ($<100\text{ nm}$).¹ L'utilizzo di nanoriempitivi permette di superare un problema molto comune nei materiali compositi, ossia il grande ingombro dei riempitivi che devono essere usati in concentrazioni moderate per non causare troppo stress strutturale. I requisiti principali per ottenere miglioramenti sono riempitivi di piccole dimensioni e una loro buona dispersione all'interno del materiale.²

Le nanostrutture di carbonio più utilizzate a tale scopo sono grafene, fullerene e nanotubi. Questa categoria di materiali combina leggerezza a grande resistenza.³ Questo è dovuto a proprietà reologiche e meccaniche come il modulo di Young e la resistenza alla trazione dai valori notevolmente alti.⁴ Oltre a questi, sono anche in grado di fornire migliori proprietà elettriche e termiche.⁵

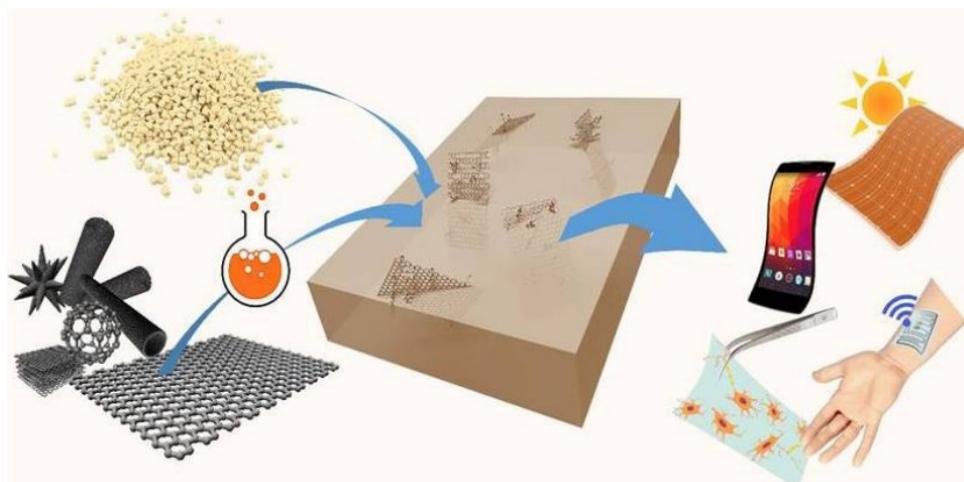


Figura 1: funzionalizzazione organica di nanostrutture di carbonio per lo sviluppo di materiali intelligenti a base polimerica.⁶

I campi di applicazione dei nanocompositi vanno dal fotovoltaico allo sviluppo e ingegnerizzazione di sensori, fino all'ambito che riguarda da vicino questo lavoro di Tesi, ossia la medicina rigenerativa.

1.2 Medicina rigenerativa ed Ingegneria dei tessuti

La medicina rigenerativa ha come scopo la riparazione, rigenerazione o la sostituzione di organi o tessuti danneggiati da malattie, traumi o qualsiasi altra causa.

Essa utilizza competenze di natura biologica, chimica, ingegneristica ed informatica come nuovo approccio per la cura di molte malattie per le quali la medicina tradizionale non è risultata adeguata.⁷ A seconda del campo di applicazione si possono distinguere diversi rami: (i) ingegneria dei tessuti, (ii) terapia cellulare (iii) dispositivi medici (iiii) organi artificiali.

Dei diversi campi di applicazione per la medicina rigenerativa, quello di interesse per questa Tesi riguarda l'ingegneria dei tessuti (TE), il cui scopo è quello di riparare tessuti e organi danneggiati, un obiettivo che la medicina tradizionale non era mai riuscita a raggiungere, almeno non con buoni risultati. La TE è una disciplina emergente nella biomedicina, molto recente, il cui scopo è quello di introdurre nuovi approcci nell'ambito di queste terapie, che possono essere divisi in due categorie generali: scaffold-free e scaffold-based.

La prima, si basa sulle capacità auto-assemblanti di componenti biologiche come fogli cellulari, sferoidi o filamenti di tessuto. I principali vantaggi di questo approccio risiedono nella velocità delle operazioni e nella migliore mimica della struttura di tessuti e organi.⁸ Tuttavia, ci sono una serie di preoccupazioni relative a questo metodo, legate alla facilità di contaminazione da parte di agenti infetti e ad una potenziale immunogenicità, oltre all'incapacità di specificare completamente il componente bioattivo del materiale.⁹

Il secondo approccio, che sta trovando maggiore interesse, è basato sull'uso di scaffold, ossia di strutture tridimensionali ingegnerizzate per essere chimicamente e biologicamente adatte ad ospitare le cellule durante il processo di crescita e sviluppo. Questo approccio deve molti dei suoi vantaggi alla possibilità di progettare un biomateriale con proprietà modulabili in modo da poter adattare le sue caratteristiche

allo specifico tessuto che si sta operando. Inoltre queste strutture, nelle prove in vivo, dovranno essere lentamente degradate e metabolizzate, quindi devono essere progettate in modo che svolgano la loro funzione, utilizzando materiali biodegradabili oltre che biocompatibili.^{10,11}

Gli scaffold per questi utilizzi in genere devono avere un grande rapporto superficie/volume, a cui consegue anche una certa porosità del materiale. Queste caratteristiche sono molto importanti per l'adesione e la crescita cellulare, permettendo l'introduzione di fattori specifici o di farmaci, oltre a tutti i processi vitali delle cellule come la respirazione e l'eliminazione degli scarti.^{12,13}

Oltre a questo, uno scaffold di questo tipo può essere ingegnerizzato anche in modo che simuli al meglio tutti gli stimoli che le cellule ricevono durante la loro crescita, e che sono i principali responsabili della differenziazione cellulare. La componente su cui, grazie all'approccio scaffold-based, si riesce ad avere un ottimo controllo è quella delle proprietà meccaniche, per cui è possibile progettare scaffold che simulino le caratteristiche di ogni tipo di tessuto, utilizzando materiali di partenza appropriati.

Per riuscire nell'obiettivo, dunque, è necessaria la creazione di matrici che simulino le caratteristiche dei tessuti del corpo umano, in modo da poter ospitare cellule totalmente o parzialmente indifferenziate che possano crescere e proliferare, andando a ricostituire il tessuto danneggiato. La TE segue alcuni principi chiave, che bisogna sempre tenere presente durante la progettazione di materiali compositi o nanocompositi per uso biomedico. Come prima cosa è necessario considerare le necessità biologiche per la rigenerazione di un tessuto:

- i.* Serve una matrice che faccia da supporto: nel corpo umano questa componente è rappresentata dalla matrice extracellulare (ECM).
- ii.* Bisogna utilizzare cellule adeguate al tessuto che si vuole riparare.
- iii.* Il corpo umano utilizza fattori di crescita cellulare per velocizzare i processi biologici

È anche necessario che questi elementi di base si trovino in grado di interagire nella maniera più simile possibile a come avviene nei sistemi biologici, ponendo non poche restrizioni al tipo di matrice che può essere utilizzata.¹⁴

La matrice deve quindi possedere le caratteristiche fisiche necessarie per favorire la crescita cellulare, oltre che per l'adesione, che risulta il requisito basilare. Queste caratteristiche sono strettamente correlate alla porosità del materiale. Pori troppo grandi non garantirebbero l'adesione delle cellule mentre pori troppo piccoli non permetterebbero lo scambio di nutrienti, di scarti e di gas, necessari per la crescita della cellula, oltre a limitarne lo sviluppo semplicemente per questioni dimensionali.¹⁵ Un'ultima, ma non meno importante, condizione necessaria da rispettare nella progettazione di questi materiali è la biomimetica, ossia l'imitazione delle caratteristiche del sistema in vivo. Questo perché le cellule, soprattutto quelle indifferenziate, sono molto sensibili all'ambiente in cui si trovano e la loro crescita vede negli stimoli che ricevono dall'ambiente circostante un fattore chiave. Per questo è necessario ottenere matrici con caratteristiche chimiche e reologiche più simili possibile a quelle della ECM del tessuto da riparare.¹⁶ Il nostro gruppo di ricerca, in collaborazione con il laboratorio del professor Francesco Filippini del Dipartimento di Biologia, si è da qualche tempo posto l'obiettivo di ottenere matrici innovative per la riparazione del sistema nervoso danneggiato. La progettazione di scaffold per questo specifico tessuto richiede particolare attenzione su alcuni aspetti, riassunti in Figura 2.

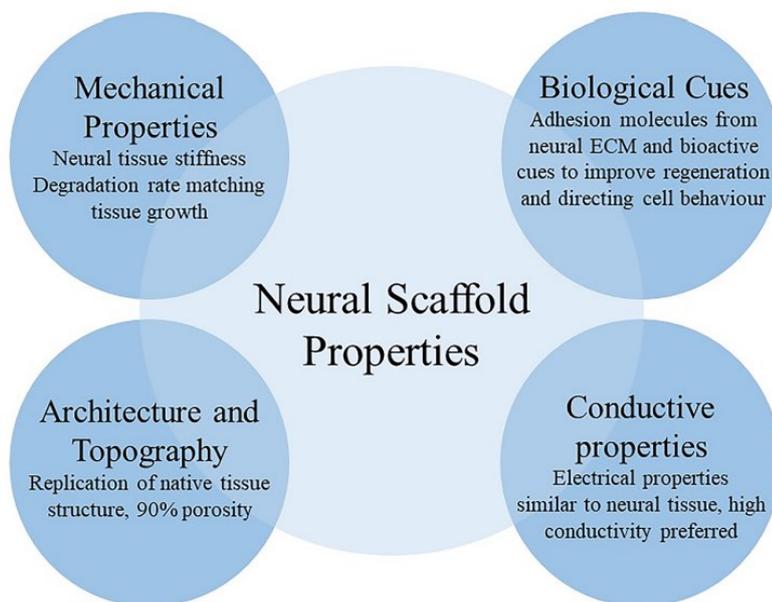


Figura 2: caratteristiche di una matrice per il tessuto neuronale.¹⁷

In passato nel gruppo di ricerca sono stati conseguiti ottimi risultati lavorando con matrici polimeriche nanocomposite di acido polilattico (PLA), utilizzando come riempitivi nanotubi di carbonio funzionalizzati¹⁸. Gli ottimi risultati sono in parte merito della grande processabilità dei polimeri come il PLA, per i quali esistono metodi di lavorazione come l'elettrospinning che permettono un alto controllo sulle caratteristiche del materiale.

Inoltre, grazie alle notevoli proprietà elettriche e di conduzione tipiche dei nanotubi, è possibile ottenere un materiale innovativo, che combina il buon controllo su dimensioni delle fibre e porosità ottenibile mediante elettrospinning¹⁹ a delle proprietà di conduzione di stimoli elettrici, soddisfacendo la maggior parte dei requisiti richiesti per uno scaffold neuronale. Tuttavia, nonostante i buoni risultati¹⁸, si è notato che le proprietà reologiche del nanocomposito PLA/CNTs, nello specifico il modulo elastico, sono molto lontane da quelle della matrice extracellulare del tessuto nervoso (0.1-10 kPa),^{20,21} essendo invece molto più adatte ad un tessuto duro come quello osseo, che possiede un modulo elastico nell'ordine di 1-10 GPa.²² Queste differenze nelle proprietà reologiche dipendono dalla composizione delle corrispettive matrici extracellulari. Infatti, la ECM di un cervello adulto è composta principalmente da glicoproteine, proteoglicani e glicosamminoglicani, non sono presenti proteine fibrose. Per questo motivo il modulo elastico è molto basso. La ECM del sistema periferico invece è costituita principalmente da collagene, da cui risulta un modulo elastico più alto, comunque non paragonabile a quello osseo. Ci si è dunque domandati se fosse possibile replicare e migliorare quanto ottenuto lavorando con il PLA utilizzando però una matrice più morbida, ponendo l'attenzione sulle proprietà reologiche della matrice, considerate una fonte importante di stimoli necessari alla buona differenziazione cellulare.

Materiali notoriamente più morbidi, come gli idrogel, sono sicuramente più adatti ad ospitare cellule che crescono bene in un ambiente come quello del sistema nervoso.

1.3 Idrogel

Un idrogel è definito dalla IUPAC come un gel in cui l'agente rigonfiante è acqua. Un gel è costituito di una matrice, o network, tridimensionale di natura polimerica che intrappola al suo interno una elevata quantità di solvente. Gli idrogel possono essere classificati secondo diversi criteri. Dipendendo dal tipo di reticolazione esistono due categorie principali, quelli reticolati fisicamente e quelli reticolate chimicamente. Un idrogel è definito chimico quando la reticolazione è di tipo covalente. Questi gel, data la natura covalente delle interazioni del reticolo, sono molto stabili e meccanicamente forti. In un gel fisico invece, la reticolazione avviene tramite interazioni non covalenti, come legami a idrogeno, legami ionici e forze di Van der Waals. Questi legami sono di natura debole e reversibile, di conseguenza, i gel fisici sono meccanicamente meno forti. Hanno però il vantaggio di essere sistemi dinamici, inoltre possono essere preparati senza l'utilizzo di agenti di reticolazione che spesso risultano tossici per le cellule e possono anche avere un effetto sull'attività di molecole biologiche incapsulate nel gel.

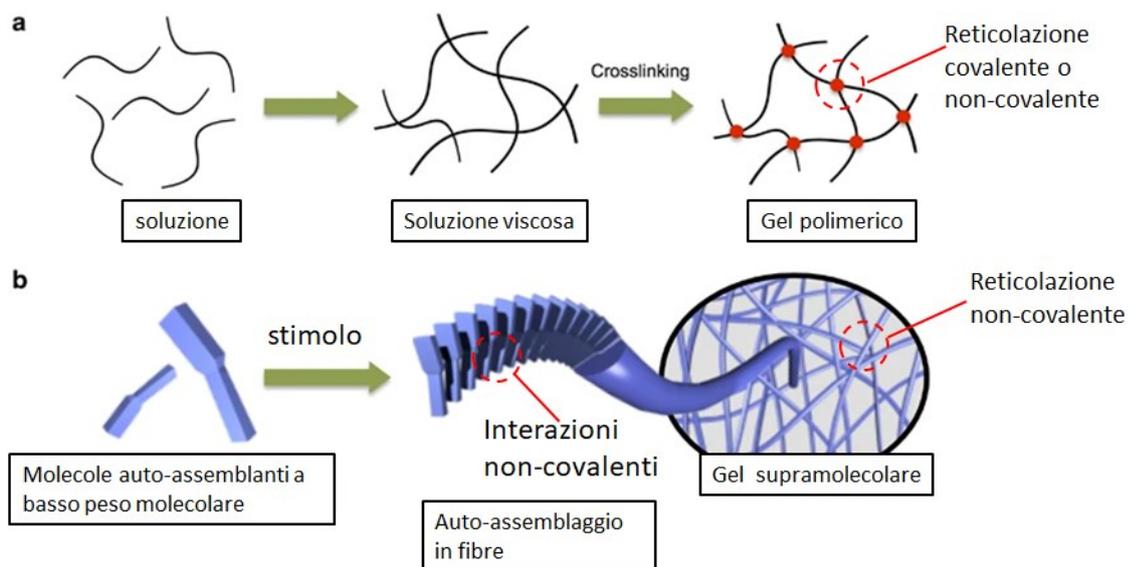


Figura 3: rappresentazione dei diversi tipi di idrogel. ²³

Gli idrogel possono essere ottenuti a partire da polimeri comuni, in cui la catena è formata da monomeri legati covalentemente: essi costituiscono i classici idrogel polimerici. In alternativa, si possono ottenere da polimeri supramolecolari, nei quali i monomeri sono piccole molecole che formano le catene polimeriche tramite processi

di auto-assemblaggio grazie all'instaurazione di interazioni non-covalenti. Questi ultimi sono gli idrogel supramolecolari o idrogel molecolari.

Gli idrogel possono essere anche classificati in sintetici o naturali, dipendentemente dell'origine del polimero. I polimeri sintetici hanno una chimica precisa e predicibile, le loro proprietà possono essere controllate.

Variando la composizione chimica si va ad agire sugli altri due parametri.

Vi è una grande varietà di materiali, sintetici e naturali, che possono formare idrogel utili per l'ingegneria dei tessuti. Per quanto riguarda quelli sintetici alcuni esempi sono polietilenoossido (PEO), polivinil alcol (PVA), acido poliacrilico (PAA) e peptidi. Per i derivati naturali invece i più noti sono agarosio, alginato, chitosano, gelatina e acido ialuronico.²⁴

1.4 Alginato

L'alginato è un polisaccaride naturale che si estrae dalle alghe Phaeophyceae che ha già molti utilizzi anche in ambito culinario come addensante, stabilizzante, gelificante ed emulsionante. Si tratta di un copolimero lineare a blocchi, composto da due zuccheri tra loro epimeri, acido β -D-mannuronico (M) e α -L-guluronico (G) uniti da un legame 1,4 glicosidico. Il rapporto tra i due è molto variabile e dipende sia dell'organismo sia dal tipo di tessuto dal quale viene isolato. I due monomeri si trovano formando blocchi omogenei di tipo MMMM (blocco M) e di tipo GGGGG (blocco G), oppure formando blocchi eterogenei alternati di tipo MGMGMG (blocchi MG). L'alginato si presenta come un solido bianco-giallo molto fino e si scioglie in acqua dando origine ad una miscela viscosa. La viscosità dipende sia dalla concentrazione utilizzata che, come vedremo nella discussione dei risultati, dal peso molecolare dell'alginato utilizzato. Infatti, la distribuzione di peso molecolare non è sempre la stessa ma può variare da 50 a 100 000 kDa,²⁵ e questo fa sì che siano disponibili in commercio diversi tipi di formulati, con caratteristiche chimiche differenti che si riflettono sulle proprietà della soluzione, come appunto la viscosità, e anche su proprietà del gel che verranno discusse in seguito.

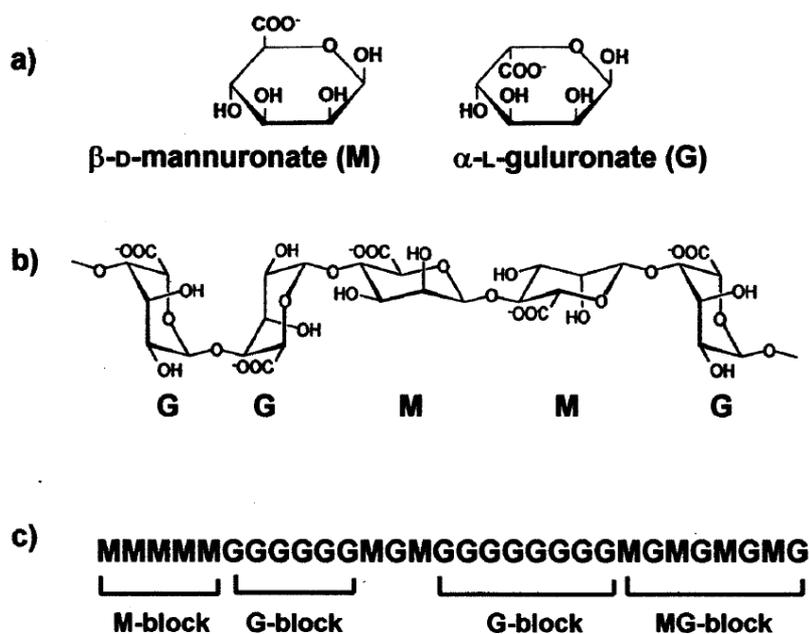


Figura 4: alginato. (a) zuccheri che ne compongono la struttura; (b) legami tra diversi i monomeri; (c) schema copolimero a blocchi.²⁶

L'alginato da solo in acqua non gelifica, ha bisogno di qualcosa che faccia avvenire la reticolazione tra le catene di polisaccaridi. Esso forma idrogel in presenza di ioni divalenti, normalmente Ca^{2+} , attraverso una reticolazione di tipo ionico. Nello specifico, gli acidi carbossilici di due coppie GG appartenenti a due catene polimeriche diverse coordinano il metallo bivalente per dare una struttura particolarmente stabile nota come "egg-box" (Figura 5). Questo tipo di reticolazione è favorita in regioni di blocchi G contenenti almeno 8 monomeri. La reticolazione coinvolgendo monomeri M è ugualmente probabile, ma dà luogo a giunzioni molto meno stabili. Le proprietà del gel ottenuto dipendono da diversi fattori: il peso molecolare dell'alginato, la concentrazione, la proporzione tra residui G e M e tra blocchi G e M, lo ione divalente e la concentrazione dell'ione divalente.

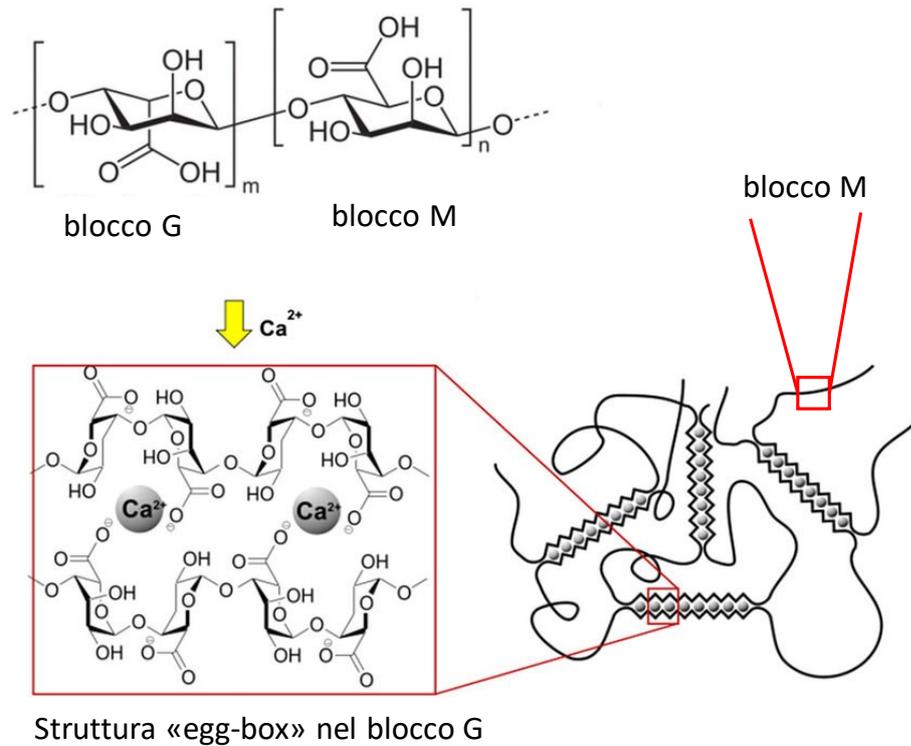


Figura 5 Rappresentazione schematica della reticolazione ionica dell'alginate con Ca^{2+} secondo il modello egg-box.

La gelificazione prevede la preparazione di una soluzione acquosa di sodio alginato che viene messa a contatto con ioni Ca^{2+} per iniziare la reticolazione. Esistono due processi di gelificazione distinti, che portano alla formazione di gel con diverse caratteristiche. La gelificazione esterna prevede la disponibilità immediata di ioni calcio in soluzione. Sia che si aggiunga la miscela di alginato alla soluzione di calcio che viceversa, il processo è istantaneo e avviene più velocemente nella superficie di contatto tra le due soluzioni, portando alla formazione di un gel eterogeneo. Al contrario, nella gelificazione interna la fonte di cationi si trova già all'interno della soluzione di alginato in forma "inattiva", dopo uno stimolo/innesco si ottiene un lento rilascio degli ioni calcio. Il secondo metodo garantisce una gelificazione più controllata e uniforme, e dunque sarà quello utilizzato per ottenere gli idrogel. Il fornitore di ioni calcio può essere un sale insolubile finemente macinato come il carbonato di calcio CaCO_3 , mentre si può utilizzare D-glucono- δ -lattone (GdL) come agente innescante. Il GdL idrolizza in acqua diminuendo lentamente il pH della soluzione. Man mano che il CaCO_3 si protona, gli ioni Ca^{2+} sono rilasciati in soluzione, permettendo la reticolazione e portando alla formazione della matrice di alginato.

1.5 Idrogel peptidici

Un altro tipo di idrogel interessanti da studiare per applicazioni biomediche sono quelli a base peptidica. Essi rientrano nella categoria di quelli che si sono precedentemente definiti gel supramolecolari. I monomeri, in questo caso, sono costituiti dal peptide stesso, le cui singole catene in soluzione tendono ad aggregare formando strutture secondarie e conseguentemente fibre che gelificano intrappolando il solvente.²⁷⁻²⁹ Questo processo è interamente governato da interazioni deboli che si instaurano inter-catena. Tra le più rilevanti troviamo i legami idrogeno, le interazioni idrofobiche, π -stacking e le interazioni elettrostatiche.

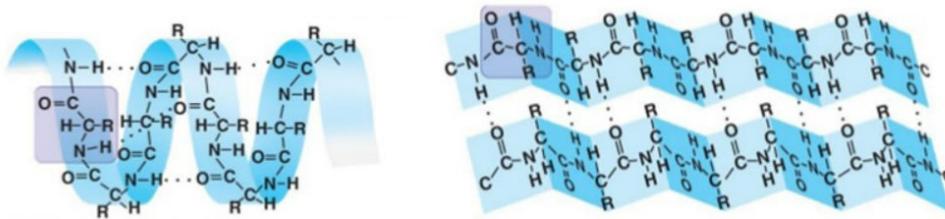


Figura 6: strutture secondarie α -elica (sx) e foglietto β (dx)

Il legame a idrogeno è alla base dei sistemi biologici e nelle proteine costituisce uno dei principali responsabili del processo di folding, stabilizzando le strutture secondarie fondamentali come la α -elica e il foglietto β . Nel caso di peptidi a catena corta, difficilmente si riesce a stabilizzare la struttura a elica. Invece, l'auto-assemblaggio di peptidi attraverso la formazione di foglietti β è nota per portare alla formazione di strutture quasi-1D, cioè fibre che danno luogo a idrogel.

Nel caso degli idrogel di peptidi, soprattutto a catena corta, piuttosto che intra-catena questi legami si formano tra gruppi amminici e carbonilici di catene diverse, portando, in sequenze ben progettate, alla formazione di strutture secondarie.

Essendo queste tutte interazioni reversibili, e dipendendo da esse la formazione del gel, i processi di gelificazione e de-assemblaggio sono controllabili modificando le condizioni in soluzione, per esempio variando il pH o la forza ionica. Anche la temperatura è un fattore che determina lo stato del materiale: oltre quella che viene definita T_{gel} il peptide non è in grado di mantenere la struttura tridimensionale e torna in soluzione.

I vantaggi derivanti dall'uso di peptidi per la formazione di idrogel sono numerosi: (i) uno dei maggiori è sicuramente l'altissima biocompatibilità del materiale, ulteriormente potenziata dall'utilizzo di peptidi a catena corta, più facili da smaltire per il nostro organismo (ii) la grande varietà di amminoacidi disponibili permette tantissime combinazioni, fatto che se da un lato può richiedere numerose prove prima di ottenere un risultato adeguato, dall'altro offre molte alternative e quindi una migliore ottimizzazione del materiale finale, oltre alla possibilità di modificare secondo necessità le catene laterali dei singoli amminoacidi. (iii) la sintesi è relativamente semplice e veloce da eseguire, sono disponibili anche macchinari che la eseguono in modo completamente automatizzato.

1.6 Peptidi corti auto-assemblanti

I peptidi auto-assemblanti in grado di formare strutture di tipo β si dividono in cinque classi principali: peptidi anfifilici, peptidi ionici auto-complementari, peptidi che alternano nella loro struttura residui idrofili e idrofobici, peptidi eterochirali e peptidi N-funzionalizzati con un gruppo aromatico.

I peptidi anfifilici presentano una struttura a 4 domini, con una catena alchilica idrofobica, una strutturata in modo da portare alla formazione di strutture secondarie, una regione carica necessaria per garantire una certa solubilità in ambiente acquoso ed al termine una sequenza biologicamente attiva.³⁰ Queste molecole auto-assemblano per dare nanofibre cilindriche, grazie sia a legame idrogeno che al collasso delle catene alifatiche.

La alternanza di residui idrofobici e residui idrofilici favorisce la formazione di strutture di tipo β -sheet. Un particolare esempio di questa strategia sono i peptidi ionici auto-complementari, che alternano nella loro struttura amminoacidi idrofobici, con amminoacidi idrofilici con carica positiva o negativa. Il processo di self-assembly è governato dalle interazioni elettrostatiche tra residui con carica opposta. Un esempio di questo tipo di peptide è il peptide RADA.³¹

L'alternanza di L- e D-amminoacidi favorisce la formazione di strutture peptidiche supramolecolari anche in peptidi di solo tre residui.³² Peptidi ciclici che alternano D- e L-amminoacidi assemblano per formare nanotubi.³³

Infine, i processi di auto-assemblaggio possono essere favoriti dall'introduzione di gruppi aromatici nel N terminale, il più comune è il gruppo Fmoc.

Un pre-requisito fondamentale affinché avvenga la gelificazione risiede dunque nella progettazione della sequenza peptidica. La forza e il numero delle interazioni regola questi processi. È noto che la variazione di anche solo un amminoacido, che in catene corte non è cosa da poco, porta alla perdita della capacità di formare il gel.³⁴ Anche la modificazione della catena, in particolare alle estremità, può diventare un metodo per migliorare le proprietà gelificanti del peptide. Inoltre, più è lunga la catena e più interazioni si possono instaurare; dunque, per peptidi corti la scelta della sequenza acquista una importanza fondamentale. Anche la concentrazione gioca un ruolo fondamentale. Viene definita minima concentrazione di gelante (MGC) come la quantità minima di materiale necessaria per la formazione di un gel stabile, naturalmente più questa è bassa e migliore sarà la capacità del peptide di formare un gel.³⁵⁻³⁸

I fattori appena descritti, ossia sequenza, interazioni e concentrazione minima, sono tutti intrinseci del peptide che si sta utilizzando. Ne esistono altri che riguardano principalmente l'ambiente, a titolo di esempio: (i) è possibile sfruttare molecole che, come visto per l'alginato, ricoprono il ruolo di agente di cross-linking, sfruttando interazioni deboli, in genere elettrostatiche, per favorire l'avvicinamento delle catene peptidiche (ii) variare il pH porterà alla protonazione e/o deprotonazione dei gruppi sensibili sulle catene laterali o alle estremità, aumentando o rimuovendo alcune interazioni (iii) la forza ionica della soluzione, regolabile aggiungendo anioni e cationi, il cui effetto principale è di schermare le cariche presenti (iiii) la sonicazione durante il processo di gelificazione è una tecnica che permette di rompere e riformare le interazioni tra catene forzando la loro combinazione nella configurazione più adatta alla formazione del gel (iiiiii) l'introduzione di enzimi nel sistema può portare alla formazione del gel.³⁹

1.7 Reologia

In generale, quando si applica una pressione (τ , Pa) con una forza tangente alla superficie di un materiale, si ottiene in risposta una deformazione γ , valutata in percentuale.

A seconda che si stia analizzando un solido o un liquido, la deformazione che deriva dallo stress applicato sarà rispettivamente finita e in continuo aumento. Questo è dovuto al fatto che nei fluidi le componenti possono scorrere l'una sull'altra e continueranno a farlo per tutto il periodo di applicazione della forza, mentre nei solidi ad ogni forza applicata corrisponde una deformazione precisa e con un limite di rottura. Quando si studiano fluidi viscosi approssimabili come ideali si fa riferimento alla legge di Newton per la viscosità (η). Quando invece si studiano i solidi, la deformazione risponde alla legge di Hooke, dove G è il modulo di deformazione del materiale.

Fluidi	Solidi
$\tau = \frac{\partial \gamma}{\partial t} \cdot \eta$	$\tau = G \cdot \gamma$

I gel sono materiali viscoelastici e perciò possiedono sia una componente viscosa che una componente elastica, e il loro comportamento risente di entrambe queste componenti. Il modulo di deformazione (G^*) è rappresentato da un valore complesso che possiede come componente reale un contributo elastico (G') e come componente immaginaria il contributo viscoso (G''). Così è descritto il comportamento viscoelastico di un materiale.

$$G^* = G' + iG''$$

Il modulo elastico (E , Pa) è definito come il rapporto stress/strain e quantifica la rigidità e la resistenza alla deformazione del materiale, e si calcola tramite rapporto di Poisson a partire dalla componente G' , a seguito dell'assunzione che il materiale sia isotropico.

$$E = 2G'(1 + \nu)$$

In cui ν viene approssimata a 0.5 per gel incompressibili, quindi il modulo elastico risulta approssimato come $3G'$.⁴⁰

1.7 Sintesi peptidica in fase solida (SPPS)

I peptidi utilizzati in questo lavoro di tesi sono stati ottenuti sfruttando la sintesi peptidica in fase solida introdotta da Merrifield.⁴¹ È una tecnica che prevede l'utilizzo di un supporto solido al quale gli amminoacidi vengono legati uno alla volta per accrescere la catena peptidica dal gruppo carbossilico terminale verso il gruppo amminico terminale. La sintesi prevede una serie di passaggi che si ripetono ciclicamente, e finisce con un ultimo passaggio di distacco del peptide dal supporto solido. Rispetto a una normale sintesi in soluzione, nella SPPS i processi di sintesi e purificazione sono notevolmente più rapidi, oltre ad essere automatizzabili. Infatti, questo tipo di sintesi viene svolta in appositi reattori con un setto poroso sul fondo che lascia passare i solventi ma non il supporto solido su cui sta crescendo la catena peptidica. In questo modo si possono rimuovere gli scarti delle reazioni ed effettuare lavaggi molto più velocemente.

È necessario invece lavorare in grande eccesso di reagenti, nello specifico sono necessari almeno 2 equivalenti di nuovo amminoacido rispetto ai siti di legame disponibili. Inoltre, le procedure per l'analisi della corretta formazione della sequenza peptidica sono rallentate dal fatto che il peptide è legato alla resina; dunque, è necessario operare con sblocchi in piccola scala per poter controllare analiticamente il processo.

I supporti solidi sopra citati sono particolari resine di tipo polimerico che devono essere insolubili nei solventi utilizzati e chimicamente inerti. La resina deve anche avere un buon numero di siti su cui ancorare il primo amminoacido tramite un legame covalente con l'acido carbossilico, il legame deve essere stabile durante tutti i passaggi della sintesi e può essere scisso con facilità solo al termine di essa nel momento del distacco. Il numero di siti attivi nella resina è il cosiddetto loading della resina ed è espresso in mmol di siti attivi per grammo di resina (mmol / g). Sono disponibili in commercio diversi tipi di resina in base al tipo di sito attivo. Diversi siti attivi hanno

diverse condizioni di distacco finale e possono rilasciare il peptide con diversi gruppi funzionali nel C-terminale (acido carbossilico libero o ammide). In questo lavoro di tesi sono state utilizzate due resine distinte: Rink Amide e 2-cloro tritil cloruro, le cui strutture sono riportate in Figura 7.

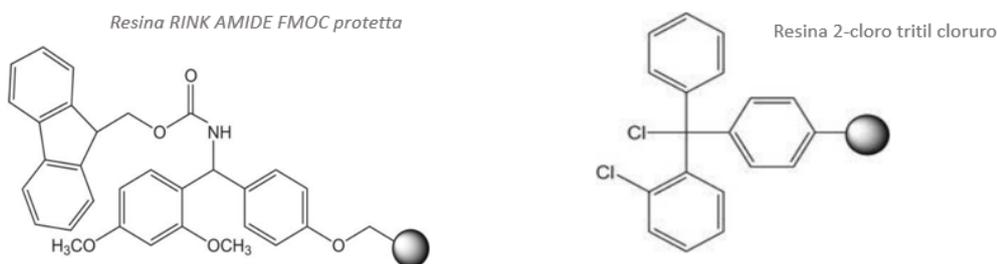


Figura 7 strutture delle resine: Rink Amide Fmoc protetta e -cloro tritil cloruro

la prima rilascia il peptide con il C-terminale libero la seconda col C-terminale modificato come ammide. Tutte e due permettono il distacco del peptide in condizioni acide.

Per ottenere un legame peptidico è necessario attivare la funzione carbossilica del primo amminoacido in modo da favorire l'attacco da parte del gruppo amminico del secondo. Inoltre, si deve fare ricorso all'utilizzo di gruppi protettori, sia nelle catene laterali, sia nel $N\alpha$ o $C\alpha$, in modo che le uniche funzioni libere di reagire siano quella α -amminica del primo amminoacido e quella α -carbossilica del secondo amminoacido. Questi gruppi protettori dovranno essere rimuovibili in maniera selettiva e indipendente, in modo da permettere alla sintesi di procedere, cioè devono essere ortogonali.

I gruppi protettori della funzione amminica hanno principalmente la funzione di deprimere la nucleofilicità, e come effetto secondario aumentano la solubilità dell'amminoacido nei solventi organici normalmente utilizzati. I più utilizzati sono gruppi uretanici, come 9-fluorenilmetossicarbonil (Fmoc), tert-butilossicarbonile e (Boc).

In questo lavoro di Tesi sono stati utilizzati esclusivamente amminoacidi con le estremità α -amminiche Fmoc protette, rimuovibili in condizioni basiche. Di conseguenza, gli altri gruppi protettori devono essere stabili in condizioni basiche e

rimuovibili in condizioni acide. Si è utilizzato il gruppo Boc per la protezione delle ammine delle catene laterali e l'estere terz-butilico (O^tBu) per la protezione degli acidi carbossilici delle catene laterali. Le strutture dei gruppi protettori utilizzati sono riportate in Figura 8.

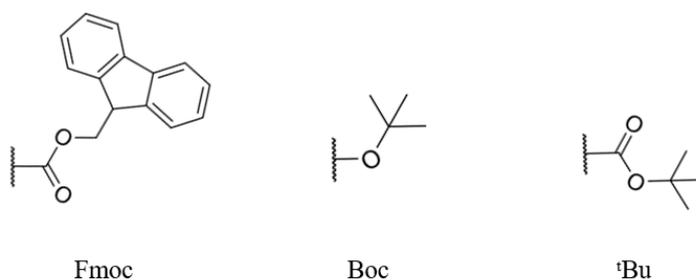


Figura 8: gruppi protettori utilizzati

Dopo l'ancoraggio del primo Fmoc-amminoacido, la SPPS prevede cicli di deprotezione del gruppo Fmoc e coupling con l'amminoacido entrante (formazione del legame ammidico). Il gruppo Fmoc viene rimosso normalmente utilizzando una soluzione di ammina secondaria (piperidina o 4-metilpiperidina) in dimetilformamide (DMF) (Figura 9).

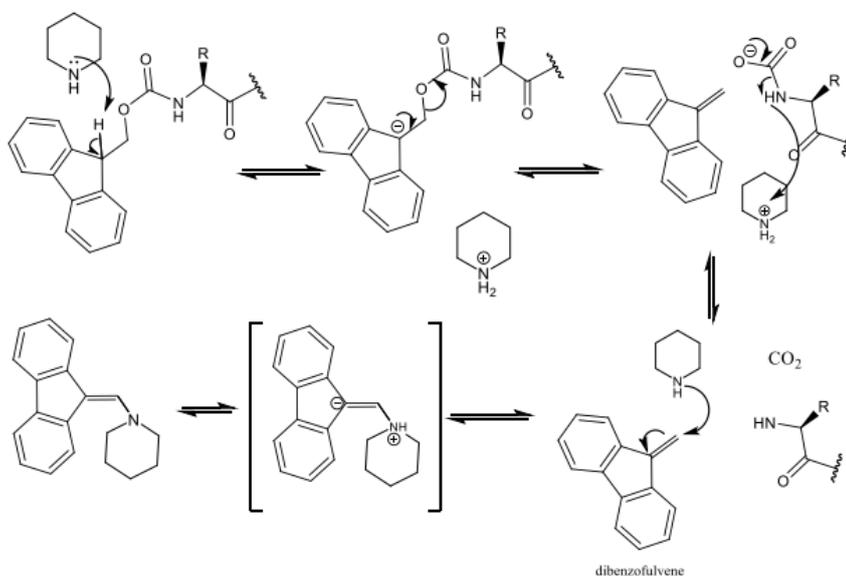


Figura 9: Meccanismo di deprotezione del gruppo Fmoc

Come detto in precedenza, per la formazione del legame ammidico è necessario attivare l'acido carbossilico dell'amminoacido che viene introdotto. L'attivazione prevede la formazione di un estere attivo grazie all'utilizzo di reagenti di attivazione o coupling reagents. In questo lavoro di Tesi sono stati utilizzati sali di uronio e guanidinio, riportati in Figura 10.



Figura 10: strutture degli attivatori di coupling più utilizzati

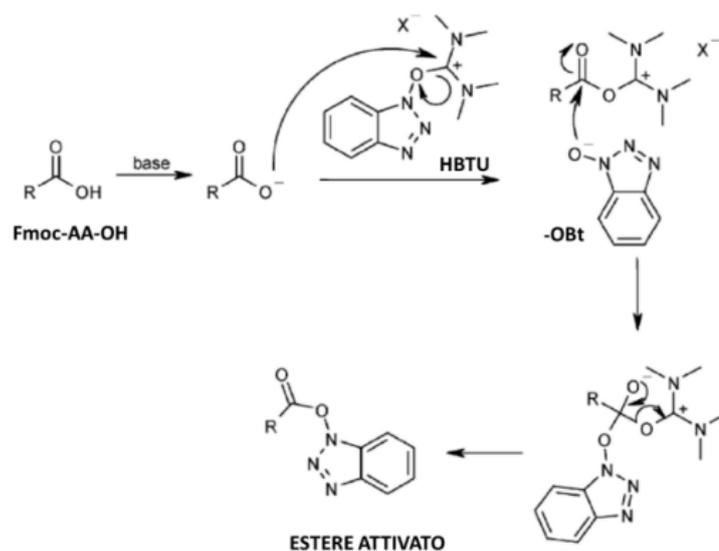


Figura 11: Attivazione di un amminoacido utilizzando la miscela di attivatori HBTU/HOBT

1.8 Nanostrutture di carbonio

Le nanostrutture di carbonio sono delle forme allotropiche del carbonio, meno note rispetto a diamante e grafite, che però da alcuni anni stanno acquistando sempre più interesse in vari campi di ricerca. Sono rappresentati principalmente da fullereni, nanotubi di carbonio, e grafene, anche se queste non rappresentano l'intera famiglia, che si estende ad altre strutture disponibili.

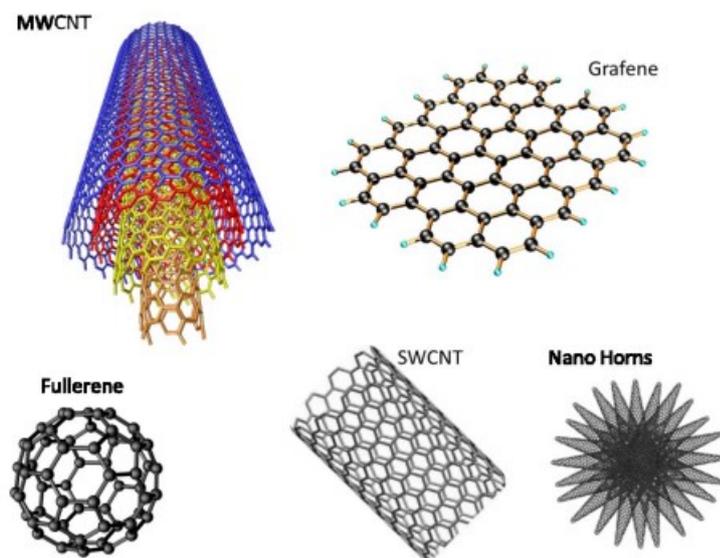


Figura 12: nanostrutture di carbonio più note

Tutte le differenti strutture sono caratterizzate da forme diverse e uniche ma si basano sulla stessa struttura reticolare formata da carboni ibridati sp^2 .

1.9 Nanotubi di carbonio

I nanotubi di carbonio possono essere pensati come a fogli di grafene arrotolati. Date le numerose direzioni per le quali è possibile arrotolare tale foglio, esistono diversi tipi di nanotubi, che mostrano diverse proprietà in funzione di diametro e struttura microscopica del tubo. Una prima catalogazione generale viene fatta in base al numero di pareti che costituiscono la nanostruttura: infatti i nanotubi possono essere costituiti da una singola parete (SWCNT) oppure da un numero n di pareti concentriche (MWCNT).

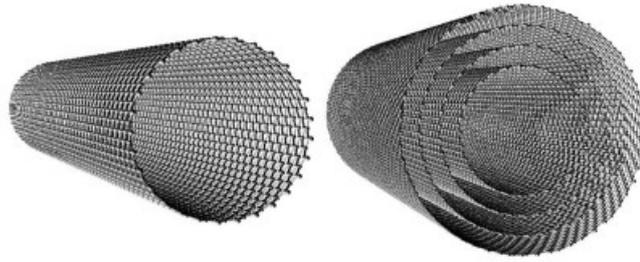


Figura 13: SWCNTs e MWCNTs

I primi hanno proprietà elettriche differenti, a seconda di come è costruito il nanotubo, mentre i secondi formano strutture più resistenti, con proprietà elettriche intermedie rispetto a quelle dei vari nanotubi concentrici.

I nanotubi SW vengono generalmente descritti in termini del vettore chirale attorno al quale il nanotubo sono arrotolati. La struttura del nanotubo dipende dalle caratteristiche delle componenti del vettore. La maggior parte di queste sono achirali, ma ne esistono due, denominate “a poltrona” e “a zig zag”, chirali. La struttura dei SWCNTs è strettamente collegata alle loro proprietà elettriche, questo permette di avere a disposizione nanotubi con caratteristiche metalliche oppure di semiconduttore. Essi rappresentano la categoria più preziosa di nanotubi, per ottenerli infatti sono richieste delle procedure di purificazione al fine di rimuovere le tracce di catalizzatore e per separare le nanostrutture a carattere metallico da quelle semiconduttrici. Per queste ragioni SWCNTs purificati sono molto costosi e spesso, quando possibile, si sceglie di usare MWCNTs.

I nanotubi MW sono ottimi conduttori, anche e meno dei SW a causa del maggiore numero di difetti, e hanno proprietà meccaniche e reologiche molto elevate. Ciò li rende ottimi candidati per l'utilizzo in nanocompositi.

Esistono diversi metodi per produrre CNTs, che si differenziano per l'omogeneità e per le dimensioni delle nanostrutture ottenute. I metodi più utilizzati sono la scarica ad arco, l'ablazione laser, la deposizione chimica da vapore, HiPco e CoMoCAT.⁴²

1.10 Reattività delle nanostrutture di carbonio

La reattività delle nanostrutture di carbonio, escluso il grafene, è simile a quella di olefine elettrone-povere. Questo è dovuto alla conformazione non-planare che assume la nanostruttura, che porta gli orbitali π a non essere più allineati come nel grafene. Il fenomeno prende nome di piramidizzazione e viene quantificato da un parametro che quantifica il disallineamento, definito angolo di piramidizzazione.

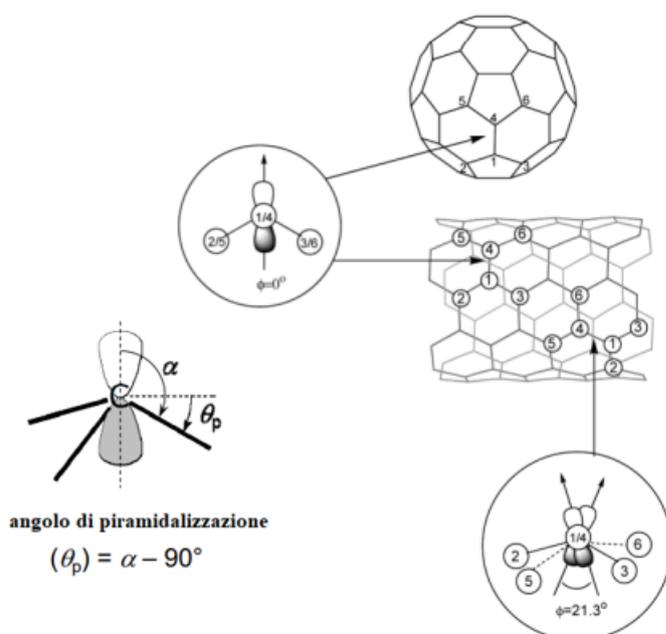


Figura 14: angoli di piramidizzazione in fullereni e nanotubi di carbonio ⁴²

Il disallineamento degli orbitali p_z coinvolti nella formazione del legame causa delle tensioni locali nel reticolo sp^2 , aumentando la reattività nei confronti delle specie che portano alla formazione di carboni sp^3 , con conseguente perdita di tensione reticolare. Perciò, le reazioni principali che svolgono fullereni e nanotubi sono addizioni nucleofile o radicaliche, cicloaddizioni, idrogenazioni e alogenazioni.

Un metodo di funzionalizzazione molto utilizzato consiste nell'ossidazione delle nanostrutture, che porta ad ottenere una parete decorata con acidi carbossilici, che possono essere utilizzati per introdurre diverse altre funzionalità. Il problema di questo metodo è la grande quantità di difetti che genera nelle nanostrutture, compromettendo alcune proprietà del materiale come ad esempio quelle elettriche.

In generale gli approcci per quanto riguarda la funzionalizzazione delle nanostrutture sono rappresentati da due categorie: (i) la funzionalizzazione non-covalente e (ii) quella covalente. La prima consiste nell'adsorbimento di molecole sulla superficie esterna dei nanotubi. La seconda sfrutta la reattività dei carboni sp^2 causata dalla piramidalizzazione della struttura.

Funzionalizzare le nanostrutture è una buona tecnica per favorire la loro dispersione in ambiente biologico. Per esempio, si possono utilizzare molecole con una giusta affinità per il solvente in modo da prevenire l'aggregazione, tendenza molto forte in solventi polari che rende molto difficile l'utilizzo di queste nanostrutture per esempio in acqua. Tale comportamento è dovuto alle forze di Van der Waals e all'alto rapporto superficie/volume

1.11 Reazione di Tour

In questo lavoro di Tesi, proprio allo scopo di rendere disperdibili in acqua i nanotubi di carbonio si è scelto di utilizzare la Reazione di Tour. Essa appartiene alla categoria delle funzionalizzazioni covalenti ed è basata sull'addizione di aril-derivati a nanotubi di carbonio partendo da aniline para-sostituite attraverso una reazione di diazotizzazione.⁴³ La reazione originale proposta da Tour prevedeva come primo passaggio la formazione del sale di diazonio e il suo isolamento sotto forma di sale tetrafluoroborato, il quale veniva poi aggiunto alla dispersione contenente i nanotubi. Tuttavia, vista l'instabilità e la tossicità dei sali di diazonio, è stata messa a punto una procedura equivalente in cui essi vengono formati direttamente in situ, utilizzando isopentilnitrito.

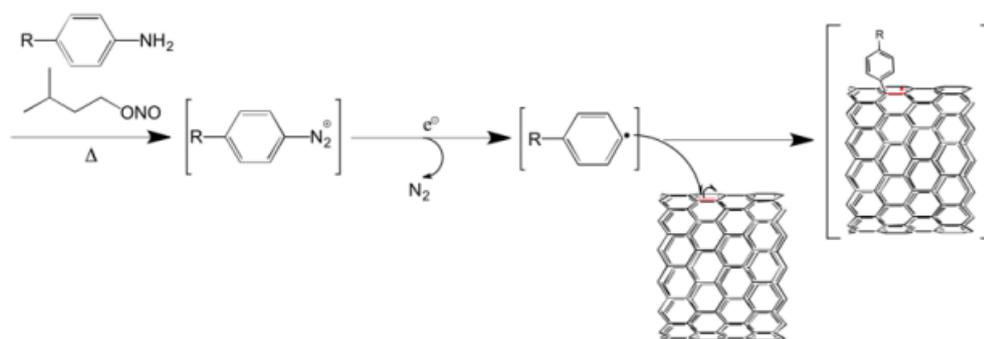


Figura 15: meccanismo proposto per reazione di diazotizzazione.⁴⁴

Nonostante il meccanismo sia ancora oggi sotto investigazione, l'ipotesi più accreditata è quella riportata in Figura 15, che prevede i seguenti step: (i) formazione del sale di arenidiazonio in situ ad alte temperature per reazione tra isopentilnitrito e l'anilina (ii) riduzione del sale di arenidiazonio a formazione di un radicale arile (iii) attacco del radicale alla parete del nanotubo.

Secondo questa ipotesi, l'elettrone fornito per la riduzione del sale di diazonio è fornito dal nanotubo stesso tramite trasferimento elettronico.

Un problema di questa reazione è che un eccesso di anilina, o anche tempi di reazione troppo lunghi, possono portare ad una competizione per il radicale arile tra la superficie del nanotubo e gli anelli aromatici che hanno reagito in precedenza.

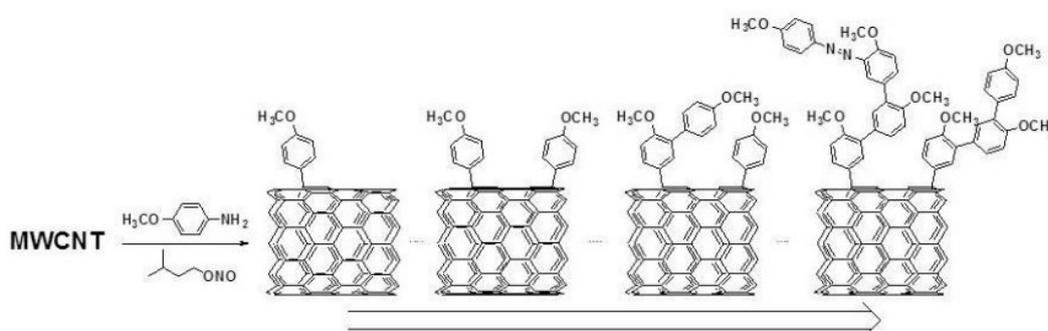


Figura 16: effetto dell'aumento di concentrazione di anilina e/o tempo di reazione⁶

Per questa ragione il gruppo di ricerca in passato si è concentrato sull'ottimizzazione dei parametri di questa reazione, studiando le condizioni migliori per diverse aniline, ottenendo ottimi gradi di riproducibilità.

1.12 Grado di funzionalizzazione

Le percentuali di funzionalizzazione in peso, ottenute dalle analisi termogravimetriche, non sono ovviamente confrontabili quando vengono utilizzate aniline con peso molecolare diverso. Per rendere i dati ottenuti confrontabili si definisce il grado di funzionalizzazione (FD) come il rapporto tra le moli di gruppo funzionale e le moli di carbonio nel campione.

$$FD = \frac{n_{FG}}{n_C}$$

In un ambiente non ossidante, ad esempio in atmosfera di azoto, i nanotubi resistono alla degradazione fino a temperature molto elevate, fino a 700-800°C. Al contrario i gruppi funzionali che decorano la superficie in genere degradano a temperature minori.

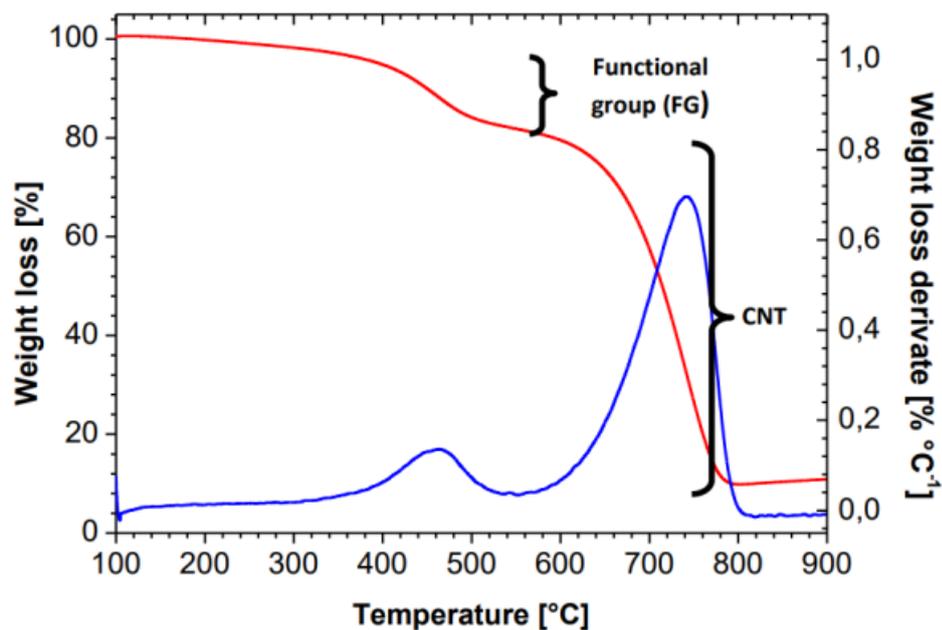


Figura 17: tipica curva di decomposizione di CNTs funzionalizzati

La perdita di peso nei campioni NT-S, NT-P e NT-N viene calcolata rispettivamente fino a 650, 450 e 450 °C. fino a quella temperatura la degradazione dei gruppi funzionali è interamente responsabile della perdita di peso del campione. Oltre quella temperatura, il peso del campione corrisponde esclusivamente al carbonio. Sfruttando le diverse temperature di degradazione possiamo determinare le moli di gruppo funzionale e quelle di carbonio.

$$n_{FG} = \frac{W_{100^{\circ}C} - W_{X^{\circ}C}}{MW_{FG}}$$

$$n_C = \frac{W_{X^{\circ}C}}{MW_{FG}}$$

2. Risultati e discussione

2.1 Funzionalizzazione di nanotubi

La prima parte di lavoro è stata dedicata alla sintesi di nanotubi di carbonio funzionalizzati con molecole organiche. Lo scopo di tali funzionalizzazioni è contrastare la tendenza dei nanotubi ad aggregare in soluzione acquosa, per due motivi principali:

- i.* Ottenere un network in cui la distribuzione dei nanotubi sia omogenea
- ii.* Limitare la tossicità delle nanostrutture in ambiente biologico

Un metodo veloce per disperdere nanotubi pristini consiste nell'utilizzo di un sonicatore a punta, ma la dispersione ottenuta non è stabile ed essi tenderanno a riaggregare nel giro di pochi minuti. Una funzionalizzazione covalente, che sfrutti interazioni repulsive o di ingombro sterico sulla superficie delle nanostrutture, è un metodo efficace non solo per riuscire a disperderle temporaneamente ma anche per rendere la dispersione stabile nel tempo, (anche mesi, come visto nel caso degli estratti preparati).

Le funzionalizzazioni sono state scelte basandosi sul lavoro precedentemente svolto dal gruppo di ricerca, e prevedono l'utilizzo di molecole cariche positivamente, cariche negativamente oppure neutre, che vengono legate covalentemente alla superficie esterna dei nanotubi.⁴⁵ A tale scopo, è stata utilizzata la reazione di Tour. I motivi principali per cui è stata scelta rispetto ad altre tecniche sono diversi, a partire dal buon controllo del grado di funzionalizzazione, che è un punto molto importante in queste applicazioni. Infatti, l'utilizzo dei nanotubi previsto in questo lavoro è quello di riempitivi in materiali nanocompositi, che migliorino sia le proprietà strutturali sia quelle elettriche. I difetti e le funzionalizzazioni interrompono il network di carbonio sp^2 di cui sono composte le nanostrutture, che è all'origine delle proprietà che ci interessa mantenere. Per questo è opportuno raggiungere un grado di funzionalizzazione che sia sufficiente ad indurre solubilità, ma non eccessivo. Oltre a questo, la reazione di Tour si basa su un reagente (un derivato anilnico) che può essere scelto tra un vastissimo catalogo di composti commerciali o facilmente sintetizzato. Inoltre, è una reazione veloce e che non fa uso di sostanze troppo costose. Queste

funzionalizzazioni sono state sviluppate e ottimizzate in lavori precedenti del gruppo di ricerca.

Le aniline usate per la funzionalizzazione sono mostrate in Figura 18

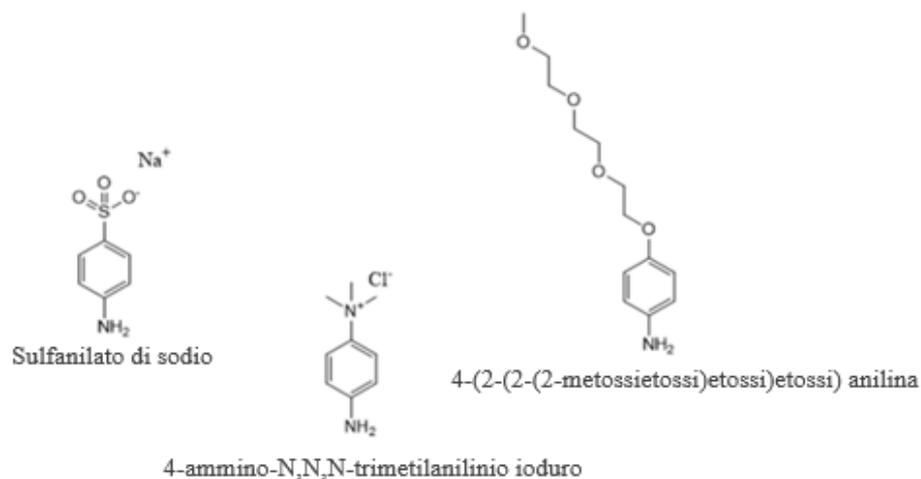


Figura 18: aniline utilizzate per le diverse funzionalizzazioni

Le molecole cariche hanno lo scopo di impedire l'aggregazione tramite interazioni repulsive. Le pareti esterne saranno decorate da cariche dello stesso segno, mantenendo i nanotubi dispersi in soluzione. Inoltre, è interessante osservare il loro comportamento nell'ambito dell'adesione cellulare; infatti, c'è la possibilità che i derivati carichi interagiscano con le proteine delle pareti cellulari, favorendo l'adesione. La 4-TEG anilina dovrebbe favorire la disperdibilità tramite legami idrogeno con il solvente e per ingombro sterico.

Tutti i nanotubi funzionalizzati sono stati sottoposti a una serie di caratterizzazioni per avere informazioni sul grado di funzionalizzazione e sul comportamento in acqua: perdita di peso in TGA, assorbimento UV-Vis-NIR, disperdibilità in acqua, analisi della distribuzione dimensionale in DLS e potenziale Z.

2.1.1 NT-S: nanotubi funzionalizzati a carica negativa

Il primo derivato sintetizzato è quello a carica negativa (Figura 19). Negli studi precedenti si è dimostrato essere quello che offre i risultati migliori in termini di disperdibilità in acqua e riproducibilità. Il residuo scelto per introdurre le cariche negative è il gruppo benzensolfonato.

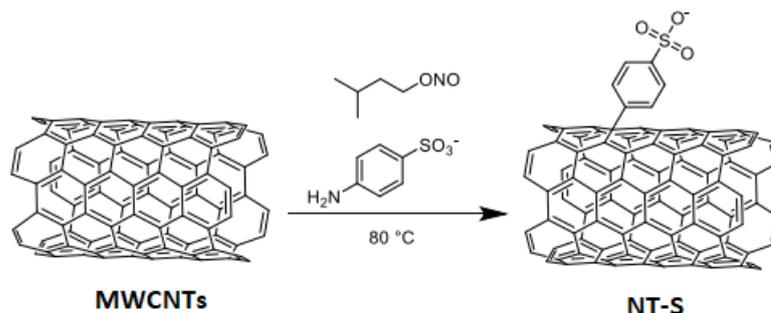


Figura 19: schema di reazione generico per funzionalizzazione di MWCNTs con gruppo benzensolfonato, a partire a acido solfanilico e isopentilnitrito.

Il reagente utilizzato è acido solfanilico, il quale ha una pK_a intorno a -6.65 ,⁴⁶ per cui si trova in forma deprotonata in un range di pH molto ampio in acqua. Questo garantisce il mantenimento della carica superficiale anche a pH biologico. Secondo il meccanismo proposto per la reazione di Tour, in presenza di isopentilnitrito l'anilina subisce una reazione di diazotazione, seguita da perdita di una molecola di azoto, lasciando il radicale benzensolfonato, il quale viene ridotto da uno dei carboni della parete portando alla formazione del legame covalente. Il problema principale nell'utilizzo dell'acido solfanilico è che a temperatura ambiente è un solido cristallino zwitterionico, il che limita molto la scelta dei solventi a causa della sua scarsa solubilità in ambiente organico. In acqua si scioglie a pH neutro o basico, quando le ammine sono deprotonate e la forma zwitterionica viene persa.⁴⁷ Per questo motivo l'acido solfanilico prima di essere aggiunto nella miscela di reazione viene sciolto in acqua utilizzando un equivalente di NaOH. In un lavoro precedente si erano scelte le seguenti condizioni di reazione: un tempo di 4 ore e quantità di acido solfanilico e isopentilnitrito pari rispettivamente a 0.05 e 0.1 equivalenti, in rapporto alle moli di C dei nanotubi. Nel nostro lavoro abbiamo innanzitutto valutato l'effetto di condizioni

diverse (concentrazione di anilina e isopentilnitrito aumentate di dieci volte) e di nanotubi pristini con diametri diversi (< di 8 nm e tra 8 e 15 nm). Abbiamo così ottenuto 3 diversi campioni (Tabella 1) e ne abbiamo confrontato il grado di funzionalizzazione e la disperdibilità in acqua.

Tabella 1: nanotubi NT-S a confronto: analisi termogravimetriche

Derivato	Diametro MWCNTs (nm)	Equivalenti rispetto a C	Funzionalizzazione % (a 650°C)	Disperdibilità in acqua (mg/mL)
NT-S1	8-15	0.05 anilina 0.1 IPN	8.013	0.15
NT-S2	<8	0.05 anilina 0.1 IPN	9.757	0.12
NT-S3	8-15	0.5 anilina 1 IPN	7.223	0.14

Le differenze in termini di disperdibilità, il parametro che ha più rilevanza per l'applicazione finale, sono minime, mentre la differenza rispetto ai nanotubi pristini (di fatto non disperdibili) è evidente ad occhio nudo.

2.1.1.1 Analisi termogravimetriche

Le TGA sono state eseguite in azoto, un ambiente inerte in modo da eliminare il contributo ossidativo alla degradazione.

Si osservano due distinte perdite di peso, una a temperature molto superiori dell'altra. Questa differenza è troppo grande per pensare che queste perdite siano dovute a diversi stadi della degradazione. L'ipotesi più accreditata suggerisce che la prima perdita di peso sia dovuta al desorbimento di molecole fisisorbite sulla superficie, grazie ad interazioni deboli, in particolare π - π stacking, che vengono a stabilirsi tra sistemi elettronici di tipo π .⁶ È quindi probabile che la prima perdita di peso sia relativa alla degradazione di anilina legata non-covalentemente per interazione dell'anello aromatico con la parete del nanotubo. Tali interazioni sono reversibili, e in seguito verranno discusse più nello specifico. La seconda perdita di peso, a temperature più elevate, è coerente con la rottura di un legame più forte, di natura covalente.⁴⁸

Per le altre caratterizzazioni, una quantità di nanotubi funzionalizzati sufficiente a lasciare corpo di fondo, è stata dispersa in acqua milliQ. Concettualmente lo scopo è di portarsi oltre il limite di solubilità in modo da avere in soluzione la massima concentrazione possibile di nanotubi. Questi vengono dispersi con l'aiuto di un sonicatore a punta e poi centrifugati. Il surnatante viene recuperato e filtrato, in questo modo si ottiene un estratto contenente la frazione più solubile dei derivati funzionalizzati. È importante usare sempre la stessa procedura in modo da avere dati confrontabili.

2.1.1.2 Disperdibilità in acqua

La disperdibilità dei nanotubi in acqua viene valutata tramite TGA e UV-Vis-NIR. 1 mL di estratto viene portato a secco goccia a goccia su un pan precedentemente tarato, la quantità di prodotto secco viene valutata in TGA, seguendo il metodo spiegato più in particolare nelle procedure. In questo modo si ottiene con una buona precisione la quantità di CNT dispersi in un mL di acqua milliQ. L'analisi UV-Vis-NIR è parallela a quella termogravimetrica e offre una stima della concentrazione di nanotubi in soluzione, collegandola all'assorbanza ad una determinata lunghezza d'onda di riferimento, che in questo caso è a 1000 nm. I nanotubi pristini, anche se sonicati, dopo alcuni minuti tendono a riaggregare e depositarsi quasi completamente sul fondo della soluzione, portando a valori di assorbanza molto più bassi. Il dato relativo all'estratto dei pristini è di 0.06 a.u. (per MWCNTs con diametro 8-15 nm). Va sottolineato che tali misure di assorbanza non possono essere utilizzate per un calcolo quantitativo di concentrazione, ma forniscono un'indicazione relativa utile a confrontare con un'analisi veloce campioni diversi, come confermato dall'andamento rispetto ai valori di disperdibilità (Tabella 2). La lunghezza d'onda a 1000 nm è stata scelta perché in quella regione lo scattering ha un contributo molto minore rispetto alle regioni più energetiche,⁴⁹⁻⁵² tuttavia tale fenomeno non può essere escluso. Inoltre, i CNT sono materiali estremamente disomogenei e non è possibile definirne una assorbività molare univoca.

Tabella 2: nanotubi NT-S, disperdibilità e assorbanza a 1000 nm

Derivato	Disperdibilità in acqua (mg/mL)	Abs 1000 nm
NT-S1	0.15	0.2623
NT-S2	0.12	0.2186
NT-S3	0.14	0.2551

Dai dati riportati in Tabella 2 si evince che non ci sono differenze significative tra i metodi utilizzati in termini di disperdibilità in acqua. Nel resto di questo lavoro di tesi verranno usati i nanotubi NT-S1, che risultano, anche se di poco, più disperdibili.

Eseguendo analisi DLS e di potenziale Z sugli estratti, si possono ottenere altre informazioni sulla tendenza dei nanotubi funzionalizzati ad aggregare. Il DLS è una tecnica che permette di stimare il diametro idrodinamico medio delle particelle in soluzione, e si applica di norma a particelle di forma approssimativamente sferica. Questo ovviamente non è il caso dei nanotubi di carbonio, quindi i valori ottenuti non corrispondono ad un diametro vero e proprio. Tuttavia, considerando anche che i nanotubi in soluzione possono essere parzialmente aggregati e ripiegati su se stessi, la tecnica fornisce un metodo comparativo, che permette di confrontare le dimensioni di tali particelle in soluzione. Naturalmente per i nanotubi funzionalizzati, che formano aggregati più piccoli, ci aspettiamo un raggio idrodinamico medio minore rispetto ai pristini, il cui valore misurato per MWCNT con diametro di 8-15 nm è 200.8 nm. Bisogna anche tenere conto che questo valore è una fotografia del diametro delle particelle subito dopo la procedura per ottenere l'estratto, non tiene conto della diversa stabilità nel tempo.

L'indice di polidispersione fornisce una stima dell'eterogeneità di un campione in quanto a dimensioni. Più è alto e più il campione è dimensionalmente disomogeneo, più è basso e più il campione sarà uniforme. Un valore alto può, in questo caso, essere segnale che dei processi di aggregazione sono in atto.

Le misure di potenziale-Z permettono di studiare la distribuzione di carica superficiale. Poiché le funzionalizzazioni usate possiedono carica negativa, questa dovrebbe venire rilevata nell'analisi.

Tabella 3: nanotubi NT-S, confronto diametro idrodinamico medio, indice di polidispersione, potenziale Z

Derivato	Diam. idrodinamico medio (nm)	PDI	Z-pot
NT-S1	141.6	0.244	-28.2
NT-S2	139,3	0.221	-37.9
NT-S3	140	0.226	-40.3

2.1.2 NT-P: nanotubi funzionalizzati a carica positiva

Il secondo tipo di nanotubi che abbiamo funzionalizzato sono decorati con gruppi funzionali a carica positiva. Un potenziale vantaggio di questa funzionalizzazione risiede nella possibilità di instaurare interazioni con le cariche negative presenti nella doppia parete fosfolipidica delle cellule, migliorando l'adesione. Il metodo è la reazione di Tour e l'anilina utilizzata è la 4-ammino-N,N,N-trimetilanilinio ioduro (Figura 20) mentre per analogia con i derivati solfonati, si sono utilizzati solo i nanotubi pristini con diametro 8-15 nm.

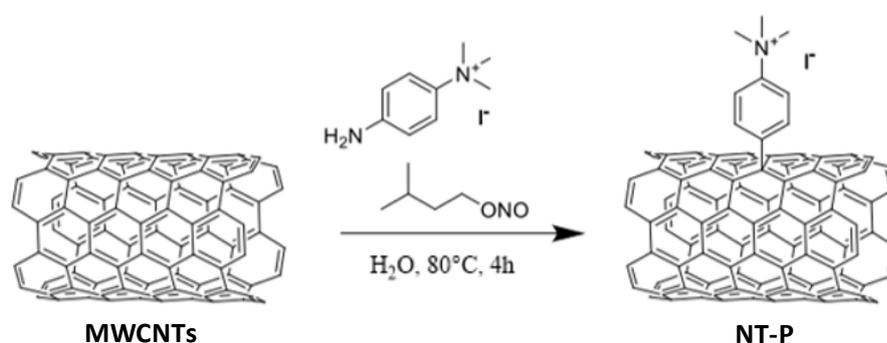


Figura 20: schema di reazione per la funzionalizzazione dei nanotubi di carbonio multi walled con 4-ammino-N,N,N-trimetilanilinio ioduro mediante reazione di Tour

Le condizioni di reazione ottimizzate richiedono l'utilizzo di 0.5 equivalenti di anilina e 0.1 di isopentilnitrito rispetto alle moli di carbonio. Il prodotto è stato caratterizzato secondo le procedure prima descritte.

2.1.2.1 Analisi termogravimetrica

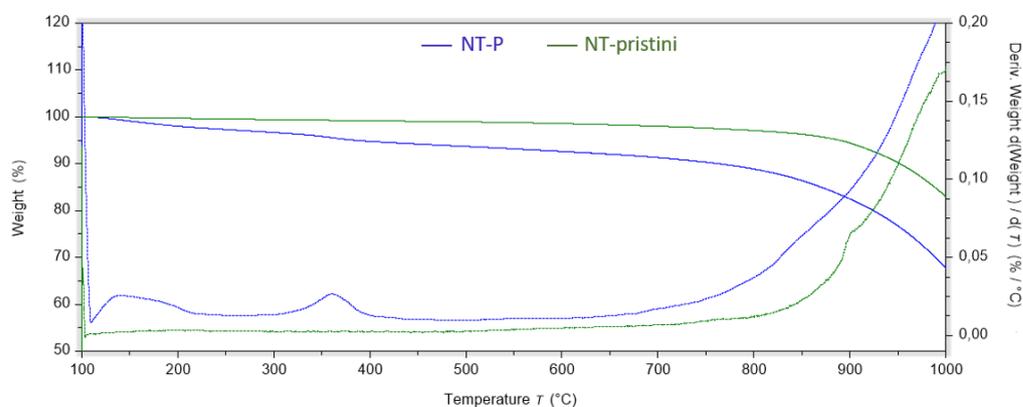


Figura 21: analisi termogravimetrica relativa a nanotubi multi walled funzionalizzati con 4-ammino-*N,N,N*-trimetilaniolinio ioduro (NT-P)

Il confronto di NT-P con i nanotubi pristini mette in evidenza due perdite di peso. La prima, viste le temperature relativamente basse può essere attribuita o alla funzionalizzazione non-covalente o a residui di solvente adsorbito. Tuttavia, poiché si è lavorato in acqua e metanolo, e il metodo di analisi termogravimetrica prevede una isoterma a 100°C della durata di 10 minuti, è probabile la prima ipotesi. Il grado di funzionalizzazione ottenuto per NT-P è inferiore rispetto al derivato solfonato, e questo si traduce in una disperdibilità minore dei nanotubi (Tabella 4).

Tabella 4: confronto funzionalizzazione percentuale e disperdibilità tra NT-S1 ed NT-P

Derivato	Diametro MWCNTs (nm)	Equivalenti rispetto a C	Funzionalizzazione % (a 650°C)	Disperdibilità in acqua (mg/mL)
NT-S1	8-15	0.05 anilina 0.1 IPN	8.013	0.15
NT-P	8-18	0.5 anilina 0.1 IPN	5.806	0.11

La differenza in disperdibilità resta comunque bassa e i nanotubi NT-P restano una valida alternativa ai solfonati. Di seguito, anche le altre analisi vengono confrontate con NT-S1 in Tabella 5.

Tabella 5: confronto diametro idrodinamico medio, indice di polidispersione, potenziale Z e assorbanza a 1000 nm tra NT-S1 ed NT-P

Derivato	Diametro idrodinamico medio (nm)	PDI	Z-pot	UV-Vis-NIR 1000 nm
NT-S1	141.6	0.244	-28.2	0.26
NT-P	189.5	0.345	36.5	0.22

Tutti i confronti sono coerenti con una maggiore funzionalizzazione e disperdibilità di NT-S1.

2.1.3 NT-N: nanotubi a funzionalizzazione neutra

Nell'ultima funzionalizzazione eseguita (Figura 22) i nanotubi sono stati decorati con molecole neutre. L'anilina utilizzata è la 4-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etossi)anilina. L'obiettivo è quello di sfruttare le interazioni dipolari e di legame idrogeno che il gruppo trietilenglicole può instaurare con il solvente, evitando dunque di usare gruppi a catena troppo lunga che finirebbero per avvolgere la nanostruttura. Utilizzare una molecola neutra per funzionalizzare i nanotubi, da un lato fa perdere quel contributo di interazione ipotizzato con le pareti fosfolipidiche cellulari, dall'altro offre la possibilità di creare un materiale nanocomposito il cui riempitivo non è carico. Questo potrebbe risultare utile nel caso di matrici aventi gruppi carichi, che potrebbero interagire in maniera indesiderata con i nanotubi ottenuti in precedenza.

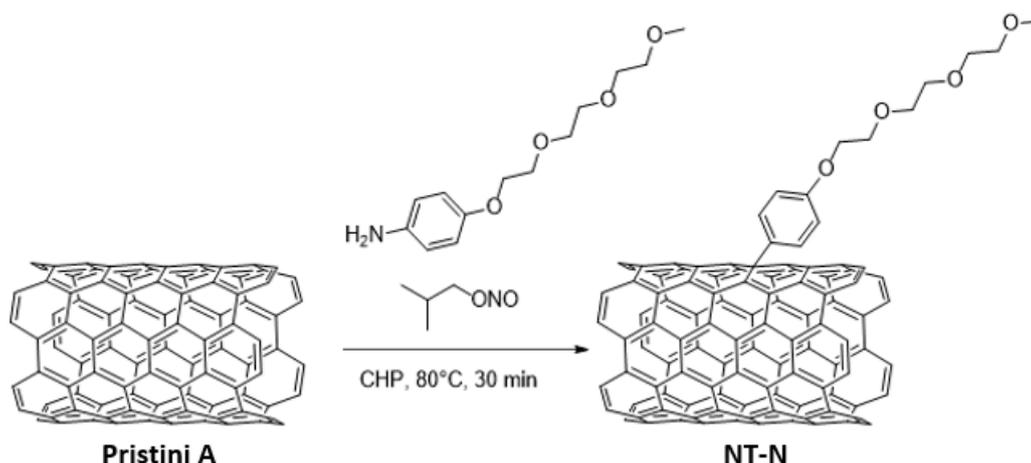


Figura 22: schema di reazione per la funzionalizzazione dei nanotubi di carbonio multi walled con 4-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etossi) anilina mediante reazione di Tour

Per funzionalizzare i nanotubi è stata utilizzata la reazione di Tour. La reazione è stata condotta in CHP per la sua buona capacità di dissolvere sia i nanotubi che l'anilina. La temperatura è stata impostata a 80° e sono stati utilizzati 0.5 equivalenti sia di anilina che di isopentilnitrito, rispetto alle moli di carbonio. Diversamente dalle sintesi precedenti il tempo di reazione è ridotto a 30 minuti.

Tabella 6: confronto funzionalizzazione percentuale a 650°C e disperdibilità tra NT-S1, NT-P ed NT-N

Derivato	Diametro MWCNTs (nm)	Equivalenti rispetto a C	Funzionalizzazione % (a 650°C)	Disperdibilità in acqua (mg/mL)
NT-S1	8-15	0.05 anilina 0.1 IPN	8.013	0.15
NT-P	8-15	0.5 anilina 0.1 IPN	5.806	0.11
NT-N	8-15	0.5 anilina 0.5 IPN	5.581	0.10

Tabella 7: confronto diametro idrodinamico medio, indice di polidispersione, potenziale Z e assorbanza a 1000 nm tra NT-S1, NT-P ed NT-N

Derivato	Diam. idrodinamico medio (nm)	PDI	Z-pot	UV-Vis-NIR 1000 nm
NT-S1	141.6	0.244	-28.2	0.26
NT-P	189.5	0.345	36.5	0.22
NT-N	193.2	0.339	/	0.20

Dal confronto con gli altri derivati ottenuti si osserva come la funzionalizzazione con la 4-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etossi) anilina porti a nanotubi meno disperdibili e con una maggiore tendenza ad aggregare

2.2 Purificazione termica

La funzionalizzazione non-covalente è un approccio talvolta utilizzato per conferire solubilità ai nanotubi, è questo il caso di alcuni tensioattivi o polimeri.⁵³ Tuttavia, considerando l'applicazione finale dei materiali nanocompositi che si vogliono ottenere in questa ricerca, ossia l'utilizzo in ambito biologico, la reversibilità di queste interazioni costituirebbe un problema. Infatti, se le aniline utilizzate (questa è la fattispecie in esame, ma in generale qualsiasi molecola utilizzata come reagente per un metodo di funzionalizzazione) dovessero essere rilasciate in ambiente cellulare, potrebbero risultare dannose. Per prima cosa è stata investigata la natura delle perdite di peso osservate alla TGA, verificando l'ipotesi che una di queste corrisponda alla degradazione dei composti adsorbiti non-covalentemente sulla superficie dei nanotubi. In seguito, è stato testato un metodo semplice e veloce per la purificazione del prodotto rimuovendo le molecole adsorbite. Sono infine state eseguite prove di disperdibilità sul prodotto purificato.

2.2.1 Esperimenti di controllo

Secondo l'ipotesi prima citata, con la reazione di Tour ci si può attendere una miscela di prodotti come riportato nel seguente schema di reazione:

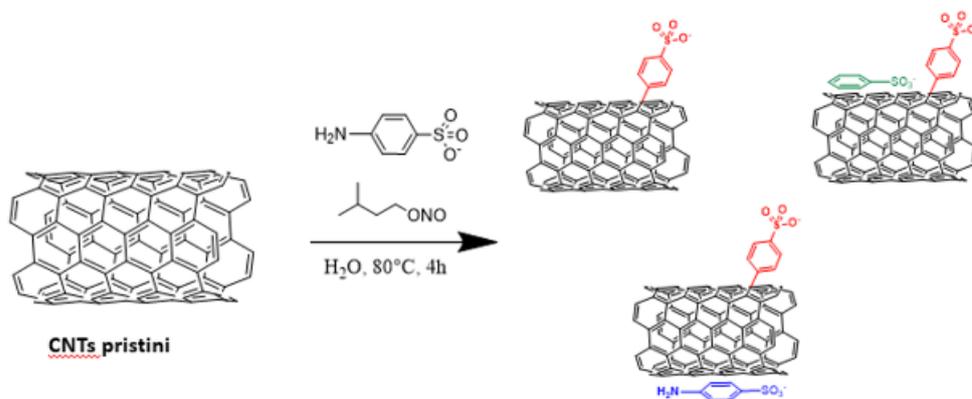


Figura 23: insieme dei prodotti ipotizzati per reazione di Tour con acido solfanilico

La funzionalizzazione covalente è indicata in rosso, mentre quella non covalente in blu per l'anilina e in verde per il benzensolfonato, la cui formazione può essere

ipotizzata come esito collaterale del meccanismo di reazione. Per verificare la veridicità dell'ipotesi abbiamo svolto degli esperimenti di controllo, basati sulla procedura di sintesi di NT-S, omettendo di aggiungere isopentilnitrito, come schematizzato in Figura 24.

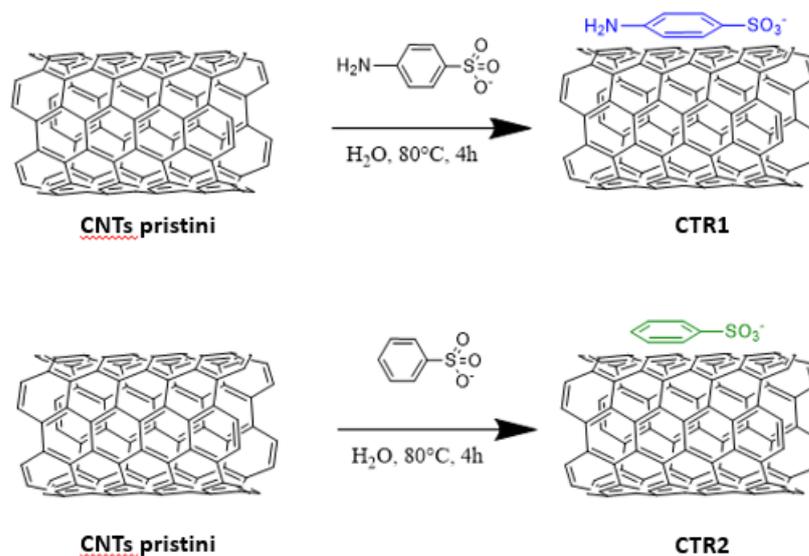


Figura 24: esperimenti di controllo su NT-S, utilizzando sulfanolato (sopra) e benzenosolfonato (sotto)

Le condizioni di reazione sono le stesse utilizzate per la reazione di Tour: solvente, temperatura, concentrazioni e rapporti molari tra reagenti. Tuttavia, data l'assenza di isopentilnitrito, la reazione non avviene.

Una volta ottenuti i prodotti **CTR1** e **CTR2**, è stata eseguita un'analisi termogravimetrica e sono stati preparati gli estratti in modo da valutarne la disperdibilità in acqua. I risultati sono riassunti in Tabella 8 e in seguito sono riportate le curve di decomposizione termica.

Tabella 8 confronto disperdibilità tra uno dei derivati ottenuti mediante Reazione di Tour (NT-S3) e le reazioni di controllo.

Derivato	Condizioni di reazione	Perdita di peso % (100-450°C)	Perdita di peso % (450-650°C)	Disperdibilità in acqua (mg/mL)
NTS3	H ₂ O, 80°C, 4h, 0.5 eq isopentilnitrito	2.693	4,530	0.14
CTR1	H ₂ O, 80°C, 4h, 0.5 eq no isopentilnitrito	3.782	/	ND
CTR2	H ₂ O, 80°C, 4h, 0.5 eq no isopentilnitrito	2.655	/	ND

Già dal confronto visivo si notano differenze significative tra gli estratti ottenuti dalle reazioni di controllo e dalla funzionalizzazione. È evidente ad occhio nudo il diverso grado di dispersione: l'estratto ottenuto dai nanotubi funzionalizzati con la reazione di Tour è uniformemente nero, mentre quelli ottenuti dalle reazioni di controllo presentano una evidente formazione di aggregati: un comportamento simile a quello dei pristini anche se più moderato.

Da questi risultati si può dedurre che le molecole adsorbite contribuiscano in misura trascurabile alla solubilità.

Osservando le curve di decomposizione termica la prima cosa che si nota è che le perdite di peso delle reazioni di controllo, ragionevolmente attribuibili ai composti aromatici adsorbiti sulla superficie dei nanotubi, coincidono con la prima degradazione in NT-S3, in termini di intervallo di temperature. Queste evidenze supportano l'ipotesi che i precursori anilinici, ed eventuali prodotti della loro degradazione, rimangano in parte adsorbiti sulla superficie dei nanotubi anche in concomitanza con la funzionalizzazione covalente. Si è comunque dimostrato che il contributo della componente non covalente alla disperdibilità del prodotto è trascurabile.

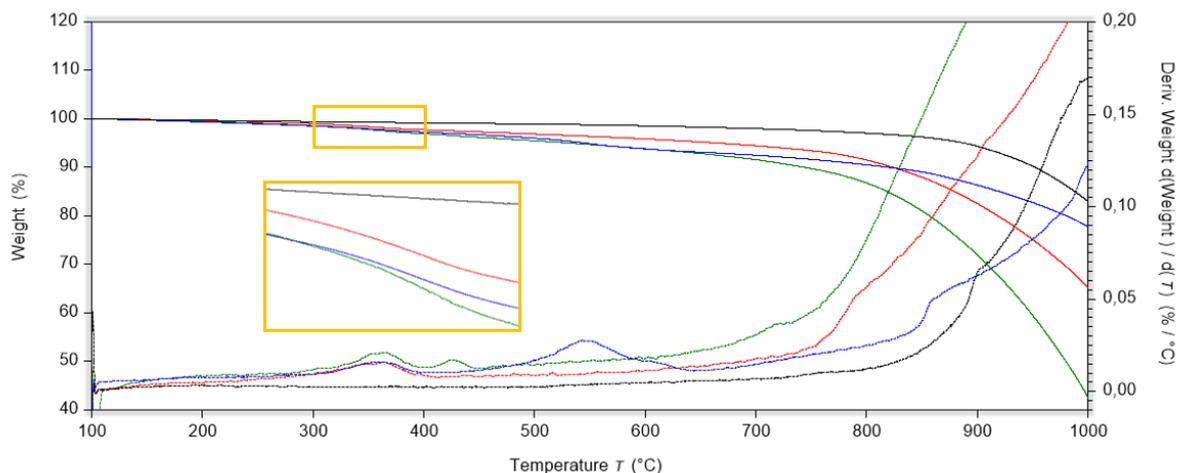


Figura 25: analisi termogravimetrica su reazioni controllo per nanotubi a funzionalizzazione negativa (NT-S3: blu scuro, CTR1: verde scuro, CTR2: rosso, pristini: nero)

Lo stesso studio è stato eseguito sui nanotubi funzionalizzati con molecole cariche positivamente, come riportato in Figura 26:

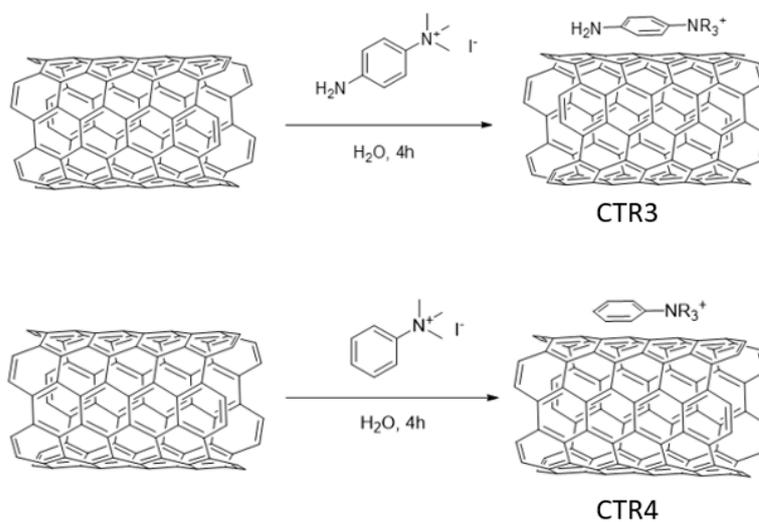


Figura 26: esperimenti di controllo su NT-S, utilizzando 4-ammino-N,N,N-trimetilanilinio ioduro (sopra) e N,N,N trimetilbenzen ammonio (sotto)

I campioni **CTR3** e **CTR4** sono stati analizzati in TGA, come mostrato in Figura 27. Di queste prove, solo l'estratto di **CTR3** sembrava distinguersi leggermente da quello dei nanotubi pristini, e quindi ne è stata valutata la disperdibilità. L'estratto di **CTR4** invece aveva già iniziato a formare aggregati dopo pochi minuti, al pari di quello dei pristini.

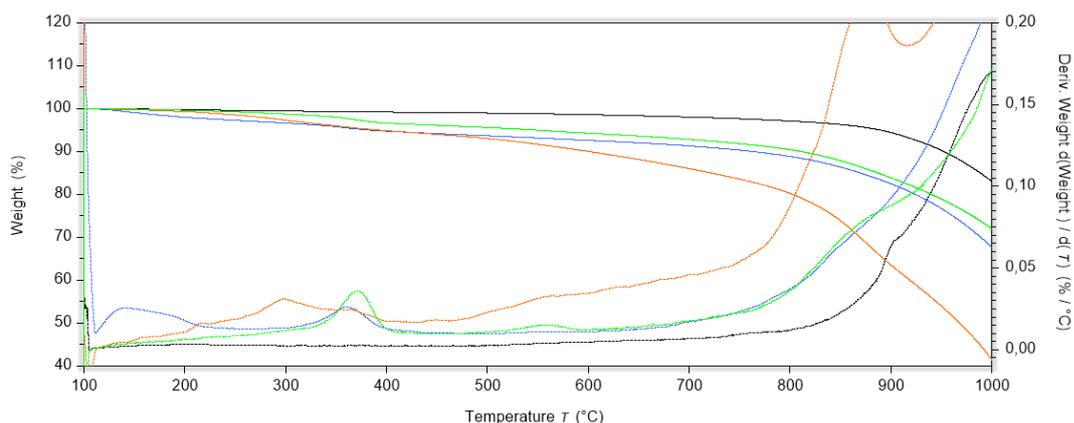


Figura 27: analisi termogravimetrica su reazioni controllo per nanotubi a funzionalizzazione positiva (NT-P: azzurro, CTR3: verde chiaro, CTR4: arancione, pristini: nero)

Dalla sovrapposizione delle curve di decomposizione termica sembrerebbe che la reazione di Tour e **CTR3** portino allo stesso prodotto, mentre la reazione **CTR4** mostra un picco di decomposizione spostato a T inferiori. Tuttavia se si osservano gli estratti è evidente anche ad occhio nudo la differenza tra quello ottenuto da **NT-P** e quelli dei prodotti di controllo, il primo porta ad una dispersione stabile, i secondi tendono a riaggregare molto in fretta. Anche la valutazione della solubilità in TGA conferma quello che si è visto: la solubilità degli estratti di controllo è prossima allo zero e quindi impossibile da valutare in modo preciso.

Tabella 9: confronto disperdibilità tra il derivato NT-P ottenuto mediante Reazione di Tour e le reazioni di controllo.

Derivato	Condizioni di reazione	Perdita di peso % (100-450°C)	Solubilità (mg/mL)
NT-P	H ₂ O, 80°C, 4h, 0.5 eq isopentilnitrito	3.102	0.11
CTR3	H ₂ O, 80°C, 4h, 0.5 eq no isopentilnitrito	3.893	0.05
CTR4	H ₂ O, 80°C, 4h, 0.5 eq no isopentilnitrito	5.894	ND

L'ipotesi che si può trarre da questi esperimenti è che in presenza di isopentilnitrito la maggior parte dell'anilina viene utilizzata per la reazione di Tour, formando legami covalenti, mentre ne resta una parte che viene adsorbita sulla superficie dei nanotubi. In assenza di isopentilnitrito, dati i valori comparabili dei gradi di funzionalizzazione,

si può supporre che l'anilina venga interamente utilizzata per la funzionalizzazione non covalente. La cosa più rilevante che emerge però è che in queste reazioni, con queste funzionalizzazioni la solubilità è data esclusivamente dal contributo covalente, e quindi si può pensare ad una procedura che permetta di rimuovere le aniline adsorbite senza intaccare le proprietà dei nanotubi, evitando il rischio di rilascio di molecole aromatiche nell'ambiente biologico.

2.2.2 Purificazione derivati a carica negativa

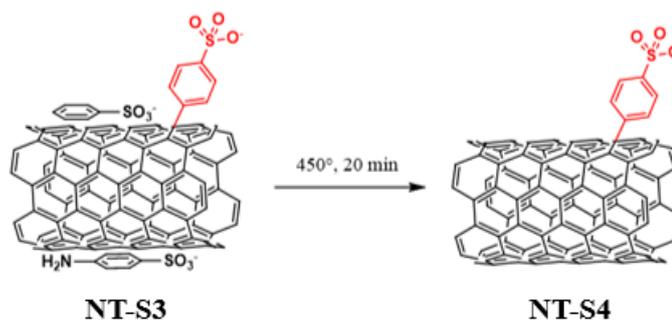


Figura 28: schema di reazione per il processo di purificazione dei nanotubi funzionalizzati a partire da nanotubi funzionalizzati con gruppo solfonato (NT-S3)

Si è quindi sperimentato un protocollo di purificazione termica basato sulla diversa temperatura di rilascio delle molecole adsorbite rispetto a quella di degradazione delle funzionalizzazioni covalenti. Il metodo è stato testato sui derivati solfonati. Un campione di NT-S3 è stato posto in TGA con un programma di riscaldamento fino a 450°C, seguito da isoterma per 20 minuti. Il prodotto è stato recuperato, e sono state eseguite le analisi di disperdibilità e funzionalizzazione.

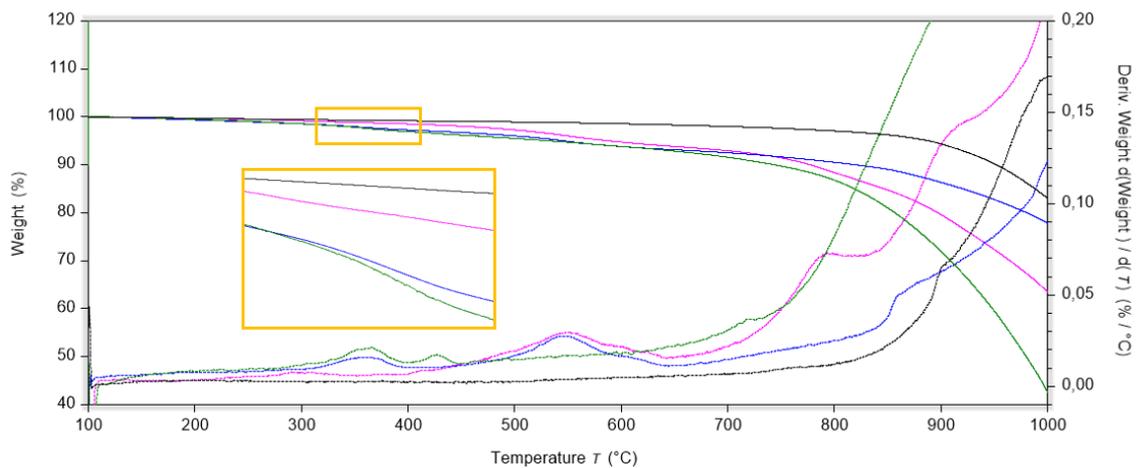


Figura 29: valutazione termogravimetrica di purificazione termica su nanotubi a funzionalizzazione negativa (CTR1: verde scuro, NT-S3: blu scuro, NT-S4: viola, pristini: nero)

Dal confronto delle curve di decomposizione di CTR1, NT-S3 ed NT-S4 (Figura 29) si vede che la perdita di peso che era stata associata alle aniline adsorbite per interazioni non-covalenti non è più presente, quindi il materiale ottenuto è composto esclusivamente da nanotubi funzionalizzati in modo covalente.

Tabella 10: confronto disperdibilità tra un esperimento di controllo e le reazioni di Tour prima e dopo la procedura di purificazione termica

Derivato	Condizioni di reazione	Perdita di peso % (100-450°C)	Perdita di peso % (450-650°C)	Solubilità (mg/mL)
NTS3	H ₂ O, 80°C, 4h, 0.5 eq	2,693	4,530	0.14
CTR1	H ₂ O, 4h, 0.5 eq	3.065	/	ND
NTS4	EV-03 → 450°C	/	4,658	0.15

La solubilità dei nanotubi purificati risulta invariata rispetto a quella di NT-S3 (campione di partenza).

Viene infine, in Tabella 11 riportato il grado di funzionalizzazione calcolato per i derivati sintetizzati:

Tabella 11: vengono riportati i gradi di funzionalizzazione calcolati per i diversi nanotubi funzionalizzati ottenuti

Derivato	Perdita di peso % (100-650°C)	FD
NT-S1	8.013	0.67
NT-S2	9.757	0.85
NT-S3	7.223	0.56
NT-S4	6.028	0.50
NT-P	5.806	0.50
NT-N	5.581	0.48

2.3 Idrogel nanocompositi di alginato

Inizialmente si è sintetizzato un materiale nanocomposito funzionale per la crescita cellulare basandosi sulla chimica dell'alginato: questo, infatti, è ampiamente utilizzato come agente gelante e la sua biocompatibilità è nota.

Tutti i nanocompositi sono stati prodotti in concentrazioni di NaCl fisiologiche, per riprodurre al meglio l'ecosistema cellulare, e per tener conto dell'impatto della forza ionica nella stabilità della dispersione di nanomateriali.⁵⁴

Un problema di cui bisogna tenere conto è la contaminazione. Per lavorare con le cellule è necessario mantenere l'ambiente sterile e per questo motivo i gel sono stati preparati col supporto del gruppo Molbinfo del prof. Francesco Filippini, nel Dipartimento di Biologia. Si è lavorato utilizzando una cappa a flusso laminare, la quale impedisce a batteri e spore presenti nell'aria di contaminare il campione, invalidando le prove cellulari. Inoltre, le soluzioni e gli strumenti vanno sterilizzati prima di essere utilizzati in cappa laminare. I metodi tradizionali utilizzati per la sterilizzazione sono:⁵⁵

- i.* Autoclave a 121°C per 20 minuti
- ii.* Esposizione a luce ultravioletta (ore)
- iii.* Filtri sterili (0.2 e 0.45 µm)

Nell'introduzione abbiamo parlato di due possibili metodi di gelificazione per l'alginato: quello interno e quello esterno. Allo scopo di ottenere un gel uniforme, è necessario utilizzare il metodo a gelificazione interna, più lento. Per questo l'agente reticolante, che in questo caso è lo ione calcio (II), deve essere rilasciato molto lentamente dall'interno della soluzione di alginato. Affinché il rilascio sia lento e controllato, viene usata una soluzione di carbonato di calcio, insolubile in acqua a pH neutro, e introducendo un fattore di rilascio per Ca(II) che rispetti le condizioni appena descritte. Si è scelto di utilizzare Glucono- δ -lactone (GdL), il quale idrolizza rilasciando ioni H⁺, che inducono la decomposizione del carbonato, liberando in soluzione ioni Ca(II). La velocità del rilascio di Ca(II) è quindi governata dalla cinetica di idrolisi del GdL.⁵⁶ Il rapporto molare tra CaCO₃ e GdL deve sempre essere 0.5: in questo modo la soluzione mantiene la neutralità necessaria alla coltura cellulare. Inoltre, la decomposizione del carbonato sviluppa in soluzione CO₂ gassosa, che porta

alla formazione di canali e cavità all'interno del gel. Questa caratteristica è potenzialmente molto utile durante la crescita cellulare, poiché dovrebbe permettere alle cellule di svilupparsi e crescere all'interno di quelle cavità.

Basandoci su un lavoro precedente svolto dal gruppo di ricerca del Dipartimento di Biologia con cui si è collaborato, le concentrazioni di CaCO_3 , GdL, alginato ed NaCl sono state ottimizzate in modo che il gel riproduca le condizioni di pH e forza ionica dell'ambiente cellulare in vivo. La procedura qui schematizzata mostra i passaggi sintetici per il materiale nanocomposito, ed è spiegata nel dettaglio nella parte sperimentale.

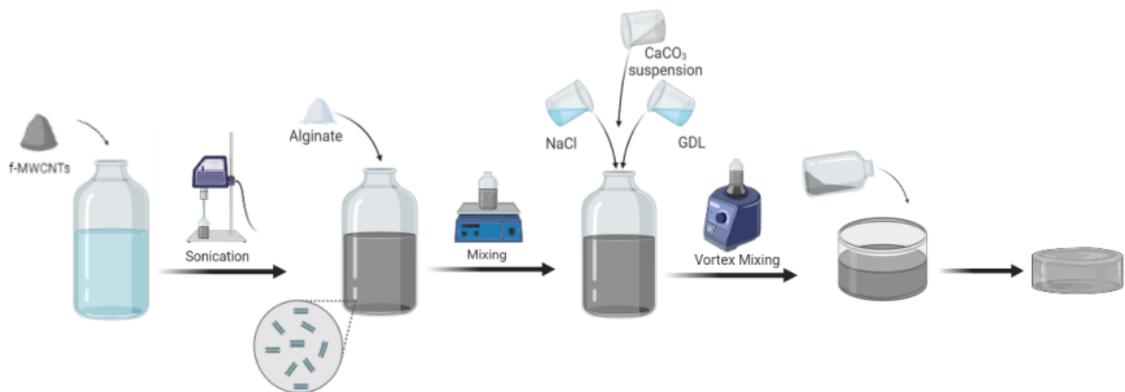


Figura 30: schema del metodo utilizzato per la preparazione di idrogel nanocompositi di alginato

2.3.1 Alginato a bassa viscosità (LV) e ad alta viscosità (HV)

Essendo l'alginato un copolimero a blocchi composto da due zuccheri, le sue caratteristiche di peso molecolare e viscosità dipendono dal rapporto tra i due. Il punto di partenza è stato scegliere le caratteristiche dell'alginato con cui lavorare che da un lato fossero compatibili con i moduli elastici attesi per l'impiego biologico finale, dall'altro basandoci su criteri di praticità, tempistiche di gelificazione. A questo scopo si sono utilizzati due diversi tipi di alginato, uno ad alta e uno a bassa viscosità. Seguendo la procedura spiegata nella parte sperimentale sono stati preparati i due campioni.

Le prime distinzioni si sono osservate già in fase di preparazione: l'alginato HV è risultato più difficile da sciogliere in acqua, a differenza di quello LV. Una volta ottenuti i gel, sono stati fatti riposare per 24 ore in modo da dare il tempo al reticolo di

formarsi completamente. Si è osservato che la gelificazione dei due campioni procede a velocità differenti. Rimuovendo dopo solo 30 minuti lo stampino dal gel HV, il campione aveva già formato un reticolo sufficiente a non deformarsi mentre in quello LV lo stampino non si è potuto rimuovere prima di un'ora e mezza.

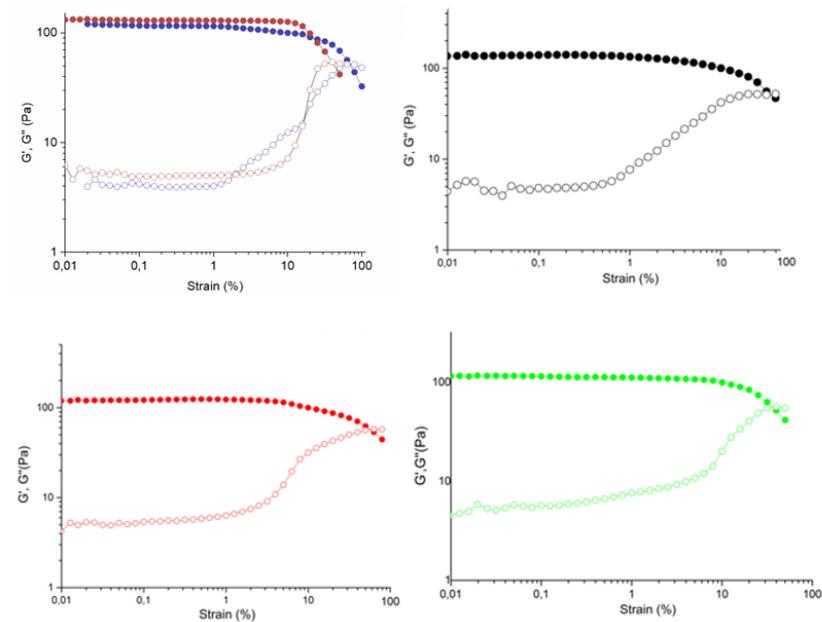
Per valutare le differenze di modulo elastico, parametro di principale interesse, tra i due idrogel ottenuti, sono state effettuate prove reologiche. Queste non hanno evidenziato particolari differenze di modulo elastico tra i due gel ($E_{\text{Alg HV}} = 343,8 \text{ Pa}$; $E_{\text{Alg LV}} = 394,7 \text{ Pa}$). Per entrambi è compreso nel range bersaglio 0.1-1 kPa, quindi si è scelto di proseguire con l'alginato HV, il quale impiega meno tempo a gelificare.

Una volta scelto l'alginato, sono state fatte delle prove per determinare la concentrazione di nanotubi da usare per ottenere il materiale nanocomposito. Sono stati preparati gel a base di Alg HV, con incorporati nanotubi in concentrazioni da 1% a 2% in massa su quella di alginato e su di essi sono state eseguite prove reologiche per valutare come l'inserimento del nano-riempitivo andasse a modificare il modulo elastico del materiale. Queste prove sono state eseguite utilizzando i nanotubi che avevano dato i migliori risultati in termini di disperdibilità, ossia NT-S. L'incorporazione dei nanotubi è avvenuta con successo in tutti i campioni, portando alla formazione di un gel dalla colorazione nera omogenea, indizio che i nanotubi restino dispersi.

1. Alg HV + NT-S 1%
2. Alg HV + NT-S 1,5%
3. Alg HV + NT-S 2%

2.3.2 Prove reologiche

I campioni LV e HV sono stati preparati come descritto nella procedura sperimentale.



*Figura 31: esperimenti di Amplitude Sweep
in alto a sx: confronto Alg HV (in blu) con Alg LV (in rosso); in alto a dx: NT-S 1%;
in basso a sx: NT-S 1.5%; in basso a dx: CNTs 2%*

Nel primo esperimento, amplitude sweep, la geometria esercita uno stress torsionale sul gel, variando gradualmente l'angolo. Il gel resta tale fino a che la curva di G' non collassa su quella di G'' , definendo il "flow point" come il limite di resistenza del gel alla torsione. Nel secondo esperimento, frequency sweep, il gel viene deformato dalla geometria angolare fino a poco prima del flow point (circa 10% prima). In quelle condizioni la geometria inizia a vibrare a diverse frequenze. Se le curve di G' e G'' restano parallele allora si può affermare che il materiale ottenuto si comporta come un gel.

Tabella 12: prove reologiche sui vari idrogel di alginato preparati

Campione	G' (Pa)	G'' (Pa)	Flow point	E (Pa)
Alg HV	114.6	3.7	68.23%	343.8
Alg LV	131.6	5.7	39.78%	394.7
AlgHV + 1% NT-S	138.1	4.8	35.04%	414.3
AlgHV + 1,5% CNTs	120.9	5.0	57.31%	362.8
AlgHV + 2% CNTs	98.2	4.7	35.59%	294.8

Dai dati in Tabella 12 si nota come il segno della variazione di modulo elastico E dipenda dalla concentrazione di nanotubi aggiunta. Quello che ci si aspettava era un valore di modulo elastico crescente, mentre invece dalla reologia si osserva un profilo a massimo, che parte dal valore di 343.8 Pa per Alg HMW, cresce fino a 414.3 Pa con 1% di nanotubi e poi inizia a diminuire fino a 294.8 per il campione 2%. Una ipotesi verosimilmente potrebbe essere che oltre una certa concentrazione i nanotubi, che hanno una struttura molto rigida e ingombrante, diminuiscano le interazioni di cross-linking portando ad un indebolimento della struttura.

2.4 Idrogel di peptidi

2.4.1 Progettazione razionale della sequenza peptidica

Dopo aver concluso che l'alginato non è una matrice adeguata alla crescita cellulare a causa della scarsa adesione, ci siamo dedicati alla progettazione di un peptide che potesse portare all'ottenimento di un idrogel migliore da questo punto di vista. Come già spiegato in precedenza, i peptidi dovrebbero dare gel più biocompatibili proprio perché imitano la costituzione delle matrici extracellulari molto meglio rispetto a qualsiasi polimero.

Si è deciso di lavorare con peptidi corti, contenenti non più di cinque amminoacidi. Il motivo di questa scelta risiede principalmente in questioni pratiche: sono più veloci da progettare, sintetizzare ed eventualmente modificare³⁴. Inoltre, idrogel ottenuti da peptidi a sequenza corta sono molto appetibili per le applicazioni in vivo a causa del loro basso impatto biologico, infatti essendo costituiti da piccoli building-blocks a bassa concentrazione, in seguito alla degradazione hanno buone probabilità di essere espulsi per via renale.⁵⁷

Alla base della scelta degli amminoacidi che andranno a comporre la sequenza peptidica c'è l'alternanza amminoacido idrofobico – amminoacido idrofilico, che porta all'ottenimento di un peptide anfifilico. Questi peptidi, come anticipato in introduzione, presentano una forte tendenza a formare strutture β che aggregano formando fibre, le quali, intrappolando acqua formando il gel.⁵⁸

Le sequenze che verranno sintetizzate contengono almeno un amminoacido aromatico. Questi amminoacidi sono importanti perché portano a interazioni di tipo π - π stacking che, insieme al legame idrogeno, favoriscono l'autoassemblaggio del peptide e la conseguente formazione del gel.⁵⁹⁻⁶¹

Il primo peptide (**P1**), la cui sequenza è AcO-Ala-Lys-Phe-Lys-Ala-NH₂, è mostrato in Figura 32. Gli estremi N e C-terminali sono protetti e la parte polare è costituita da due Lys che a pH fisiologico sono protonate, ma a pH sufficientemente basico sono neutre. Di conseguenza ci aspettiamo che questo peptide possa formare idrogel a pH basico oppure per effetto salino in presenza di sufficienti anioni.

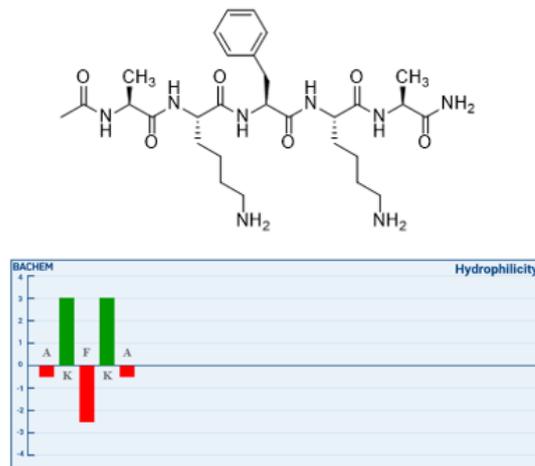


Figura 32: struttura di **P1** e idrofilit  degli AA calcolata utilizzando il sito BACHEM

Il secondo peptide sintetizzato (**P2**)   costruito sulla sequenza HO-Trp-Lys-Trp-Glu-Trp-H che il gruppo di ricerca stava gi  studiando sempre nell'ambito di idrogel peptidici per uso biomedico, con dei primi risultati in termini di gelificazione abbastanza promettenti. Tuttavia, il metodo di gelificazione andava ottimizzato e reso riproducibile.

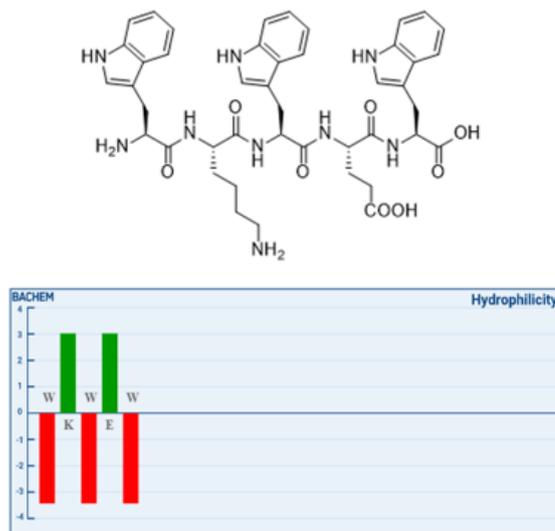


Figura 33: struttura di **P2** e idrofilit  degli AA calcolata utilizzando il sito BACHEM

La parte apolare   costituita da triptofano, il quale secondo alcuni studi   l'amminoacido aromatico che interagisce meglio con i nanotubi di carbonio,⁶² oltre a formare interazioni π - π pi  forti. I residui lisina (pKa=10.79) e glutammico (pKa=4.25) in posizione due e quattro sono rispettivamente carichi positivamente e

negativamente a pH fisiologico; quindi, a questo pH avranno la tendenza ad interagire orientati in modo antiparallelo, favorendo la formazione della struttura β antiparallela tramite interazioni di tipo ionico. Le estremità del peptide sono state lasciate non protette, quindi sono presenti un gruppo amminico e uno carbossilico in più che possono contribuire alle interazioni elettrostatiche tra catene.

2.4.2 Sintesi e caratterizzazione di AcO-Ala-Lys-Phe-Lys-Ala-NH₂ (P1)

Il peptide P1 è stato progettato con le estremità protette, per questo motivo si è utilizzata la resina “Rink Amide”, la quale, alle condizioni di distacco, rilascia il peptide con un gruppo ammidico nel C-terminale. Per la deprotezione del gruppo Fmoc è stata utilizzata una soluzione al 20% di piperidina in DMF. L’attivazione del gruppo carbossilico è stata eseguita con miscela HBTU/HOBt/DIPEA in DMF. Il gruppo amminico al N-terminale è stato acetilato prima del distacco per reazione con anidride acetica in presenza di DIPES. Il distacco dalla resina è stato effettuato con una miscela TFA/TIS/H₂O 95/2.5/2.5.

Il peptide è stato ottenuto come un solido bianco in una resa del 78%. Usare il TFA per lo sblocco di un peptide che contiene gruppi amminici nelle catene laterali, porta all’ottenimento del sale di TFA del peptide. Questo in genere vuole essere evitato, soprattutto se il peptide è destinato ad usi biologici, vista la forte tossicità del TFA. Per fare ciò vengono comunemente utilizzati dei protocolli di scambio anionico. In questo caso, il peptide è stato sospeso in una soluzione di acido cloridrico 0.1M e poi liofilizzato.

Il peptide è stato poi caratterizzato con diverse tecniche, tra le quali ESI-MS, FT-IR e NMR.

Nella Figura 34 si riporta l’analisi HPLC in fase inversa del peptide sintetizzato, in cui non si nota la presenza di altri composti, segno che non sono presenti prodotti secondari della sintesi peptidica.

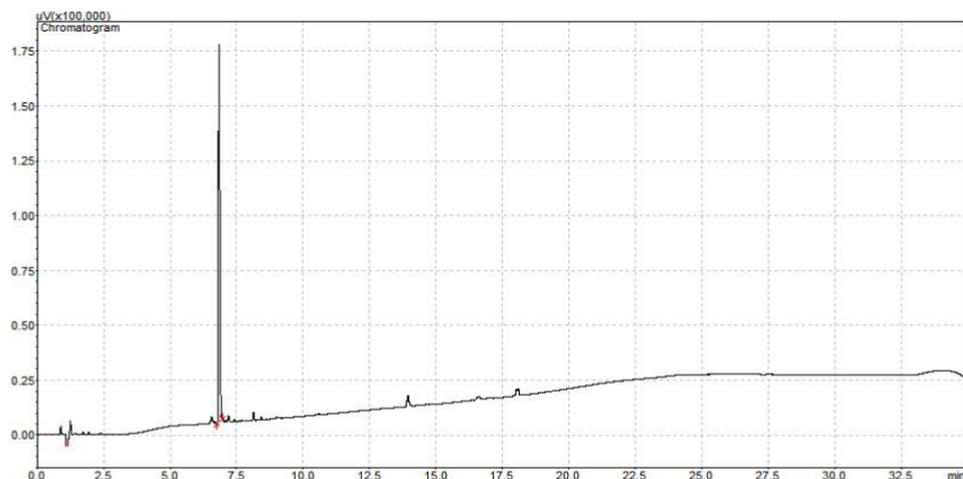


Figura 34: cromatogramma del peptide P1

Lo spettro di massa (Figura 35) mostra la presenza di un picco a m/z 605, corrispondente all'addotto monocarico $[M+H]^+$ e un altro picco a m/z 303 corrispondente all'addotto dicarico $[M+2H]^{2+}$. I due picchi accanto a quello principale, a m/z 627 e 643, sono riconducibili agli addotti $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$.

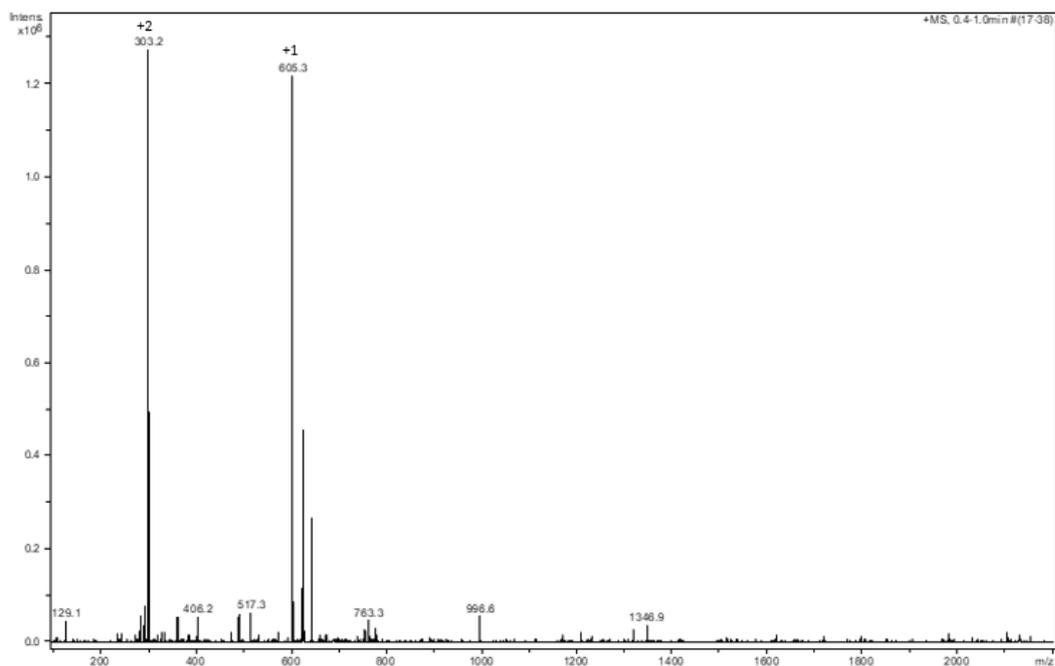
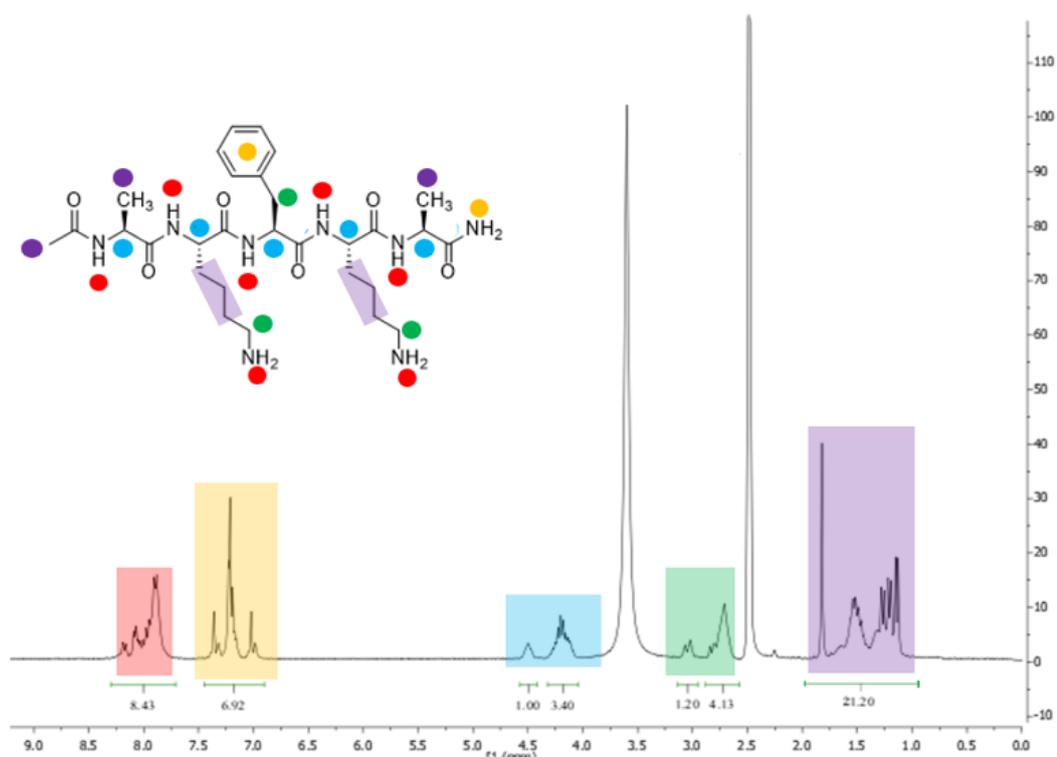


Figura 35: spettro ESI-MS del peptide P1

Di seguito è riportato lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del peptide P1 in DMSO-d_6 .



Spettro ¹H-NMR di P1 (300 MHz, DMSO-d₆)

Nella regione a ppm più alti compresa tra 8.2 e 7.8 ppm si osservano i picchi relativi ai gruppi amminici delle lisine e amidici della catena peptidica. Tra 7.5 e 6.8 ppm si trovano i protoni aromatici della fenilalanina e i segnali del gruppo ammidico all'estremità C-terminale. Nella zona tra 4.5 e 4 ppm sono presenti i segnali dovuti ai cinque protoni legati ai C_α degli aminoacidi. A ppm più alti (4.5 ppm) si può identificare il segnale del protone del C_α relativo alla fenilalanina, deschermato per effetto di anisotropia magnetica dell'anello aromatico. Nella regione tra 3.2 e 2.8 ppm si osservano i picchi relativi a CH₂ della fenilalanina (ppm più alti per vicinanza con l'anello aromatico) mentre i CH₂ prossimali alle ammine delle lisine si identificano a ppm inferiori (2.7-2.6 ppm). Infine, il picco a 1.9 ppm corrisponde ai protoni del gruppo acetile mentre i restanti segnali sono relativi alle catene laterali delle lisine.

Le analisi confermano che il peptide ottenuto è corretto ed ha un grado di purezza sufficiente per essere utilizzato.

2.4.3 Sintesi e caratterizzazione di HO-Trp-Lys-Trp-Glu-Lys-H(P2)

A differenza di **P1**, in questo caso le estremità devono essere entrambe libere, per questo la resina utilizzata è la 2-clorotritil cloruro che permette di rilasciare il peptide come acido carbossilico. Il legame tra il peptide e questa resina si comporta allo stesso modo della sintesi precedente, quindi è molto acido labile e viene scisso facilmente utilizzando TFA. Per l'attacco del primo amminoacido (Trp) non è necessaria la miscela di attivatori in quanto avviene una semplice sostituzione nucleofila al cloruro da parte dell'ossigeno carbossilico, in presenza di DIPEA. Per i successivi coupling è stata utilizzata la miscela attivante HBTU/HOBt/DIPEA in DMF. Il distacco dalla resina è stato invece effettuato utilizzando una miscela TFA/TIS/H₂O/EDT. La scelta di questa miscela per il distacco si deve a che il triptofano, una volta rimosso il gruppo protettore, è molto sensibile all'alchilazione dell'anello indolico da parte dei carbocationi terz-butilici liberati durante la rimozione dei gruppi protettori con TFA. Si rende allora necessario l'utilizzo di altri scavengers più efficaci, normalmente ditioli.⁶³ Il più comune è l'EDT ma in questo lavoro abbiamo utilizzato DTT, un suo analogo che però non presenta lo stesso odore sgradevole.

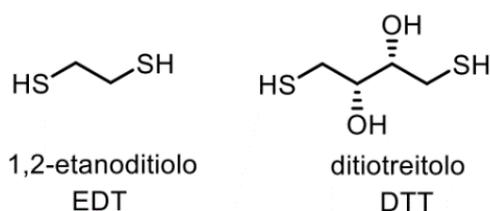


Figura 36: scavengers utilizzati durante la rimozione del gruppo protettore Boc

La rimozione del gruppo Boc del Trp avviene in due passaggi (Figura 37). Il primo, veloce, consiste nella liberazione di catione terz-butile con conseguente rilascio di catione terz-butilico. Il secondo, più lento, consiste nella decarbossilazione che porterà alla catena laterale libera. Al fine di promuovere il rilascio del gruppo carbossilico restante al termine della catena laterale di questi amminoacidi, la cinetica di decarbossilazione viene aiutata tramite liofilizzazione in presenza di acido acetico, un protocollo noto ed utilizzato per questo genere di deprotezioni. Così facendo si rispetta anche il protocollo di scambio anionico, necessario per la completa rimozione del TFA, dannoso per le cellule. Il prodotto è stato ottenuto come solido bianco tramite precipitazione in etere etilico freddo, con una resa del 54%.

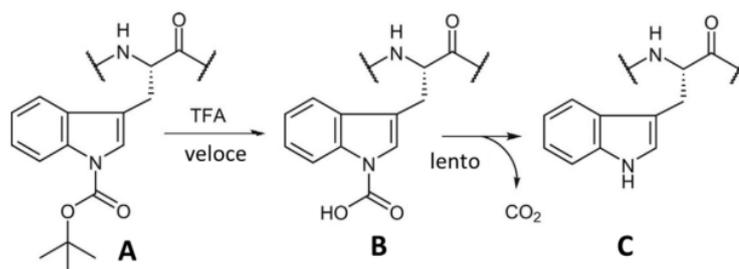


Figura 37: meccanismo di rimozione del gruppo protettore Boc dalla catena laterale del triptofano

Il peptide è stato poi caratterizzato con diverse tecniche, tra le quali ESI-MS, FT-IR e NMR.

Nella Figura 38 si riporta l'analisi HPLC in fase inversa del peptide sintetizzato, in cui non si nota la presenza di altri composti, segno che non sono presenti prodotti secondari della sintesi peptidica.

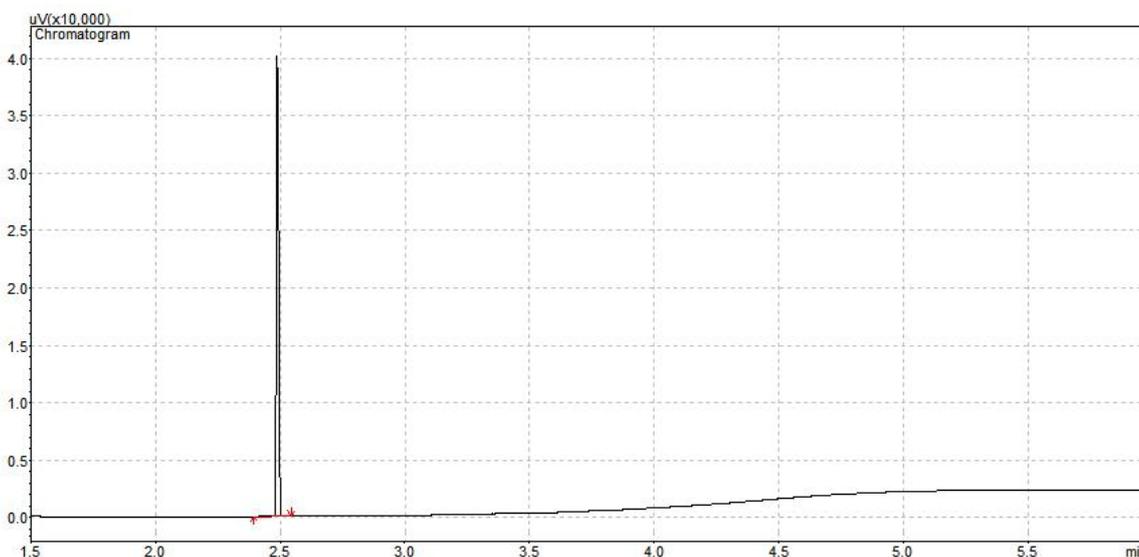


Figura 38: cromatogramma del peptide P2

Lo spettro di massa (Figura 39) mostra la presenza di un picco a m/z 834, corrispondente a all'addotto monocationico $[M+H]^+$ e un altro picco a m/z 417 corrispondente all'addotto dicarico $[M+2H]^{2+}$. Il picco ad 890 è relativo al prodotto di mono terz-butilazione, avvenuta su un Trp nonostante le accortezze utilizzate durante la procedura di sblocco.

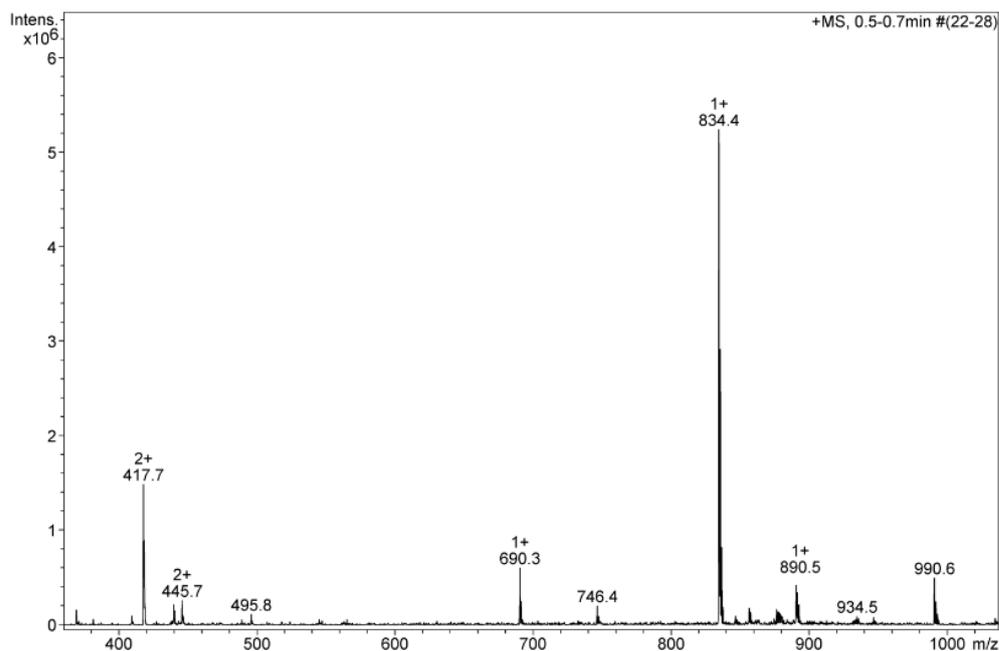
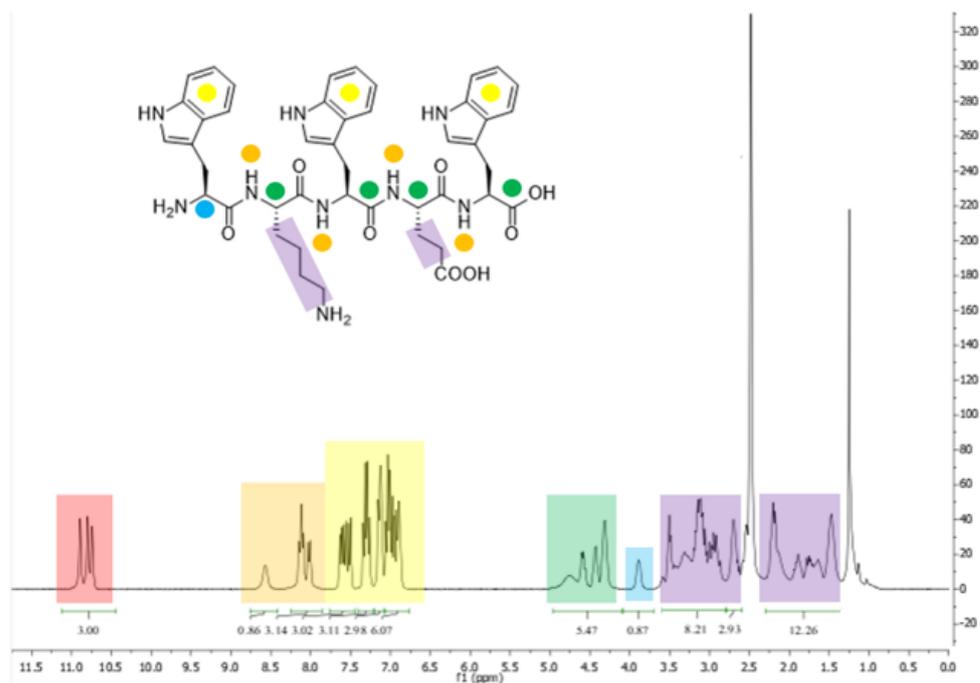


Figura 39: spettro ESI-MS del peptide P2

Di seguito è riportato lo spettro ¹H-NMR del peptide P2 in DMSO-d₆.



Spettro ¹H-NMR di P2 (300 MHz, DMSO-d₆)

Si notano i segnali relativi ai protoni amminici dei tre anelli indolici tra 10.5 e 11 ppm. Tra 9 e 8 ppm si possono osservare i quattro protoni amminici, che precedono la serie dei protoni aromatici tra 8 e 7 ppm. Nella regione centrale dello spettro si osservano i segnali relativi ai protoni in α dei diversi aminoacidi, in cui è stato individuato a ppm 3.85 quello del triptofano N-terminale, più schermato rispetto agli altri. Il primo singoletto a ppm 1.2 è stato attribuito al gruppo terz-butile legato all'anello indolico durante la procedura di stacco.

Le analisi confermano che il peptide ottenuto è corretto ed ha un grado di purezza sufficiente per essere utilizzato.

2.4.4 Prove di gelificazione peptide AcO-AKFKA-NH₂

Le prime prove di gelificazione sono state eseguite sul peptide **P1**.

La sequenza è stata pensata per valutare la possibilità di sperimentare diversi metodi per favorire gelificazione, che dovrebbe comunque dipendere principalmente dall'alternanza AA polare- AA apolare:

1. Variando il pH
2. Utilizzando nanotubi funzionalizzati a carica negativa come agenti di cross-linking

2.4.4.1 Variazione di pH

Osservando il grafico carica netta vs pH riportato nella Figura 40, si vede che a pH < 10 il peptide si trova in forma dicationica poiché sono protonate le ammine delle catene laterali delle due lisine. A pH > 12 le due ammine vengono deprotonate e la carica netta del peptide diventa zero. Dunque, le catene peptidiche finché si trovano in una soluzione con pH inferiore a 10 difficilmente riusciranno ad auto-assemblare a causa delle interazioni elettrostatiche repulsive dovute alle lisine cariche positivamente, il peptide resterà in soluzione. Invece, andando a deprotonare le lisine si eliminano queste repulsioni e le molecole possono avvicinarsi e auto-assemblare per formare eventualmente il gel.

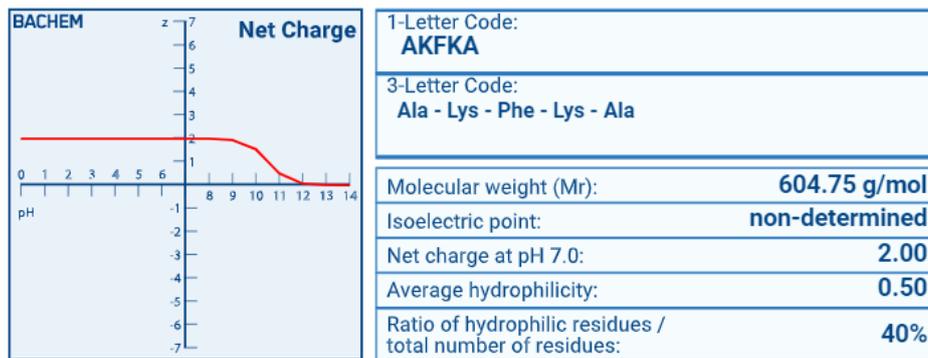


Figura 40: carica netta vs pH per PI, grafico e dati ottenuti con il programma BACHEM

Il peptide è stato dunque sciolto in acqua MilliQ a una concentrazione di 20 mg/mL, e la soluzione è stata poi portata fino a pH 14 senza osservare però nessun accenno alla gelificazione. Non sono state realizzate ulteriori prove, per cui non è da scartare che i gel possano essere ottenuti a una concentrazione maggiore.

2.4.4.2 Utilizzando nanotubi funzionalizzati a carica negativa come agenti di cross-linking

Una delle strategie di gelificazione spesso utilizzate quando si lavora con dei sistemi carichi consiste proprio nel coprire le cariche, che impediscono l'aggregazione per interazioni repulsive, con dei contro-ioni aumentando la concentrazione salina della soluzione.

In questo caso la strategia prevedeva di coprire appunto le cariche positive delle lisine lasciandole interagire con quelle negative dei gruppi solfonati che ricoprono la superficie dei nanotubi. Il tentativo è rappresentato nel seguente schema:

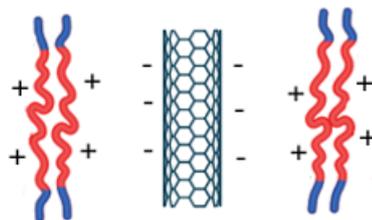


Figura 41: ipotesi di interazione tra nanotubi decorati con gruppi carichi negativamente e catene laterali delle lisine cariche positivamente

Le concentrazioni di nanotubi utilizzate sono le stesse dei lavori con alginato, quindi 1, 1.5 e 2% peso/peso rispetto al peptide. A quanto pare peptide e nanotubo interagiscono, ma non nel modo che ci eravamo aspettati: invece che favorire

l'aggregazione e dunque la formazione del gel, l'interazione ha portato alla precipitazione dei nanotubi NT-S (Figura 37), che erano stati valutati come i più disperdibili ottenuti.



Figura 42: soluzione con P1 e NT-S, l'interazione porta alla precipitazione dei nanotubi

2.4.5. Prove gelificazione peptide HO-WKWEW-H

Prove di gelificazione preliminari: metodo 1

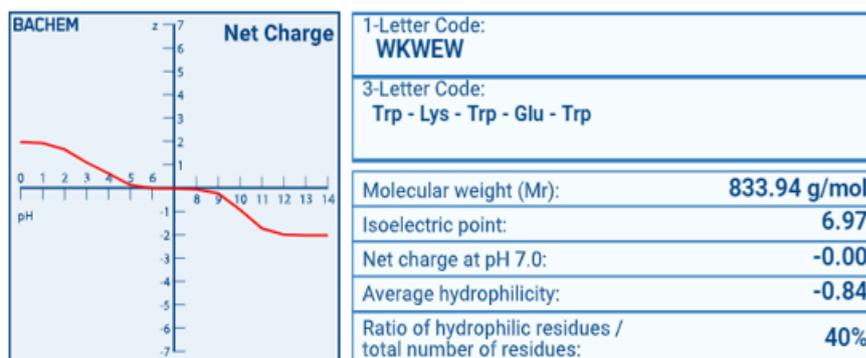


Figura 43: carica netta vs pH per P2, grafico e dati ottenuti con il programma BACHEM

Come mostra il grafico in Figura 43, il punto isoelettrico del peptide si trova a pH 6.9. Il grafico mostra che il peptide ha una carica netta uguale a zero nello intervallo di pH tra 6 e 8. Ciò significa che in una soluzione con pH dentro di questo intervallo, entrambe le ammine sono protonate ed entrambi gli acidi carbossilici sono deprotonati. Sono proprio queste caratteristiche che vogliono essere sfruttate per favorire le interazioni elettrostatiche tra catene disposte in modo antiparallelo. Queste interazioni cooperano con quelle di π - π che si instaurano tra le catene laterali degli amminoacidi

aromatici per direzionare le interazioni tra le catene verso la formazione di una struttura secondaria di tipo foglietto β antiparallelo.

Nel gruppo di ricerca in cui si è svolto il lavoro di Tesi, la abilità di questo peptide per formare idrogel era stata già esplorata ³⁰, arrivando alla conclusione che gli idrogel potevano essere ottenuti semplicemente in acqua MilliQ oppure in miscele acqua Milli Q / tampone fosfato salino. La formazione degli idrogel prevedeva la sospensione del peptide nel solvente acquoso, seguito da sonicazione, eventualmente riscaldamento a 80 °C per 20 minuti e riposo a temperatura ambiente. Erano state tre le metodologie studiate:

- (A) sonicazione 10 minuti, 24h di riposo
- (B) sonicazione per almeno 30 min, 24h di riposo
- (C) sonicazione per almeno 30 min, riscaldamento a 80°C, raffreddamento per 24h

Continuando con questi studi, si è provato a riprodurre gli esperimenti precedenti. Queste tre metodologie sono state applicate in diverse condizioni di gelazione, come riportato nella Tabella 9. Come negli studi precedenti, la formazione dei gel è stata confermata in primis capovolgendo il vial, se il materiale rimane sul fondo e non scivola giù parliamo di gel. Non si è osservata la formazione di gel in tampone PBS salino neanche in miscele acqua/PBS. Si osserva invece la formazione di gel a una concentrazione di 20 mg/mL sia in acqua MilliQ (pH = 5.4), sia in acqua MilliQ che è stata portata a pH 6.9 per aggiunta di una soluzione di NaOH 0.01N. A una concentrazione di 10 mg/mL i gel ottenuti sono deboli, ossia tendono ad assumere caratteristiche di un liquido molto viscoso piuttosto che la compattezza di un gel. Pertanto, si è deciso di lavorare in acqua Milli Q a pH = 6.9 e una concentrazione di 20 mg/mL, utilizzando il metodo C. Queste condizioni saranno di ora in poi definite come Metodo 1.

Tabella 13: prove di gelificazione peptide P1.

N° prova	Concentrazione (mg/mL)	Solvente	Metodo	Risultato
1	10	H ₂ O	C	Gel debole
2	10	PBS	A,B,C	/
3	10	H ₂ O/PBS 1/1	A,B,C	/
4	20	H ₂ O/PBS 4/1	A,B,C	/
5	20	H₂O	C	Gel
6	20	H₂O (pH=6.9)	C	Gel
7	20	PBS	A,B,C	/
8	20	H ₂ O/PBS 9/1	C	Gel debole

Una volta stabilito il metodo di gelazione, sono state effettuate delle prime prove di inserimento dei nanotubi a diverse concentrazioni (Tabella 10), inizialmente più basse di quelle utilizzate per l'alginato. La metodologia prevede di sciogliere il peptide in acqua MilliQ a pH = 6.9, aggiungere i nanotubi, sonicare e seguire i passaggi del metodo 1 introdotti prima. I gel nanocompositi si sono formati con tutte e tre i tipi di nanotubi funzionalizzati testati (neutri, negativi e positivi) sia utilizzando un 0.15% che un 0.5% peso/peso del nanotubo rispetto al peptide. Si è provato anche ad abbassare la concentrazione iniziale di peptide a 10 mg/mL, visto che i nanotubi potrebbero in principio rinforzare il gel, permettendo l'utilizzo di una concentrazione minore di peptide. Sfortunatamente, non si è osservata la formazione di gel in nessun caso a questa concentrazione di peptide.

Tabella 14: prove di gelificazione peptide P2 utilizzando il metodo 1

N° prova	Concentrazione (mg/mL)	Nanotubi	% Nanotubi (rispetto al peptide)	Risultato
9	20	NT-S	0.5	Gel
10	20	"	0.15	Gel
11	10	"	0.5	/
12	10	"	0.15	/
13	20	NT-P	0.5	Gel
14	20	"	0.15	Gel
15	10	"	0.5	/
16	10	"	0.15	/
17	20	NT-N	0.5	Gel
18	20	"	0.15	Gel
19	10	"	0.5	/
20	10	"	0.15	/

Metodo 1: analisi TEM

I campioni ottenuti da queste prove sono stati analizzati al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). In questo caso non è possibile depositare direttamente i gel dovuto all'alta concentrazione di peptide. Si rende necessario operare una diluizione del gel immediatamente prima della deposizione. Una prima osservazione è che nel momento della diluizione i gel sono subito tornati liquidi. A causa, probabilmente, di ciò, le prime analisi non mostrano fibre ma solo agglomerati peptidici. Non vi è traccia di elementi supramolecolari ordinati per il Gel-5, Tabella 10, come mostrato in Figura 44.

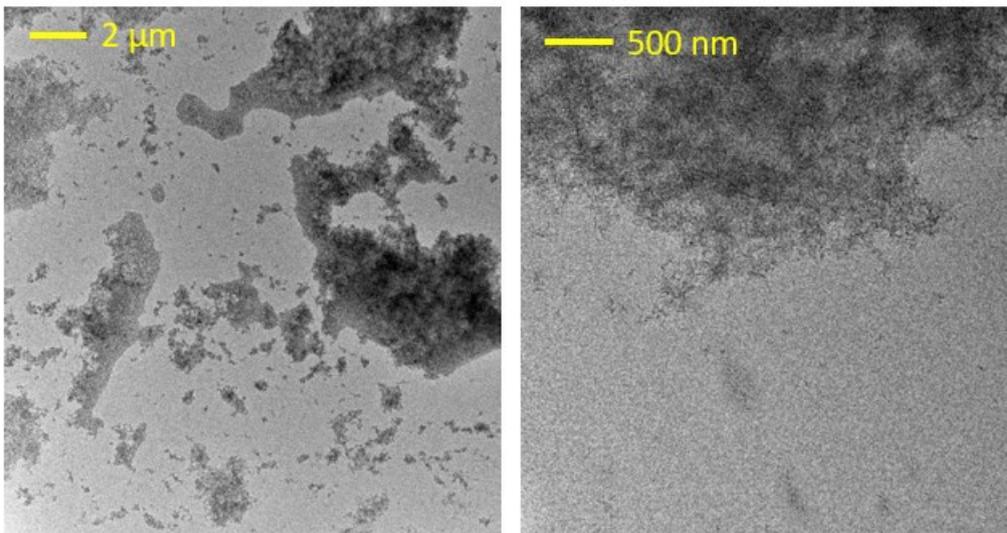


Figura 44: Analisi TEM Gel 5 (Tabella10). Immagini ingrandite: a sx 2 µm, a dx 500 µm

L'assenza di fibre si osserva anche nei campioni con i nanotubi, tuttavia, si sono ottenute informazioni sulla disperdibilità dei nanotubi nella matrice di gel. L'immagine dei gel 9 e gel 14, dimostrano una buona disperdibilità dei nanotubi NT-S, carichi negativamente, e i nanotubi NT-P, carichi positivamente. Infine, nelle immagini del gel 17 contenenti nanotubi neutri, si osservano principalmente aggregati dei nanotubi (Figura 45).

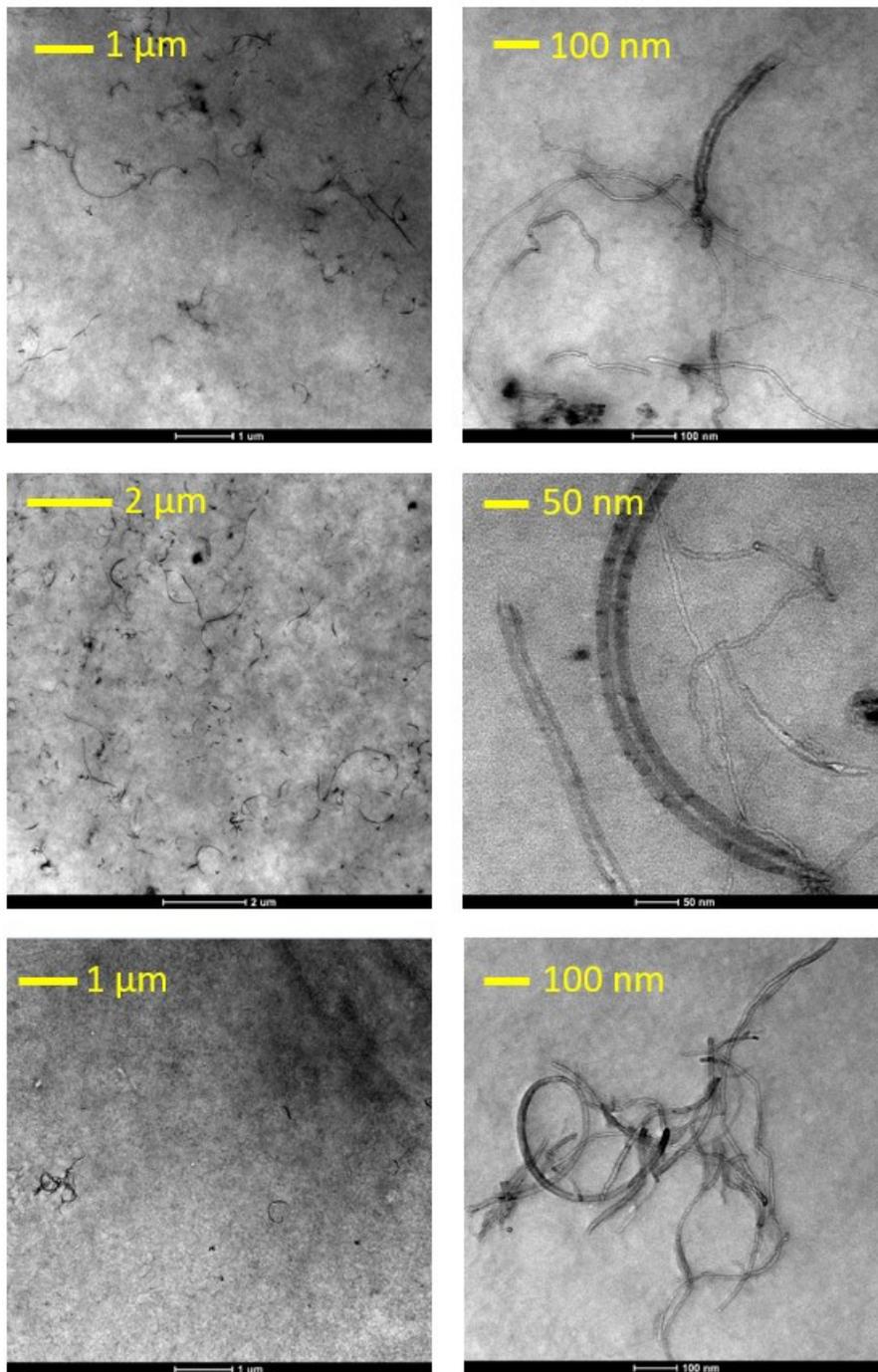


Figura 45: Analisi TEM di gel 9 (in alto), 14 (al centro), 17 (in basso)

La scarsa resistenza all'aggiunta di solvente non risulta essere un problema solo a livello di analisi, ma è anche un ostacolo non trascurabile nella deposizione cellulare, poiché come visto nelle prove cellulari sull'alginato la matrice su cui verranno depositate le cellule deve essere condizionata con il terreno di coltura, e questo richiede una certa resistenza all'aggiunta di discreti volumi di soluzione.

Non solo, oltre ai problemi appena enunciati, con questo metodo di gelificazione non sono stati ottenuti risultati riproducibili. In molti casi nel tentativo di riprodurre i risultati si sono ottenuti invece gel parziali, in cui una porzione di solvente non veniva intrappolata nel gel.

Prove di gelificazione per cambiamento di pH, metodo 2

Per risolvere il problema di riproducibilità riscontrato si è deciso di studiare la formazione dei gel per cambiamento di pH. Il peptide è stato disperso in acqua e la dissoluzione è stata favorita dall'aggiunta di una soluzione di NaOH 0.1M, con l'ausilio di sonicazione. A questo punto la soluzione è stata riportata al pH di partenza (6.9) per aggiunta di un equivalente di HCl. Gel opachi e uniformi sono stati ottenuti in pochi secondi lavorando a una concentrazione di 10 mg/mL di peptide (Tabella 12 e Figura 46). Si è anche provato ad acidificare utilizzando GdL al posto di HCl, nel tentativo di rallentare il processo, ma senza ottenere alcun cambiamento sia nella velocità di formazione che nell'aspetto del gel.

Tabella 15: prove di gelificazione con metodo 2

N° prova	Nanotubi (1% P/P_{peptide})	Acido
21	/	HCl
22	NT-S	HCl
23	NT-P	HCl
24	NT-N	HCl
25	/	GdL



*Figura 46: gele e gel nanocompositi ottenuti con il **metodo 2** ad una concentrazione di 10 mg/mL per tutti i campioni.*

Utilizzando questo metodo sono stati ottenuti con successo anche idrogel nanocompositi con tutti i derivati di nanotubi funzionalizzati disponibili in concentrazione pari al 1% peso/peso rispetto al peptide (Tabella 12 e Figura 46). La procedura prevede sciogliere il peptide in acqua MilliQ per aggiunta di NaOH 0.1 M, aggiungere a questo punto i nanotubi, sonicare brevemente e acidificare per aggiunta di HCl 0.1N.

I gel così ottenuti sono stati analizzati al TEM e si sono fatte le prove reologiche per valutare il modulo elastico.

Metodo 2: analisi TEM

In questo caso, l'immagini TEM degli idrogel peptidici ottenuti per acidificazione sia con HCl sia con GdL, mostrano la formazione di un network fibroso (Figura 47). La struttura dei due idrogel appare molto simile e per questo motivo, almeno per il momento, si è scelto di lavorare con HCl, per questioni di praticità. Per questi campioni non è stato riscontrato nessun problema durante la preparazione del campione per il TEM.

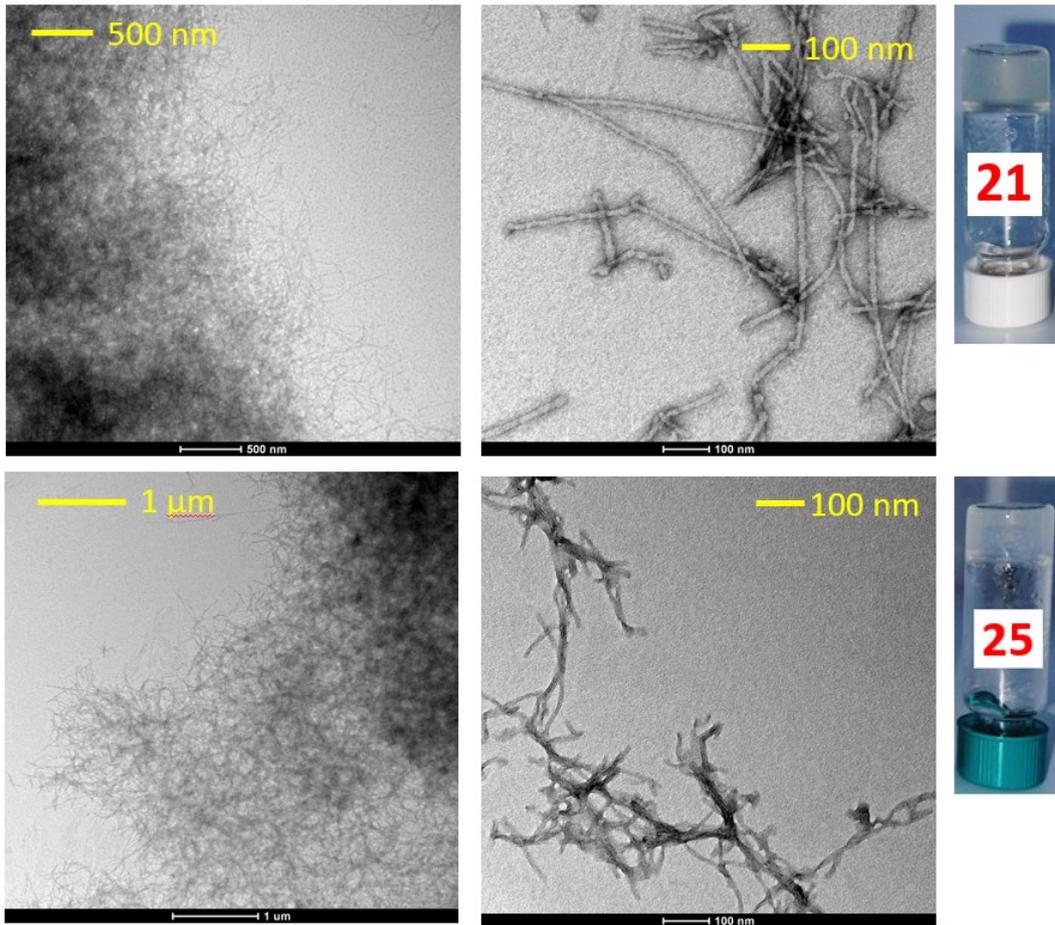


Figura 47: Immagini TEM delle fibre del Gel 21 (in alto) e del Gel 25 (in basso)

Le immagini TEM dei gel contenenti nanotubi di carbonio, mostrano che i nanotubi carichi, campioni 22 e 23, si disperdono bene nella matrice del gel. Questo è ottimo dal punto di vista della citotossicità dei nanotubi, che come già anticipato viene notevolmente amplificata con la formazione di aggregati. Al contrario, i nanotubi neutri mostrano una forte tendenza a formare aggregati anche all'interno dell'idrogel che, oltre a impedire una dispersione omogenea, comporta anche una maggiore citotossicità. Le questioni appena esposte sono illustrate in figura 48.

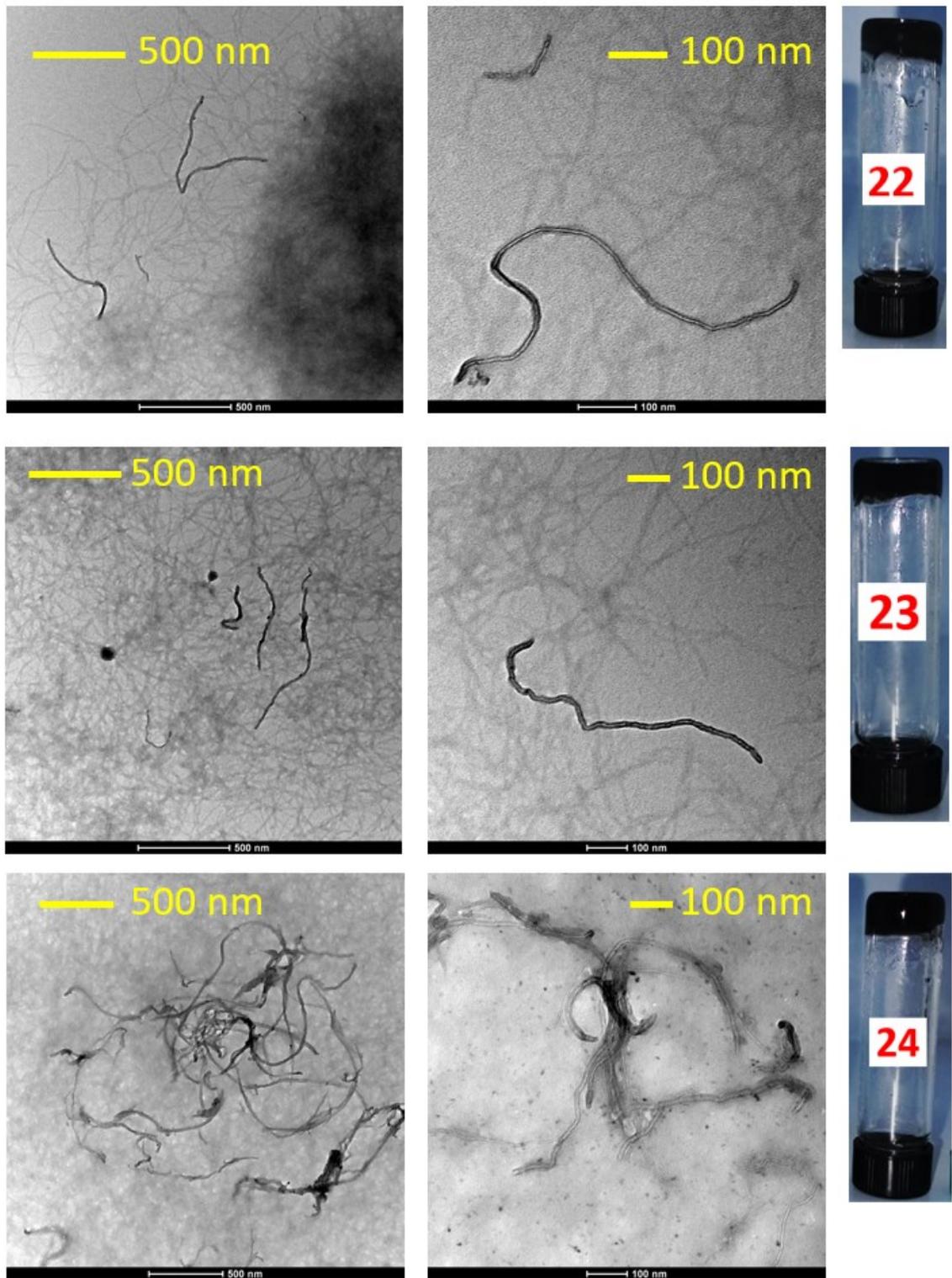


Figura 48 analisi TEM di **Gel 22** (in alto) e **Gel 23** (in mezzo) e **Gel 24** (in basso)

Condizionamento idrogel con terreno di coltura

Prima di depositare le cellule su un gel, è necessario che la matrice venga condizionata con il terreno di coltura. Nel caso degli idrogel, questo processo consiste nel depositare sulla superficie del gel il terreno di coltura appropriato per il tipo di cellule che si desidera far crescere. In questo caso il terreno di coltura è il DMEM-F-12 con 10% di siero fetale bovino (FBS) tamponato con bicarbonato, in cui è presente un indicatore colorimetrico che passa da rosa a giallo quando la soluzione si trova ad un pH inferiore a quello minimo per poter coltivare le cellule. Il processo di condizionamento prevede depositare il terreno di coltura di colore rosa sopra il gel (Figura 49A) e lasciar riposare il campione in modo che il terreno di coltura possa diffondere all'interno del gel. Dopo qualche minuto, si osserva la perdita del colore rosa (Figura 49B), a indicare che il gel è ancora troppo acido. A questo punto si ritira il liquido restante con cura di non danneggiare il gel e si ripete l'operazione. L'operazione viene ripetuta finché rimane la colorazione rosa, ad indicare che siamo nell'intervallo giusto di pH (Figura 49C). Il materiale mantiene la sua natura di gel, come dimostrato capovolgendo un vial contenente il gel dopo il condizionamento con il terreno di coltura (Figura 49).

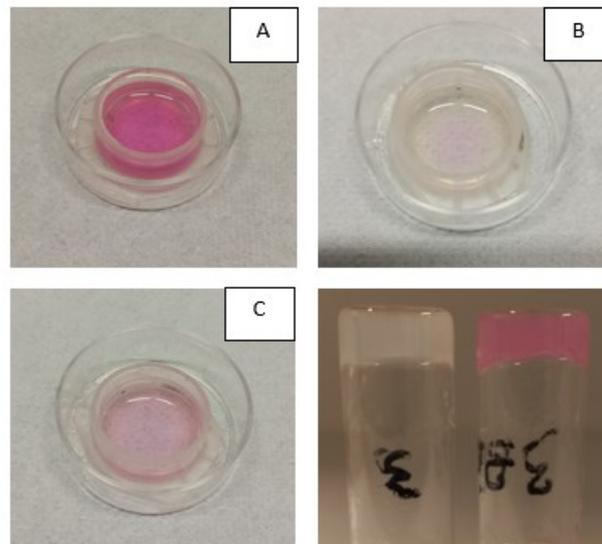


Figura 49: A: DMEM-F-12 depositato su gel A; B: gel A dopo il primo cambio di terreno; C: gel A dopo sei cambi di terreno D: confronto tra gel A prima del trattamento e gel A dopo il condizionamento col terreno di coltura.

Prove Reologiche su idrogel peptidici

In seguito ai risultati emersi dalle analisi al microscopio ottico, si è deciso di non considerare i derivati neutri come una possibile alternativa nell'immediato futuro. Sono quindi state eseguite analisi reologiche sui **gel 21, 22 e 23**.

In Figura 50 si mostra il grafico di frequency sweep per il gel 21. Si osserva che il modulo G' è un ordine di grandezza maggiore di G'' , questo conferma che il materiale è un gel. I valori di G' sono molto più elevati rispetto all'alginato, tra 2000 e 3000 Pa. Contando che il modulo elastico viene approssimato come $3xG'$, la differenza tra i due è ancora più grande. Si è dunque ottenuto un gel con un valore di E di circa 9000 Pa, quando il range ricercato arrivava ad un massimo di 1000 Pa. valori di G' molto più elevati rispetto all'alginato, tra 2000 e 3000 Pa. Poichè il modulo elastico viene approssimato come $3xG'$, la differenza tra i due è ancora più grande. Si è dunque ottenuto un gel con un valore di E di circa 6000 Pa, quando il range ricercato arrivava ad un massimo di 1000 Pa.

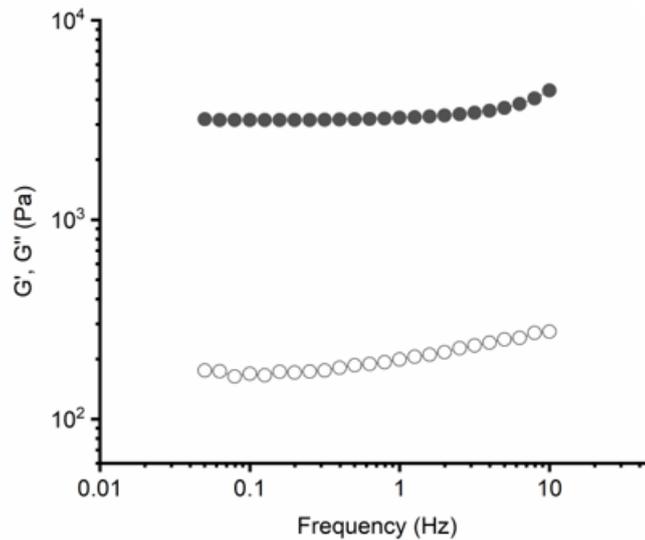


Figura 50: esperimento di frequency sweep sul gel 21.

Ci si è dunque dedicati a studiare come l'inserimento dei nanotubi nella matrice influenzi e proprietà reologiche (Figura 51). Si è osservato che per il Gel B, contenenti nanotubi anionici, il grafico di frequency sweep è sovrapponibile a quello ottenuto per il gel peptidico senza nanotubi. Invece, l'inserimento di nanotubi cationici, Gel C, provoca una leggera diminuzione di G' . Un'ipotesi per spiegare questo insolito

comportamento, nata anche dall'osservazione dei valori di G' ottenuti negli studi sull'alginato, è che utilizzando l'1% di nano-rinforzi si sia già superata quella soglia oltre la quale il riempitivo ostacola la formazione di un gel omogeneo, finendo per indebolire la struttura.

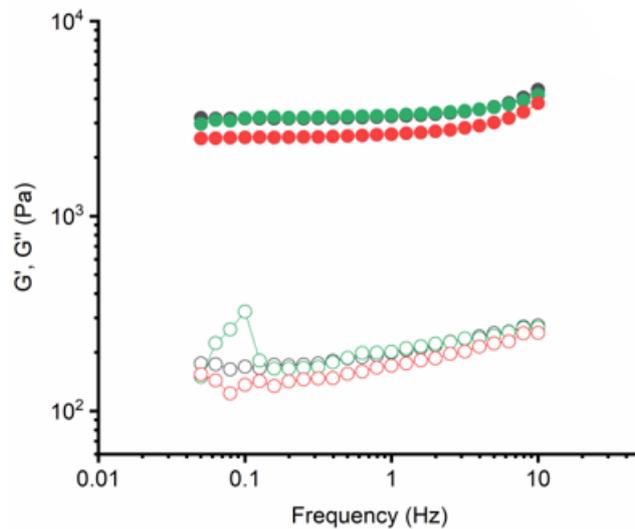


Figura 51: frequency sweep dei Gel 21 (nero), 22 (verde) e 23 (rosso) a confronto.

Anche se le proprietà meccaniche dei gel non sono nell'intervallo ricercato per la nostra applicazione, si è deciso di procedere comunque con le prove cellulari poiché in prima battuta il primo obiettivo del lavoro è verificare se la presenza dei nanotubi migliori adesione, crescita e differenziazione anche nei gel oltre che nelle matrici polimeriche di PLA studiate precedentemente nel gruppo di ricerca.

Prima di procedere con le prove cellulari sono state eseguite le analisi reologiche sul gel condizionato con il terreno di coltura, mostrate in Figura 52. Il grafico di frequency sweep riportato in dimostra, come ci si poteva aspettare, che il gel risulta indebolito dalla procedura di condizionamento e il valore di G' si abbassa, perdendo anche linearità ad alcune frequenze. Tuttavia essendo partiti da valori di G' più alti di quelli desiderati, le conseguenze del condizionamento oltre a non essere dannose potrebbero addirittura risultare favorevoli.

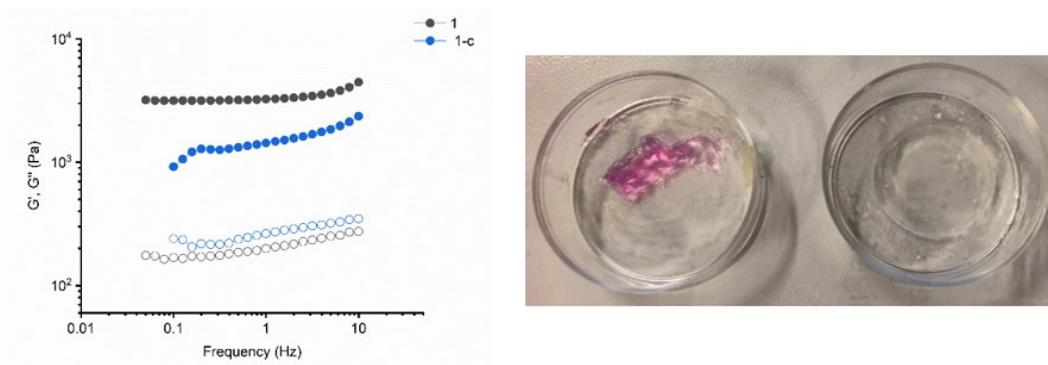


Figura 52: a sx: confronto frequency sweep gel A e gel A post condizionamento; a dx: dall'immagine si vede come l'esperimento abbia completamente distrutto il gel condizionato, segno che la procedura lo ha reso più fragile rispetto al gel normale, che è restato intatto

2.5 Prove cellulari

Tutti gli idrogel nanocompositi ottenuti, sia quelli basati su alginato sia quelli basati sul peptide H-WKWEW-OH sono stati sintetizzati direttamente nei laboratori del professor Filippini, lavorando in modo sterile per non contaminare l'ambiente di crescita cellulare, utilizzando nanotubi NT-S.

Una volta ottenuti degli idrogel con modulo elastico comparabile a quello del sistema nervoso sono stati fatti degli studi preliminari per valutarne la citocompatibilità e la capacità delle cellule di aderirvi, proliferare e differenziare. Come modello è stata usata la linea cellulare immortalizzata SH-SY5Y. Queste cellule offrono diverse caratteristiche che si rivelano ideali per questo tipo di test. Essendo state isolate da una metastasi di neuroblastoma presentano un fenotipo neuronale non maturo, breve tempo di replicazione (27 h), possibilità di essere mantenute in coltura per lunghi periodi di tempo e, al contempo, una ridotta resistenza agli stress ambientali rispetto ad altre linee tumorali.^{64,65} Anche se solo parzialmente differenziate, è noto che queste cellule possono essere indotte verso un fenotipo neuronale più maturo mediante trattamento con acido retinoico.⁶⁶⁻⁶⁹ Anche se in maniera più limitata, è stato osservato che stimoli chimico-fisici, provenienti dall'ambiente extracellulare possono iniziare questo processo, il che rende queste cellule utili anche per valutare eventuali effetti degli hydrogel sul differenziamento.⁷⁰

2.5.1 Prove cellulari utilizzando Idrogel di Alginato

Se è vero che la chimica dell'alginato nella formazione di idrogel è nota e semplice, d'altra parte si conosce la sua scarsa propensione a favorire l'adesione cellulare.⁷¹ Per questo, si è scelto di inserire nella miscela da gelificare additivi che interagiscono con le pareti cellulari aiutando l'adesione, questi vengono definiti fattori di adesione. Quelli utilizzati per queste matrici di alginato sono gelatina e polilisina, fattori di adesione generici, non specifici per la linea cellulare utilizzata.

Tutti i seguenti idrogel sono stati ottenuti seguendo la procedura riportata nella sezione sperimentale. Gelatina e polilisina sono state aggiunte uno step prima del GdL, le concentrazioni sono quelle comunemente utilizzate per 1 mL di gel. Le seguenti prove sono illustrate in Figura 53.

1. Gel HMW
2. Gel HMW + gelatina (7 μ L)
3. Gel HMW + polilisina (0.7 μ L)
4. Gel HMW + gelatina (7 μ L) + polilisina (0.7 μ L)
5. Gel HMW + gelatina (70 μ L) + polilisina (7 μ L)
6. Gel HMW + gelatina (70 μ L) + polilisina (35 μ L)
7. Gel HMW + gelatina (70 μ L) + polilisina (70 μ L)

Gli idrogel, ottenuti in ambiente sterile, sono stati lasciati riposare 24 ore in incubatore a 37°C, con umidità e pressione di CO₂ controllate. Prima della deposizione cellulare sono sempre stati condizionati con il terreno di coltura DMEM-F-12.

Sono state seminate 50 mila cellule (neuroblastoma) per gel e osservato il risultato a 24 ore dalla semina previa staining con calcein (che rende fluorescenti le cellule vive).

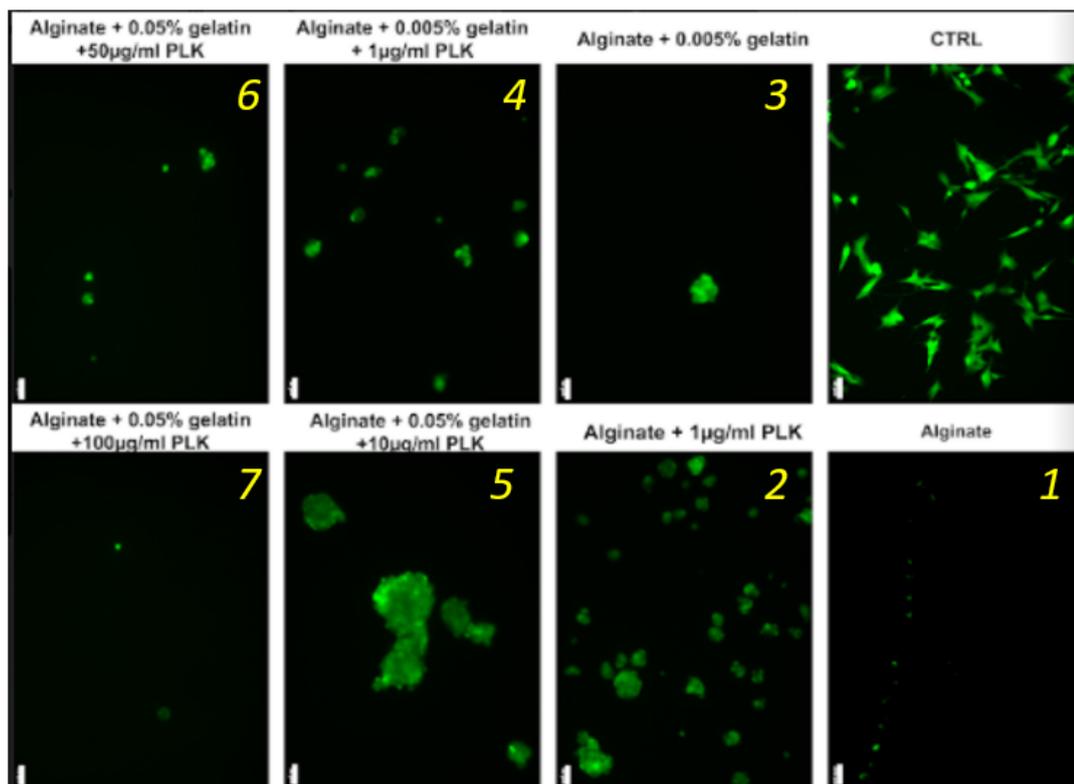


Figura 53 colture cellulari su scaffold di alginato + fattori di adesione

Come mostrato in Figura 53 (CTRL), quando queste cellule aderiscono ad un substrato solido tendono ad appiattirsi su di esso assumendo un aspetto epiteliale con cellule che crescono a cluster e da cui si possono estendere processi che possono arrivare a 75-100 μm . Al contrario, in caso di mancata o scarsa adesione le cellule rimangono in sospensione dove assumono forma sferica e tendono ad aggregare tra loro formando cluster. Come si può vedere dalla figura solo le cellule di controllo risultano adese al substrato, mentre in ogni altra condizione l'adesione si è rivelata scarsa. Questo è confermato anche dal ridotto numero di cellule osservate sui gel rispetto al controllo: inizialmente in tutte le condizioni è stato seminato lo stesso numero di cellule, ma la maggior parte è stata rimossa durante il trattamento con la calcein, cosa che non accade quando le cellule crescono in adesione. È comunque interessante notare che il trattamento con calcein-AM, oltre a rendere fluorescenti le cellule (e quindi più facilmente visibili) permette anche di valutarne qualitativamente la vitalità. Infatti, la calcein-AM è un composto che penetra le membrane cellulari e che non emette fluorescenza quando eccitata a 495 nm. Il processamento da parte di esterasi cellulari la converte in una forma attiva, con picco di eccitazione a 495 nm ed emissione a 515

nm, che non può attraversare le membrane. Cellule morte o in apoptosi perdono sia l'integrità di membrana sia l'attività esterasica e, di conseguenza, non possono essere colorate dalla calcein.⁷² Il fatto che le poche cellule osservate sui gel fossero fluorescenti indica una ridotta tossicità dei gel almeno in termini di potenziali variazioni di pH o osmolarità del mezzo.

2.5.2 Prove cellulari su matrici nanocomposite di algiato in presenza ed in assenza di fattori di adesione generici

Basandoci sui risultati delle prove reologiche e su considerazioni di tossicità legate alla concentrazione dei nanotubi, abbiamo scelto di procedere con le prove cellulari usando nanotubi funzionalizzati con NT-S1 all'1% in peso rispetto all'algiato, per vedere se questi potessero essere punti di ancoraggio cellulare anche in assenza di fattori propri nella matrice polimerica.

1. Gel HV+ NT-S 1%
2. Gel HV+ NT-S 1% + gelatina (70 μ L)
3. Gel HV+ NT-S 1% + polilisina (7 μ L)
4. Gel HV+ NT-S 1% + gelatina (70 μ L) + polilisina (7 μ L)

Le prove cellulari con in materiali nanocompositi non hanno portato nessun miglioramento nell'adesione. Probabilmente in futuro, per rendere l'algiato una matrice utilizzabile sarebbe necessario uno studio approfondito di fattori di adesione più specifici.

2.5.3 Prove cellulari su idrogel di peptidi

Gli stessi test sono stati effettuati su idrogel basati su peptidi per valutare se una differente matrice possa favorire una maggiore adesione pur mantenendo modulo elastico compatibile con quello del sistema nervoso. Come si può vedere dalla Figura 54 (GEL), questi scaffold mostrano un'adesione migliorata: sebbene non distesi, i cluster di cellule non sono in sospensione ma adesi al substrato e alcuni piccoli processi si possono osservare nelle immagini in campo chiaro. È possibile che la natura peptidica di questi gel favorisca l'adesione più di quanto non faccia l'algiato, che è un substrato noto per le sue proprietà refrattarie all'adesione cellulare.

Nonostante gli idrogel peptidici favoriscano l'adesione più di quelli basati su algiato le caratteristiche del gel vanno ulteriormente migliorate per permettere il loro utilizzo

come piattaforme di differenziamento “autonome”. In questo senso una maggiore adesione potrebbe essere favorita dall’aggiunta di motivi RGD nella formulazione del peptide, mentre fattori differenziativi potrebbero essere dati dall’utilizzo di elementi IKVAV o NOG.⁷³⁻⁷⁵

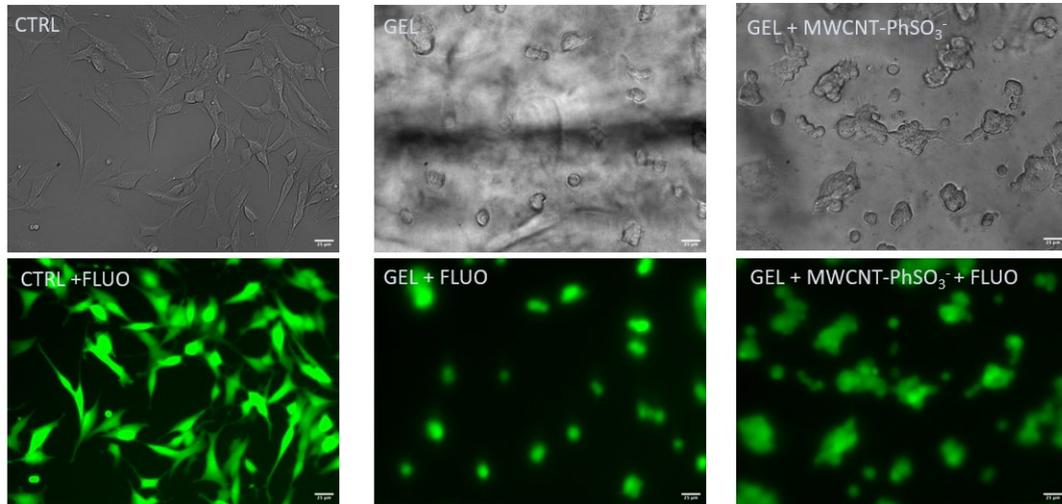


Figura 54: prove cellulari idrogel di peptide P1 + NT-S

Conclusioni

In primo luogo, è stata indagata la possibilità di funzionalizzare covalentemente nanotubi di carbonio per la loro compatibilizzazione in matrici biocompatibili. I derivati dei nanotubi sono stati ottenuti utilizzando una reazione di diazotizzazione, nota come reazione di Tour. In questo modo sono stati ottenuti tre derivati con gruppi funzionali dalle differenti proprietà di carica: nello specifico un gruppo solfonico (NT-S), un ammonio quaternario (NT-P) e un gruppo trietilen glicolico (NT-N). I derivati hanno dimostrato un notevole miglioramento della disperdibilità in solvente acquoso rispetto ai nanotubi pristini, nonché una scarsa tendenza a riaggregare, anche a distanza di mesi. I risultati migliori sono stati ottenuti utilizzando i nanotubi NT-S ed NT-P, mentre NT-N mostrano una maggiore tendenza alla riaggregazione, che ha reso complicato il loro utilizzo in ambiente cellulare per questioni di citotossicità. Per quanto riguarda le matrici, il modello da cui si è partiti è l'alginato, i cui grandi vantaggi consistono nella facilità di utilizzo e lavorazione, che permettono di modulare le proprietà reologiche dell'idrogel affinché siano comparabili con quelle del tessuto nervoso, oltre ad essere facilmente disponibile ed economico. Il grande svantaggio dell'alginato, motivo per il quale viene raramente utilizzato, e mai da solo, per le prove cellulari, è la sua scarsa propensione all'adesione delle cellule. Per tali ragioni in questa tesi si è tentato di migliorare questo aspetto disperdendo all'interno della matrice nanotubi funzionalizzati e fattori di adesione cellulare generici. Sono stati ottenuti ottimi risultati in termini di proprietà reologiche, con valori di modulo elastico dello stesso ordine di grandezza del tessuto nervoso; tuttavia, non si è osservata nessuna adesione cellulare. Dunque, si è deciso di modificare la natura della matrice, concentrandosi sull'utilizzo di peptidi corti auto-assemblanti. Tali peptidi sono stati progettati in funzione di eventuali interazioni deboli sia con i nanotubi di carbonio funzionalizzati che con le pareti cellulari. Le prove di gelificazione del secondo peptide sintetizzato hanno dato esiti positivi, anche per quanto riguarda l'incorporazione dei nanotubi. Le prove reologiche hanno mostrato valori di modulo elastico di un ordine di grandezza superiori rispetto ai gel di alginato e al tessuto nervoso, ma comunque molto più adatti rispetto, ad esempio, a matrici a base polimerica. Le prove di biocompatibilità svolte presso il Dipartimento di Biologia hanno mostrato per il gel peptidico nanocomposito notevoli miglioramenti rispetto alle matrici a base di alginato in termini di adesione, che rappresenta il primo passo per la

valutazione dell'effetto di nano-riempitivi sulla crescita cellulare. Le cellule depositate su matrici peptidiche, infatti, a differenza di quelle depositate su alginato, non sono apparse semplicemente sospese, ma sono state incorporate con successo nella matrice nanocomposita.

Tuttavia non si è ancora riusciti a far sì che l'adesione portasse ad una crescita e ad un differenziamento cellulare. Come prospettive per il futuro, ci si è proposti di utilizzare come base il lavoro svolto sugli idrogel di peptidi ottenuti, aggiungendo fattori di adesione specifici per le cellule nervose oppure sintetizzando peptidi che includano nella struttura tali fattori, da utilizzare per la preparazione di nuove matrici nanocomposite a base di CNT.

3. Parte sperimentale

3.1 Reagenti

Solventi	Fornitore
Metanolo	Sigma-Aldrich
CHP	Sigma-Aldrich
Etere dietilico	Sigma-Aldrich
Diclorometano	Sigma-Aldrich
DMF	Sigma-Aldrich
4-metil piperidina	TCI

Resine	Fornitore
2-CTC	Iris Biotech
Fmoc-Rink Amide	Iris Biotech

CNTs	Fornitore
MWCNTs (d < 8 nm)	ACS
MWCNTs (d = 8-15 nm)	ACS

Reagenti	Fornitore
Acido solfanilico	Sigma-A
isopentilnitrito	Sigma-A
GdL	Sigma-A
Sodio idrossido	Scharlau
Carbonato di calcio	Riedel-de-Haen
Sodio alginato	specialIngredients
HBTU	Sigma-A
HOBt	Sigma-A
DIPEA	Sigma-A
Fmoc-Ala-OH	Sigma-A
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Sigma-A
Fmoc-Phe-OH	Sigma-A
Fmoc-Trp(Boc)-OH	Sigma-A
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	TCI

3.2 Strumentazione

Risonanza magnetica nucleare (NMR)

Tutti gli spettri NMR sono stati acquisiti con uno spettrometro Bruker AC-300, che opera a 300MHz per ^1H e 75 MHz per ^{13}C . In seguito gli spettri sono stati processati usando il software Mestrenova.

Spettrometria di massa (ESI-MS)

Tutti gli spettri di massa sono stati acquisiti usando uno spettrometro di massa a trappola MSD SL di Agilent Technologies. Per le analisi sono state preparate soluzioni 10^{-5} e 10^{-4} M di peptide in H_2O MilliQ. Sono stati iniettati 20 μL a corsa, usando acqua acida come eluente a una velocità di flusso di 0.05 mL/min. La pressione del nebulizzatore durante l'analisi era tenuta a 20 psi, il flusso di gas a 5 L/min e la temperatura a 325°C.

Cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC)

Le analisi HPLC sono state eseguite per mezzo dello strumento Shimadzu LC-10AD, con rivelatore UV SPD-20A fissato a 217 nm. La colonna utilizzata è una C18 Agilent Eclipse Plus a fase inversa. Solvente A: 95% H_2O + 0.1% TFA; solvente B: CH_3CN 95% + 0.1% TFA. Il flusso è mantenuto costante a 1 mL/min. I campioni sono stati preparati a una concentrazione di 1 mg/mL, diluiti 5 a 1 e filtrati utilizzando un filtro per siringhe di 0.22 μm .

Analisi termogravimetrica (TGA)

Per le misurazioni termogravimetriche è stata usata la TGA Q5000IR, di TA Instruments. Le analisi in aria e in azoto sono state eseguite con una isoterma a 100°C, a cui è seguita una isoterma della durata di 10 minuti per rimuovere tutte le tracce di solvente residuo e successivamente una rampa di temperatura (10°C/min) fino a 1000°C. Le analisi in azoto sono state eseguite con lo stesso metodo. Per le misure di disperdibilità dei nanotubi in acqua il metodo prevede una isoterma a 100°C, della durata di 20 minuti. Il dato di disperdibilità è stato ottenuto dal peso del campione al termine dell'isoterma. Le analisi sono state processate con il software TA Analysis.

Scattering dinamico (DLS)

Le misure DLS sono state eseguite usando lo strumento Zetasizer Nano S, della Malvern Instruments. Il materiale da impostare nel software dello strumento è lattice di polistirene (RI = 1.590, Abs = 0.010), e l'angolo di misura è 173°. Le analisi sono state svolte a temperatura ambiente, in acqua, usando cuvette di plastica dal cammino ottico di 1 cm. Il dato finale si ottiene dalla media di tre misure, ciascuna composta da 11 corse. I dati sono stati elaborati usando il software Zetasizer.

Potenziale Zeta

Per le misure di potenziale zeta è stato usato lo strumento Zetasizer Nano S, della Malvern Instruments. Il materiale da impostare nel software dello strumento è lattice di polistirene (RI = 1.590, Abs = 0.010). Le misure sono state fatte a temperatura ambiente, usando NaCl 0.2 mM come disperdente, in una cella apposita. Il dato finale è la media di tre misure. I dati sono stati elaborati usando il software ZetaSizer.

Spettrofotometria UV-Vis-NIR

Gli spettri UV sono stati acquisiti tra 280 e 1400 nm usando uno spettrofotometro Variant Cary 5000. Le misure sono state fatte a temperatura ambiente, usando cuvette di quarzo dal cammino ottico di 1 cm, con una velocità di scansione di 300 nm/min e una larghezza di banda spettrale pari a 2 nm. Gli spettri sono stati elaborati usando il software Matlab.

Microscopia a trasmissione elettronica (TEM)

Le immagini TEM sono state acquisite con un microscopio Tecnai G2 (FEI). Per le analisi TEM una piccola porzione di gel è stata trasferita in una provetta e diluita con qualche goccia di acqua milliQ. 25 µL della soluzione sono stati depositati su una griglia da 400 mesh, precedentemente resa idrofobica tramite rivestimento di carica. Alcuni campioni sono stati marcati con uno stain radioattivo per ottenere un miglior contrasto nelle immagini.

Sonicatore a punta

Per disperdere i nanotubi in soluzione è stato usato il sonicatore Misonix 3000, con punta in titanio. La soluzione di nanotubi viene sonicata in una vial di vetro, indipendentemente dal tempo, per intervalli 3 secondi on e 3 secondi off, in modo da non surriscaldare troppo la soluzione e da non danneggiare la struttura dei nanotubi.

Sonicator a bagno

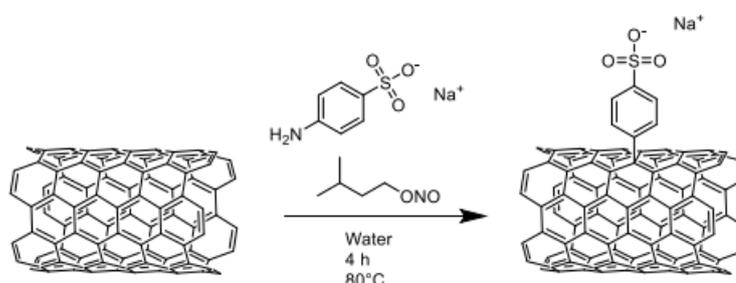
Il sonicator usato è un Bandelin SONOREX, riempito di acqua distillata. La potenza è di 320 W, la frequenza RF 35 kHz.

Centrifugazione

Per determinare la disperdibilità dei nanotubi in acqua è necessario usare una procedura che alteri le condizioni del sistema il meno possibile. Per questo viene usata la centrifuga IEC CL 10, della Thermo ELECTRON CORPORATION, termostata a 20°C. Le soluzioni di nanotubi sono tutte state centrifugate a 3500 rpm, per 10 minuti.

3.3 Funzionalizzazione nanotubi di carbonio

3.3.1 Sintesi di NT-S1: funzionalizzazione con acido solfanilico



	Mw [g/mol]	Densità [g/mL]	Peso (mg)	Volume [mL]	Moli [mmol]
MWCNTs (diametro 8-15 nm)	12.01	/	49.7	/	4.14
Acido solfanilico	173.19	/	35.8	/	0.207
Isopentilnitrito	117.15	0.872	48.5	0.0584	0.414
Acqua MilliQ	18.01	0.997	/	8	/

Nanotubi MWCNTs, (49.7 mg, 4.14 mmol di C) sono stati dispersi in acqua (5 mL) forzando la disaggregazione con un sonicator a punta per 10 minuti (intensità 6W, 3 secondi on 3 secondi off). Per favorire la dissoluzione di acido solfanilico (0.05 eq) in acqua (3 mL) sono stati aggiunti 206 µL di una soluzione di NaOH 1 M (1 equivalente di acido solfanilico). Tutte le operazioni sono state eseguite sotto flusso costante di N₂ usando un pallone a tre colli, per mantenere un'atmosfera inerte. La miscela di

reazione è stata scaldata fino a 80° C usando bagno ad olio e termocoppia. A questo punto viene aggiunto isopentilnitrito (58.4 µL, 0.1 eq). Dopo 4 ore, il riscaldamento è stato spento e la miscela di reazione è stata raffreddata aggiungendo 20 mL di metanolo a temperatura ambiente. I nanotubi dispersi sono stati filtrati usando un filtro a membrana (Millipore PC 0.45µm) e lavati con 5 step da 100 mL di H₂O MilliQ e 5 da 100 mL di metanolo.

Perdita di peso (110-450°C. N₂): 2.847%

Perdita di peso (450-650°C. N₂): 5.166%

Disperdibilità in acqua: 0.15 mg/mL

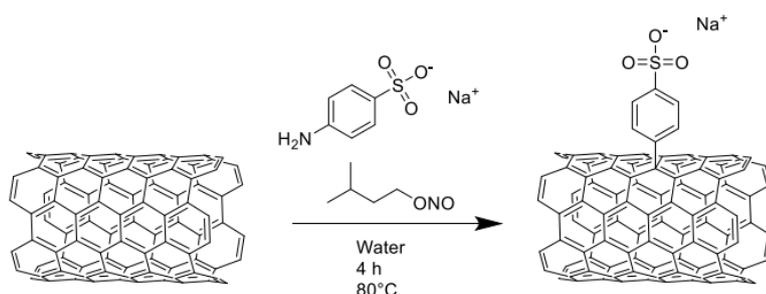
Diametro idrodinamico medio: 141.6 nm

Indice di polidispersione: 0.244

Potenziale Z (0.5 mS/cm): -28.2 mV

Assorbanza UV-NIR (1000 nm): 0.26

3.3.2 Sintesi di NT-S2: Funzionalizzazione con acido solfanilico



	Mw [g/mol]	Densità [g/mL]	Peso (mg)	Volume [mL]	Moli [mmol]
MWCNTs (diametro < 8 nm)	12.01	/	49.7	/	4.14
Acido solfanilico	173.19	/	35.7	/	0.207
Isopentil-nitrito	117.15	0.872	48.5	0.0584	0.414
Acqua MilliQ	18.01	0.997	/	8	/

Nanotubi MWCNTs, (49.7 mg, 4,14 mmol di C) sono stati dispersi in acqua (5 mL) forzando la disaggregazione con un sonicatore a punta per 10 minuti (intensità 6W, 3 secondi on 3 secondi off). Per favorire la dissoluzione di acido solfanilico in acqua (3 mL) sono stati aggiunti 208 μ L di una soluzione di NaOH 1 M (1 equivalente di acido solfanilico). Tutte le operazioni sono state eseguite sotto flusso costante di N₂ in un pallone a tre colli per mantenere un'atmosfera inerte. La miscela di reazione è stata scaldata fino a 80° C usando bagno ad olio e termocoppia. A questo punto viene aggiunto isopentilnitrito (58.4 μ L, 0.1 eq). Dopo 4 ore, il riscaldamento è stato spento e la miscela di reazione è stata raffreddata aggiungendo 20 mL di metanolo a temperatura ambiente. I nanotubi dispersi sono stati filtrati usando un filtro a membrana (Millipore PC 0.45 μ m) e lavati con 5 step da 100 mL di H₂O MilliQ e 5 da 100 mL di metanolo.

Perdita di peso (110-450°C. N₂): 3.607%

Perdita di peso (450-600°C. N₂): 6.150%

Disperdibilità in acqua: 0.12 mg/mL

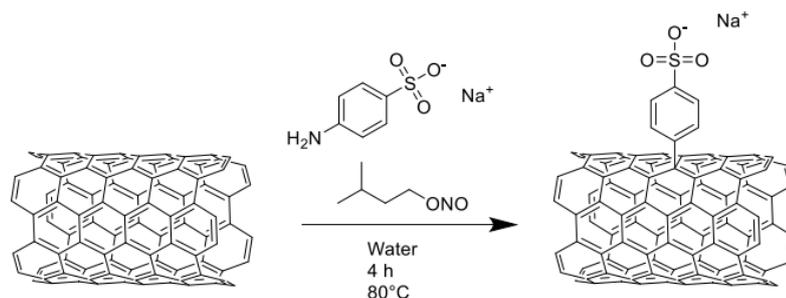
Diametro idrodinamico medio: 145.8 nm

Indice di polidispersione: 0.219

Potenziale Z (0.5 mS/cm): -37.9 mV

Assorbanza UV-NIR (1000 nm): 0.21

3.3.4 Sintesi di NT-S3: funzionalizzazione con acido solfanilico, 0.5 equivalenti



	Mw [g/mol]	Densità [g/mL]	Peso (mg)	Volume [mL]	Moli [mmol]
MWCNTs (diametro 8-15 nm)	12.01	/	50.1	/	4.17
Acido solfanilico	173.19	/	361,2	/	2.08
Isopentil-nitrito	117.15	0.872	488	0.559	4.17
Acqua MilliQ	18.01	0.997	/	8	/

Nanotubi MWCNTs, (50.1 mg) sono stati dispersi in acqua (5 mL) forzando la disaggregazione con un sonicatore a punta per 10 minuti (intensità 6W, 3 secondi on 3 secondi off). Per favorire la dissoluzione dell'acido solfanilico in acqua (3 mL) sono stati aggiunti 206 μ L di una soluzione di NaOH 1 M (1 equivalente di acido solfanilico). Tutte le operazioni sono state eseguite sotto flusso costante di N₂ per mantenere un'atmosfera inerte. La miscela di reazione è stata scaldata fino a 80° C usando bagno ad olio e termocoppia. A questo punto viene aggiunto isopentilnitrito (559 μ L, 1 eq). Dopo 4 ore, il riscaldamento è stato spento e la miscela di reazione è stata raffreddata aggiungendo 20 mL di metanolo a temperatura ambiente. I nanotubi dispersi sono stati filtrati usando un filtro a membrana (Millipore PC 0.45 μ m) e lavati con 5 step da 100 mL di H₂O MilliQ e 5 da 100 mL di metanolo.

Perdita di peso (110-450°C. N₂): 3.607%

Perdita di peso (450-600°C. N₂): 6.150%

Disperdibilità in acqua: 0.14 mg/mL

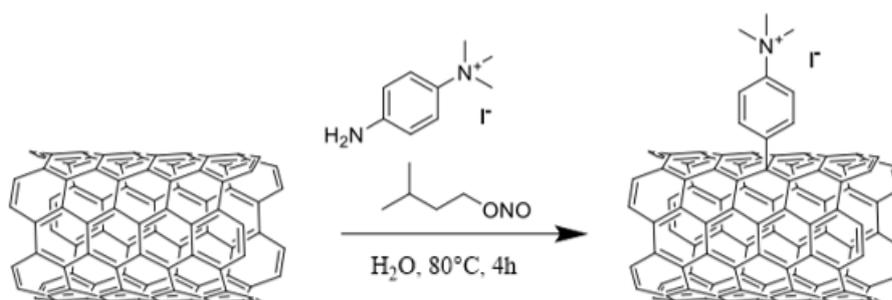
Diametro idrodinamico medio: 140 nm

Indice di polidispersione: 0.226

Potenziale Z (0.5 mS/cm): -40.3

Assorbanza UV-NIR (1000 nm): 0.255

3.3.5 Sintesi NT-P: funzionalizzazione nanotubi con 4-ammino-N,N,N-trimetilanilinio ioduro



	Mw [g/mol]	Densità [g/mL]	Peso (mg)	Volume [mL]	Moli [mmol]
MWCNTs (d 8-15 nm)	12.01	/	40.0	/	3.33
4-ammino-N,N,N-trimetilanilinio ioduro	278.136	/	46.4	/	1.67
Isopentil-nitrito	117.15	0.872	/	0.233	1.67
Acqua MilliQ	18.01	0.997	/	12	/

Nanotubi MWCNTs, (40.0 mg) sono stati dispersi in acqua (6 mL) forzando la disaggregazione con un sonicatore a punta per 10 minuti (intensità 6W, 3 secondi on 3 secondi off). L'anilina (46.6 mg, 0.5 eq) è stata sciolta in acqua (6mL e aggiunta alla miscela di nanotubi). Tutte le operazioni sono state eseguite sotto flusso costante di N₂ per mantenere un'atmosfera inerte. La miscela di reazione è stata scaldata fino a 80° C usando bagno ad olio e termocoppia. A questo punto viene aggiunto isopentilnitrito (233µL, 0.5 eq). Dopo 4 ore, il riscaldamento è stato spento e la miscela di reazione è stata raffreddata aggiungendo 20 mL di metanolo a temperatura ambiente. I nanotubi

dispersi sono stati filtrati usando un filtro a membrana (Millipore PC 0.45 μ m) e lavati con 5 step da 100 mL di H₂O MilliQ e 5 da 100 mL di metanolo.

Perdita di peso (100-450°C. N₂): 5.806%

Disperdibilità in acqua: 0.11 mg/mL

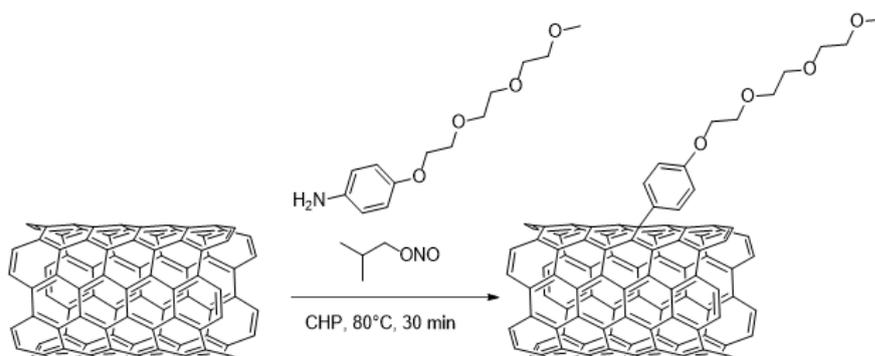
Diametro idrodinamico medio: 189.5 nm

Indice di polidispersione: 0.345

Potenziale Z (0.5 mS/cm): 36.5 mV

Assorbanza UV-NIR (1000 nm): 0.22

3.3.6 NT-N1 funzionalizzazione di nanotubi con 4-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etossi) anilina



	Mw [g/mol]	Densità [g/mL]	Peso (mg)	Volume [mL]	Moli [mmol]
MWCNTs (diametro 8-15 nm)	12.01	/	25.0	/	2.08
4-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etossi) anilina	255.314	/	267.2	/	1.05
Isopentil-nitrito	117.15	0.872	123.3	0.141	1.05
CHP	167.25	1.007	/	20	/

Nanotubi MWCNTs, (25.0 mg) sono stati dispersi in CHP (10 mL) forzando la disaggregazione con un sonicatore a punta per 10 minuti (intensità 6W, 3 secondi on 3 secondi off). 4-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etossi) anilina (267.2 mg, 0.5 eq) è stata dissolta in 10 mL di CHP e aggiunta alla miscela di nanotubi. Tutte le operazioni sono

state eseguite sotto flusso costante di N₂ per mantenere un'atmosfera inerte. La miscela di reazione è stata scaldata fino a 80° C usando bagno ad olio e termocoppia. È stato aggiunto isopentilnitrito (141 µL, 0.5 eq). Dopo 30 minuti, il riscaldamento è stato spento e la miscela di reazione è stata raffreddata aggiungendo 20 mL di metanolo a temperatura ambiente. I nanotubi dispersi sono stati filtrati usando un filtro a membrana Fluoropore PTFE da 0.2 µm. In seguito, il filtro è stato rimosso e i nanotubi filtrati sono stati riportati in soluzione acquosa utilizzando il bagno ad ultrasuoni e rifiltrati su un filtro Millipore PC 0.45µm. sono stati infine lavati con 5 step da 100 mL di H₂O MilliQ e 5 da 100 mL di metanolo.

Perdita di peso (110-450°C. N₂): 7.5%

Disperdibilità in acqua: 0.12 mg/mL

Diametro idrodinamico medio: 233.6 nm

Indice di polidispersione: 0.278

Assorbanza UV-NIR (1000 nm): 0.19

3.4 Sintesi peptidiche

Swelling della resina

prima di procedere con i passaggi sintetici è necessario rigonfiare la resina in modo che tutti i siti di legame siano esposti, e che la catena peptidica sia libera di crescere. Per fare questo si lascia la resina immersa nel solvente per circa 20 minuti, sotto agitazione. Il solvente utilizzato è DMF, e viene prima trattato flussando azoto direttamente nella soluzione per almeno mezz'ora, in modo da eliminare le ammine secondarie che porterebbero alla deprotezione indesiderata delle estremità N-terminali.

Deprotezione estremità N-terminale

Tutti gli amminoacidi utilizzati in questa tesi hanno l'estremità N protetta con il gruppo Fmoc. Per rimuoverlo si lascia la resina in agitazione in una soluzione di DMF al 20% in 4-metilpiperidina. Il volume dipende dalla quantità di resina, sono indicati 10 mL di soluzione per ogni grammo. La miscela viene lasciata agire per 20 minuti, dopodiché il solvente viene rimosso e la procedura ripetuta una volta.

Coupling

Per forzare le reazioni di coupling in modo da massimizzare la resa si lavora in grande eccesso di reagenti. Per quando riguarda amminoacidi e attivatori si usano 4 equivalenti rispetto al loading della resina, mentre per la DIPEA se ne usano 12. Unica eccezione riguarda le condizioni di coupling del primo amminoacido per la resina 2-cloro tritilil cloruro, dal momento che non si tratta di un legame peptidico non è necessaria la presenza di attivatori. Inoltre si possono usare 3 equivalenti di amminoacido rispetto al loading della resina, e 4 di DIPEA.

Acetilazione

Al termine della sintesi il peptide può essere acetilato, in modo da proteggere l'estremità N terminale. Per fare ciò è stata usata anidride acetica, che ha reagito con l'ammina terminale in una reazione di sostituzione nucleofila in presenza di DIPEA.

Liofilizzazione con acido cloridrico

Il peptide viene sciolto in una soluzione di acido cloridrico 0.1 M e liofilizzato fino a stabilizzazione del peso. Questo è necessario non solo per eliminare il solvente ma anche per permettere lo scambio anionico con il trifluoro acetato, tossico per le cellule.

Liofilizzazione con acido acetico

Il peptide viene sciolto in una soluzione di acido acetico 0.1M e liofilizzato fino a stabilizzazione del peso. Questo non solo permette di effettuare lo scambio anionico rimuovendo il TFA, ma è necessario per completare la procedura di rimozione dei gruppi protettori delle catene laterali del triptofano.

Distacco del peptide con TFA al TFA/TIS/H₂O

È la procedura di distacco standard quando si opera una “sintesi Fmoc”. Essendo stati usati amminoacidi che non richiedono particolari accortezze durante il processo di distacco, la miscela utilizzata è TFA/TIS/H₂O in rapporti 95/2.5/2.5.

Distacco del peptide con miscela TFA all' TFA/TIS/H₂O/DTT

La procedura di distacco della resina è resa più complessa dalla presenza del triptofano per i motivi spiegati nella sezione di risultati e discussione. In questo caso la miscela di reazione utilizzata è TFA/TIS/H₂O/DTT in rapporti 88/2/5/5.

Test di Kaiser

Una punta di spatola di resina viene messa in una vial di vetro. Si aggiungono circa 20 μL di soluzione di ninidrina al 6% in etanolo, 20 μL di cianuro di potassio in piridina e 20 μL di una soluzione di fenolo all'80% in etanolo. Si scalda la miscela con pistola termica e si aspetta qualche minuto.

3.4.1 Sintesi AcO-AKFKA-NH₂

	MW (g/mol)	Peso (g)	Moli (mmol)	Volume (mL)
HBTU	379.24	0.961	2.54	/
HOBt	153	0.388	2.54	/
DIPEA	129.24	/	7.80	1.4
Fmoc-Ala-OH	311,33	0.809	2.60	/
Fmoc-Lys(Boc)- OH	468.54	1.218	2.60	/
Fmoc-Phe-OH	387.43	1.007	2.60	/

La resina pesata (1 g) viene messa in un reattore per sintesi in fase solida. Per rigonfiarla si aggiungono 15 mL di DMF degassata e si lascia mescolare tramite flusso di azoto per 30 minuti, dopodiché il solvente viene rimosso. Prima di ogni coupling, il gruppo Fmoc che protegge la resina o l'estremità N dell'ultimo amminoacido legato, viene rimosso utilizzando una miscela al 20% di 4-metil piperidina in DMF, 10 mL per ogni grammo di resina utilizzata. La miscela viene lasciata agitare per 20 minuti, poi il solvente viene rimosso e lo step ripetuto una volta. Il solvente viene rimosso e la resina viene lavata con DMF (3x10mL) e DCM (3x10mL). Per ogni coupling (le quantità utilizzate sono riportate in tabella) viene preparata una soluzione con l'amminoacido da attaccare (4 equivalenti, anche di seguito sempre calcolati rispetto alla resina), HOBt (3.9 equivalenti), HBTU (3.9 equivalenti), in 20 mL di DMF. In seguito, vengono aggiunti 12 equivalenti di DIPEA. La miscela viene fatta agitare con flusso di azoto per due ore e mezza. Poi, il solvente viene rimosso e la resina lavata con DMF (3x10mL) e DCM (3x10mL). Dopo ogni coupling, la resina viene seccata e si esegue un test di Kaiser. Una volta completata la sintesi, prima del distacco dalla

resina il peptide viene acetilato nell'estremità N, usando 10 mL di una miscela di anidride acetica, DIPEA e DMF in rapporto 1:2:7. Infine, con la resina completamente seccata, il peptide è stato rilasciato trattando la resina con 10 mL di una miscela di TFA/TIS/H₂O in rapporto 95/2.5/2.5. Questo processo viene ripetuto una volta. I solventi vengono raccolti in un pallone e la miscela viene concentrata in rotavapor. Il peptide viene fatto precipitare aggiungendo etere etilico freddo e lasciato a 0°C per una notte, in seguito viene filtrato su Gooch G4, in vuoto. Si ottiene un solido bianco che viene sciolto in una soluzione di HCl 0.1 M e liofilizzato fino a stabilizzazione del peso.

Il peptide ottenuto viene caratterizzato tramite HPLC, ¹³C-NMR, H-NMR e ESI-MS.

Ogni volta che la sintesi viene sospesa, la resina con l'amminoacido terminale ancora protetto va seccata utilizzando lavaggi in DCM e flusso di azoto e conservata in frigo a 0°C. È sempre necessario rigonfiarla prima di usarla di nuovo.

L'HPLC ha mostrato un alto grado di purezza nella sintesi, non è stato ritenuto necessario un processo di purificazione

3.4.2 Sintesi H-WKWEW-OH

	MW (g/mol)	Peso (g)	Moli (mmol)	Volume (mL)
HBTU	379.24	2.366	6.2	/
HOBt	153	0.955	6.2	/
DIPEA	129.24	/	19.2	3.3
Fmoc-Trp(Boc)-OH (primo AA)	526.21	2.256	4.8	/
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.21	3.368	6.4	
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468	2.999	6,4	/
Fmoc-Glu(OtBu)- OH	443.47	2.838	6.4	/

La resina e tutti gli amminoacidi vengono conservati in freezer, prima di utilizzarli è necessario aspettare che arrivino a temperatura ambiente.

La resina pesata (1 g) viene messa in un reattore per sintesi in fase solida. Per rigonfiarla si aggiungono 15 mL di DMF degassata e si lascia mescolare tramite flusso di azoto per 30 minuti, dopodiché il solvente viene rimosso. Utilizzando la resina 2-cloro-tritil cloruro, il coupling del primo amminoacido non richiede la presenza di attivatori. 3 equivalenti di amminoacido vengono fatti reagire direttamente con la resina, in presenza di 12 equivalenti di DIPEA. Da questo punto, prima di ogni coupling, il gruppo Fmoc che protegge l'estremità N dell'ultimo amminoacido legato, viene rimosso utilizzando una miscela al 20% di 4-iodometil piperidina in DMF, 10 mL per ogni grammo di resina utilizzata. La miscela viene lasciata agitare per 20 minuti, poi il solvente viene rimosso e lo step ripetuto una volta. Il solvente viene rimosso e la resina viene lavata con DMF (3x10mL) e DCM (3x10mL). Per ogni coupling (le quantità utilizzate sono riportate in tabella) viene preparata una soluzione con l'amminoacido da attaccare (4 equivalenti, anche di seguito sempre calcolati rispetto alla resina), HOBt (3.9 equivalenti), HBTU (3.9 equivalenti), in 20 mL di DMF. In seguito, vengono aggiunti 12 equivalenti di DIPEA. La miscela viene fatta agitare con flusso di azoto per due ore e mezza. Poi, il solvente viene rimosso e la resina lavata con DMF (3x10mL) e DCM (3x10mL). Dopo ogni coupling, la resina viene seccata e si esegue un test di Kaiser. Una volta completata la sintesi, con la resina completamente seccata, il peptide è stato trattato con 10 mL di una miscela di TFA/TIS/H₂O/DTT in rapporto 88/5/5/2. Il processo viene ripetuto una volta. I solventi vengono raccolti in un pallone e la miscela viene concentrata in rotavapor. Il peptide viene fatto precipitare aggiungendo etere etilico freddo e lasciato a 0°C per una notte, in seguito viene filtrato su Gooch G4, in vuoto. Si ottiene un solido bianco che viene sciolto in una soluzione di acido acetico 0.1 M e liofilizzato fino a stabilizzazione del peso.

Il peptide ottenuto viene caratterizzato tramite HPLC, ¹³C-NMR, H-NMR e ESI-MS.

Ogni volta che la sintesi viene sospesa, la resina con l'amminoacido terminale ancora protetto va seccata utilizzando lavaggi in DCM e flusso di azoto e conservata in frigo a 0°C.

Anche per questo peptide l'HPLC ha mostrato un alto grado di purezza nella sintesi, non è stato ritenuto necessario un processo di purificazione

3.5 Prove su alginato

3.5.1 Idrogel di alginato senza fCNTs

Si prepara una soluzione 21 mg/mL di NaCl e si lascia in autoclave a 121°C e 2 atm per 20 min. La soluzione di NaCl si utilizza quindi per le seguenti preparazioni:

- 52.5 mg di alginato vengono disciolti in 4.0 mL di acqua. La soluzione di alginato viene agitata magneticamente per 2 ore in modo che l'alginato possa dissolversi completamente. A questo punto, si aggiunge 1.0 mL di soluzione di NaCl e la soluzione viene filtrata in modo sterile con filtro a pori da 0.22 µm.
- 7.0 mg di CaCO₃ (precedentemente macinato attraverso ball milling) si disperdono in 1.0 mL di soluzione di NaCl. La sospensione di CaCO₃ è tenuta in sonicatore a bagno per prevenire la deposizione di CaCO₃ e viene posta in autoclave a 121°C e 2 atm per 20 min.
- 25.0 mg di GDL si disciolgono in 1.0 mL di soluzione di NaCl appena prima della preparazione dell'idrogel.

Per ottenere 1.4 mL di gel:

1 mL della soluzione di alginato, 0.2 mL della sospensione di CaCO₃ e 0.2 mL della soluzione di GDL vengono aggiunti insieme e miscelati rapidamente tramite vortex. La miscela finale si trasferisce in uno stampo e si lascia gelificare per 24h in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in aria a 37°C per evitare l'evaporazione.

3.5.2 Idrogel di alginato + fCNTs

Gli idrogel nanocompositi sono stati preparati con 1%, 1.5% e 2% w/w di CNT rispetto al peso di alginato.

Si prepara una soluzione 21 mg/mL di NaCl e si pone in autoclave a 121°C e 2 atm per 20 min. La soluzione di NaCl si utilizza quindi per le seguenti preparazioni:

- 52.5 mg di alginato vengono disciolti in 2.0 mL di acqua. La soluzione di alginato viene agitata magneticamente per 2 ore in modo che l'alginato possa dissolversi completamente. A questo punto, si aggiunge 1.0 mL di soluzione di NaCl e la soluzione viene filtrata in modo sterile con filtro a pori da 0.22 µm.

- Rispettivamente, 1.05 mg (CNT1%), 1.6 mg (CNT1.5%) e 2.10 mg (CNT2%) di CNT vengono dispersi in 4.0 mL di acqua utilizzando un sonicatore a punta (1 minuto, 6W intensità, 3s on and 3s off intervallo). La dispersione viene poi posta in autoclave a 121°C e 2 atm per 20 min. A questo punto, 2 mL di dispersione di CNT si aggiungono alla soluzione di alginato.
- 7.0 mg di CaCO₃ (precedentemente macinato attraverso ball milling) si disperdono in 1.0 mL di soluzione di NaCl. La sospensione di CaCO₃ viene posta in autoclave a 121°C e 2 atm per 20 min. Prima dell'uso è tenuta in sonicatore a bagno per prevenire la deposizione di CaCO₃.
- 25.0 mg di GDL si disciolgono in 1.0 mL di soluzione di NaCl appena prima della preparazione dell'idrogel.

1 mL della miscela alginato/CNTs, 0.2 mL della sospensione di CaCO₃ e 0.2 mL della soluzione di GDL vengono aggiunti insieme e miscelati rapidamente tramite vortex. La miscela finale si trasferisce in uno stampo e si lascia gelificare per 24h in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in aria a 37°C per evitare l'evaporazione.

3.6 Idrogel di peptidi

Poiché il peptide P1 non ha dato esiti positivi nelle prove di gelificazione effettuate, i paragrafi successivi fanno riferimento esclusivamente a prove effettuate sul peptide P2.

3.6.1 Metodo 1

$MCG_{\text{metodo 1}} = 20 \text{ mg/mL}$

1 mL di H₂O viene aggiunto ogni 20 mg di peptide. Al fine di sciogliere completamente il peptide la miscela viene sonicata per 10 minuti e poi portata ad una temperatura di 80° C. Raggiunta la temperatura il gel viene lasciato ritornare a temperatura ambiente lentamente. Questa procedura è il risultato della combinazione dei metodi A, B, C descritti nel paragrafo (*Prove di gelificazione preliminari: metodo 1*). Con questo metodo non sono stati ottenuti risultati riproducibili.

3.6.2 Metodo 2

$MCG_{\text{metodo 2}} = 10 \text{ mg/mL}$

Per la formazione di 1 mL di gel è necessario dissolvere completamente 10 mg peptide. Per fare ciò il peptide viene disperso in acqua milliQ (pH = 6.9) e la dissoluzione viene ottenuta aggiungendo 60 µL di una soluzione di NaOH 0.1. Una volta aggiunta la soluzione di nanotubi, se richiesto, si riporta la miscela al pH di partenza utilizzando 60 µL di una soluzione di HCl 0.1 M.

La soluzione di 1 mL è composta da:

- Acqua MilliQ (le stesse prove verranno eseguite con acqua MilliQ basificata con NaOH fino a pH 6.97, il punto isoelettrico del peptide).
- Soluzione di NaOH: il peptide, vista la forte tendenza ad aggregare, non si scioglierà del tutto fino all'aggiunta di 60 µL (ogni 10 mg di peptide) di NaOH 0.1 M.
- Soluzione di nanotubi: 2 mg di NT-S1 vengono dispersi in 4 mL di H₂O MilliQ, aiutandosi con il sonicatore a punta (1 min, 3 sec on 3 sec off)
- Soluzione di HCl (o GDL): un equivalente di acido viene aggiunto per tornare al pH iniziale
- Il gel ottenuto viene lasciato riposare 24h, in contenitore chiuso in modo da contrastare l'evaporazione dell'acqua.

Le quantità utilizzate vengono riportate in Tabella 16.

Tabella 16: quantità utilizzate per la formazione di idrogel (P2) con il metodo 2

	Peptide (mg)	H₂O tot (µL)	NaOH 0.1M (µL)	fCNTs (%)	Sol CNTs (µL)	HCl 0.1M (µL)
Idrogel P2	10	880	60	/	/	60
Idrogel P2 + CNTs (1%)	10	762	60	1	118	60

Bibliografia

1. Hu, Y., Shenderova, O. A., Hu, Z., Padgett, C. W. & Brenner, D. W. *Reports on Progress in Physics* **2006**, 69, 1847–1895.
2. Liu, H., Zhang, L., Yan, M. & Yu, J. *Journal of Materials Chemistry B* vol. 5 6437–6450
3. Calvert, P. *Nature* **1999**, 399, 210–211.
4. Hu, Y., Shenderova, O. A., Hu, Z., Padgett, C. W. & Brenner, D. W. *Reports on Progress in Physics* **69**, 1847–1895 (2006).
5. Grady, B. P. *Carbon nanotube-polymer composites: manufacture, properties, and applications*. **2015**.
6. Gatti, T., Vicentini, N., Menna, E. & Maggini, M. *Chimica&Nanotecnologie*. **2017**, 3, 28-34
7. Mao, A. S. & Mooney, D. J. *Proc Natl Acad Sci USA* **2015**, 112, 14452–14459.
8. Ovsianikov, A., Khademhosseini, A. & Mironov, V. *Trends in Biotechnology* **2018**, 36, 348–357.
9. Rajab, T. K., O'Malley, T. J. & Tchantchaleishvili, V. *Artificial Organs* **2020**, 44, 1031–1043.
10. Zdrahala R. J. & Zdrahala I. J. *J Biomater Appl*. **1999**, 14, 192–209 (1999).
11. Meloni, M. *Colture Cellulari*. **2021**
12. Landers, J. *et al. Adv Healthc Mater* **2014**, 3, 1745–1752.
13. Vicentini, N. *et al. Carbon NY* **2015**, 95, 725–730.
14. Salgado, A. J., Coutinho, O. P. & Reis, R. L. *Macromolecular Bioscience* **2014**, 4, 743–765.
15. Salgado, A. J., Oliveira, J. M. *Int Rev Neurobiol* **2013**, 108, 1–33.
16. Berthiaume, F., Maguire, T. J. & Yarmush, M. L. *Annu Rev Chem Biomol Eng* **2011**, 2, 403–430.
17. Peressotti, S., Koehl, G. E., Goding, J. A. & Green, R. *ACS Biomaterials Science and Engineering* **2021**, 7, 4136–4163.
18. Vicentini, N. *et al. Mater Chem Phys* **2018**, 214, 265–276.
19. Pettikiriachchi, J. T. S., Parish, L. C. & Molly, S. S. *Aust J Chem* **2010**, 63, 1143–1154.
20. Vanderhooft, J. L., Alcoutlabi, M., Magda, J. J. & Prestwich, G. D. *Macromol Biosci* **2009**, 9, 20–28.
21. Pacheco, D. P. *et al. J Mater Chem B* **2019**, 7, 4940–4952.
22. Morgan, E. F., Unnikrisnan, G. U. & Hussein, A. I. Annual Review of Biomedical Engineering Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. **2018**

23. Ihara, H., Takafuji, M. & Kuwahara, Y. Polymer functionalization by luminescent supramolecular gels. *Polymer Journal* **2016**, 48, 843–853.
24. Drury, J. L. & Mooney, D. J. *Biomaterials* vol. **2003**, 24, 4337–4351.
25. Augst, A. D., Kong, H. J. & Mooney, D. J. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci* **2006**, 6, 623–633.
26. Draget, K. I., Skjåk-Braek, G. & Smidsrød, O. *Alginate based new materials. International Journal of Biological Macromolecules* **1997**, 21
27. Zweep, N. & van Esch, J. H. The Design of Molecular Gelators. **2013**, 1, 1–29.
28. Dong, R., Pang, Y., Su, Y. & Zhu, X. *Biomater Sci* **2015**, 3, 937–954.
29. Du, X., Zhou, J., Shi, J. & Xu, B. *Chemical Reviews* **2015**, 115, 13165–13307
30. Stendahl, J. C., Rao, M. S., Guler, M. O. & Stupp, S. I. *Adv Funct Mater* **2006**, 16, 499–508
31. Zhang, S. *et al. Biomaterials* **1995**, 16, 1385–1393.
32. Marchesan, S., Easton, C. D., Kushkaki, F., Waddington, L. & Hartley, P. G. *Chemical Communications* **2012**, 48, 2195–2197.
33. Hartgerink, J. D., Granja, J. R., Milligan, R. A. & Ghadiri, M. R. *Self-Assembling Peptide Nanotubes*. **1996**.
34. Wychowaniec, J. K. *et al. Biomacromolecules* **2020**, 21, 2670–2680.
35. Koutsopoulos, S. *J Biomed Mater Res A* **2016**, 104, 1002–1016.
36. Iglesias, D. *et al. ACS Nano* **2008**, 12, 5530–5538
37. Han, C. *et al. International Journal of Nanomedicine* **2020**, 15 10257–10269.
38. Wan, S. *et al. Acta Biomater* **2016**, 46, 29–40.
39. Rozhin, P., Charitidis, C. & Marchesan, *Molecules* **2021**, 26.
40. Mezger & Thomas. *The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers*. **2020**
41. Merrifield R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149–2154.
42. Niyogi, S. *et al. Acc Chem Res* **2002**, 35, 1105–1113.
43. Bahr, J. L. & Tour, J. M. *Chemistry of Materials* **2001**, 13, 3823–3824.
44. Lipińska, M. E. *et al. Carbon N Y* **2012**, 50, 3280–3294.
45. Ceroni, L. & Menna, E. Functionalized Carbon Nanotubes as Fillers in Nanocomposite Hydrogels for Biomedical Applications.
46. Crumrine, Shankweiler & Hoffman. *J. Org. Chem.* 1986, 51, 5013–5015.
47. Farokhi S. A. & Nandibewoor S.T. *Tetrahedron* **2003**, 59, 7595–7602.

48. Kannan, R., Kakade, B. A. & Pillai, V. K. *Angewandte Chemie - International Edition* **2008**, 47, 2653–2656.
49. Prateek G. & wang Y. *Adv Mater Lett* **2020**, 11, 1–8.
50. Kato, H., Nakamura, A., Takahashi, K. & Kinugasa, S. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, 11, 4946–4948
51. Micali, N., Mallamace, F., Castriciano, M., Romeo, A. & Scolaro, L. M. *Anal Chem* **2001**, 73, 4958–4963.
52. Omar, A. F. bin & MatJafri, M. Z. *Sensors* **2009**, 9, 8311–8335.
53. Fujigaya, T. & Nakashima, N. *Science and Technology of Advanced Materials* **2015**, 16.
54. Wang, L. *et al. J Environ Sci (China)* **2017**, 51, 248–255.
55. Lorson, T. *et al. ACS Omega* **2020**, 5, 6481–6486.
56. Growney Kalaf, E. A., Flores, R., Bledsoe, J. G. & Sell, S. A. *Materials Science and Engineering C* **2016**, 63, 198–210.
57. Fichman, G. & Gazit, E. *Acta Biomaterialia* vol. **2014**, 10, 1671–1682
58. Braun, G. A. *et al. Biomacromolecules* **2020**, 21, 4781–4794.
59. Chen, L. *et al. Langmuir* **2010**, 26, 5232–5242.
60. Wang, L. *et al. Soft Matter* **2008**, 14, 566–573.
61. Singha, N. *et al. Chem Sci* **2019**, 10, 5920–5928.
62. Xie, H., Becraft, E. J., Baughman, R. H., Dalton, A. B. & Dieckmann, G. R. *Journal of Peptide Science* **2008**, 14, 139–151
63. Cleland, W. W. *Biochemistry* **1964**, 3, 480–482.
64. Dwane, S., Durack, E. & Kiely, P. A. *BMC Res Notes* **2013**, 6, 366
65. Kovalevich, J. & Langford, D. *Methods Mol Biol* **1078**, 9–21 (2013).
66. Kaplan, D. R., Matsumoto, K., Lucarelli, E. & Thiele, C. J. *Neuron* **1993**, 11, 321–331.
67. Singh, A. *et al. Cancer* **2011**, 117, 5189–5202.
68. Lopes, F. M. *et al. Brain Res* **2010**, 1337, 85–94.
69. Joshi, S., Guleria, R., Pan, J., DiPette, D. & Singh, U. S. *Oncogene* **2006**, 25, 240–247.
70. Scapin, G. *et al. Nanomedicine* **2015**, 11, 621–632.
71. Grijalvo, S., Nieto-Díaz, M., Maza, R. M., Eritja, R. & Díaz, D. D. *Biotechnology Journal* **2019**, 14.
72. Chan, L. L.-Y., McCulley, K. J. & Kessel, S. L. *Cell Viability Assays: Methods and Protocols* **2017**, 27–41.

73. Yin, Y. *et al. Biomater Sci* **2021**, 9, 2887–2892.
74. Scapin, G. *et al. Comput Struct Biotechnol J* **2021**, 19, 5622–5636.
75. Gasparotto, M. *et al. Biomedicines* **2022**, 10.