



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

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

# Studio di materiali a base di nanostrutture di carbonio per applicazioni biomediche

Relatore: Prof. Enzo Menna

Controrelatore: Prof.ssa Carla Marega

LAUREANDA: Brun Linda Maria

ANNO ACCADEMICO 2022/2023



# Sommario

Abbreviazioni .....	V
Abstract .....	VII
Riassunto .....	IX
<b>1 Introduzione.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Medicina rigenerativa .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Materiali compositi.....	2
1.1.2 CNS in materiali compositi .....	3
1.1.3 Matrici (idrogel) .....	4
1.1.3.1 Idrogel peptidici.....	5
1.1.3.2 Idrogel di nanocellulosa carbossilata .....	6
<b>1.2 Nanostrutture di carbonio.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Nanotubi di carbonio .....	7
1.2.2 Nanoconi di carbonio.....	12
1.2.3 Reattività delle CNS .....	15
1.2.4 Reazione di Tour .....	16
<b>1.3 Caratterizzazioni .....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Analisi termogravimetrica (TGA) .....	17
1.3.2 Spettroscopia UV-Vis-NIR .....	18
1.3.3 Dynamic Light Scattering (DLS) e Zeta Potential (ZP) .....	19
1.3.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM).....	20
1.3.5 Reologia .....	21
<b>1.4 Scopo della tesi .....</b>	<b>22</b>
<b>2 Risultati e discussione .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Funzionalizzazione di f-CNS .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Caratterizzazione di f-CNS .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Derivati di nanotubi di carbonio .....</b>	<b>27</b>

2.3.1	Funzionalizzazione di nanotubi di carbonio .....	27
2.3.2	Caratterizzazione di derivati di nanotubi di carbonio .....	29
<b>2.4</b>	<b><i>Derivati di nanoconi di carbonio</i></b> .....	<b>34</b>
2.4.1	Funzionalizzazione di nanoconi di carbonio .....	34
2.4.2	Caratterizzazione di derivati di nanoconi di carbonio.....	35
<b>2.5</b>	<b><i>Nanocompositi peptidici</i></b> .....	<b>39</b>
2.5.1	Nanocompositi di Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH.....	41
2.5.2	Nanocompositi di Fmoc-WKWEW-NH <sub>2</sub> .....	48
<b>2.6</b>	<b><i>Nanocompositi a base di nanocellulosa carbossilata</i></b> .....	<b>49</b>
<b>2.7</b>	<b><i>Conclusioni</i></b> .....	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>Parte sperimentale</b> .....	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Solventi e reagenti</i></b> .....	<b>55</b>
<b>3.2</b>	<b><i>Strumentazione e procedure analitiche</i></b> .....	<b>56</b>
3.2.1	Cromatografia su strato sottile (TLC).....	56
3.2.2	Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) .....	56
3.2.3	Spettrometria di massa (ESI-MS).....	56
3.2.4	Sonicazione a punta .....	56
3.2.5	Sonicazione a bagno .....	56
3.2.6	Centrifugazione .....	57
3.2.7	Analisi termogravimetrica (TGA).....	57
3.2.8	Scattering dinamico (DLS).....	57
3.2.9	Zeta Potential (ZP) .....	57
3.2.10	Spettroscopia UV-Vis-NIR .....	58
3.2.11	Preparazione delle dispersioni di f-MWCNT e f-SWCNH .....	58
3.2.12	Calcolo della <i>disperdibilità</i> delle nanostrutture in acqua.....	59
3.2.13	Microscopia elettronica a trasmissione (TEM).....	59
3.2.14	Analisi reologica .....	59
<b>3.3</b>	<b><i>Sintesi e caratterizzazioni</i></b> .....	<b>60</b>
3.3.1	Sintesi di 2-(4-(dimetilammino)fenil)isoindolin-1,3-dione .....	60
3.3.2	Sintesi di 4-(1,3-dioxisoindolin-2-il)-N,N,N-trimetilbenzene ammonio ioduro a partire da 2-(4-(dimetilammino)fenil)isoindolin-1,3-dione .....	61

3.3.3	Sintesi 4-ammino-N,N,N-trimetilbenzene ammonio ioduro a partire da 4-(1,3-dioxisoindolin-2-il)-N,N,N-trimetilbenzene ammonio ioduro .....	62
3.3.4	Funzionalizzazione di MWCNT con benzensolfonato (MWCNT-S1) ... ..	63
3.3.5	Funzionalizzazione di MWCNT con benzensolfonato (MWCNT-S2) ... ..	64
3.3.6	Funzionalizzazione di MWCNT con metilsulfonilbenzene (MWCNT-MeS) .....	65
3.3.7	Funzionalizzazione di MWCNT con N,N,N-trimetilbenzenammonio (MWCNT-N).....	66
3.3.8	Funzionalizzazione di SWCNH con benzensolfonato (SWCNH-S) .....	67
3.3.9	Funzionalizzazione di SWCNH con metilsulfonilbenzene (SWCNH-MeS) .....	68
3.3.10	Funzionalizzazione di SWCNH con N,N,N-trimetilbenzenammonio (SWCNH-N).....	69
3.3.11	Preparazione gel di Fmoc-Lys(Fmoc)-RGD-OH.....	70
3.3.12	Preparazione gel di Fmoc-Lys(Fmoc)-RGD-OH con f-MWCNT ...	70
3.3.13	Preparazione gel di nanocellulosa carbossilata con f-MWCNT....	71
<b>Bibliografia .....</b>		<b>73</b>
<b>Appendice .....</b>		<b>77</b>



## Abbreviazioni

MWCNT: nanotubi di carbonio a parete multipla

SWCNH: nanoconi di carbonio a parete singola

f-MWCNT: nanotubi di carbonio funzionalizzati

CNS: nanostrutture di carbonio

PLLA: acido L-polilattico

CNH: nanoconi di carbonio

CNT: nanotubi di carbonio

SWCNT: nanotubi di carbonio a parete singola

AD: arc-discharge

LA: laser ablation

CVD: chemical vapor deposition

f-CNS: nanostrutture di carbonio funzionalizzate

TGA: analisi termogravimetrica

FD: grado di funzionalizzazione

FG: gruppo funzionale

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

DLS: dynamic light scattering

ZP: potenziale Zeta

TEM: microscopio a trasmissione elettronica

f-SWCNH: nanoconi di carbonio a parete singola funzionalizzati

CHP: 1-cicloesil-2-pirrolidone

PdI: indice di polidispersione

Fmoc: 9-fluorenilmetilossicarbonile

DMSO: dimetilsolfossido

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF: N,N-dimetilformammide

TLC: cromatografia su strato sottile

NMR: risonanza magnetica nucleare

ESI-MS: ionizzazione elettrospray-spettrometria di massa





## **Abstract**

This thesis project concerns the study of the chemical modification of carbon nanostructures, in particular multi-walled nanotubes (MWCNTs) and single-walled nanohorns (SWCNHs), to be used as fillers in composite materials to promote cell growth and differentiation and tissue regeneration.

The first part of the project was devoted to studying the effects of functionalisation on the properties of the nanostructures, with a particular interest in water *dispersibility*. MWCNT and SWCNH were functionalised with benzenesulfonate, methylsulfonylbenzene and trimethylbenzene ammonium groups to obtain water soluble derivatives.

Subsequently, the functionalised carbon nanotubes (f-MWCNTs) were used to prepare hydrogel-based scaffolds based on self-assembling short peptides or carboxylated nanocellulose, designed to conduct adhesion, growth and differentiation studies of nerve tissue cells. The aim was to study how the presence of MWCNTs influences the mechanical properties of composite materials and interactions with cells. Attention was focused on the role of the surface group charge in promoting cell adhesion phenomena.

The self-assembling short peptides were synthesised by the research group of Prof. Miriam Mba, the carboxylated nanocellulose was prepared by the research group of Prof. Giovanna Brusatin at the Department of Industrial Engineering, and the cell tests were conducted by the research group of Prof. Francesco Filippini at the Department of Biology.



## Riassunto

Il progetto di tesi riguarda lo studio della modificazione chimica di nanostrutture di carbonio, in particolare nanotubi a parete multipla (MWCNT) e nanoconi a parete singola (SWCNH), da utilizzare come *filler* in materiali compositi che promuovano la crescita e la differenziazione cellulare e la rigenerazione di tessuti.

La prima parte del progetto è stata dedicata allo studio degli effetti della funzionalizzazione sulle proprietà delle nanostrutture, con particolare interesse verso la *disperdibilità* in acqua. MWCNT e SWCNH sono stati funzionalizzati con gruppi benzensolfonato, metilsulfonilbenzene e trimetilbenzenammonio al fine di ottenere dei derivati disperdibili in acqua.

In seguito, i nanotubi di carbonio funzionalizzati (f-MWCNT) sono stati utilizzati per la preparazione di *scaffold* a base di idrogel di peptidi corti autoassemblanti e di nanocellulosa carbossilata progettati per condurre studi di adesione, crescita e differenziamento di cellule del tessuto nervoso. Si è voluto studiare come la presenza dei MWCNT influenza le proprietà meccaniche dei materiali compositi e le interazioni con le cellule. Particolare interesse viene rivolto al ruolo che la carica del gruppo superficiale riveste nel promuovere fenomeni di adesione cellulare.

I peptidi corti autoassemblanti sono stati sintetizzati dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Miriam Mba, la nanocellulosa carbossilata è stata preparata dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Giovanna Brusatin del Dipartimento di Ingegneria Industriale e le prove cellulari sono state condotte dal gruppo di ricerca del Prof. Francesco Filippini del Dipartimento di Biologia.

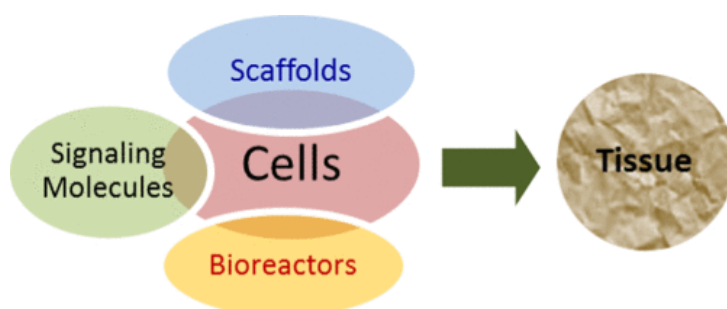


# 1 Introduzione

## 1.1 Medicina rigenerativa

Quando si parla di medicina rigenerativa ci si riferisce ad una nuova branca della medicina che mira a ripristinare tessuti e organi malati o danneggiati, combinando lo studio biologico delle cellule con una serie di strategie ingegneristiche. Ogni anno, milioni di persone soffrono la perdita o il danneggiamento di un organo a causa di un incidente o una malattia. In questi casi, nonostante le limitazioni imposte da età, compatibilità e disponibilità dei donatori, la terapia più comunemente accettata è il trapianto dell'organo. La medicina rigenerativa si presenta dunque come una promettente alternativa al trapianto perché consente di aggirare problemi quali fenomeni di rigetto o scarsità ed incompatibilità dei donatori.<sup>1, 2</sup> Uno dei rami della medicina rigenerativa è l'ingegneria tissutale.

L'ingegneria tissutale può essere definita come lo studio e la sintesi di biomateriali per il trattamento o la rigenerazione di tessuti danneggiati. Si tratta di un settore interdisciplinare che coinvolge la scienza dei materiali, la biologia cellulare, le interazioni cellule-materiale e la caratterizzazione della superficie. Una delle componenti chiave dell'ingegneria tissutale è la progettazione di *scaffold* biomedici, naturali o sintetici, che fungono da supporto per le funzioni cellulari, l'adesione e il trapianto (*Figura 1.1*).



*Figura 1.1* Illustrazione schematica delle componenti chiave dell'ingegneria tissutale.<sup>3</sup>

Per promuovere la crescita di tessuti è necessario sviluppare materiali che ricreino un ambiente simile alla matrice extracellulare. Gli *scaffold* devono infatti possedere composizione, proprietà meccaniche e stabilità chimica

adatte a supportare la sostituzione, riparazione o ricostruzione di una parte o dell'intero tessuto. Devono essere poi in grado di supportare ed incoraggiare l'adesione cellulare, la proliferazione e la differenziazione. Inoltre, per garantire le interazioni tra cellule e la diffusione dell'ossigeno e dei metaboliti, la porosità del materiale deve essere elevata. Progettare *scaffold* biologicamente attivi con caratteristiche ottimali è quindi uno dei fattori chiave per il successo dell'ingegneria tissutale.<sup>3-5</sup>

I materiali nanocompositi costituiti da matrici a base di biopolimeri biodegradabili e *nanofiller* bioattivi sono considerati *scaffold* in grado di indirizzare correttamente l'attività cellulare e promuovere la rigenerazione dei tessuti.<sup>6</sup>

### **1.1.1 Materiali compositi**

I materiali compositi sono materiali ibridi costituiti da una fase continua, definita matrice, e da una fase rinforzante chiamata *filler*. Data la natura eterogenea di questi materiali, spesso risulta difficile stabilire come, e in che misura, le loro proprietà siano influenzate da proprietà, volumi, dimensioni e geometrie delle singole fasi che li compongono. Le matrici più comunemente utilizzate per la costruzione di materiali compositi sono i polimeri. I *filler* più diffusi sono invece fibre di vetro, di Kevlar® e di carbonio, che tipicamente presentano dimensioni della scala dei micrometri. Recentemente sono stati sviluppati nanocompositi, ovvero materiali la cui fase di rinforzo presenta almeno una dimensione inferiore ai 100 nm. Se paragonati ai materiali compositi, i nanocompositi presentano proprietà particolarmente interessanti. Ad esempio, date le dimensioni ridotte, l'area superficiale dei *filler* risulta particolarmente elevata e questo comporta un aumento della superficie di contatto tra riempitivo e matrice circostante. Distribuzione uniforme e buona dispersione del *filler* sono requisiti generalmente richiesti per avere materiali compositi performanti ma non sempre l'una implica l'altra, soprattutto nel caso dei nanocompositi. La prima descrive la collocazione del rinforzante all'interno della matrice, mentre la seconda si riferisce alla dimensione degli

aggregati nella fase disperdente. A causa della notevole area superficiale, spesso risulta difficile ottenere buone dispersioni di nanoriempitivi.<sup>7,8</sup>

In generale, quando i materiali compositi contengono fasi sintetizzate a partire da polimeri naturali, vengono definiti bio-compositi. Questi materiali risultano interessanti per applicazioni biomediche, ad esempio nel campo dell'ingegneria tissutale, in quanto biodegradabili, facilmente riciclabili e commercializzabili. In particolare, vengono definiti *scaffold* biomedici quei materiali compositi progettati per interagire con l'ambiente cellulare. Le cellule seminate in questi *scaffold* sono in grado di crescere fino a formare tessuti dalla struttura tridimensionale.<sup>9</sup>

### **1.1.2 CNS in materiali compositi**

*Scaffold* biomedici aventi come riempitivi nanostrutture di carbonio (CNS) si stanno rivelando efficaci anche per la diagnosi e il trattamento di malattie. I materiali a base di nanostrutture di carbonio stanno infatti acquisendo un interesse sempre maggiore nel campo dei nanomateriali e gli studi condotti finora mostrano risultati promettenti per svariate applicazioni, tra cui impianti medici, *drug delivery* e rigenerazione dei tessuti. Le CNS presentano proprietà uniche che possono essere modulate, per migliorare caratteristiche come morfologia della superficie, biocompatibilità o area superficiale. La possibilità di controllare questi parametri chiave del materiale rende vantaggiosa la scelta di questi *filler*.<sup>9</sup> Studi recenti hanno dimostrato che, grazie alle loro proprietà meccaniche, elettriche e strutturali, i nanotubi di carbonio migliorano alcune caratteristiche delle matrici in cui sono inseriti, ad esempio ne aumentano il modulo elastico. Studi *in vitro* hanno evidenziato che talvolta i nanotubi di carbonio sono in grado di assorbire proteine extracellulari che migliorano le interazioni a livello cellulare, rendendo gli *scaffold* più bioattivi e biocompatibili. Effetti di questo tipo provano che le nanostrutture possono avere un ruolo importante nello sviluppo di modelli per lo studio della rigenerazione dei tessuti. Normalmente per poter maneggiare le CNS, queste devono essere modificate chimicamente. In particolare, se ci si riferisce all'applicazione biomedica, le nanostrutture devono essere rese

disperdibili in acqua al fine di promuoverne la biocompatibilità. Tuttavia, i fluidi fisiologici non contengono solo acqua ma anche proteine, molecole organiche e a volte concentrazioni saline e pH diversi. Risulta quindi fondamentale modificare adeguatamente le CNS per renderle disperdibili nell'ambiente cellulare in cui vogliono essere impiegate. In letteratura si trovano vari studi condotti su nanotubi di carbonio funzionalizzati incorporati in matrici come collagene, acido L-polilattico (PLLA) e policarbonato-uretano.<sup>5, 10, 11</sup>

In passato, all'interno del gruppo di ricerca del Prof. Enzo Menna, sono stati sviluppati diversi materiali nanocompositi per la crescita e differenziazione di cellule neuronali. I primi *scaffold* biocompatibili sono stati ottenuti utilizzando PLLA come matrice e nanotubi di carbonio funzionalizzati con *p*-metossifenile come *filler*. Questi materiali sono risultati in grado di promuovere l'adesione e la differenziazione delle cellule nervose.<sup>12, 13</sup>

### **1.1.3 Matrici (idrogel)**

Tra le matrici che possono essere impiegate per lo sviluppo di bio-materiali compositi vi sono gli idrogel. Si tratta di sistemi reticolari tridimensionali composti da polimeri idrofilici (naturali o sintetici) legati tra loro attraverso legami covalenti (idrogel chimici) o mediante attrazioni fisiche intra ed intermolecolari (idrogel fisici). Gli idrogel sono in grado di assorbire enormi quantità di acqua o fluidi biologici, fino a percentuali dell'ordine delle migliaia, e rigonfiarsi senza dissolversi. Nello stato "rigonfiato" gli idrogel sono morbidi ed elastici, proprio come la gran parte dei tessuti del corpo umano. La grande affinità per l'acqua di queste matrici è dovuta alla presenza di componenti idrofiliche come gruppi carbossilici, carbonilici, amminici e ammidici distribuiti lungo la catena polimerica.<sup>3</sup>

Gli idrogel sono generalmente considerati materiali biocompatibili in quanto la loro struttura e composizione presenta una certa somiglianza con la matrice extracellulare e con i componenti macromolecolari del corpo. Quando ci si riferisce ad un materiale, la biocompatibilità è l'abilità di trovarsi nel corpo senza danneggiare le cellule vicine o provocare una risposta che



riduce l'efficacia dalla funzione desiderata. Negli ultimi tempi gli idrogel hanno trovato largo impiego in numerose applicazioni, tra cui l'ingegneria tissutale. Per essere impiegati in questo settore e promuovere la formazione di nuovi tessuti, gli idrogel devono rispettare una serie di criteri strutturali che includono parametri fisici (es. meccanici e degradativi) e legati al comportamento biologico (es. adesione cellulare e biocompatibilità). Le proprietà meccaniche dipendono principalmente dalla rigidità delle catene polimeriche originali, dal tipo di *cross-linking*, dalla densità dei legami e dal rigonfiamento. Tutti questi fattori influenzano l'adesione cellulare e il *design* del gel, che deve creare e mantenere spazi adeguati allo sviluppo del tessuto. Le interazioni che si sviluppano tra cellule e idrogel influenzano significativamente l'adesione, la migrazione e la differenziazione cellulare. Interazioni inappropriate infatti possono causare formazione di tessuti in modo indesiderato.<sup>2</sup>

All'interno del gruppo di ricerca, dopo aver analizzato le proprietà reologiche degli *scaffold* a base di PLLA, si è visto che il modulo elastico di questi nanocompositi risulta troppo alto rispetto a quello tipico del tessuto nervoso.<sup>14</sup> Si è scelto dunque di sviluppare *scaffold* a base di idrogel in quanto questi presentano proprietà reologiche modulabili e compatibili con il tessuto nervoso. Sono stati inizialmente studiati idrogel di alginato ma i risultati ottenuti hanno mostrato una scarsa adesione cellulare. Si è quindi deciso di passare alla realizzazione di idrogel di peptidi corti autoassemblanti con lo scopo di migliorare l'adesione e crescita cellulare.<sup>15</sup>

### **1.1.3.1 Idrogel peptidici**

Recentemente gli idrogel peptidici, in particolare quelli basati su peptidi autoassemblanti a catena corta, hanno ricevuto un considerevole interesse da parte della comunità scientifica. Grazie alla loro composizione e somiglianza strutturale con l'ambiente extracellulare, risultano tra i principali candidati per la costruzione di *scaffold* biocompatibili per l'ingegneria tissutale. La loro struttura infatti, risulta vantaggiosa per la proliferazione cellulare e la sopravvivenza delle cellule seminate. Inoltre, cambiando la

sequenza degli amminoacidi è possibile modificare caratteristiche come forma, porosità, morfologia superficiale e dimensione degli idrogel. Trattandosi di gel fisici, i processi di gelificazione si basano su interazioni di natura supramolecolare che dipendono dalla sequenza amminoacidica, dal pH o dal tipo di elettroliti presenti nel mezzo.<sup>3, 16-18</sup>

### **1.1.3.2 Idrogel di nanocellulosa carbossilata**

La cellulosa è il biopolimero più abbondante al mondo e negli ultimi decenni è stato largamente studiato dalla comunità scientifica.<sup>19</sup> Si tratta infatti di un materiale abbondante, rinnovabile, dalle proprietà meccaniche eccellenti e facilmente modificabile per via chimica grazie alla presenza dei gruppi ossidrilici. Tuttavia, per riuscire a disperdere la cellulosa in acqua è necessario ridurla in nanofibre, note per l'innata flessibilità e per la capacità di formare reticoli fisici a concentrazioni relativamente basse. Per ottenere fibre di nanocellulosa, il pretrattamento più comune è la carbossilazione della cellulosa. L'introduzione di gruppi carbossilici favorisce il secondo trattamento, ovvero l'omogenizzazione ad alta pressione, grazie alla quale si ottiene nanocellulosa carbossilata. La carica superficiale e la morfologia della nanocellulosa consentono di ottenere nanofibre che si disperdono bene in acqua, dando sospensioni ad alta viscosità in grado di formare idrogel. L'eccezionale trasparenza di questi gel li rende ottimi candidati come matrici di materiali compositi per applicazioni biomediche, quali ad esempio l'ingegneria tissutale.<sup>20, 21</sup>

## **1.2 Nanostrutture di carbonio**

Il carbonio è l'elemento della tavola periodica alla base della vita sulla Terra. A livello elementare si trova in natura sottoforma di due allotropi, diamante e grafite, che consistono in un'estesa rete di atomi di carbonio, ibridati rispettivamente  $sp^3$  e  $sp^2$ , legati covalentemente.<sup>22</sup> Oltre alle forme allotropiche naturali ne esistono di sintetiche e alcune di queste prendono il nome di nanostrutture di carbonio. Le CNS possono essere definite come materiali carboniosi che vengono sintetizzati in modo tale che almeno una

delle loro dimensioni sia dell'ordine dei nanometri ( $< 100$  nm). La classe delle CNS comprende un'enorme varietà di allotropi del carbonio che si distinguono per forma e dimensione. Alla base di tale variabilità vi è la capacità dell'atomo di carbonio di presentarsi in più possibili stati di ibridazione (in questo caso  $sp^2$  e  $sp^3$ ), influenzando così la geometria dei legami covalenti che il singolo atomo può formare. Tra le CNS si possono distinguere strutture adimensionali come i nanoconi (CNH), monodimensionali come i nanotubi (CNT), bidimensionali o tridimensionali come i fullereni.<sup>7</sup> (Figura 1.2)

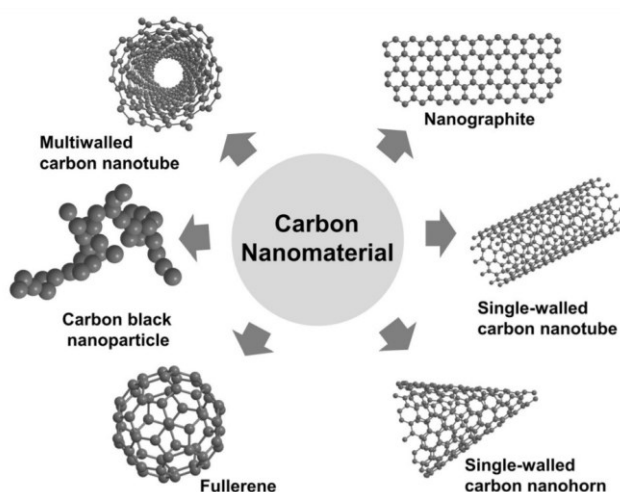


Figura 1.2 Rappresentazione schematica di alcune nanostrutture a base di carbonio<sup>23</sup>

Negli ultimi decenni le CNS hanno acquisito un interesse sempre maggiore grazie alle loro proprietà fisiche, chimiche, ottiche ed elettriche. In particolare, le proprietà e le applicazioni di CNT sono state investigate con molto interesse dalla comunità scientifica. Inizialmente la ricerca si concentrò su applicazioni che ne sfruttassero le proprietà fisiche, ultimamente invece l'attenzione si è spostata al campo biomedico.<sup>11, 24</sup>

### 1.2.1 Nanotubi di carbonio

I nanotubi di carbonio risultano particolarmente adatti per applicazioni di tipo neurale. Questa predisposizione è dovuta alla loro notevole area superficiale, alle importanti proprietà elettriche e meccaniche e alla loro capacità

intrinseca di supportare l'adesione delle cellule neuronali. Recenti studi hanno confermato le grandi potenzialità della superficie dei nanotubi di carbonio come substrato bio-compatibile su cui i neuroni sono in grado di aderire. Questa affinità sembrerebbe essere legata proprio alle proprietà della superficie come polarità, ruvidezza e carica.<sup>25</sup>

I nanotubi di carbonio sono CNS monodimensionali formate interamente da legami covalenti tra atomi di carbonio ibridati  $sp^2$ . Possono essere pensati come cilindri, i cui diametri sono dell'ordine dei nanometri, costituiti da fogli di grafene arrotolati. Normalmente, il singolo nanotubo di carbonio presenta almeno una delle due estremità chiusa con una struttura emisferica analoga a quella del fullerene. In base al processo di fabbricazione, si possono distinguere due tipi di CNT: a parete singola (SWCNT) e a parete multipla (MWCNT). I primi sono formati da un singolo foglio di grafene arrotolato, mentre i secondi sono costituiti da due o più fogli avvolti in modo coassiale attorno ad un cilindro vuoto. Forze di van der Waals tra gli strati adiacenti mantengono questo tipo di struttura.<sup>26</sup>

I nanotubi di carbonio sono uno degli esempi di nanostrutture ottenibili attraverso sintesi basate sull'approccio *bottom-up*. Se confrontati con altri nanomateriali, nonostante presentino una composizione chimica e un sistema di legami molto semplice, i nanotubi di carbonio mostrano variabilità strutturale e correlazione tra struttura e proprietà alquanto significative. Controllare i processi di sintesi di CNT consente di modularne proprietà e caratteristiche strutturali. Tuttavia, sintetizzare CNT con proprietà desiderate richiede, nella pratica, un eccezionale controllo del riarrangiamento atomico. I principali metodi di sintesi per i CNT sono *arc-discharge* (AD), *laser ablation* (LA) e *chemical vapor deposition* (CVD). I primi due si caratterizzano per l'uso di fonti di carbonio allo stato solido come precursori per la crescita dei nanotubi e prevedono la vaporizzazione del carbonio ad alte temperature (migliaia di gradi Celsius). La CVD invece, oltre ad impiegare idrocarburi gassosi come fonte di carbonio, utilizza particelle di catalizzatori metallici come "semi" per la crescita di CNT, e il processo avviene a temperature relativamente basse (500-1000 °C).<sup>27</sup> Nonostante il meccanismo di crescita

di CNT non sia noto con esattezza, ancora oggi si cercano nuovi metodi di sintesi per ottenere rese e purezze più alte con un basso grado di difetti.<sup>28</sup>

I MWCNT utilizzati in questo lavoro di tesi per la sintesi dei derivati sono stati ottenuti mediante l'approccio CVD.

In base all' "angolo di arrotolamento" dei fogli di grafite, i CNT possono avere tre ellitticità: sedia, zig-zag e chirale. La chiralità del singolo nanotubo viene definita attraverso il vettore chirale:

$$C_h = na_1 + ma_2$$

dove n e m sono numeri interi che rappresentano i coefficienti lungo i vettori  $a_1$  e  $a_2$  del reticolo esagonale. Utilizzando questo schema, definito (n, m), si distinguono tre tipi di orientazione che gli atomi di carbonio possono assumere lungo la circonferenza del CNT. La chiralità è definita sulla base dei valori n e m: se  $n = m$  si parla di nanotubi "a sedia", se  $m = 0$  di nanotubi "zig-zag" e infine, in tutti gli altri casi, quando  $n \neq m$  di nanotubi "chirali".

(Figura 1.3)

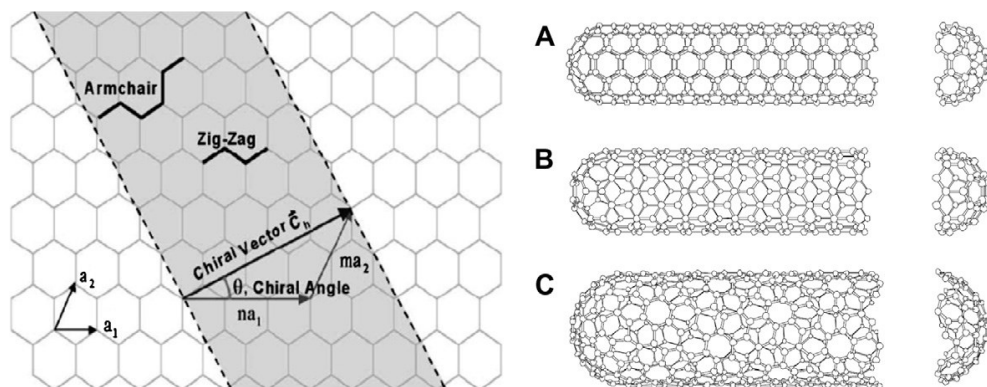


Figura 1.3 Rappresentazione schematica di un reticolo esagonale di un foglio di grafene e dei profili dei CNT a diverse ellitticità (A: sedia, B: zig-zag, C: chirale).<sup>26</sup>

L'ellitticità di CNT ha un impatto significativo sulle proprietà, in particolare quelle elettroniche: se  $(2n + m)$  è un multiplo di 3 il nanotubo ha carattere metallico, in caso contrario semiconduttore. Quando però ci si riferisce a MWCNT, risulta complicato stabilire le proprietà elettriche in quanto ciascun nanotubo è costituito da più fogli di grafene, ognuno dei quali può avere ellitticità diverse.<sup>26, 27, 29</sup>

I nanotubi di carbonio pristini, ovvero formati idealmente da soli atomi di carbonio, risultano insolubili in tutti i solventi organici e nelle soluzioni acquose. È possibile disperderli in alcuni solventi mediante sonicazione, ma quando il processo viene interrotto precipitano immediatamente. Per rendere i CNT più solubili al fine di integrarli in sistemi biologici, organici o inorganici, devono essere trattati chimicamente. I principali approcci per la modificazione di queste CNS monodimensionali possono essere raggruppati in tre categorie: (a) attacco covalente di gruppi funzionali attraverso reazioni allo scheletro di legami  $\pi$ -coniugati; (b) assorbimento o cattura non covalente di molecole sulla superficie del CNT; e (c) riempimento della cavità interna.<sup>30</sup> In questo lavoro di tesi, i MWCNT sono stati modificati chimicamente secondo il metodo (a). Per descrivere meglio la reattività chimica, è utile dividere la struttura di CNT in due regioni: parete laterale e porzione terminale. Quest'ultima presenta una struttura analoga all'emisfera di un fullerene; infatti l'estremità di un SWCNT (5,5) (*Figura 1.4a*) ricorda un fullerene C<sub>60</sub>. Di conseguenza, per comprendere al meglio la reattività di CNT è necessario prima accennare alla reattività dei fullereni e alle caratteristiche strutturali che la influenzano.

La reattività dei fullereni è, in primo luogo, determinata dall'enorme tensione di legame, dovuta alla geometria sferica, e che si riflette nel valore dell'angolo di piramidizzazione ( $\theta_p$ ) degli atomi di carbonio. L'angolo di piramidizzazione può essere definito come l'angolo compreso tra l'orbitale  $\pi$  dell'atomo di carbonio e il legame  $\sigma$  adiacente, a cui viene sottratto di un contributo di 90° (*Figura 1.4b*). Gli atomi di carbonio ibridati  $sp^2$ , tendono ad instaurare interazioni con altri atomi seguendo una geometria trigonale planare che implica angoli di piramidizzazione  $\theta_p = 0^\circ$ . Gli atomi di carbonio ibridati  $sp^3$  invece, assumono preferibilmente una geometria tetraedrica con  $\theta_p = 19.5^\circ$ . Nel fullerene C<sub>60</sub> tutti gli atomi di carbonio ( $sp^2$ ) hanno  $\theta_p = 11.6^\circ$ , ovvero la geometria dei loro legami è più vicina alla tetraedrica che alla trigonale planare. Per questo motivo nei fullereni le reazioni di addizione che portano alla conversione dei carboni trivalenti in carboni tetravalenti sono favorite. Ecco dunque che in un nanotubo di carbonio (sia a parete singola

che multipla) la porzione terminale risulta sempre più reattiva della parete laterale, indipendentemente dal diametro di CNT.

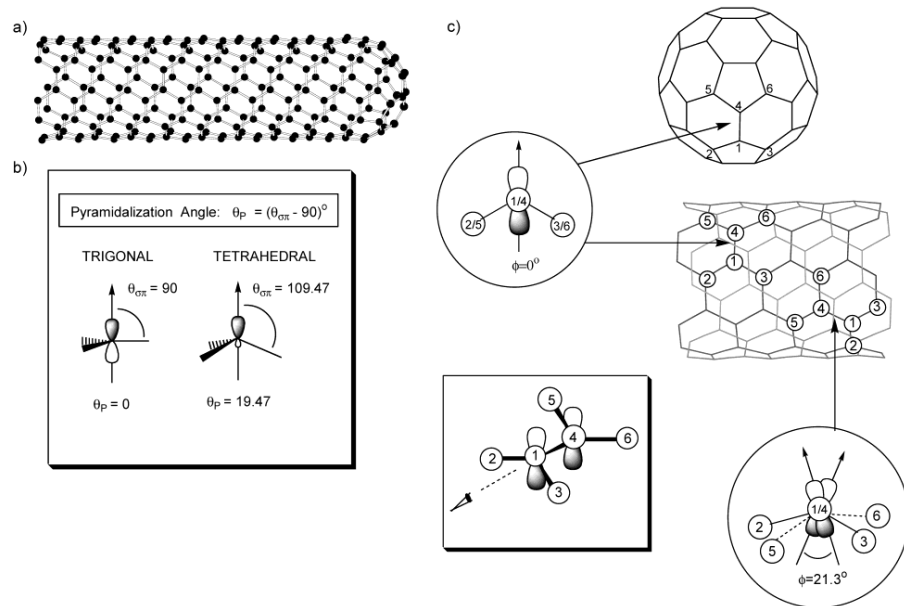


Figura 1.4 Rappresentazione schematica di (a) SWCNT (5,5), (b) angolo di piramidalizzazione ( $\theta_p$ ) e (c) angolo di disallineamento degli orbitali  $\pi$  lungo il legame covalente C1-C4 nel fullerene  $C_{60}$  e nel SWCNT (5,5).<sup>31</sup>

Un CNT perfetto, ovvero privo di difetti e gruppi funzionali, è considerato chimicamente inerte in quanto costituito esclusivamente da legami covalenti tra atomi di carbonio. Tuttavia, la curvatura indotta dalla piramidalizzazione e il disallineamento degli orbitali  $\pi$  degli atomi di carbonio, inducono una tensione locale che rende i CNT più reattivi rispetto a un foglio di grafene. Analizzando la struttura di un nanotubo di carbonio (Figura 1.4c) si nota che, nonostante gli atomi che la costituiscono siano tutti uguali fra loro, è possibile distinguere due tipologie di legami: quelli che corrono paralleli alla circonferenza (o perpendicolari all'asse del nanotubo), come C4-C6, e quelli che formano un certo angolo con la circonferenza, ad esempio C1-C4. Se si esaminano gli orbitali  $\pi$  degli atomi di carbonio coinvolti in questi legami si nota che nel primo caso sono perfettamente sovrapposti mentre, nel caso del legame C1-C4, tra i due orbitali è presente uno sfasamento quantificabile attraverso l'angolo di disallineamento ( $\phi$ ). A differenza dei nanotubi, nei fullereni l'allineamento degli orbitali  $\pi$  è praticamente perfetto. Caratteristiche come l'angolo di piramidalizzazione e di disallineamento variano

inversamente al diametro dei CNT e influenzano la reattività della nanostruttura.<sup>31, 32</sup>

### 1.2.2 Nanoconi di carbonio

Da qualche anno i nanoconi e i loro nanocompositi vengono studiati per diverse applicazioni, tra cui assorbimento e trasporto di gas, supporto di catalizzatori, sensoristica e ingegneria biomedica.<sup>33</sup> Uno degli aspetti che rende i nanoconi di carbonio a parete singola (SWCNH) particolarmente interessanti è la notevole area superficiale.<sup>34</sup>

I SWCNH sono strutture tubulari a forma di corno con punta conica, costituite da atomi di carbonio ibridati  $sp^2$  legati covalentemente. Generalmente, si ottengono mediante *laser ablation* di grafite pura, senza l'utilizzo di catalizzatori metallici, a temperatura ambiente, con tempi di produzione brevi e rese elevate. Durante la sintesi, i nanoconi tendono ad interagire tra loro mediante interazioni di tipo van der Waals, formando aggregati del diametro di circa 100 nm. In base alla forma di tali aggregati si possono distinguere tre diverse tipologie di CNH: "a dalia", "a bocciolo" e "a seme". Nonostante la forte tendenza ad aggregare, le caratteristiche strutturali, la reattività e l'approccio sintetico hanno reso i CNH oggetto di studio per svariate applicazioni (adsorbimento, supporto di catalizzatori, *drug delivery*, celle fotovoltaiche ecc.). Presi singolarmente, i SWCNH possono essere pensati come dei coni di diametro 2-5 nm e lunghezza 40-50 nm. Dal punto di vista strutturale, sono costituiti dalla combinazione di pentagoni, esagoni ed eptagoni. Così come i nanotubi, anche i nanoconi possono essere immaginati come frutto della distorsione di un singolo foglio di grafite. In generale, se si vuole ottenere una struttura conica a partire da un disco piatto, vi sono tre possibili modi (*Figura 1.5*). Il primo prevede la formazione di una doppia piega (*a*), il secondo la rimozione di una porzione triangolare del disco e la riconnessione delle estremità (*b*), ed il terzo il taglio, seguito da ripiegamento e sovrapposizione delle estremità, così da formare una sorta di elica (*c*).



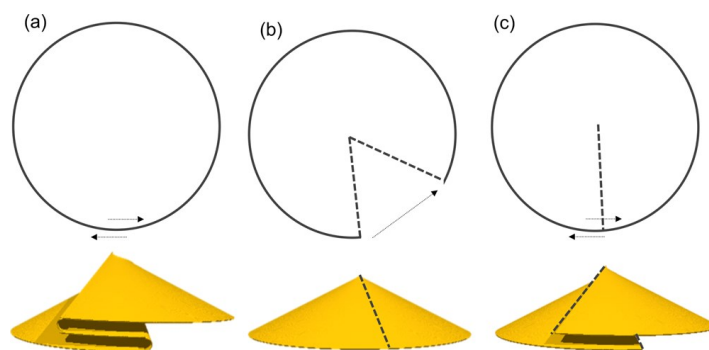


Figura 1.5 Tre modi per ottenere una struttura conica a partire da un disco piatto: (a) piega doppia, (b) rimozione di una sezione e riconnessione delle estremità, (c) taglio e sovrapposizione fuori dal piano a formare una struttura elicoidale.<sup>35</sup>

Immaginando di applicare al grafene quanto riportato in *Figura 1.5* per ottenere un SWCNH, le modalità (a) e (c) consentono di ottenere nanostrutture di forma conica con qualsiasi angolo al vertice. L'approccio (b) invece, ammette solo valori finiti di angoli al vertice. Tali limitazioni nascono dal fatto che, dato il sistema aromatico della grafite, per mantenere la continuità dei legami è necessario rimuovere "fette" con angoli di  $60^\circ$  (o multipli di  $60^\circ$ ). Data la struttura esagonale del grafene, ogni rimozione di una sezione triangolare porta alla formazione di almeno un pentagono in corrispondenza della punta del nanocono (*Figura 1.6a, 1.6b*).

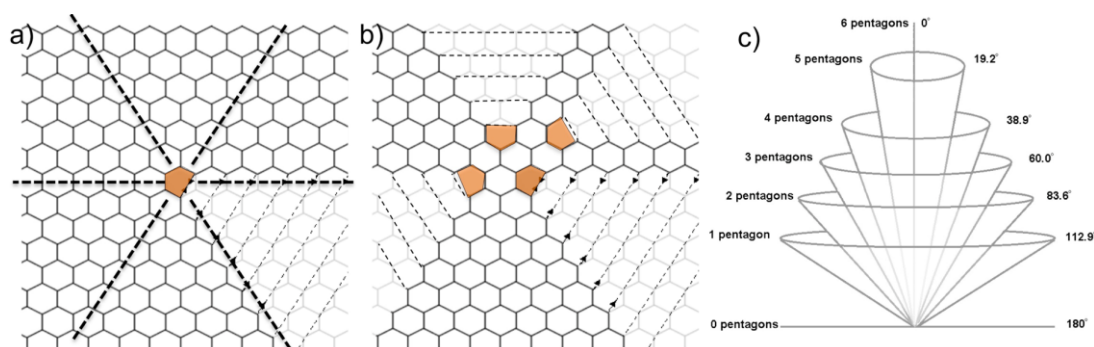


Figura 1.6 Rappresentazione schematica della costruzione di un SWCNH dal grafene mediante rimozione di una sezione triangolare (in grigio) e riconnessione delle estremità con formazione di nuovi legami (linee tratteggiate). (a) cono con un pentagono, (b) cono con quattro pentagoni, (c) Possibili coni con i relativi angoli di vertice e numeri di pentagoni.<sup>35</sup>

La *Figura 1.6c* mostra come l'angolo al vertice di SWCNH varia al variare del numero di pentagoni presenti nella punta. Normalmente ogni nanocono è costituito da un' estremità di forma conica, seguita da una breve sezione

cilindrica che ricorda la struttura dei nanotubi. Nella maggior parte dei casi le punte di CNH contengono cinque pentagoni, ma per mantenere la parete del CNH parallela all'asse centrale, come accade nei CNT, è necessario vi sia un ulteriore pentagono posto lontano dalla punta. Per compensare la curvatura imposta dalla presenza del sesto pentagono, a poca distanza da questo si trova un eptagono. (Figura 1.7)

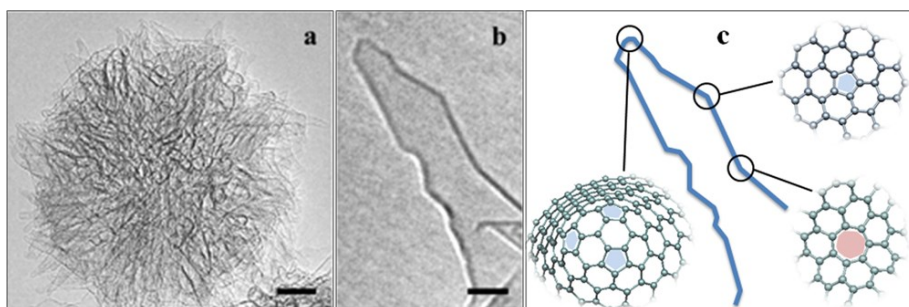


Figura 1.7 Immagini HRTEM di (a) un aggregato di CNH "a dalia" e (b) un singolo CNH. (c) rappresentazione schematica della tipica disposizione di pentagoni (blu) ed eptagoni (rosa).<sup>35</sup>

La combinazione di queste due geometrie (pentagono ed eptagono) comporta un'alterazione della struttura originale, che permette di mantenere costante la curvatura del nanocono influenzandone però la reattività. Pentagoni ed eptagoni costituiscono deviazioni dall'aromaticità, pertanto sono siti che possono essere attaccati più facilmente. Anche le regioni con curvatura elevata, dovuta alla distorsione piramidale dei legami di carboni ibridati  $sp^2$ , promuovono una reattività chimica localizzata. Nel caso di CNH dunque la reattività chimica risulta principalmente circoscritta attorno ai difetti e vicino alla punta. Uno dei principali modi per modificare la superficie di CNH è introdurre molecole/ioni/particelle inorganiche attraverso la funzionalizzazione chimica. Modificare chimicamente CNH può aumentarne la solubilità in acqua, requisito indispensabile nel caso di applicazioni biomediche, e dare nuovi sviluppi nello studio della scienza dei materiali. Per introdurre modifiche chimiche su CNH è possibile seguire due vie principali: attacco covalente di molecole organiche attraverso la formazione di legami stabili nella parete esterna, oppure assemblaggio non covalente di molecole funzionali attraverso  $\pi$ - $\pi$  *stacking*, interazione elettrostatica o immobilizzazione di particelle inorganiche. Le funzionalizzazioni covalenti a loro volta possono essere divise in due categorie: ossidazioni delle

terminazioni coniche, per introdurre specie ossidate (principalmente gruppi carbossilici) che possono subire modificazioni chimiche successive, e introduzione diretta di gruppi funzionali nella parete di CNH.<sup>35-37</sup>

### 1.2.3 Reattività delle CNS

Per anni l'uso delle nanostrutture di carbonio come filler di materiali compositi è stato ostacolato dalla loro insolubilità ed incompatibilità con i polimeri. Si è riusciti a risolvere questo problema attraverso protocolli sintetici che prevedono l'introduzione di sostituenti organici sulle pareti delle CNS. La funzionalizzazione infatti limita fortemente la tendenza all'aggregazione tipica delle CNS e le rende solubili in solventi organici, o in acqua. È utile precisare che i valori di solubilità delle nanostrutture dipendono fortemente dal metodo di filtrazione e di preparazione delle dispersioni. Per questo, quando si forniscono dati di solubilità, è importante definire il protocollo utilizzato per la determinazione, così da poter effettuare confronti e valutazioni consistenti.<sup>38</sup> In generale, le CNS possono essere modificate con approcci che prevedono il riempimento della cavità oppure la funzionalizzazione covalente, o non covalente, lungo le pareti, alle estremità o in corrispondenza dei difetti strutturali. Uno dei metodi più studiati per l'attacco di molecole alla superficie delle CNS è l'ossidazione. Sfortunatamente questa tecnica porta a nanostrutture con un livello di difetti elevato, condizione che altera significativamente le proprietà elettriche e meccaniche. Modificare chimicamente la parete delle CNS, risulta invece un approccio meno aggressivo e perciò viene preferito quando, ad esempio, si vogliono mantenere le proprietà elettroniche di CNT. Uno dei metodi di sintesi più importanti per la modifica chimica della superficie delle CNS è il *coupling* con sali di diazonio, noto anche con il nome di "reazione di Tour".<sup>39, 40</sup>

In questo lavoro di tesi tutti i derivati sintetizzati sono stati ottenuti modificando le nanostrutture di carbonio attraverso la reazione di Tour.

### 1.2.4 Reazione di Tour

La funzionalizzazione delle nanostrutture di carbonio attraverso la chimica del diazonio è una strategia versatile, scalabile e a basso costo per ottenere nanomateriali solubili con gradi di funzionalizzazione tra i più alti mai ottenuti. Nonostante il meccanismo sia ancora dibattuto, la via sintetica più accettata si basa sul meccanismo di Gomberg-Bachmann, secondo cui la reazione avviene mediante trasferimento di un elettrone dalla nanostruttura al sale di diazonio, rilasciando  $N_2$  e formando un radicale arilico reattivo in grado di attaccare la parete della nanostruttura per formare un legame covalente. A dare un notevole contributo per lo sviluppo di un processo semplice, conveniente e veloce per ottenere CNT altamente funzionalizzati e solubili, furono Tour e i suoi collaboratori. Essi infatti dimostrarono che è possibile funzionalizzare SWCNT attraverso sali di diazonio generati *in situ* mediante trattamento di aniline *p*-sostituite con isopentilnitrito. Questo tipo di approccio evita la necessità di isolare e conservare sali di diazonio arilici, fotosensibili e potenzialmente esplosivi. È comunemente accettato che il primo *step* della reazione di diazotazione coinvolga la dissociazione riduttiva del sale di diazonio, con perdita di  $N_2$  e formazione di un radicale arilico che, a sua volta, potrebbe attaccare un doppio legame carbonio-carbonio (Figura 1.8).

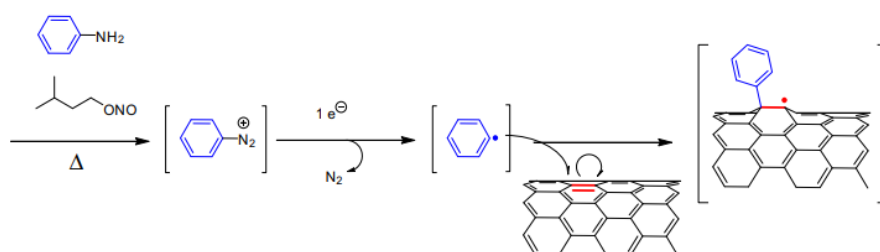


Figura 1.8 Meccanismo radicalico di funzionalizzazione dei CNT per aggiunta di sali di diazonio.<sup>41</sup>

Questo processo, probabilmente a causa dell'elevata reattività delle specie radicaliche coinvolte, porta a nanotubi altamente funzionalizzati e con valori di solubilità tra i più alti riportati in letteratura. Recentemente, è stato provato che la chimica del diazonio è applicabile anche a diversi allotropi del carbonio.<sup>39, 41, 42</sup>

### 1.3 Caratterizzazioni

Per studiare le CNS funzionalizzate (f-CNS) vengono utilizzate le seguenti caratterizzazioni.

#### 1.3.1 Analisi termogravimetrica (TGA)

La TGA è una tecnica fondamentale per lo studio delle proprietà termiche delle nanostrutture; essa consiste nel monitorare la variazione di peso di un campione che viene riscaldato in modo controllato, modulando il tempo, la temperatura e l'atmosfera (ossidante o inerte). Le perdite di peso possono essere attribuite a fenomeni di evaporazione, decomposizione ed ossidazione (nel caso in cui il processo avvenga in aria). Le CNS sono caratterizzate da un'elevata stabilità termica che deriva dalla loro composizione e struttura e che le rende refrattarie alla decomposizione fino a circa 650 °C, in base al tipo di CNS considerata (Figura 1.9). Nel caso in cui le CNS siano funzionalizzate è possibile osservare nel campione perdite di peso a temperature più basse e che possono essere associate alla decomposizione delle molecole legate alla superficie.

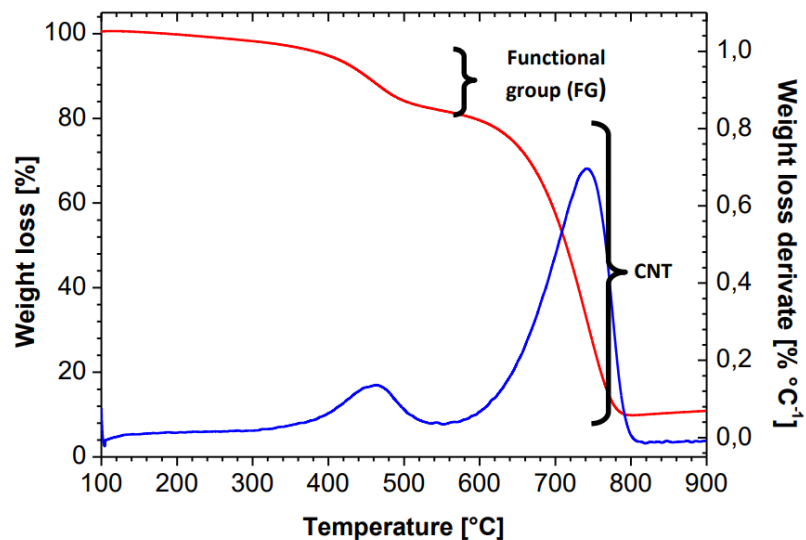


Figura 1.9 Esempio di un termogramma di un campione di f-MWCNT.<sup>14</sup>

Analizzando le due principali perdite di peso, è possibile calcolare il grado di funzionalizzazione (FD) delle nanostrutture attraverso il rapporto tra il numero di moli di gruppo funzionale ( $n_{FG}$ ) ed il numero di moli di carbonio ( $n_C$ ) presenti nel campione:

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

Il numero di moli del gruppo funzionale viene calcolato come rapporto tra la perdita di peso attribuita alla decomposizione del gruppo funzionale (FG) e la sua massa molecolare ( $MW_{FG}$ ). L'intervallo di temperatura nel quale si osserva la degradazione del FG va da 100 °C a 600 °C o 640 °C, a seconda che ci si riferisca a derivati di SWCNH o MWCNT rispettivamente. Analogamente,  $n_C$  è dato dal rapporto tra il peso residuo del campione alla temperatura alla quale termina la degradazione di FG ( $T_{FG}$ ) e la massa atomica del carbonio ( $MW_C$ ):

$$n_{FG} = \frac{(W_{100\text{ }^\circ\text{C}} - W_{T_{FG}})}{MW_{FG}}$$

$$n_C = \frac{(W_{T_{FG}})}{MW_C}$$

### 1.3.2 Spettroscopia UV-Vis-NIR

La misura di assorbimento UV-Vis-NIR viene condotta in un intervallo di lunghezze d'onda molto ampio che va dai 400 nm ai 2500 nm. Lo spettro di assorbimento delle nanostrutture di carbonio è caratterizzato da una regione lineare, detta plasmonica, relativa all'assorbimento degli elettroni delocalizzati dei carboni  $sp^2$ . Data la naturale tendenza delle nanostrutture di carbonio ad aggregare, è molto probabile che nella soluzione analizzata vi siano aggregati di dimensioni comparabili o talvolta superiori alla lunghezza d'onda della radiazione incidente, provocando fenomeni di scattering di Mie. Le misure UV-Vis-NIR quindi misurano l'attenuazione della luce data dalla somma di due contributi: l'assorbimento delle singole CNS e lo scattering della radiazione incidente sulla superficie degli aggregati. Nel caso in cui le f-CNS risultino ben disperse nel solvente, è possibile correlare l'assorbanza del campione alla sua concentrazione attraverso la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

in cui A rappresenta l'assorbanza del campione,  $\epsilon$  [ $\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ] il coefficiente di estinzione molare, l [cm] la lunghezza del cammino ottico e C la concentrazione del campione [ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]. Tuttavia, data la natura eterogenea delle CNS, valore del coefficiente di estinzione molare  $\epsilon$  non è noto a priori.<sup>43</sup>

### 1.3.3 Dynamic Light Scattering (DLS) e Zeta Potential (ZP)

La tecnica DLS fornisce il valore di raggio idrodinamico di nanoparticelle disperse in soluzione. Il raggio idrodinamico corrisponde al raggio di un'ipotetica sfera dura che, sottoposta a DLS, diffonde con la stessa velocità della particella analizzata (Figura 1.10).

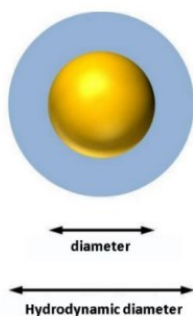


Figura 1.10 Rappresentazione schematica del confronto tra diametro e diametro idrodinamico di una particella sferica.<sup>14</sup>

Lo strumento, dopo aver misurato l'intensità della luce scatterata dalle nanoparticelle, la correla al coefficiente di diffusione del campione attraverso un modello matematico. Il valore del raggio idrodinamico viene poi ricavato utilizzando l'equazione di Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_H}$$

dove D è il coefficiente di diffusione,  $k_b$  la costante di Boltzmann,  $\eta$  la viscosità del campione e  $R_H$  il raggio idrodinamico della particella sferica.<sup>44</sup>

Anche la misura di potenziale Zeta si basa sullo scattering della luce. Quando una particella carica si trova in un mezzo disperdente, a cui viene applicato un campo elettrico, questa si muove verso l'elettrodo di segno opposto (elettroforesi). Considerando ad esempio una particella carica

negativamente (vedi Figura 1.11), nei pressi della sua superficie si trovano un'elevata quantità di ioni di carica opposta (strato di Stern); oltre questo strato l'effetto della carica superficiale cala e si sviluppa uno strato diffuso in cui si trovano sia particelle positive che negative. Si definisce doppio strato elettrico la somma dello strato di Stern e dello strato diffuso. Durante l'elettroforesi le particelle (con il loro doppio strato elettrico) si muovono verso l'elettrodo opposto e l'interfaccia tra la particella mobile e il mezzo dispersante prende il nome di piano di scivolamento. Il potenziale Zeta è il potenziale in corrispondenza del piano di scivolamento. Convenzionalmente, valori  $< -30$  mV e  $> 30$  mV sono considerati valori di potenziale Zeta elevati.<sup>44, 45</sup>

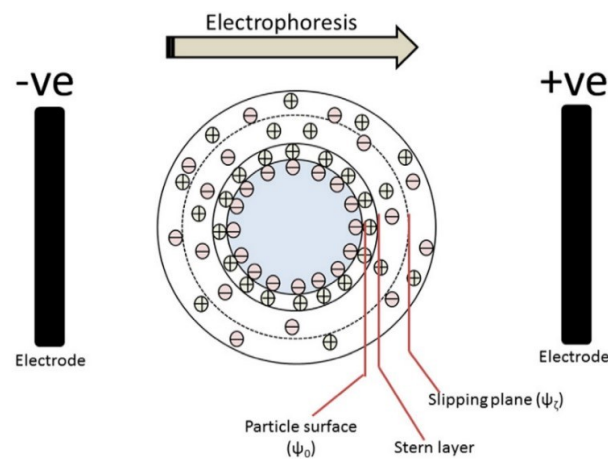


Figura 1.11 Rappresentazione del doppio strato elettrico di una particella negativa.<sup>44</sup>

### 1.3.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

La microscopia elettronica usa un fascio di elettroni, generato da un flusso di corrente in un filo di tungsteno, come sorgente di radiazione luminosa per ottenere immagini ad alta risoluzione. Gli elettroni vengono accelerati verso il campione da una differenza di potenziale tra il filo e un anodo e focalizzati mediante delle lenti elettromagnetiche. Il microscopio a trasmissione elettronica (TEM) acquisisce immagini ad alta risoluzione attraverso il rilevamento degli elettroni trasmessi. Nel caso dei materiali nanocompositi a base di idrogel, questa tecnica viene utilizzata per osservare lo stato di aggregazione e la distribuzione delle nanostrutture all'interno della matrice.



### 1.3.5 Reologia

Il termine “reologia” viene definito come lo studio della deformazione della materia.<sup>46</sup> Gli esperimenti reologici prevedono l'applicazione di forze, flessioni e velocità di taglio su un materiale al fine di studiarne la deformazione ( $\gamma$ ). In particolare, la forza di taglio ( $\tau$ ) è la pressione applicata al campione e si definisce come il rapporto tra la forza tangente alla superficie e l'area della sezione di taglio. Tutti i possibili comportamenti reologici possono essere collocati tra due estremi: liquido viscoso ideale e solido elastico ideale. Il primo segue la legge della viscosità ( $\eta$ ) di Newton:

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

il comportamento di un solido elastico ideale invece viene descritto dalla legge di Hooke:

$$\tau = G \cdot \gamma$$

Se si considera un comportamento elastico lineare, il modulo di taglio ( $G$ ) non dipende dalla durata o dal tipo di deformazione e quando la pressione viene rimossa il materiale ritorna allo stato iniziale. Quando però un materiale presenta simultaneamente un comportamento elastico e viscoso, definito viscoelastico, il suo modulo di taglio ( $G^*$ ) assume una forma complessa. Per i materiali viscoelastici  $G^*$  possiede infatti un contributo che descrive la componente elastica del materiale ( $G'$ ) e uno che descrive la componente viscosa ( $G''$ ).

Il modulo elastico ( $E$ ) di un solido, o modulo di Young, è definito come il rapporto tra la forza di taglio e la deformazione che ne deriva e quantifica la resistenza del materiale alla deformazione. Se si assume che un materiale sia isotropico, si può calcolare il modulo elastico ( $E$ ) tramite il rapporto di Poisson:

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

Nel caso poi di materiali incomprimibili, il valore di  $\nu$  viene approssimato a 0.5, consentendo di calcolare il modulo elastico con l'espressione semplificata  $3G'$ .<sup>47</sup> Essendo gli idrogel materiali viscoelastici, l'analisi

reologica consente di ottenere informazioni sulle loro proprietà fisiche e meccaniche, come ad esempio il modulo elastico, applicando le approssimazioni sopra descritte.<sup>48</sup>

#### **1.4 Scopo della tesi**

Lo scopo di questo lavoro di tesi è sintetizzare derivati di nanostrutture da impiegare come *filler* in materiali compositi per studiarne le proprietà in vista di possibili applicazioni biomediche. Si intende in particolare ottenere derivati di SWCNH (f-SWCNH) e MWCNT (f-MWCNT) con diversi gruppi funzionali per valutare come la funzionalizzazione influenzi il comportamento delle nanostrutture, in particolare la *dispersibilità* in acqua. Nel caso dei nanotubi si intende poi valutare come la diversa funzionalizzazione influenzi le proprietà dei materiali compositi ottenuti disperdendo i derivati all'interno di idrogel biocompatibili a base peptidica o di nanocellulosa carbossilata.

Si intende utilizzare i materiali nanocompositi risultanti come modelli per lo studio di crescita e differenziazione delle cellule nervose. Le caratteristiche dei gruppi funzionali introdotti (in particolare la loro carica elettrostatica) potrebbero infatti modulare non solo la solubilità delle nanostrutture, ma anche l'effetto delle stesse sulle proprietà meccaniche e sull'adesione, la crescita e la differenziazione cellulare. Non è da escludere ad esempio che la carica superficiale possa influenzare la tossicità della nanostruttura, aspetto che dipende principalmente dallo stato di aggregazione e dalle interazioni con proteine e membrane cellulari, e che può influenzare la crescita e differenziazione cellulare. In prospettiva, una futura prosecuzione del lavoro estenderà lo studio a nanocompositi a base dei derivati di SWCNH.

## 2 Risultati e discussione

### 2.1 Funzionalizzazione di f-CNS

Le nanostrutture di carbonio pristinе, ovvero non funzionalizzate, come nanotubi e nanoconi, tendono ad aggregare molto facilmente a causa di interazioni attrattive di tipo van der Waals tra i carboni ibridati  $sp^2$  e  $\pi$ - $\pi$  *stacking*. Tale comportamento limita la possibilità di usare questi materiali in ambito biologico e di sfruttarne proprietà come ad esempio l'elevata area superficiale. Modificare chimicamente la parete di MWCNT e SWCNH comporta l'introduzione di gruppi funzionali che possono instaurare interazioni di tipo repulsivo elettrostatico tra CNS e/o di tipo attrattivo con il solvente, come legami idrogeno o interazioni dipolari. La presenza di uno o di entrambi questi fattori limita la tendenza delle nanostrutture all'aggregazione e ne promuove la *disperdibilità*.

Per ottenere derivati di MWCNT e SWCNH solubili in acqua le nanostrutture sono state funzionalizzate con gruppi benzensolfonato (**S**), metilsulfonilbenzene (**MeS**) e trimetilbenzenammonio (**N**) (Figura 2.1) utilizzando la reazione di Tour.

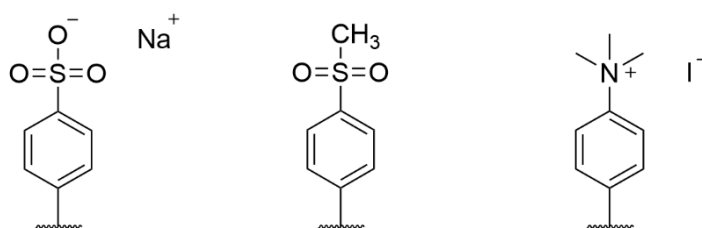


Figura 2.1 Gruppi funzionali dei derivati di MWCNT e SWCNH sintetizzati. Da sinistra: benzensolfonato, metilsulfonilbenzene e trimetilbenzenammonio.

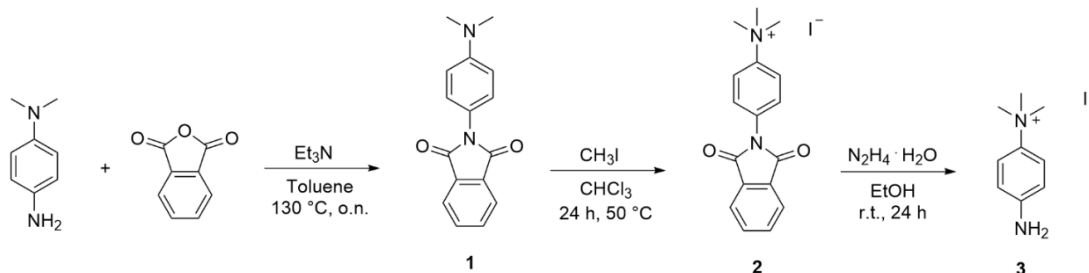
La reazione è stata condotta in acqua, per derivati funzionalizzati con benzensolfonato e trimetilbenzenammonio, e in 1-cicloesil-2-pirrolidone (CHP) per quelli funzionalizzati con metilsulfonilbenzene. La scelta del solvente è stata dettata dalla solubilità delle aniline precursore che sono, rispettivamente, sodio sulfanilato, 4-N,N,N-trimetilbenzenammonio ioduro e 4-metilsulfonilanilina.

Nel gruppo di ricerca sono già stati sintetizzati in passato derivati di MWCNT con gruppi benzensolfonato.<sup>14, 15, 49</sup> Tra gli aspetti vantaggiosi di questa scelta si possono citare la buona solubilità in acqua dell'anilina precursore e la sua semplice manipolazione. Anche la persistenza della carica negativa è stato uno dei fattori che hanno reso il benzensolfonato interessante per lo studio che si è voluto condurre in questo lavoro di tesi. Data infatti la notevole forza acida dell'acido benzensolfonico ( $pK_a = -6.65$ )<sup>50</sup>, il gruppo benzensolfonato mantiene la sua forma deprotonata in un ampio intervallo di pH e in particolare in condizioni fisiologiche ( $pH = 7.53-7.45$ )<sup>51</sup>. I dati raccolti durante i lavori precedenti dimostrano che il gruppo benzensolfonato favorisce la disaggregazione degli agglomerati di MWCNT, rendendo la nanostruttura disperdibile in acqua.

Data la prospettiva di impiego di f-MWCNT e f-SWCNH come *filler* di materiali per la crescita cellulare, si è voluto testare nanostrutture decorate con gruppi neutri per evitare di introdurre cariche nell'ambiente cellulare. Alcuni studi infatti hanno dimostrato che il tipo e la densità di cariche sulla superficie dei nanotubi può influenzare l'interazione del materiale con le cellule.<sup>52</sup> L'idea è stata dunque quella di funzionalizzare MWCNT e SWCNH con metilsulfone per conferire solubilità mediante interazioni polari e legami a idrogeno con il solvente, senza introdurre cariche superficiali.

Negli ultimi anni l'introduzione di cariche positive sulla superficie di scaffold per la crescita cellulare ha assunto un interesse sempre maggiore, in particolar modo per applicazioni in ambito neuronale. Diversi studi infatti hanno dimostrato che, quando i neuroni crescono in presenza di cariche positive, si osservano assoni più lunghi e con ramificazioni più elaborate.<sup>25</sup> Naturalmente, come riportato per il gruppo benzensolfonato, è importante che anche i derivati carichi positivamente risultino stabili in ambiente biologico e mantengano la carica in condizioni di pH fisiologico. Si è scelto dunque di funzionalizzare MWCNT e SWCNH con un gruppo ammonio quaternario già utilizzato in passato nel gruppo di ricerca: trimetilbenzenammonio.<sup>14, 15</sup> Per ottenere l'anilina precursore (4-N,N,N-trimetilbenzenammonio ioduro) la N,N-dimetilbenzene-1,4-diammina è stata metilata mediante una sintesi multistadio.<sup>53</sup> Lo schema di reazione è riportato

in *Figura 2.2*. Il primo *step* consiste nella protezione dell'ammina primaria con anidride ftalica, attraverso attacco nucleofilo dell'azoto sul carbonio carbonilico, per dare un legame ammidico (**1**). Lo ioduro di metile è quindi in grado di reagire selettivamente con l'ammina terziaria dando il sale di ammonio quaternario (**2**). Infine, l'anidride ftalica viene rimossa mediante riduzione con idrazina, liberando così l'ammina primaria (**3**).



*Figura 2.2* Schema di reazione della sintesi multistadio di 4-N,N,N-trimetilbenzenammonio ioduro.

## 2.2 Caratterizzazione di f-CNS

Al fine di studiare le proprietà dei derivati f-MWCNT e f-SWCNH, sono state effettuate una serie di caratterizzazioni tipicamente utilizzate nel campo delle nanostrutture di carbonio. Non trattandosi di molecole ma di materiali disomogenei per forma, struttura e dimensione, la valutazione dei risultati può essere complessa e richiede spesso un approccio comparativo. In questo lavoro sono state condotte le seguenti caratterizzazioni: analisi TGA per studiare la degradazione termica, misure di *dispersibilità* in acqua, spettri di assorbimento UV-Vis-NIR, esperimenti DLS per stimare la dimensione degli aggregati e la loro distribuzione e misure di potenziale Zeta.

Le analisi TGA sono state condotte sui campioni solidi in atmosfera di azoto al fine di ottenere la perdita di peso percentuale e il profilo degradativo della nanostruttura, in particolare della componente organica associata ad essa, evitando contributi legati all'ossidazione del materiale.

Tutte le altre caratterizzazioni sono state condotte in soluzioni ottenute a partire da un *estratto* in acqua dei derivati sintetizzati. Con il termine "estratto" si intende la dispersione acquosa contenente la frazione più solubile di ciascun derivato, ottenuta mediante una specifica procedura

basata su processi di sonicazione, centrifugazione e filtrazione (*per i dettagli consultare sezione 3.2.11 e lavori precedenti*<sup>41</sup>). Al fine di ottenere risultati confrontabili all'interno della tesi e con lavori precedenti, si è usata sempre la medesima procedura, con l'unica accortezza di utilizzare una centrifugazione a valori di rpm più alti nel caso dei nanoconi in quanto più leggeri dei nanotubi (*vedi sezione 1.2.2*), e quindi più difficili da precipitare.

Per ogni derivato, un volume noto di *estratto* è stato caricato sul crogiolo della TGA, utilizzando poi lo strumento per evaporare a temperatura controllata il solvente e misurare il peso del prodotto asciutto (*vedi sezione 3.2.12*), che è stato quindi usato per stabilire la concentrazione dell'*estratto* in mg/mL. Si è quindi definito tale valore "*disperdibilità*" in acqua del derivato, dato che con questo tipo di sostanze non si può a rigore applicare il concetto di solubilità dei sistemi molecolari.

La spettroscopia UV-Vis-NIR è una tecnica che può fornire informazioni sullo stato di aggregazione dei derivati delle nanostrutture.<sup>54</sup> In questo lavoro viene definita "*assorbanza operativa*" il valore di assorbanza a 1000 nm della soluzione ottenuta diluendo l'*estratto* 100 volte. Si è scelto di considerare tale lunghezza d'onda per poter attribuire i valori di assorbanza registrati alla sola nanostruttura, in quanto i gruppi funzionali introdotti non hanno assorbimenti caratteristici attorno a 1000 nm. A differenza dai sistemi molecolari in soluzione diluita, per le nanostrutture non si può presumere una dipendenza lineare dell'assorbanza dalla concentrazione. Pertanto, la spettroscopia UV-Vis-NIR non è stata utilizzata al fine di ricavare la concentrazione delle dispersioni, per confrontare la *disperdibilità* di derivati di CNS con funzionalizzazione diversa e le cui dispersioni sono state preparate applicando la stessa procedura.

Le CNS sono caratterizzate da forme che si discostano significativamente dalla geometria sferica. Di conseguenza, le misure DLS non possono fornire il raggio idrodinamico delle singole nanostrutture (nanotubi e nanoconi) e l'equazione di Stokes-Einstein non può a rigore essere applicata. Tuttavia, se si considerano aggregati di CNH e CNT, questi possono essere approssimati ad una struttura di forma complessivamente sferica. Pertanto, l'analisi DLS

delle dispersioni (*per dettagli consultare sezione 3.2.11*) può essere utilizzata per avere una stima del diametro idrodinamico medio degli aggregati delle f-CNS. I valori ottenuti per i diversi derivati hanno consentito di confrontare le dimensioni degli aggregati e la loro distribuzione nella dispersione. L'indice di polidispersione (PDI), associato alle misure del diametro idrodinamico medio, è un dato che può essere utilizzato per avere una stima dell'eterogeneità del campione in termini di diametri idrodinamici registrati. La polidispersione può essere dovuta alla distribuzione dimensionale degli aggregati nel campione o all'aggregazione del campione durante l'analisi.

La misura del potenziale Zeta (ZP) fornisce un potenziale di superficie che può dare un'indicazione sulla natura della carica superficiale (positiva o negativa) delle f-CNS. Questa assunzione è basata sul fatto che la composizione in termini di carica del piano di scivolamento sia simile a quella della superficie f-CNS.<sup>44</sup>

## **2.3 Derivati di nanotubi di carbonio**

### **2.3.1 Funzionalizzazione di nanotubi di carbonio**

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati quattro derivati di MWCNT: due carichi negativamente (**MWCNT-S1**, **MWCNT-S2**), uno neutro (**MWCNT-MeS**) e uno carico positivamente (**MWCNT-N**). Le reazioni di funzionalizzazione sono state condotte su MWCNT pristini con diametro esterno di 8-15 nm. In *Tabella 2.1* vengono riportati i rapporti molari (in seguito denominati "equivalenti") di anilina precursore e isopentil nitrito, rispetto alle moli di carbonio, utilizzati per la sintesi dei derivati.

*Tabella 2.1 Rapporti molari di anilina precursore ed isopentil nitrito, rispetto alle moli di carbonio.*

<b>Derivato</b>	<b>Equivalenti di anilina precursore</b>	<b>Equivalenti di isopentil nitrito</b>
<b>MWCNT-S1</b>	0.5	1
<b>MWCNT-S2</b>	0.05	0.1
<b>MWCNT-MeS</b>	0.5	0.5
<b>MWCNT-N</b>	1	1

La reazione di funzionalizzazione consiste in un *coupling* tra i carboni  $sp^2$  di MWCNT e il sale di diazonio ottenuto a partire dall'anilina, utilizzando come iniziatore radicalico isopentil nitrito<sup>39</sup> (Figura 2.3).

Poiché è noto che gli *equivalenti* di reagenti utilizzati per la funzionalizzazione hanno un effetto non trascurabile sulla struttura dei derivati ottenuti<sup>41</sup>, si è deciso, basandosi su lavori di tesi svolti in passato all'interno del gruppo di ricerca<sup>14, 15, 49</sup>, di sintetizzare due tipologie di MWCNT funzionalizzati con benzensolfonato (**MWCNT-S**), al fine di confrontarne la *disperdibilità* in acqua. I derivati sintetizzati vengono denominati **MWCNT-S1** e **MWCNT-S2** e differiscono unicamente per gli *equivalenti* impiegati nel corso della reazione di Tour (vedi Tabella 2.1).

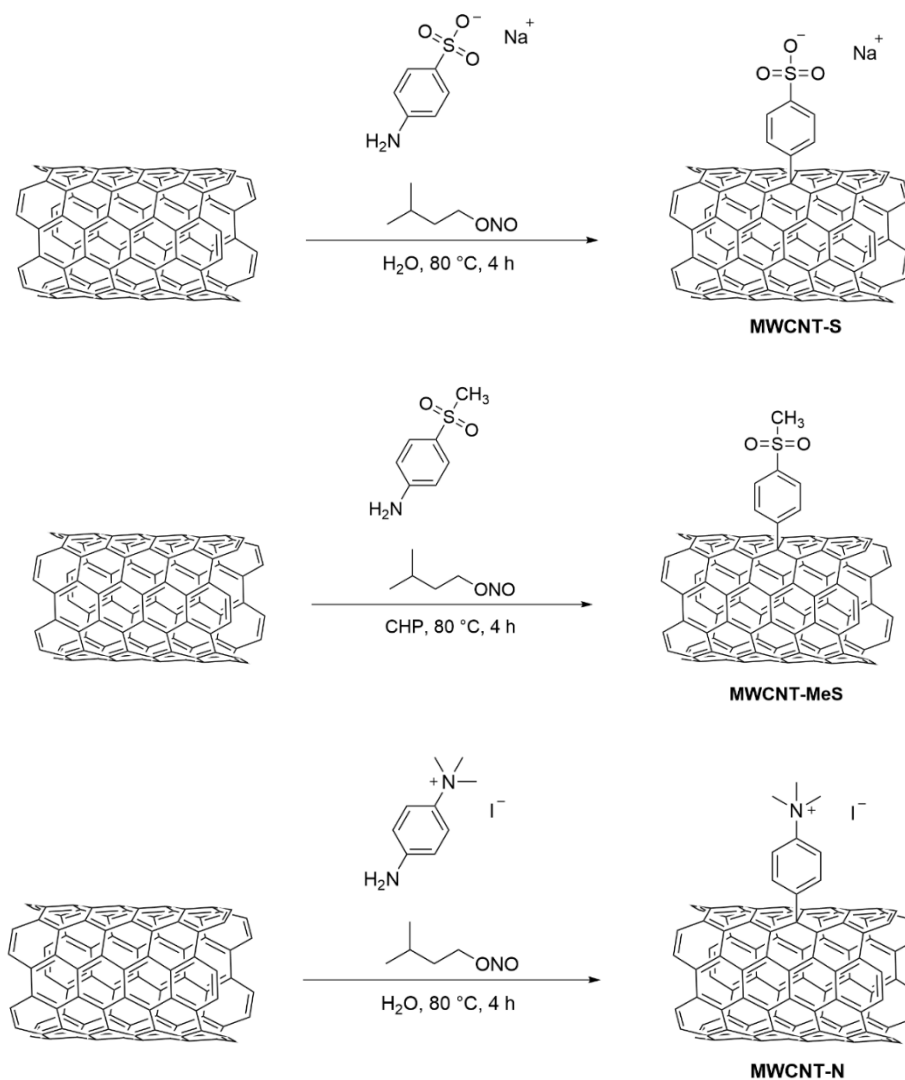


Figura 2.3 Schema della reazione di Tour per la funzionalizzazione di MWCNT con gruppi (dall'alto) benzensolfonato, metilsulfonilbenzene e trimetilbenzenammonio.



### 2.3.2 Caratterizzazione di derivati di nanotubi di carbonio

Una volta sintetizzati i derivati di MWCNT, sono state condotte le analisi termogravimetriche in atmosfera inerte. I valori di perdita di peso percentuale nell'intervallo di temperatura 100-640 °C vengono riportati in *Tabella 2.2*.

*Tabella 2.2 Risultati delle misure TGA dei derivati di MWCNT.*

<b>Derivato</b>	<b>Perdita di peso [%]</b> 100-640 °C in N <sub>2</sub>	<b>FD [%]</b> a 640°C
<b>MWCNT-S1</b>	9.04	0.67
<b>MWCNT-S2</b>	9.61	0.71
<b>MWCNT-MeS</b>	9.51	0.81
<b>MWCNT-N</b>	10.64	0.54

Osservando il termogramma del derivato **MWCNT-S1** (*Figura 2.4a*), e confrontandolo con il profilo degradativo della nanostruttura pristina, si possono riconoscere due principali perdite di peso. Il termogramma del derivato **MWCNT-S2** (*Figura 2.4b*) presenta invece un profilo degradativo differente, caratterizzato da tre perdite di peso nell'intervallo tra 100 °C e 640 °C. Entrambi i termogrammi suggeriscono che al di sotto dei 640 °C si verifica la degradazione dei gruppi funzionali benzensolfonato associati alla nanostruttura, con percentuali di perdite di peso simili per i due derivati. Dato che i derivati **MWCNT-S1** e **MWCNT-S2** differiscono solo per i rapporti molari tra nanostruttura e reagenti impiegati nel corso della sintesi, ci si potrebbe aspettare di ottenere termogrammi con profili degradativi analoghi. Il fatto che questa condizione non si verifichi conferma che non è possibile stabilire con certezza il tipo di interazioni che il gruppo funzionale instaura con la nanostruttura o le modalità con le quali questo subisce una degradazione. In generale, si possono fare diverse ipotesi sulle cause che portano alla perdita di peso del campione analizzato. Nel caso di **MWCNT-S1**, si può ipotizzare che la prima perdita di peso (nell'intervallo 240-400 °C) sia dovuta alla desolfurazione (rilascio di SO<sub>2</sub>) del gruppo benzensolfonato; mentre la seconda, a circa 565 °C, potrebbe essere associata alla degradazione della componente aromatica residua legata alla parete dei nanotubi.<sup>55</sup> Questa ipotesi non è però in accordo con il profilo degradativo del derivato **MWCNT-**

**S2.** Un'altra possibile spiegazione prevede di attribuire le perdite di peso a temperature inferiori alla degradazione di molecole adsorbite sulla superficie del nanotubo, mentre a temperature più alte avverrebbe la perdita di unità di benzenosolfonato legate covalentemente al nanotubo di carbonio.<sup>49</sup> In quest'ottica si giustificerebbe il fatto che la degradazione a temperature maggiori sembra più marcata per il derivato ottenuto con più equivalenti di reagente.

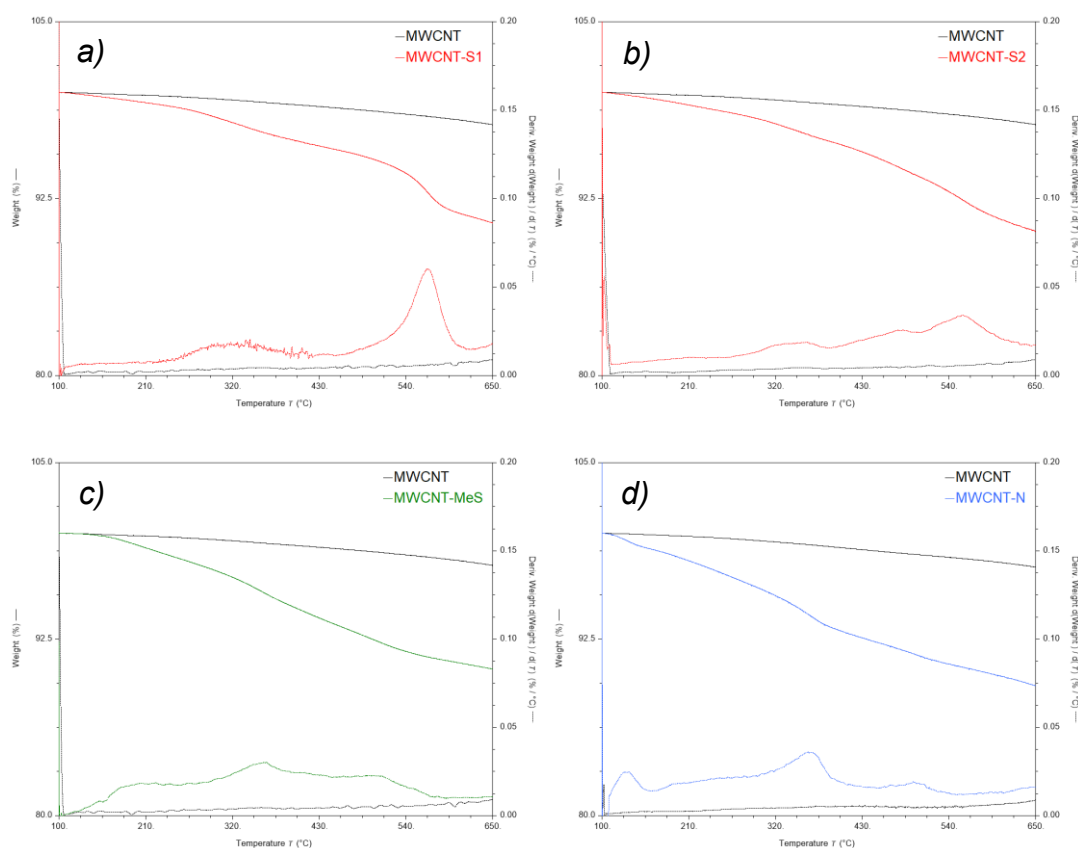


Figura 2.4 Ingrandimenti dei termogrammi di (a) **MWCNT-S1**, (b) **MWCNT-S2**, (c) **MWCNT-MeS** e (d) **MWCNT-N**.

Analizzando il profilo degradativo di **MWCNT-MeS** (Figura 2.4c) e confrontandolo con quello della nanostruttura pristina, si osserva una perdita di peso abbastanza regolare tra i 100 °C e i 600 °C, con una variazione più marcata attorno ai 360 °C. Confrontando il termogramma di **MWCNT-MeS** con quello di **MWCNT-S1** e **MWCNT-S2** si osserva che, nel caso del derivato neutro, il processo degradativo inizia a temperature più basse rispetto ai derivati carichi negativamente. Questa differenza potrebbe essere dovuta alla minor stabilità termica del gruppo metilsulfonilbenzene rispetto al

benzensolfonato, oppure alla presenza di diversi tipi di legame tra il gruppo e la nanostruttura.

Osservando il termogramma del derivato **MWCNT-N** (*Figura 2.4d*) si notano tre perdite di peso nell'intervallo di temperature tra 100 °C e 640 °C. Anche in questo caso, come per il derivato neutro **MWCNT-MeS**, il processo di decomposizione della componente organica inizia a temperature relativamente basse rispetto ai derivati carichi negativamente. La perdita di peso più significativa si ha a 360 °C. Anche in questo caso si può ipotizzare che le perdite di peso siano associate a diverse fasi della degradazione del gruppo trimetilbenzenammonio oppure che siano dovute alla natura dell'interazione che il gruppo funzionale instaura con la nanostruttura.

A partire dalle perdite in peso sono stati calcolati i gradi di funzionalizzazione FD (*vedi sezione 1.3.1*) riportati in *Tabella 2.2*, che rappresentano il rapporto tra il numero di moli di gruppo funzionale ed il numero di moli di carbonio. Si tratta tuttavia di un valore che, nel caso dei MWCNT, non può essere direttamente ricondotto alla densità superficiale dei gruppi funzionali, in quanto la maggior parte degli atomi di carbonio fanno parte degli strati interni, non disponibili alla funzionalizzazione. Il valore di FD fornisce dunque solamente una stima relativa della funzionalizzazione della nanostruttura utile in termini comparativi nel caso di derivati diversi ottenuti a partire dagli stessi MWCNT.

Confrontando i valori di FD si può ipotizzare che l'efficienza della funzionalizzazione cresca leggermente in base alla natura del gruppo funzionale con il seguente andamento: trimetilbenzenammonio, benzensolfonato e infine metilsulfonilbenzene.

In *Tabella 2.3* vengono riportati i valori di *disperdibilità* e *assorbanza operativa* dei derivati di MWCNT.

Tabella 2.3 Disperdibilità in acqua e assorbanza operativa\* dei derivati di MWCNT.

<b>Derivato</b>	<b>Disperdibilità in acqua</b> [mg/mL]	<b>Assorbanza operativa*</b> [u.a.]
<b>MWCNT-S1</b>	1.56	0.44
<b>MWCNT-S2</b>	1.44	0.40
<b>MWCNT-MeS</b>	0.36	0.09
<b>MWCNT-N</b>	1.09	0.32

\*assorbanza a 1000 nm della dispersione diluita 100 volte (vedi sezione 2.2)

Considerando che i MWCNT pristini hanno una *disperdibilità* in acqua praticamente nulla a causa della forte tendenza dei nanotubi ad aggregare, i valori ottenuti per i derivati sono piuttosto soddisfacenti e dimostrano che la funzionalizzazione ha un effetto migliorativo sul comportamento dei nanotubi in acqua. In particolare, il derivato **MWCNT-S1** risulta il più solubile, con una *disperdibilità* quattro volte superiore rispetto a **MWCNT-MeS**; **MWCNT-N** presenta invece un valore di *disperdibilità* di poco inferiore a quello dei derivati negativi ma quasi tre volte superiore a quello di **MWCNT-MeS**.

Analizzando i dati riportati in *Tabella 2.3*, è interessante notare che il rapporto tra le *disperdibilità* dei due derivati **MWCNT-S** (1.08) è uguale al rapporto tra le *assorbanze operative*, come se ci fosse una dipendenza lineare dell'assorbanza dalla concentrazione, in accordo con la legge di Lambert-Beer.<sup>43</sup> Tale comportamento non è scontato per un sistema non costituito da molecole, ma da particelle di struttura non definita, e può essere considerato indicativo dell'omogeneità della dispersione e del fatto che i due derivati abbiano struttura simile.

Per tutti i derivati sintetizzati i valori di *disperdibilità* risultano in accordo con la relativa *assorbanza operativa*.

In *Tabella 2.4* vengono riportati in valori di diametro idrodinamico medio, di Pdl, di potenziale Zeta e la relativa deviazione standard.

Tabella 2.4 Misure DLS e ZP dei derivati di MWCNT.

<b>Derivato</b>	<b>Diametro idrodinamico medio [nm]</b>	<b>Pdl</b>	<b>Potenziale Zeta [mV]</b>	<b>Potenziale Zeta Std Dev [mV]</b>
<b>MWCNT-S1</b>	144.0	0.282	-44.8	1.72
<b>MWCNT-S2</b>	136.1	0.266	-45.3	0.529
<b>MWCNT-MeS</b>	132.5	0.249	-30.2	0.577
<b>MWCNT-N</b>	139.9	0.229	43.3	1.05

L'analisi DLS è utilizzata per stimare il diametro idrodinamico medio degli aggregati di f-MWCNT e, associata alle misure di potenziale Zeta, fornisce una buona descrizione del loro comportamento in acqua. In generale, ci si può aspettare che una funzionalizzazione efficace porti ad una disaggregazione di MWCNT e dunque a valori di diametri idrodinamici più piccoli. I dati riportati in *Tabella 2.4* mostrano che il diametro idrodinamico medio degli aggregati dei derivati sintetizzati è simile e i valori di Pdl bassi suggeriscono una buona dispersione delle dimensioni degli agglomerati in soluzione. Tuttavia, nel caso di **MWCNT-MeS** nonostante il diametro idrodinamico medio sia confrontabile con quello ottenuto per gli altri derivati, la *disperdibilità* corrispondente risulta inferiore. Sugerendo che la funzionalizzazione abbia portato alla disaggregazione di una piccola frazione del campione, ovvero quella che rimane solubile della *dispersione*

Come già specificato nella sezione 2.2, in questo lavoro di tesi il valore di potenziale Zeta viene utilizzato per stimare la carica superficiale di f-MWCNT. I valori di potenziale alti (> 30 mV in valore assoluto) e negativi per entrambe i derivati benzenosolfonato confermano la presenza di cariche negative sulla superficie di **MWCNT-S**. Il valore di ZP negativo del derivato **MWCNT-MeS**, nonostante la funzionalizzazione neutra, può essere invece dovuto al processo di purificazione che hanno subito i nanotubi pristini impiegati per la sintesi, il quale prevede trattamenti ossidativi che spesso portano alla formazione di gruppo carbossilici. Ad ogni modo, i valori di potenziale Zeta non sono significativi per le nanoparticelle prive di carica e soprattutto risulta inappropriato definire una nanoparticella "neutra" sulla base del valore di

potenziale Zeta poiché le particelle di una dispersione non sono mai neutre in quanto risentono di un inevitabile accumulo di carica sulla superficie.<sup>44</sup> Infine, nonostante ZP non dia il valore della carica o della densità di carica superficiale, ma il potenziale del piano di scivolamento, il valore alto e positivo ottenuto per **MWCNT-N**, suggerisce la presenza di cariche positive sulla superficie dei nanotubi.

Analizzando nell'insieme tutte le caratterizzazioni condotte sui f-MWCNT sintetizzati, si può affermare che la funzionalizzazione mediante reazione di Tour migliora la *disperdibilità* in acqua delle nanostrutture. Inoltre, sulla base dei dati raccolti, è possibile concludere che la presenza di carica sul gruppo funzionale aumenta la *disperdibilità* in acqua, presumibilmente grazie ad interazioni di tipo ione-dipolo. Inoltre, è possibile ipotizzare che i MWCNT-S siano più solubili di MWCNT-N grazie alla presenza dei tre atomi di ossigeno del gruppo benzensolfonato, che possono fungere da accettori di legami a idrogeno nei confronti delle molecole d'acqua.

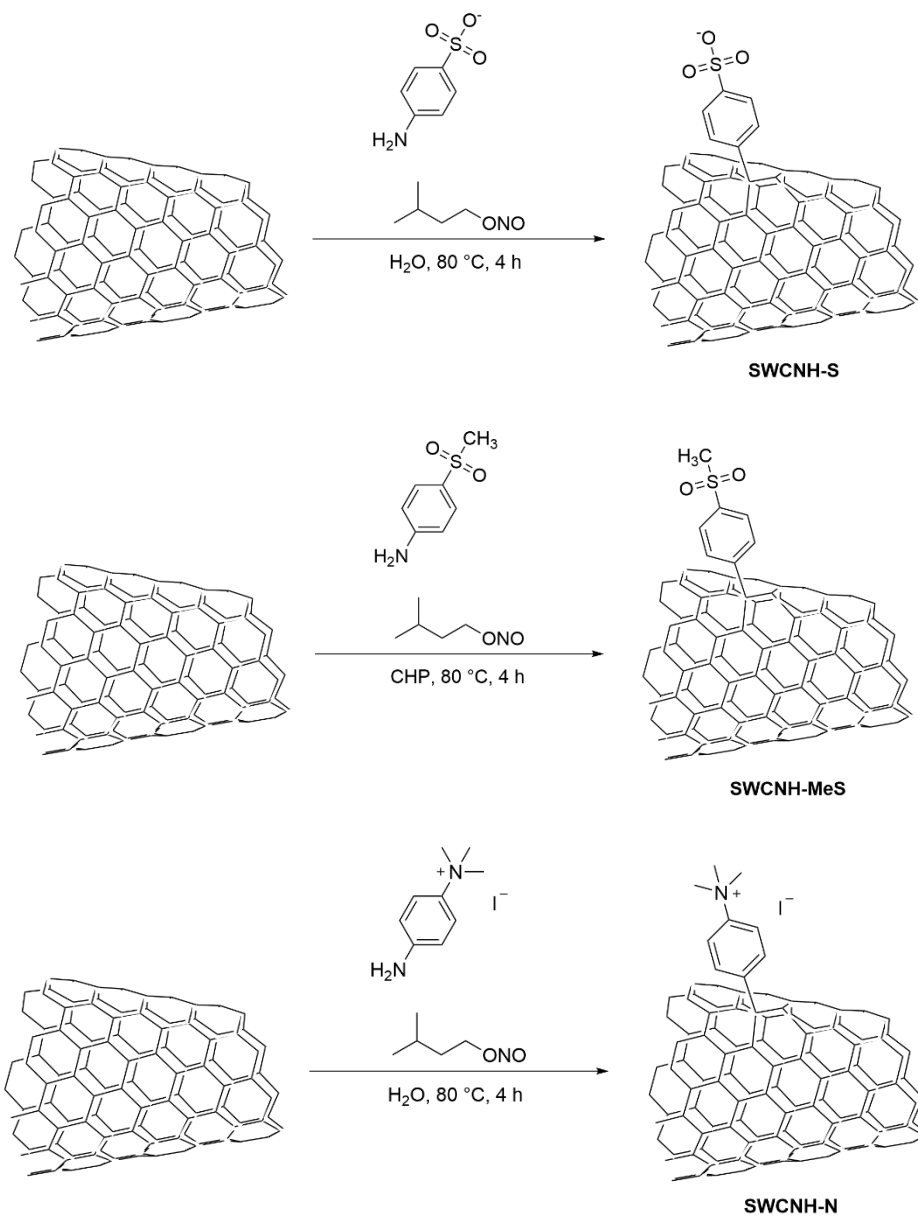
## **2.4 Derivati di nanoconi di carbonio**

Sulla base dell'esperienza maturata con i MWCNT, si è intrapresa la sintesi di derivati di SWCNH carichi negativamente, positivamente e neutri. In questo lavoro di tesi sono stati ottenuti per la prima volta derivati di SWCNH funzionalizzati con gruppi benzensolfonato (**SWCNH-S**), metilsulfonilbenzene (**SWCNH-MeS**) e trimetilbenzenammonio (**SWCNH-N**). Mantenere gli stessi gruppi funzionali impiegati per i nanotubi ha permesso di confrontare gli effetti della funzionalizzazione sulle proprietà del materiale al variare della nanostruttura.

### **2.4.1 Funzionalizzazione di nanoconi di carbonio**

Le condizioni delle reazioni di Tour su SWCNH sono state modificate rispetto al caso dei MWCNT, basandoci su precedenti lavori di funzionalizzazione di SWCNH. In particolare, si sono utilizzati quantitativi di anilina e isopentil nitrito tali da ottenere rapporti molari unitari, rispetto al numero di moli di carbonio. È necessario considerare la diversa nanomorfologia dei SWCNH,

rispetto ai MWCNT, e di conseguenza la diversa reattività e tendenza ad aggregare.<sup>13</sup> Gli schemi delle reazioni condotte vengono riportati in *Figura 2.5*.



*Figura 2.5* Schema della reazione di Tour per la funzionalizzazione di SWCNH con gruppi (dall'alto) benzensolfonato, metilsulfonilbenzene e trimetilbenzenammonio.

#### 2.4.2 Caratterizzazione di derivati di nanoconi di carbonio

Dopo aver sintetizzato i derivati di SWCNH, sono state condotte le analisi termogravimetriche in atmosfera inerte. In *Tabella 2.5* vengono riportati i

gradi di funzionalizzazione e valori di perdita di peso percentuale nell'intervallo di temperatura 100-600 °C.

Tabella 2.5 Risultati delle misure TGA dei derivati di SWCNH.

<b>Derivato</b>	<b>Perdita di peso [%]</b>	<b>FD [%]</b>
	100-600 °C in N <sub>2</sub>	a 600 °C
<b>SWCNH-S</b>	7.83	0.99
<b>SWCNH-MeS</b>	14.70	1.91
<b>SWCNH-N</b>	19.31	1.48

In Figura 2.6 vengono riportati gli ingrandimenti dei termogrammi dei derivati di SWCNH sintetizzati. Ogni termogramma mostra la sovrapposizione del profilo degradativo di f-SWCNH (a colori) e della nanostruttura pristina (in nero).

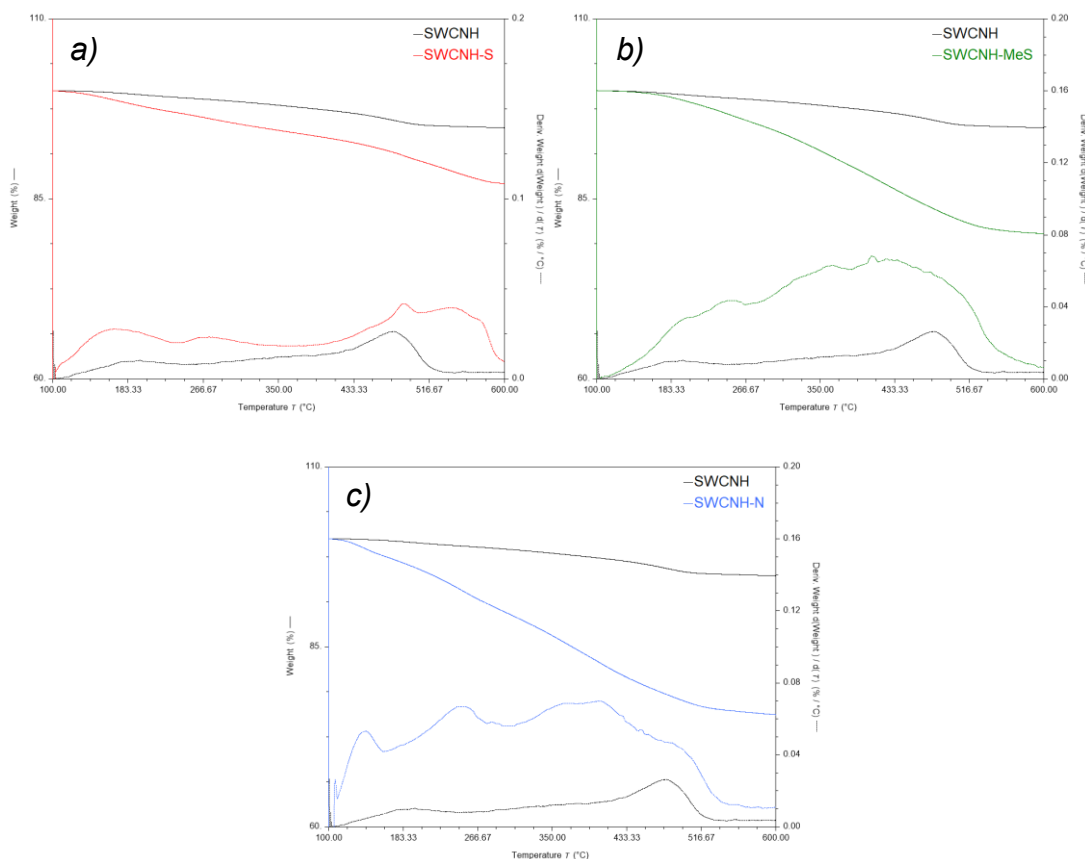


Figura 2.6 Ingrandimenti dei termogrammi di (a) SWCNH-S, (b) SWCNH-MeS, (c) SWCNH-N.

Il profilo degradativo di SWCNH pristini presenta una perdita di peso percentuale pari a 5.13 nell'intervallo di temperatura 100-600 °C. In



particolare, sembra che il principale fenomeno degradativo si verifichi a 475 °C. Nel termogramma di f-SWCNH si osserva una perdita di peso nello stesso intervallo di temperatura (100-600 °C) ascrivibile sia alla funzionalizzazione organica introdotta che alla nanostruttura pristina. Pertanto, per calcolare la perdita di peso percentuale relativa alla sola componente organica è necessario sottrarre quella già presente nella nanostruttura non funzionalizzata. In *Tabella 2.5* sono stati riportati i valori di perdita di peso percentuale corretti.

Analizzando i termogrammi in *Figura 2.6* si osserva che tutte le nanostrutture funzionalizzate presentano un profilo degradativo scomposto in più perdite di peso nell'intervallo tra 100 °C e 600 °C. Tuttavia, come visto per f-MWCNT, non è possibile stabilire con precisione quali siano i fenomeni degradativi che avvengono nel corso dell'analisi.

Confrontando le perdite di peso percentuali, si osserva che queste aumentano progressivamente nel seguente ordine: **SWCNH-S**, **SWCNH-MeS** e **SWCNH-N**. A partire da queste, sono stati calcolati i valori di FD. Da questi si può ipotizzare che l'efficienza della funzionalizzazione cresca leggermente in base alla natura del gruppo funzionale con il seguente andamento: benzensolfonato, trimetilbenzenammonio e infine metilsulfonilbenzene.

In *Tabella 2.6* sono riportati i valori di *disperdibilità* e di *assorbanza operativa* di f-SWCNH.

*Tabella 2.6 Disperdibilità in acqua e assorbanza operativa\* dei derivati di SWCNH.*

<b>Derivato</b>	<b>Disperdibilità in acqua</b> [mg/mL]	<b>Assorbanza operativa*</b> [u.a.]
<b>SWCNH-S</b>	1.26	0.54
<b>SWCNH-MeS</b>	0.54	0.16
<b>SWCNH-N</b>	1.31	0.49

\*assorbanza a 1000 nm della dispersione diluita 100 volte (vedi sezione 2.2)

Analogamente a tutte le nanostrutture a base di carbonio, i SWCNH non si disperdono facilmente in acqua a causa della natura idrofobica della loro superficie.<sup>56</sup> Tuttavia, i valori di *disperdibilità* riportati in *Tabella 2.6*

dimostrano che la funzionalizzazione promuove significativamente la solubilità dei nanoconi in acqua. In particolare, sembra che funzionalizzare SWCNH con gruppi benzensolfonato e trimetilbenzenammonio porti a valori di *disperdibilità* più alti rispetto a quelli che si ottengono con metilsulfonilbenzene. Nonostante il grado di funzionalizzazione elevato, la *disperdibilità* di **SWCNH-MeS** è molto più bassa di quella di **SWCNH-S** e **SWCNH-N**. Anche in questo caso, così come per il derivato **MWCNT-MeS**, si può ipotizzare che il gruppo metilsulfonilbenzene non promuova sensibilmente la *disperdibilità* in acqua a causa del tipo di interazioni che può instaurare con il solvente.

I valori di *disperdibilità* di f-SWCNH sono in accordo con le relative *assorbance operative*.

In *Tabella 2.7* vengono riportati i dati delle misure DLS e potenziale Zeta.

*Tabella 2.7 Misure DLS e ZP dei derivati di SWCNH.*

<b>Derivato</b>	<b>Diametro idrodinamico medio [nm]</b>	<b>Pdl</b>	<b>Potenziale Zeta [mV]</b>	<b>Potenziale Zeta Std Dev [mV]</b>
<b>SWCNH-S</b>	108.0	0.116	-31.8	0.400
<b>SWCNH-MeS</b>	266.4	0.249	-21.6	0.058
<b>SWCNH-N</b>	123.8	0.131	34.4	0.985

Considerando che in media il diametro idrodinamico di aggregati di SWCNH in acqua è circa 110 nm<sup>57</sup>, si può affermare che la funzionalizzazione con gruppi benzensolfonato e trimetilbenzenammonio promuove la disaggregazione in modo più efficace rispetto alla funzionalizzazione con metilsulfonilbenzene. Tuttavia, è importante considerare che in assenza della funzionalizzazione risulta praticamente impossibile ottenere soluzioni di nanoconi in acqua. I valori di Pdl indicano che le dimensioni degli aggregati in soluzione sono piuttosto omogenee per tutti i derivati.

Nell'analisi di SWCNH, il potenziale Zeta viene considerato un indicatore di stabilità della dispersione. In particolare, il valore assoluto di ZP viene impiegato come indice del grado di repulsione elettrostatica tra particelle

adiacenti e aventi carica simile all'interno di una dispersione. Solitamente una dispersione colloidale viene considerata stabile se presenta valori assoluti di ZP > 30 mV. ZP inferiori a 15 mV rappresentano l'inizio di fenomeni di aggregazione tra particelle, mentre valori più alti di 30 mV stanno ad indicare che vi è una mutua repulsione sufficiente a mantenere la stabilità colloidale.<sup>56, 58</sup> In questo caso le soluzioni considerate non sono semplici dispersioni colloidali; perciò, il valore di ZP non può essere interpretato in modo assoluto ma deve sempre essere associato ad altre caratterizzazioni. Considerando dunque il valore di potenziale Zeta ottenuto, e tutte le caratterizzazioni discusse in precedenza, **SWCNH-S** e **SWCNH-N** possono essere considerate stabili in acqua, mentre i **SWCNH-MeS** potrebbero avere una maggior tendenza ad aggregare. Infine, il potenziale Zeta delle soluzioni di **SWCNH-S** e **SWCNH-N** è coerente con la carica superficiale che ci si aspetta.

Analizzando nell'insieme tutte le caratterizzazioni condotte su f-SWCNH, si può affermare che la reazione di Tour ha permesso di ottenere derivati disperdibili in acqua con una buona stabilità. Sembra che la presenza della carica sulla superficie dei nanoconi promuova la solubilità del materiale e che la funzionalizzazione con i gruppi carichi sia quella che porta a dispersioni più concentrate. Si può infine affermare che, nonostante le dimensioni degli aggregati, la funzionalizzazione ha consentito di instaurare interazioni repulsive tra f-SWCNH carichi e attrattive tra f-SWCNH e il solvente, grazie alle quali si è riusciti ad ottenere nanoconi disperdibili in acqua.

## **2.5 Nanocompositi peptidici**

In questo sottocapitolo verranno discussi la preparazione e caratterizzazione di materiali nanocompositi a base di idrogel peptidici e aventi come *filler* i f-MWCNT sintetizzati durante questo lavoro di tesi (*Figura 2.7*). L'obiettivo è quello di ottenere materiali in grado di supportare la crescita e lo sviluppo delle cellule neuronali.

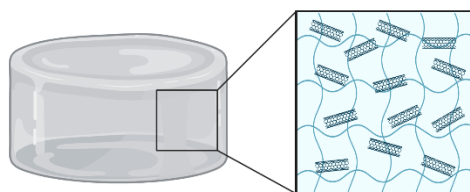


Figura 2.7 Rappresentazione schematica di un idrogel contenente f-MWCNT.

Come già accennato nella sezione 1.1.3.1, gli studi condotti negli ultimi anni hanno dimostrato la validità di questi materiali e promosso lo sviluppo di ricerche che coinvolgono l'uso di peptidi nell'ambito della bioingegneria, biotecnologia e delle nanotecnologie.<sup>16</sup> Inoltre, i nanotubi di carbonio, grazie alla loro morfologia (simile a quella dell'assone delle cellule nervose), alla conduttività elettrica, alla possibilità di modificare chimicamente la superficie e alle loro notevoli proprietà meccaniche, suscitano particolare interesse nello sviluppo di biomateriali per applicazioni neurologiche.<sup>59</sup> Si è scelto dunque di preparare idrogel peptidici con i derivati **MWCNT-S2**, **MWCNT-MeS** e **MWCNT-N**. Testare derivati con cariche superficiali diverse consente di valutare il ruolo della carica sul processo di formazione del gel, sulla sua stabilità e sulla capacità di promuovere adesione e la crescita cellulare.

I peptidi impiegati per la preparazione degli *scaffold* sono Fmoc-K(Fmoc)-RGD-OH (Figura 2.8) e Fmoc-WKWEW-NH<sub>2</sub> (Figura 2.9), sintetizzati nel gruppo di ricerca della Prof.ssa Miriam Mba.

Il peptide Fmoc-K(Fmoc)-RGD-OH è formato da quattro unità amminoacidiche in grado di formare gel grazie a interazioni di tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacking* tra i gruppi 9-fluorenilmetilossicarbonile (Fmoc) e legami a idrogeno tra gruppi carbossilici, amminici e ammidici. Appartiene alla famiglia dei peptidi contenenti la funzione Arginina-Glicina-Acido aspartico (RGD), nota per favorire l'adesione cellulare; condizione essenziale per avere materiali che promuovono la crescita e lo sviluppo cellulare e spesso difficile da ottenere.<sup>60</sup> Oltre a favorire il *self-assembly* del peptide, il gruppo Fmoc promuove la dispersione dei f-MWCNT attraverso interazioni  $\pi$ - $\pi$  *stacking* con le funzioni aromatiche della nanostruttura.<sup>61, 62</sup>

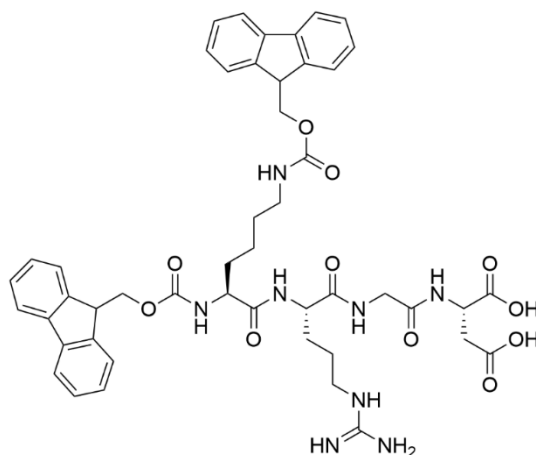


Figura 2.8 Peptide Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH.

Il peptide Fmoc-WKWEW-NH<sub>2</sub> è stato sintetizzato prendendo come riferimento una sequenza sintetizzata precedentemente (H-WKWEW-OH).<sup>15</sup> Si è scelto di introdurre all'estremità N-terminale un gruppo Fmoc con l'obiettivo di promuovere l'interazione di tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacking* tra il peptide e le nanostrutture.<sup>61, 63</sup>

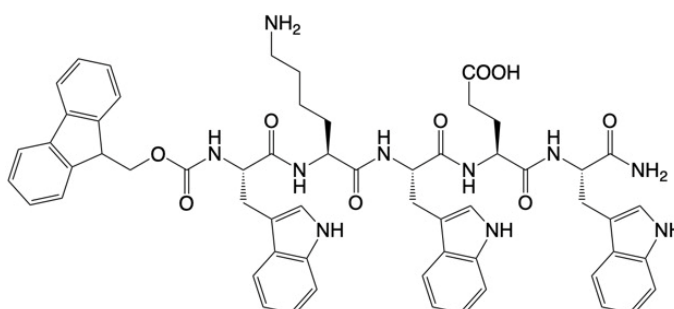


Figura 2.9 Peptide Fmoc-WKWEW-NH<sub>2</sub>.

### 2.5.1 Nanocompositi di Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH

Per ottenere gel di Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH viene impiegata la tecnica del cambio solvente.<sup>64</sup> Il peptide viene prima disciolto in dimetilsolfossido (DMSO), servendosi del bagno ad ultrasuoni, e successivamente viene diluito utilizzando acqua MilliQ (*per dettagli vedi sezione 3.3.11*). Solo dopo l'aggiunta del secondo solvente si osserva la formazione del gel. La procedura per preparare i gel nanocompositi (*Figura 2.10*) prevede che l'acqua e la dispersione di f-MWCNT siano aggiunte alla soluzione di peptide contemporaneamente (*per dettagli vedi sezione 3.3.12*).

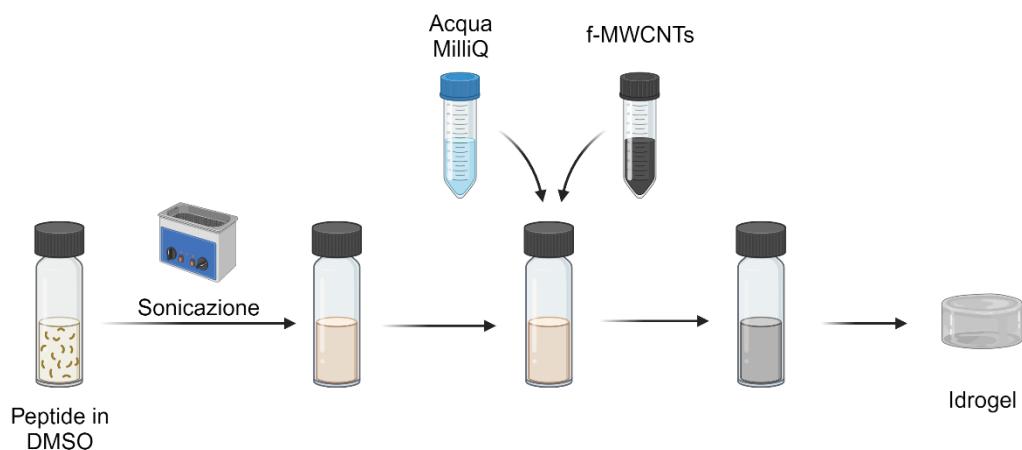


Figura 2.10 Schema procedura di preparazione degli idrogel di Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH con f-MWCNT.

Dopo aver testato la capacità del peptide di formare gel in assenza della nanostruttura, sono state condotte prove di gelificazione per ognuno dei tre derivati di MWCNT, ciascuno in percentuale 0.1 e 0.5 rispetto alla massa di peptide (Tabella 2.8).

Tabella 2.8 Prove di gelificazione idrogel composti a base di Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH.

<b>Prova</b>	<b>Derivato f-MWCNT</b>	<b>% f-MWCNT</b>
(a)	MWCNT-S2	0.1
(b)	MWCNT-S2	0.5
(c)	MWCNT-MeS	0.1
(d)	MWCNT-MeS	0.5
(e)	MWCNT-N	0.1
(f)	MWCNT-N	0.5

Tutti i test sono stati condotti con la stessa procedura e concentrazione di peptide. Come si può vedere dalla Figura 2.11, le prove condotte hanno dato esito positivo con formazione di gel pochi minuti dopo l'aggiunta delle soluzioni acquose.

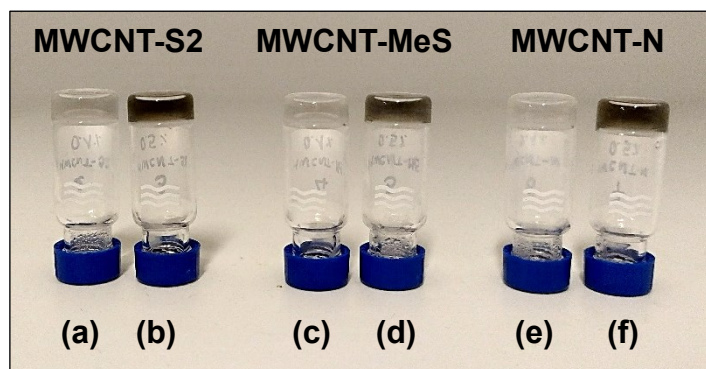


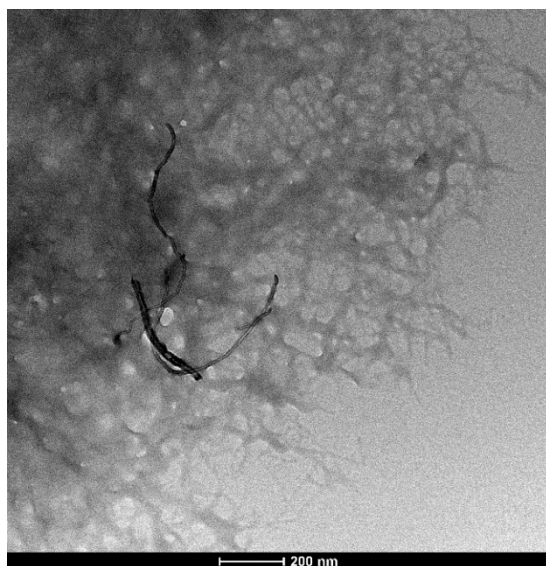
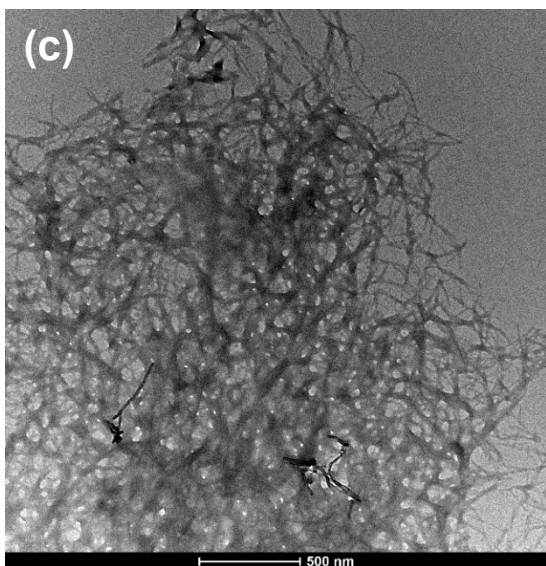
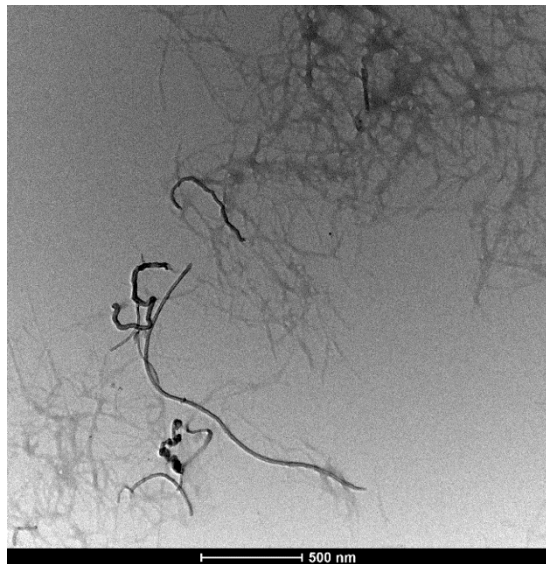
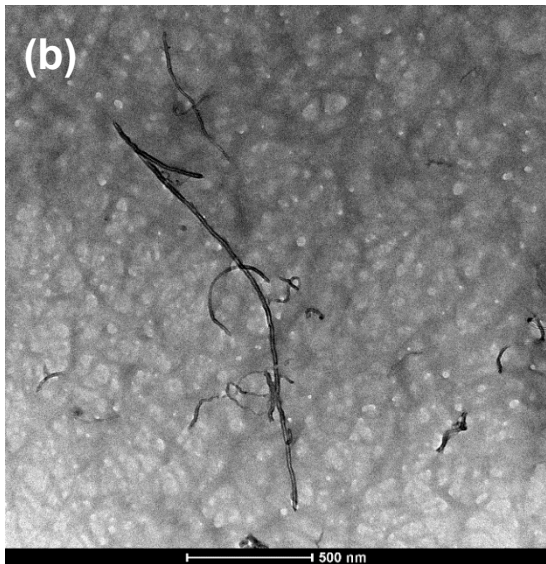
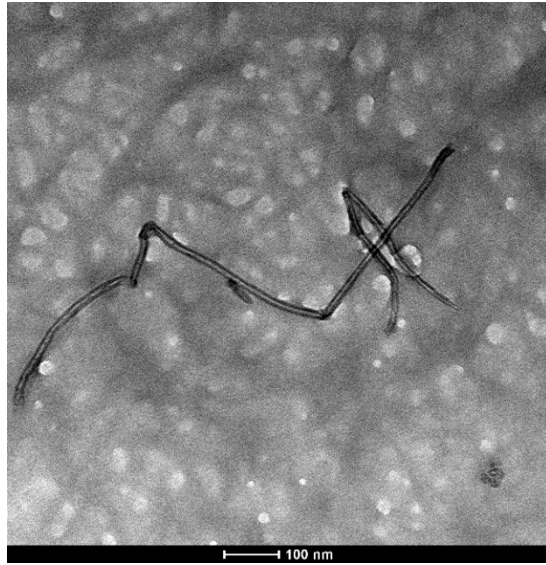
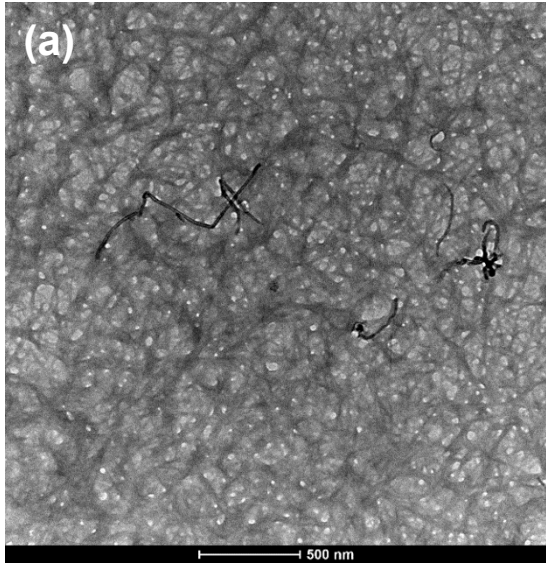
Figura 2.11 Idrogel di Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH con f-MWCNT. Rispetto alla massa di peptide, i gel (a), (c) e (e) contengono 0.1 wt% di nanostruttura, mentre i gel (b), (d), (f) contengono 0.5 wt% di nanostruttura.

Tutti i gel ottenuti non presentano aggregati macroscopici. Inoltre, aumentando la percentuale di nanostruttura all'interno del gel si osserva una colorazione più scura, ad indicare che, nonostante la maggior quantità di f-MWCNT, questi non tendono ad aggregare ma si disperdono all'interno del reticolo dell'idrogel.

Per poter valutare a livello microscopico lo stato di aggregazione delle nanostrutture, sono state acquisite immagini TEM a ingrandimenti nell'intervallo tra 500 nm e 100 nm. In ciascuna delle immagini in *Figura 2.12* è possibile distinguere la struttura reticolare dell'idrogel dai f-MWCNT, riconoscibili per la forma cilindrica e la colorazione più scura. La microscopia a trasmissione elettronica non consente di ricavare informazioni in merito alla natura delle interazioni tra il peptide e i nanotubi; perciò, non può essere utilizzata per stabilire se i gruppi Fmoc sono in grado di interagire con f-MWCNT e favorirne la dispersione. L'analisi TEM consente comunque di apprezzare l'effetto della funzionalizzazione sulla nanostruttura, infatti in *Figura 2.12* si possono osservare singoli nanotubi isolati, condizione impossibile da raggiungere nel caso di nanotubi pristini.

Le immagini TEM ottenute suggeriscono che in tutti i gel analizzati i nanotubi non formano aggregati di grandi dimensioni.







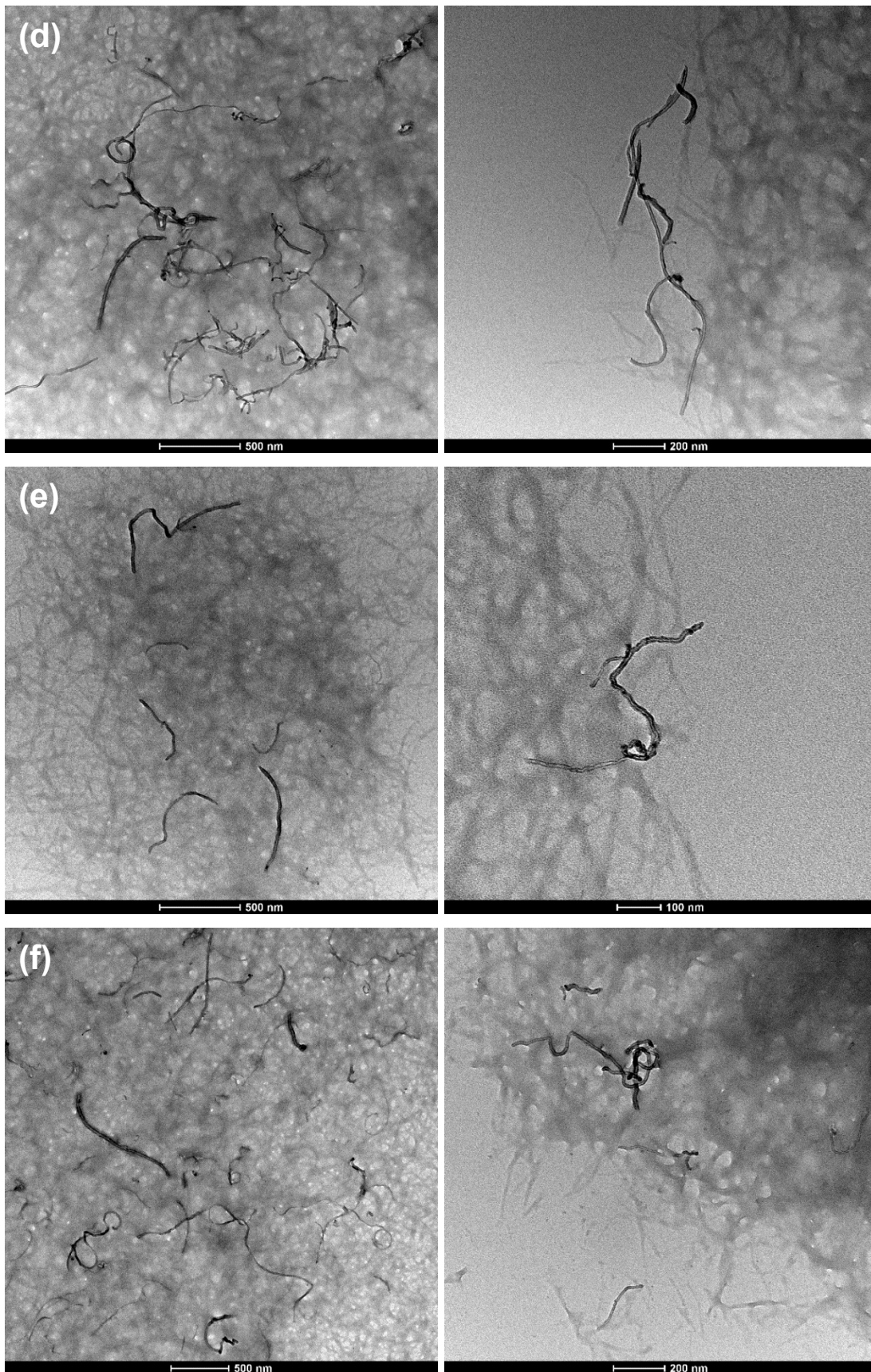
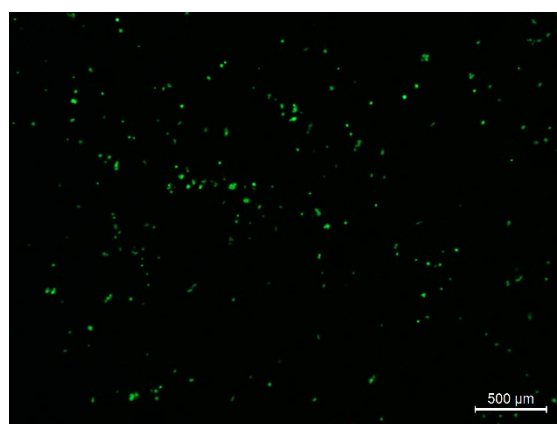


Figura 2.12 Immagini TEM degli idrogel di Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH contenenti f-MWCNT.

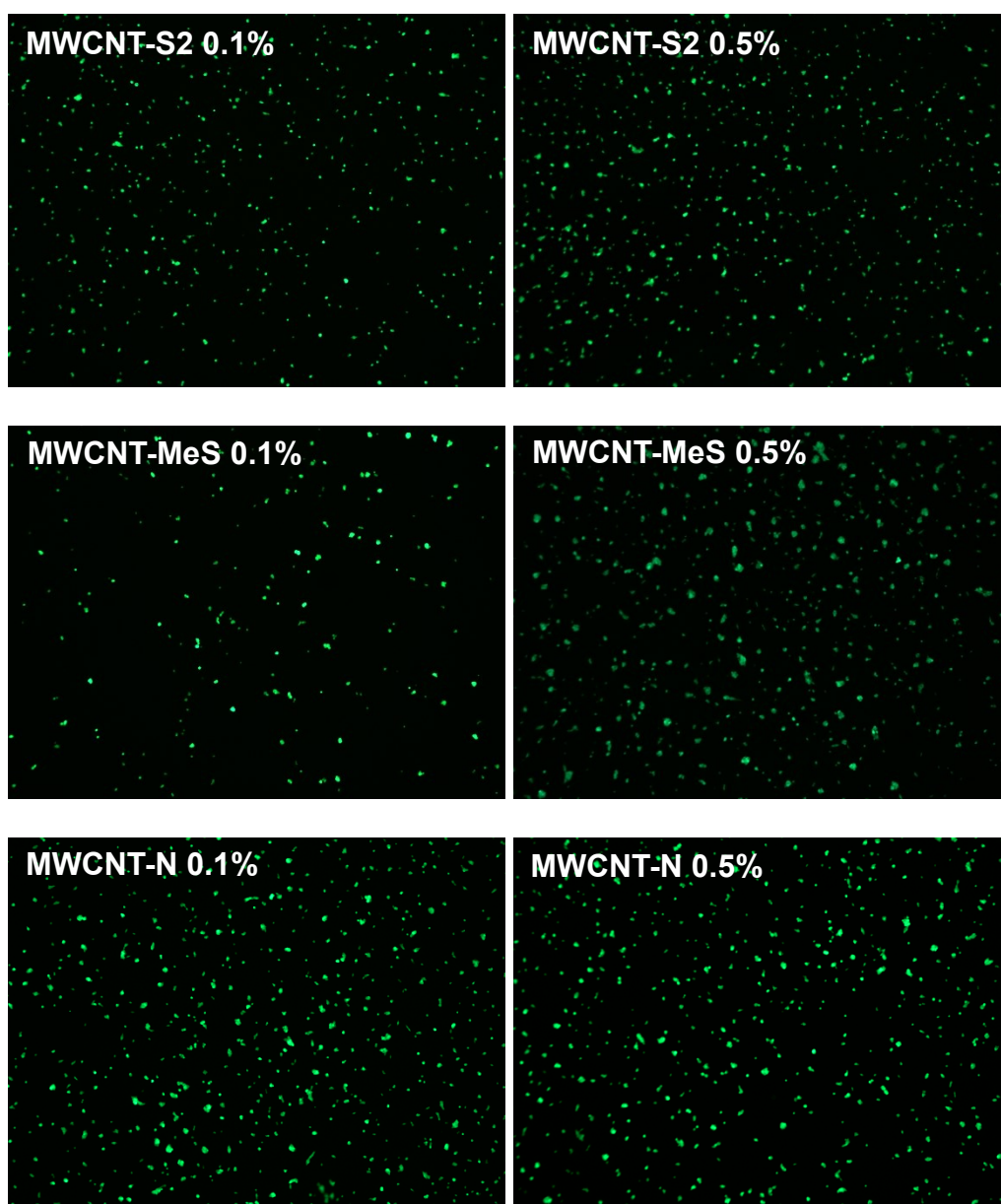
Osservando le immagini 2.12a, 2.12d, 2.12e e 2.12f, relative ai gel contenenti i derivati carichi, si nota che l'aumento della quantità di nanostruttura da 0.1 % a 0.5 %, sembra non promuovere significativamente fenomeni di aggregazione. Analizzando invece i gel con il derivato neutro, sembra che questo risenta maggiormente dell'aumento di concentrazione; passando infatti dal gel con la percentuale di **MWCNT-MeS** minore (*Figura 2.12c*) a quello con la percentuale maggiore (*Figura 2.12d*) si nota una maggior tendenza a formare aggregati rispetto a **MWCNT-S2** e **MWCNT-N**.

Al fine di valutare come la presenza dei nanotubi, la carica superficiale e la percentuale di f-MWCNT all'interno dell'idrogel peptidico influenza l'adesione cellulare, sono state svolte delle prove cellulari preliminari presso il laboratorio del Prof. Francesco Filippini del Dipartimento di Biologia utilizzando la linea cellulare SHSY-5Y di neuroblastoma (cellule tumorali indifferenziate). Sono stati testati gel nanocompositi di Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH contenenti **MWCNT-S2**, **MWCNT-MeS** e **MWCNT-N** in percentuale 0.1wt% e 0.5wt% rispetto alla massa di peptide. Le prove cellulari sono state condotte in ambiente sterile e l'adesione cellulare è stata monitorata 24 h dopo la semina, mediante trattamento con calcein-AM. Questa tecnica permette di valutare l'adesione cellulare in quanto cellule morte o in apoptosi non sono visibili al microscopio.<sup>15</sup> In *Figura 2.13* è riportata l'immagine acquisita al microscopio delle cellule depositate sull' idrogel in assenza di f-MWCNT.



*Figura 2.13 Immagine al microscopio della prova cellulare condotta su idrogel di Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH in assenza di f-MWCNT.*

In *Figura 2.14* sono riportate le immagini delle prove cellulari condotte sugli idrogel contenenti f-MWCNT.



*Figura 2.14 Prove cellulari condotte su idrogel di Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH con f-MWCNT.*

Analizzando la quantità di cellule vive (ovvero fluorescenti) è possibile confrontare l'adesione cellulare negli idrogel testati. Questi studi preliminari suggeriscono che la presenza di nanotubi all'interno dello *scaffold* peptidico promuove l'adesione delle cellule neuronali. Inoltre, valutando l'effetto della concentrazione di f-MWCNT (0.1% e 0.5%) sull'adesione cellulare, si nota che nel caso di **MWCNT-S2** e **MWCNT-N** l'esito è comparabile, mentre per **MWCNT-MeS** l'aumento della concentrazione promuove l'adesione.



Infine, si osserva che **MWCNT-S2** e **MWCNT-N** favoriscono maggiormente l'adesione cellulare rispetto a **MWCNT-MeS**.

Sono previste prove reologiche per valutare l'effetto delle nanostrutture sulle proprietà meccaniche degli idrogel a base di Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH.

## 2.5.2 Nanocompositi di Fmoc-WKWEW-NH<sub>2</sub>

La tecnica che consente la gelificazione di Fmoc-WKWEW-NH<sub>2</sub> è quella del cambio solvente (*vedi sezione 2.5.1*) e la procedura utilizzata per la preparazione dei gel nanocompositi è analoga a quella impiegata per il peptide Fmoc-K(Fmoc)-RGD-OH. Con questo peptide sono state condotte prove preliminari di gelificazione utilizzando **MWCNT-S2**, **MWCNT-MeS** e **MWCNT-N** in percentuali 0.1 e 0.5 rispetto alla massa di peptide impiegata. In tutte le condizioni testate si è osservata la formazione di gel (*Tabella 2.9*) e una dispersione omogenea delle nanostrutture senza aggregati visibili.

*Tabella 2.9 Prove di gelificazione idrogel compositi a base di Fmoc-WKWEW-NH<sub>2</sub>.*

<b>Derivato f-MWCNT</b>	<b>Concentrazione di peptide [mg/mL]</b>	<b>% f-MWCNT</b>	<b>Esito</b>	<b>Tempo di gelificazione</b>
MWCNT-S2	20	0.1	Gel	10 min
MWCNT-S2	20	0.5	Gel	10 min
MWCNT-MeS	20	0.1	Gel	10 min
MWCNT-MeS	20	0.5	Gel	10 min
MWCNT-N	20	0.1	Gel	10 min
MWCNT-N	20	0.5	Gel	10 min

Sono state acquisite immagini TEM degli idrogel contenenti 0.5% di nanostruttura per poter valutare lo stato di aggregazione di f-MWCNT a livello microscopico. In tutte le immagini acquisite (*Figura 2.15*) si distinguono la struttura reticolare dell'idrogel e f-MWCNT, che risultano ben dispersi e non formano aggregati di grandi dimensioni.

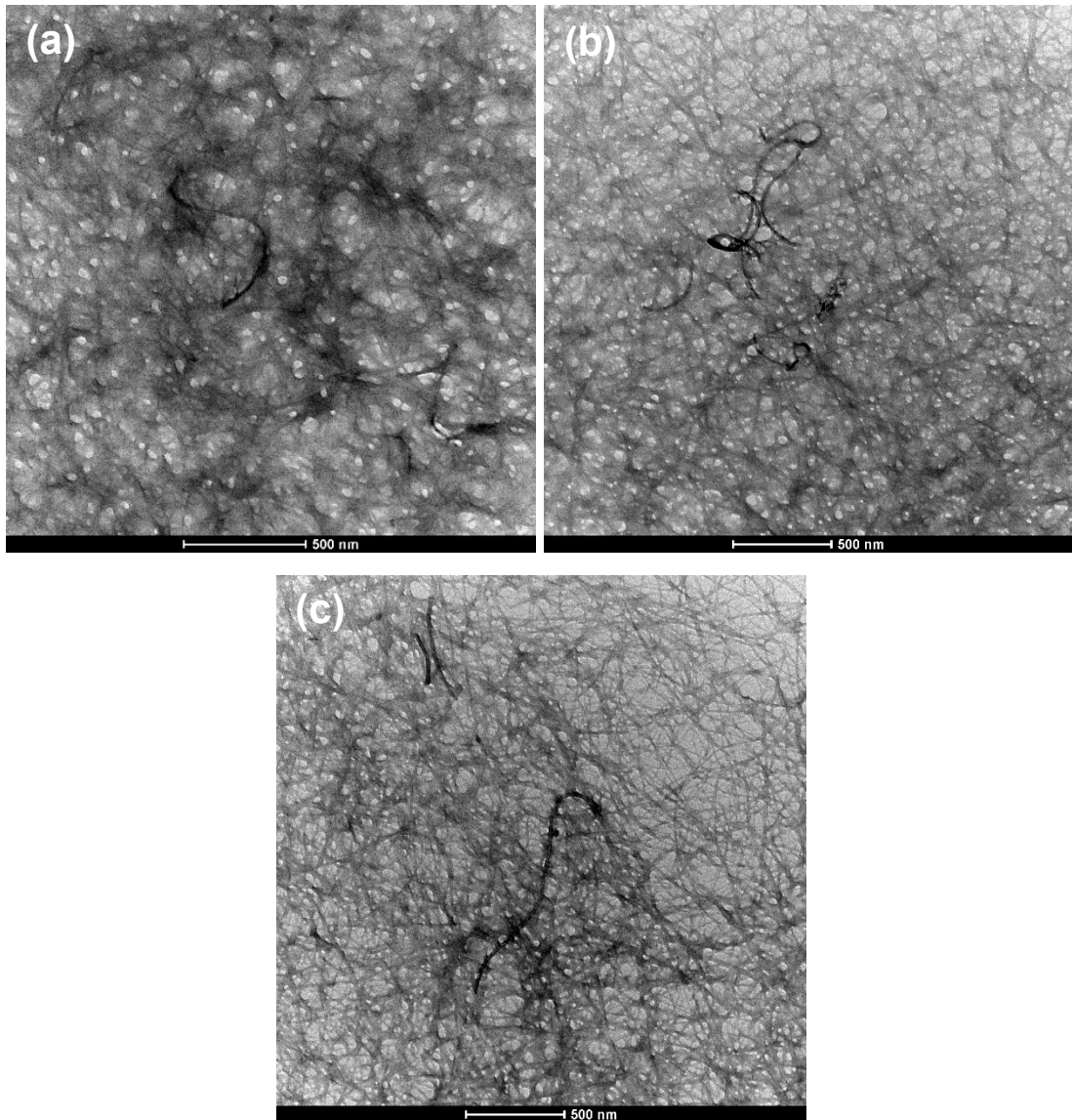


Figura 2.15 Immagini TEM degli idrogel di Fmoc-WKWEW-NH<sub>2</sub> contenenti 0.5% di **MWCNT-S2** (a), **MWCNT-MeS** (b) e **MWCNT-N** (c).

## 2.6 Nanocompositi a base di nanocellulosa carbossilata

In questo sottocapitolo verranno discussi la preparazione e caratterizzazione di materiali nanocompositi a base di idrogel di nanocellulosa carbossilata. L'obiettivo è sviluppare sistemi di cultura cellulare innovativi per applicazioni nel campo della medicina rigenerativa.

Diversi studi hanno dimostrato che biomateriali ottenuti a base di cellulosa carbossilata (Figura 2.16) possono essere usati come *scaffold* per la crescita del tessuto nervoso *in vitro*. L'aggiunta di derivati di MWCNT rende la matrice

di nanocellulosa più conduttiva e promuove l'adesione, crescita e differenziazione delle cellule nervose.<sup>65</sup>

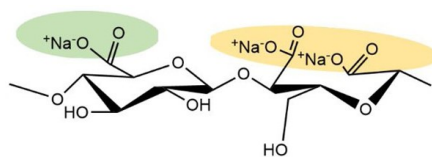


Figura 2.16 Cellulosa carbossilata.<sup>20</sup>

Trattandosi di biomateriali che possono essere impiegati per sistemi di coltura cellulare in 3D, ovvero in cui le cellule crescono all'interno dello *scaffold* e non sulla superficie<sup>66</sup>, le cellule vengono introdotte direttamente nella miscela da gelificare. Affinché le cellule possano proliferare, una buona parte del volume dell'idrogel deve essere costituito da mezzo di coltura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Se si considera infatti 1.0 mL di idrogel di nanocellulosa carbossilata, questo è costituito da:

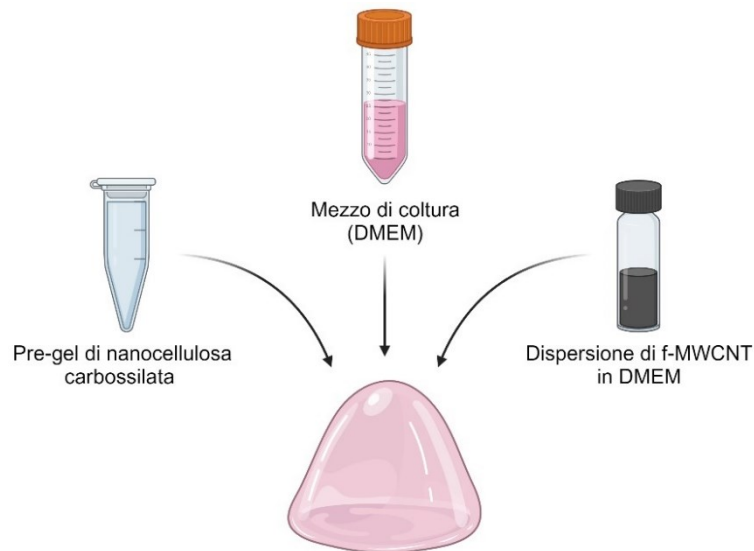
- 500  $\mu$ L di pre-gel di nanocellulosa carbossilata
- 300  $\mu$ L di coltura cellulare
- 200  $\mu$ L di mezzo di coltura (DMEM)

Il termine pre-gel di nanocellulosa è riferito all'idrogel che le fibre di nanocellulosa carbossilata sono in grado di formare quando si trovano in soluzione acquosa. Il pre-gel, così come la procedura da seguire per ottenere lo *scaffold*, sono stati forniti dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Giovanna Brusatin del Dipartimento di Ingegneria Industriale.

Per condurre i test di gelificazione si è scelto di sostituire i 300  $\mu$ L di coltura cellulare con un eguale volume di DMEM. Anche le dispersioni delle nanostrutture sono state preparate in mezzo di coltura.

Al fine di valutare il comportamento delle diverse nanostrutture all'interno del gel di nanocellulosa carbossilata sono stati testati tutti i f-MWCNT sintetizzati (**MWCNT-S1**, **MWCNT-S2**, **MWCNT-MeS** e **MWCNT-N**), inserendoli in una percentuale pari a 0.1wt% rispetto alla massa di nanocellulosa.

La procedura di preparazione degli idrogel nanocompositi è schematizzata in *Figura 2.17* (per dettagli procedura vedi sezione 3.3.13).



*Figura 2.17 Schema procedura di preparazione degli idrogel di nanocellulosa carbossilata con f-MWCNT.*

Tutti i test effettuati hanno dato esito positivo alla gelificazione. Tuttavia, solo i **MWCNT-S1** sono risultati ben dispersi all'interno della matrice senza costituire aggregati.

Si può ipotizzare che la presenza di aggregati sia dovuta alla scarsa disperdibilità di **MWCNT-S2**, **MWCNT-MeS** e **MWCNT-N** nel mezzo di coltura. È possibile infatti che, data la composizione di DMEM (fattori di crescita, proteine, ormoni, vitamine ecc.)<sup>67</sup>, la disperdibilità di f-MWCNT risulti differente rispetto a quella in acqua.

Visto il risultato ottenuto con **MWCNT-S1**, si è scelto di valutare la disperdibilità della nanostruttura nella matrice a tre concentrazioni differenti (0.1wt%, 0.2wt% e 0.5wt%). La procedura utilizzata per la preparazione dei gel è riportata alla sezione 3.3.13).



*Figura 2.18 Idrogel di nanocellulosa carbossilata con MWCNT-S1 (da sinistra) 0.1wt%, 0.2wt% e 0.5wt%.*

In tutti gli idrogel ottenuti (*Figura 2.18*) non si osservano aggregati di nanotubi visibili ad occhio nudo. Tale comportamento è indice della buona distribuzione e dispersione della nanostruttura all'interno della matrice.

Per valutare l'effetto di **MWCNT-S1** sulle proprietà meccaniche degli idrogel ottenuti sono previste prove reologiche.



## 2.7 Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono stati funzionalizzati derivati di MWCNT e SWCNH con gruppi benzensolfonato, metilsulfonilbenzene e trimetilbenzenammonio. In particolare, tutte le funzionalizzazioni di SWCNH e quella di MWCNT con metilsulfonilbenzene sono state condotte per la prima volta. Gli studi effettuati sulle f-CNS ottenute hanno dimostrato che la funzionalizzazione mediante reazione di Tour rende le nanostrutture disperdibili in acqua. Sia per MWCNT che per SWCNH si è visto che i gruppi benzensolfonato e trimetilbenzenammonio promuovono la *disperdibilità* in acqua in modo più significativo rispetto a metilsulfonilbenzene. Funzionalizzare le CNT è quindi un passo significativo verso l'obiettivo di disperderle in idrogel progettati per applicazioni biomediche legate all'ingegneria tissutale.

Una volta ottenuti i f-MWCNT, sono stati inseriti in idrogel a base di peptidi corti autoassemblanti (Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH e Fmoc-WKWEW-NH<sub>2</sub>) e nanocellulosa carbossilata al fine di ottenere *scaffold* da impiegare come modelli per lo studio di crescita e differenziazione delle cellule nervose.

Le prove condotte su Fmoc-K(Fmoc)RGD-OH hanno dimostrato che tutti i derivati f-MWCNT si disperdono efficacemente all'interno della matrice (in concentrazione 0.1 wt% e 0.5 wt%). Inoltre, le prove cellulari preliminari condotte hanno permesso di apprezzare il ruolo che le nanostrutture, in particolare quelle cariche, hanno nel promuovere l'adesione di cellule nervose.

Dalle prove condotte su idrogel a base di Fmoc-WKWEW-NH<sub>2</sub> sembra che f-MWCNT (0.5 wt%) si disperdano efficacemente all'interno di queste matrici.

Introducendo f-MWCNT all'interno delle matrici di nanocellulosa composita si osserva ad occhio nudo la formazione di aggregati, fatta eccezione per **MWCNT-S1**, per i quali sembra rimanere buona la capacità di disperdersi fino a concentrazioni 0.5 wt%

Tutti i materiali compositi ottenuti con f-MWCNT dovranno essere analizzati mediante prove reologiche e cellulari per testare la capacità di promuovere la crescita e il differenziamento cellulare, oltre all'eventuale citotossicità.

La prospettiva futura è testare anche i f-SWCNH ottenuti in matrici analoghe a quelle studiate con i nanotubi per evidenziare eventuali effetti specifici della nanostruttura sulle proprietà degli *scaffold*.

### 3 Parte sperimentale

#### 3.1 Solventi e reagenti

<b>Solvente</b>	<b>MM [g·mol<sup>-1</sup>]</b>	<b>d [g·mL<sup>-1</sup>]</b>	<b>b.p. [°C]</b>	<b>Produttore</b>
<b>Metanolo</b>	32.04	0.7910	64.70	Sigma-Aldrich
<b>Etanolo</b>	46.07	0.79	78	Merck
<b>1-cicloesil-2-pirrolidone (CHP)</b>	167.25	1.007	284	TCI
<b>Toluene</b>	92.14	0.8650	110-111	Sigma-Aldrich
<b>Dietil etere</b>	74.12	0.7100	34.60	Sigma-Aldrich
<b>Cloroformio</b>	119.38	1.4760	60.50-61.50	Sigma-Aldrich
<b>N,N-dimetilformammide (DMF)</b>	73.09	0.944	153	Sigma-Aldrich
<b>Dimetilsolfossido (DMSO)</b>	78.13	1.10	189	Sigma-Aldrich

<b>Reagente</b>	<b>MM [g·mol<sup>-1</sup>]</b>	<b>d [g·mL<sup>-1</sup>]</b>	<b>Produttore</b>
<b>N,N-dimetilbenzene-1,4-diammina</b>	136.19	-	Sigma-Aldrich
<b>Anidride ftalica</b>	148.12	-	Sigma-Aldrich
<b>Trietilammina</b>	101.19	0.726	Sigma-Aldrich
<b>Ioduro di metile</b>	141.94	2.28	Sigma-Aldrich
<b>Idrazina monoidrato</b>	50.06	1.032	Sigma-Aldrich
<b>4-metilsulfonilanilina</b>	171.21	-	TCI
<b>Sodio sulfanilato diidrato</b>	231.2	-	Sigma-Aldrich

<b>Nanostruttura</b>	<b>OD [nm]</b>	<b>ID [nm]</b>	<b>Lunghezza [μm]</b>	<b>Produttore</b>
<b>MWCNT (8-15 nm)</b>	8-15	3-5	0.5-2	ACS
<b>SWCNH</b>	-	-	-	CARBONIUM

## **3.2 Strumentazione e procedure analitiche**

### **3.2.1 Cromatografia su strato sottile (TLC)**

Le analisi TLC sono state condotte su TLC silica gel 60 F<sub>254</sub>. Le macchie sono state osservate mediante lampada UV a 254 nm.

### **3.2.2 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)**

Gli spettri 1H-NMR sono stati acquisiti con lo strumento Bruker AC-300, operando a 300 MHz. Gli spettri sono stati elaborati utilizzando il software MestReNova.

### **3.2.3 Spettrometria di massa (ESI-MS)**

Gli spettri di massa sono stati acquisiti con lo strumento Agilent Technologies MSD SL trap Mass Spectrometer utilizzando la ionizzazione elettrospray in modalità positiva. Durante le analisi le soluzioni degli analiti sono state iniettate con una velocità di flusso di 0.05 mL/min (pressione nebulizzatore 20 psi, flusso del gas 5 L/min, temperatura 325 °C).

### **3.2.4 Sonicazione a punta**

Le nanostrutture sono state disperse nel solvente mediante sonicazione a punta utilizzando il sonicatore Misonix 3000 con punta in titanio. La sonicazione è stata condotta al livello di potenza 2.0 (4-6 W) alternando periodi ON e OFF, ciascuno della durata di 3 s, indipendentemente dal tempo di sonicazione previsto dalla procedura.

### **3.2.5 Sonicazione a bagno**

Il sonicatore a bagno utilizzato è il Bandelin SONOREX riempito di acqua distillata (potenza 320 W, frequenza RF 35 kHz).

### **3.2.6 Centrifugazione**

Le centrifugazioni sono state condotte con una centrifuga MR23i (Thermo SCIENTIFIC). La durata di ogni ciclo di centrifugazione per f-MWCNT e f-SWCNH è stata di 10 min, rispettivamente a 4000 rpm e 10'000 rpm.

### **3.2.7 Analisi termogravimetrica (TGA)**

Le misure termogravimetriche sono state condotte mediante TGA Q5000IR (TA Instruments). Le analisi delle CNS funzionalizzate sono state eseguite in atmosfera di azoto con un'isoterma iniziale a 100 °C per 10 min, per rimuovere eventuali tracce residue di solvente, seguita da una rampa di temperatura 10 °C/min fino a 1000 °C. I termogrammi sono stati elaborati utilizzando il software TA Instruments.

### **3.2.8 Scattering dinamico (DLS)**

Le misure DLS sono state condotte mediante Zetasizer Nano S (Malvern Instruments) impostando come materiale lattice di poliestere (IR = 1.590, Abs = 0.010) e come angolo di misura 173 °. Le analisi sono state condotte a temperatura ambiente, in acqua MilliQ, utilizzando cuvette a volume ridotto in plastica con un cammino ottico di 1 cm. Il dato finale per ogni campione si ricava dalla media di tre misure, ciascuna delle quali prevede 11 corse. I dati sono stati elaborati con il software Zetasizer.

### **3.2.9 Zeta Potential (ZP)**

Le misure di Zeta Potential sono state condotte mediante Zetasizer Nano S (Malvern Instruments) impostando come materiale lattice di poliestere (IR = 1.590, Abs = 0.010). Le analisi sono state condotte a temperatura ambiente, in soluzione di NaCl 0.2 mM e acqua MilliQ, utilizzando l'apposita cella. Il dato finale per ogni campione si ricava dalla media di tre misure, ciascuna delle quali prevede 40 corse. I dati sono stati elaborati con il software Zetasizer.

### 3.2.10 Spettroscopia UV-Vis-NIR

Gli spettri UV-Vis-NIR sono stati acquisiti tra 280 nm e 1400 nm utilizzando lo spettrofotometro Varian Cary 5000. Le misure sono state condotte a temperatura ambiente in acqua MilliQ. Le analisi sono state condotte in cuvette di quarzo con cammino ottico di 1 cm, ad una velocità di scansione di 300 nm/min e con una ampiezza di banda passante di 2 nm. Gli spettri sono stati elaborati utilizzando il software Origin 2018.

### 3.2.11 Preparazione delle dispersioni di f-MWCNT e f-SWCNH

5 mg di f-MWCNT sono stati dispersi in 2.5 mL di acqua MilliQ mediante trattamento con sonicatore a punta per 1 min. La miscela è stata centrifugata ed il surnatante è stato poi recuperato e filtrato su cotone.

5 mg di f-SWCNH sono stati dispersi in 2.5 mL di acqua MilliQ sonicando a punta per 1min. La miscela è stata poi centrifugata ed il surnatante è stato recuperato e filtrato su cotone.

Per condurre le analisi DLS, ZP e UV-Vis-NIR di f-MWCNT e f-SWCNH sono stati preparati i seguenti campioni:

- 100  $\mu$ L di dispersione sono stati aggiunti a 1.0 mL di acqua MilliQ in una cuvetta di plastica per l'analisi DLS.
- 100  $\mu$ L di dispersione sono stati aggiunti a 700  $\mu$ L di acqua MilliQ e a 160  $\mu$ L di una soluzione 1 mg/mL di NaCl in una cella per l'analisi di Zeta Potential.
- 30  $\mu$ L di dispersione sono stati aggiunti a 2.97 mL di acqua MilliQ in una cuvetta di quarzo per l'analisi UV-Vis-NIR.
- 1.0 mL di dispersione è stato fatto evaporare su un pan TGA, seguendo la tecnica del *drop-casting*, e analizzato mediante TGA a 100 °C in aria.
- Per ogni derivato sintetizzato, è stata condotta una misura TGA in atmosfera inerte su una piccola quantità di nanostruttura asciutta (1-2 mg).

### **3.2.12 Calcolo della *disperdibilità* delle nanostrutture in acqua**

Per stabilire il quantitativo di nanostruttura disciolta nella dispersione (*vedi sopra*), 1 mL di questa viene seccato su un pan TGA utilizzando la tecnica del *drop-casting*. Successivamente viene effettuata una misura TGA impostando un'isoterma a 100 °C al fine di rimuovere eventuali tracce di solvente e determinare la massa di CNS asciutta. Rapportando tale valore al volume analizzato si ottiene la *disperdibilità* della nanostruttura.

### **3.2.13 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)**

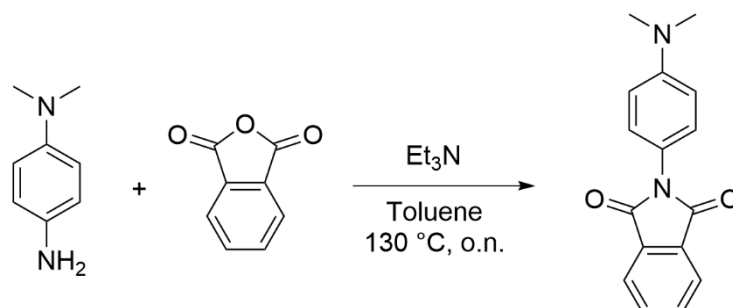
Le immagini TEM sono state acquisite con un microscopio Tecnai G2 (FEI) che opera a 100 kV e catturate con una fotocamera digitale Veleta (Olympus Soft Imaging System). Per condurre le analisi TEM, un piccolo pezzo di idrogel viene diluito in 1 mL di acqua e agitato vigorosamente per rompere la struttura reticolare. Successivamente una goccia di dispersione viene depositata in film di *grid* forate con *mesh* 400 precedentemente rese idrofiliche.

### **3.2.14 Analisi reologica**

Le analisi reologiche sono state condotte su un reometro Kinexus Lab+ con geometria dei piatti parallela. (Scrivi come sono stati preparati e analizzati gel)

### 3.3 Sintesi e caratterizzazioni

#### 3.3.1 Sintesi di 2-(4-(dimetilammino)fenil)isoindolin-1,3-dione <sup>53</sup>



	M.M. [g·mol <sup>-1</sup> ]	Densità [g·mL <sup>-1</sup> ]	Massa [g]	Volume [mL]	Moli [mmol]
<b><i>N,N</i>-dimetilbenzene-1,4-diammina</b>	136.19	/	4.01	/	29.44
<b><i>Anidride ftalica</i></b>	148.12	/	8.71	/	58.80
<b><i>Trietilammina</i></b>	101.19	0.726	1.45	2.0	14.35
<b><i>Toluene (solvente)</i></b>	92.14	0.8650	/	100	/

*N,N*-dimetilbenzene-1,4-diammina (4.01 g, 29.44 mmol), anidride ftalica (8.71 g, 58.80 mmol) e trietilammina (2.0 mL) vengono disciolti in toluene (100 mL) in un apparato Dean-Stark e mantenuti sotto agitazione magnetica a 130 °C tutta la notte. La miscela viene poi raffreddata e parte del solvente viene rimosso mediante evaporatore rotante. Si osserva la formazione di un precipitato che viene filtrato e lavato più volte con metanolo freddo fino ad ottenere un solido giallo.

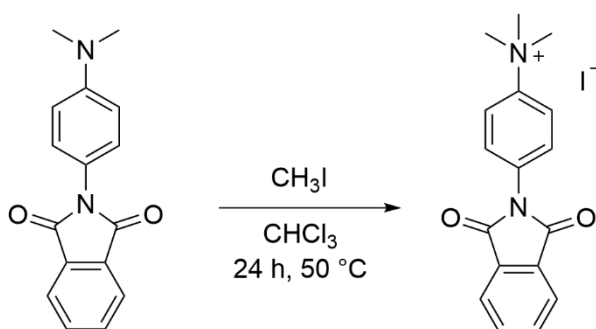
Resa 86 % (6.70 g)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 7.92-7.95 (m, 2H), 7.75-7.78 (m, 2H), 7.25 (d, J = 9 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 9 Hz, 2H), 3.00 (s, 6H)

**ESI-MS** (MeOH acido, modalità positiva): m/z 267.1 [M+H<sup>+</sup>]



**3.3.2 Sintesi di 4-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)-N,N,N-trimetilbenzene ammonio ioduro a partire da 2-(4-(dimetilammino)fenil)isoindolin-1,3-dione** <sup>53</sup>



	M.M. [g·mol <sup>-1</sup> ]	Densità [g·mL <sup>-1</sup> ]	Massa [g]	Volume [mL]	Moli [mmol]
<b>2-(4-(dimetilammino)fenil)isoindolin-1,3-dione</b>	266.11	/	6.70	/	25.18
<b>Ioduro di metile</b>	141.94	2.28	14.82	6.5	104.41
<b>Cloroformio (solvente)</b>	119.38	1.4760	/	100	/

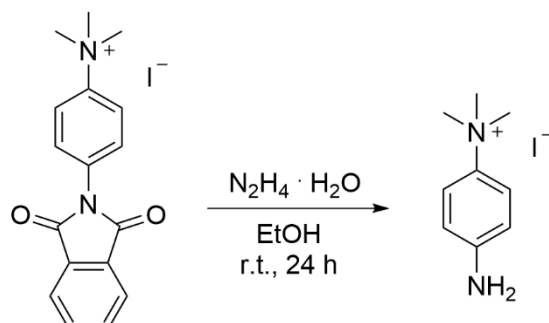
In un tubo pirex, 6.5 mL di CH<sub>3</sub>I (104.41 mmol) vengono aggiunti a 2-(4-(dimetilammino)fenil) isoindolin-1,3-dione (6.70 g, 25.18 mmol) sciolto in 100 mL di CHCl<sub>3</sub>. La miscela viene scaldata per 24 ore a 50 °C. Durante la reazione precipita il prodotto, che viene filtrato e lavato con CHCl<sub>3</sub> freddo fino ad ottenere un solido grigio chiaro.

Resa 58 % (6.00 g)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO, δ, ppm): 8.15 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.93-8.02 (m, 4H), 7.74 (d, J = 9 Hz, 2H), 3.66 (s, 9H)

**ESI-MS** (MeOH, modalità positiva): m/z 281.2 [M-I<sup>-</sup>]

### 3.3.3 Sintesi 4-ammino-N,N,N-trimetilbenzene ammonio ioduro a partire da 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)-N,N,N-trimetilbenzene ammonio ioduro <sup>53</sup>



	M.M. [g·mol <sup>-1</sup> ]	Densità [g·mL <sup>-1</sup> ]	Massa [g]	Volume [mL]	Moli [mmol]
<b>4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)-N,N,N-trimetilbenzenammonio ioduro</b>	408.24	/	6.00	/	14.70
<b>Idrazina monoidrato</b>	50.06	1.032	3.72	3.6	74.31
<b>Etanolo (solvente)</b>	46.07	0.79	/	200	/

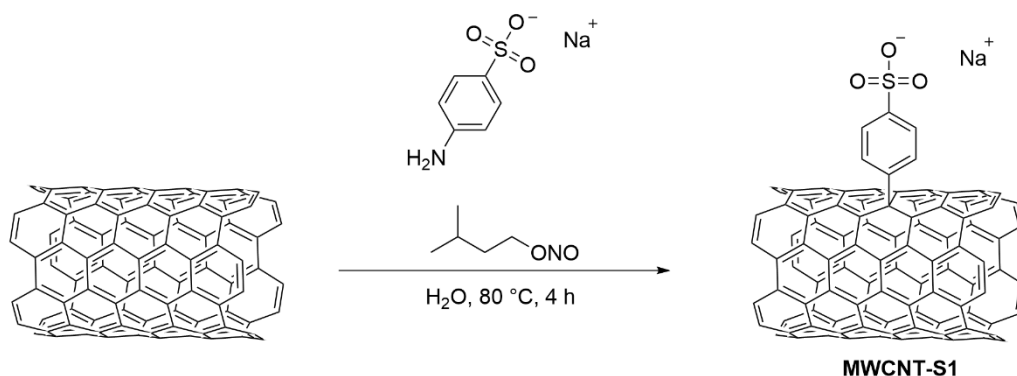
L'idrazina monoidrato (3.6 mL, 74.31 mmol) è stata aggiunta ad una sospensione di 4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)-N,N,N-trimetilbenzenammonio ioduro (6.00 g, 14.70 mmol) in etanolo (200 mL). La miscela è stata agitata per 24 ore a temperatura ambiente e poi filtrata. Il filtrato, contenente il prodotto finale, è stato portato a secco mediante evaporatore rotante. Il solido ottenuto è stato ricristallizzato con etanolo e lavato con EtOH freddo. Il prodotto si presenta come un solido di colore viola chiaro.

Resa 76 % (3.09 g)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO, δ, ppm): 7.53 (d, J = 9 Hz, 2H), 6.63 (d, J = 9 Hz, 2H), 5.62 (s, 2H), 3.48 (s, 9H)

**ESI-MS** (MeOH acido, modalità positiva): m/z 151.1 [M-I<sup>-</sup>]

### 3.3.4 Funzionalizzazione di MWCNT con benzensolfonato (MWCNT-S1)



	<b>M.M.</b> [g·mol <sup>-1</sup> ]	<b>Densità</b> [g·mL <sup>-1</sup> ]	<b>Massa</b> [mg]	<b>Volume</b> [mL]	<b>Moli</b> [mmol]
<b>MWCNT (8-15 nm)</b>	12.01	/	50.0	/	4.16
<b>Sodio sulfanilato diidrato</b>	231.2	/	481.3	/	2.08
<b>Isopentil nitrito</b>	117.15	0.872	513.6	0.589	4.16
<b>Acqua MilliQ (solvente)</b>	18.01	0.997	/	7.5	/

In un pallone di vetro a due colli sono stati introdotti MWCNT (50.0 mg, 4.16 mmol di C) e il sodio sulfanilato (481.3 mg, 2.08 mmol) precedentemente sciolto in 7.5 mL di acqua MilliQ. La miscela è stata portata a 80 °C in atmosfera di N<sub>2</sub> sotto agitazione magnetica. Successivamente è stato aggiunto l'isopentil nitrito (0.589 mL, 4.16 mmol). Dopo 4 ore, il riscaldamento è stato interrotto e la miscela di reazione raffreddata. Il prodotto è stato poi recuperato mediante filtrazione su filtri Millipore PC 0.1 µm e lavato 7 x 25 mL di acqua MilliQ e 1 x 25 mL di MeOH. I MWCNT funzionalizzati sono stati infine rimossi dal filtro mediante sonicazione in MeOH e la dispersione è stata asciugata sotto flusso di N<sub>2</sub>.

**Perdita di peso (TGA)** (100-640 °C, N<sub>2</sub>): 9.04 %

**Diametro idrodinamico medio:** 144.0 nm

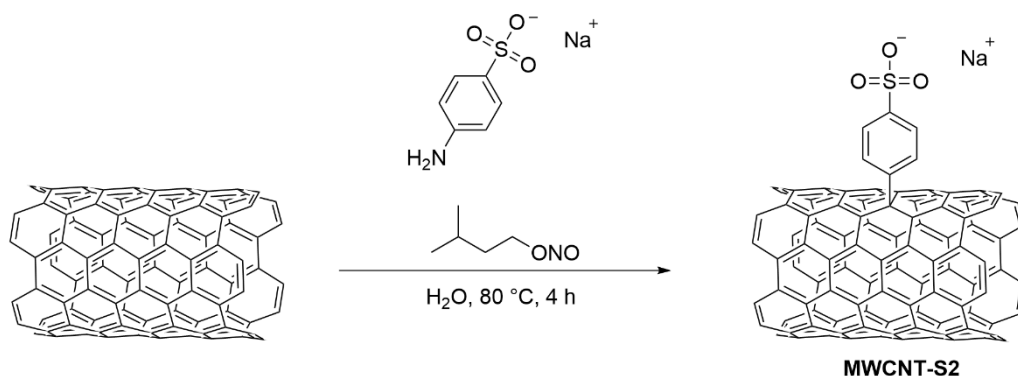
**Pdl:** 0.282

**Zeta potential** (0.5 mS/cm): -44.8 mV  $\sigma = 1.72$  mV

**Assorbanza UV-Vis-NIR** (1000 nm): 0.43731 u.a.

**Disperdibilità in acqua:** 1.546 mg/mL

### 3.3.5 Funzionalizzazione di MWCNT con benzensolfonato (MWCNT-S2)



	<b>M.M.</b> [g·mol <sup>-1</sup> ]	<b>Densità</b> [g·mL <sup>-1</sup> ]	<b>Massa</b> [mg]	<b>Volume</b> [mL]	<b>Moli</b> [mmol]
<b>MWCNT (8-15 nm)</b>	12.01	/	50.1	/	4.17
<b>Sodio sulfanilato diidrato</b>	231.2	/	48.2	/	0.21
<b>Isopentil nitrito</b>	117.15	0.872	51.5	0.059	0.42
<b>Acqua MilliQ (solvente)</b>	18.01	0.997	/	7.5	/

In un pallone di vetro a due colli sono stati introdotti MWCNT (50.1 mg, 4.17 mmol di C) e il sodio sulfanilato (48.2 mg, 0.21 mmol) precedentemente sciolto in 7.5 mL di acqua MilliQ. La miscela è stata portata a 80 °C in atmosfera di N<sub>2</sub> sotto agitazione magnetica. Successivamente è stato aggiunto l'isopentil nitrito (0.059 mL, 0.42 mmol). Dopo 4 ore, il riscaldamento è stato interrotto e la miscela di reazione raffreddata. Il prodotto è stato poi recuperato mediante filtrazione su filtri Millipore PC 0.1 µm e lavato 7 x 25 mL di acqua MilliQ e 1 x 25 mL di MeOH. I MWCNT funzionalizzati sono stati infine rimossi dal filtro mediante sonicazione in MeOH e la dispersione è stata asciugata sotto flusso di N<sub>2</sub>.

**Perdita di peso (TGA)** (100-640 °C, N<sub>2</sub>): 9.61%

**Diametro idrodinamico medio:** 136.1 nm

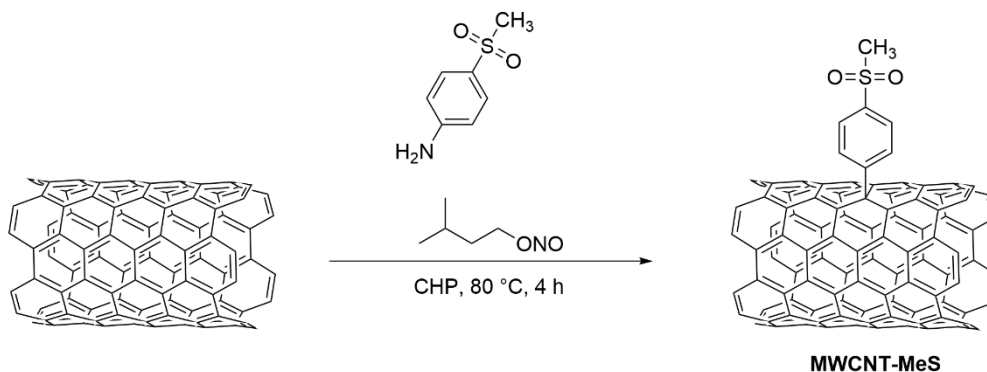
**Pdl:** 0.266

**Zeta potential** (0.5 mS/cm): -45.3 mV  $\sigma = 0.529$  mV

**Assorbanza UV-Vis-NIR** (1000 nm): 0.40295 u.a.

**Disperdibilità in acqua:** 1.437 mg/mL

### 3.3.6 Funzionalizzazione di MWCNT con metilsulfonilbenzene (MWCNT-MeS)



	<b>M.M.</b> [g·mol <sup>-1</sup> ]	<b>Densità</b> [g·mL <sup>-1</sup> ]	<b>Massa</b> [mg]	<b>Volume</b> [mL]	<b>Moli</b> [mmol]
<b>MWCNT (8-15 nm)</b>	12.01	/	20.0	/	1.67
<b>4-(metilsulfonil)anilina</b>	171.21	/	142.7	/	0.83
<b>Isopentil nitrito</b>	117.15	0.872	103	0.118	0.83
<b>CHP (solvente)</b>	167.25	1.007	/	8.0	/

In un pallone di vetro a due colli sono stati introdotti MWCNT (20.0 mg, 1.67 mmol di C) e la 4-(metilsulfonil)anilina (142.7 mg, 0.83 mmol) precedentemente sciolta in 8.0 mL di CHP. La miscela è stata portata a 80 °C in atmosfera di N<sub>2</sub> sotto agitazione magnetica. Successivamente è stato aggiunto l'isopentil nitrito (0.118 mL, 0.83 mmol). Dopo 4 ore, il riscaldamento è stato interrotto e sono stati aggiunti 15 mL di MeOH. Una volta raffreddata la miscela, il prodotto è stato recuperato mediante filtrazione su filtri Fluoropore PTFE 0.2 µm e lavato 6 x 25 mL di acqua MilliQ e 1 x 25 mL di MeOH recuperando su filtri Millipore PC 0.1 µm. I MWCNT funzionalizzati sono stati infine rimossi dal filtro mediante sonicazione in MeOH e la dispersione è stata asciugata sotto flusso di N<sub>2</sub>.

**Perdita di peso (TGA)** (100-640 °C, N<sub>2</sub>): 9.51 %

**Diametro idrodinamico medio:** 132.5 nm

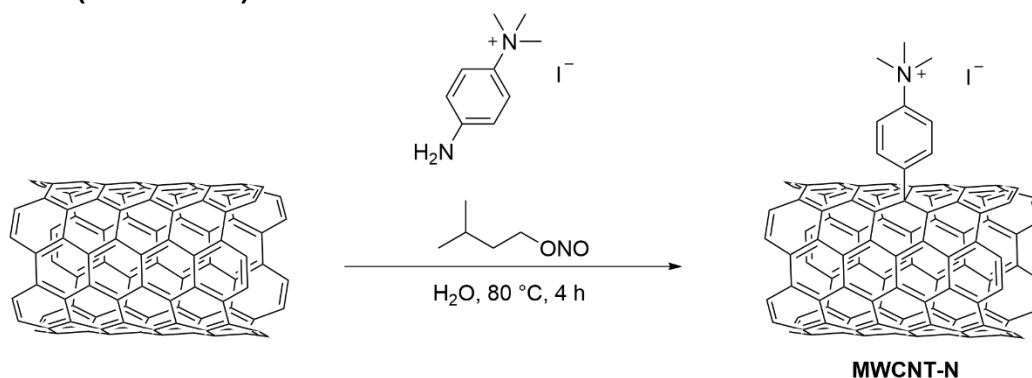
**Pdl:** 0.249

**Zeta potential** (0.5 mS/cm): -30.2 mV  $\sigma = 0.577$  mV

**Assorbanza UV-Vis-NIR** (1000 nm): 0.09252 u.a.

**Disperdibilità in acqua:** 0.357 mg/mL

### 3.3.7 Funzionalizzazione di MWCNT con N,N,N-trimetilbenzenammonio (MWCNT-N)



	<b>M.M.</b> [g·mol <sup>-1</sup> ]	<b>Densità</b> [g·mL <sup>-1</sup> ]	<b>Massa</b> [mg]	<b>Volume</b> [mL]	<b>Moli</b> [mmol]
<b>MWCNT (8-15 nm)</b>	12.01	/	30.3	/	2.52
<b>4-ammino-N,N,N-trimetilbenzenammonio ioduro</b>	278.14	/	701.9	/	2.52
<b>Isopentil nitrito</b>	117.15	0.872	311.3	0.357	2.52
<b>Acqua MilliQ (solvente)</b>	18.01	0.997	/	16.0	/

In un pallone di vetro a due colli sono stati introdotti MWCNT (30.3 mg, 2.52 mmol di C) e la 4-ammino-N,N,N-trimetilbenzenammonio ioduro (701.9 mg, 2.52 mmol) precedentemente sciolta in 16.0 mL di acqua MilliQ. La miscela è stata portata a 80 °C in atmosfera di N<sub>2</sub> sotto agitazione magnetica. Successivamente è stato aggiunto l'isopentil nitrito (0.357 mL, 2.52 mmol). Dopo 4 ore, il riscaldamento è stato interrotto e, una volta raffreddata la miscela, il prodotto è stato recuperato mediante filtrazione su filtri Millipore PC 0.1 µm e lavato 3 volte con 25 mL di acqua MilliQ e poi 3 volte con 25 mL di MeOH. I MWCNT funzionalizzati sono stati infine rimossi dal filtro mediante sonicazione in MeOH e la dispersione è stata asciugata sotto flusso di N<sub>2</sub>.

**Perdita di peso (TGA)** (100-600 °C, N<sub>2</sub>): 10.64 %

**Diametro idrodinamico medio:** 139.9 nm

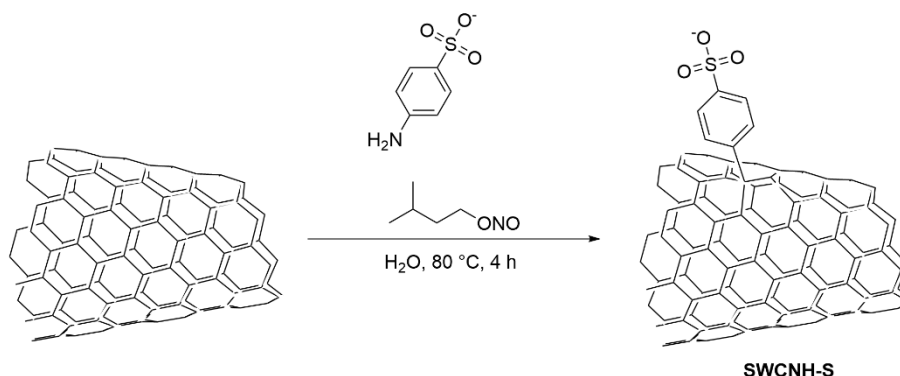
**Pdl:** 0.229

**Zeta potential** (0.5 mS/cm): 43.3 mV  $\sigma = 0.854$  mV

**Assorbanza UV-Vis-NIR** (1000 nm): 0.31788 u.a.

**Disperdibilità in acqua:** 1.086 mg/mL

### 3.3.8 Funzionalizzazione di SWCNH con benzensolfonato (SWCNH-S)



	<b>M.M.</b> [g·mol <sup>-1</sup> ]	<b>Densità</b> [g·mL <sup>-1</sup> ]	<b>Massa</b> [mg]	<b>Volume</b> [mL]	<b>Moli</b> [mmol]
<b>SWCNH</b>	12.01	/	50.0	/	4.16
<b>Sodio sulfanilato diidrato</b>	231.2	/	962.5	/	4.16
<b>Isopentil nitrito</b>	117.15	0.872	513.6	0.589	4.16
<b>Acqua MilliQ (solvente)</b>	18.01	0.997	/	8.0	/

In un pallone di vetro a due colli sono stati introdotti SWCNH (50.0 mg, 4.16 mmol di C) e il sodio sulfanilato (962.5 mg, 4.16 mmol) precedentemente sciolto in 8.0 mL di acqua MilliQ. La miscela è stata portata a 80 °C in atmosfera di N<sub>2</sub> sotto agitazione magnetica. Successivamente è stato aggiunto l'isopentil nitrito (0.589 mL, 4.16 mmol). Dopo 4 ore, il riscaldamento è stato interrotto e la miscela di reazione raffreddata. Il prodotto è stato poi recuperato mediante filtrazione su filtri Millipore PC 0.1 µm e lavato 7 x 25 mL di acqua MilliQ e 1 x 25 mL di MeOH. I SWCNH funzionalizzati sono stati infine rimossi dal filtro mediante sonicazione in MeOH e la dispersione è stata asciugata sotto flusso di N<sub>2</sub>.

**Perdita di peso (TGA)** (100-600 °C, N<sub>2</sub>): 7.83 %

**Diametro idrodinamico medio:** 108.0 nm

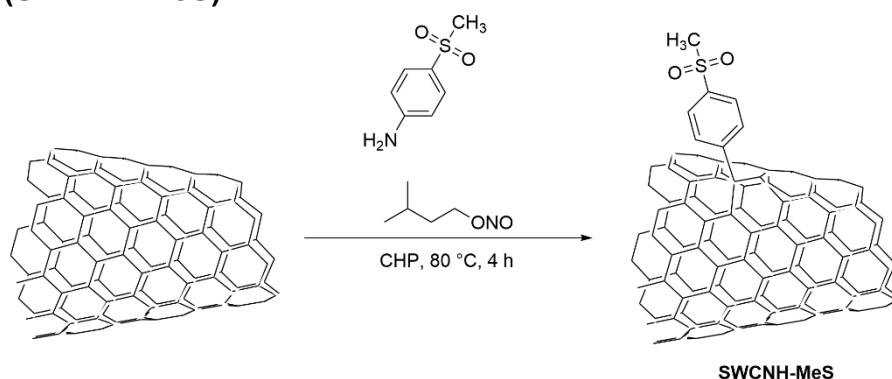
**Pdl:** 0.116

**Zeta potential** (0.5 mS/cm): -31.8 mV  $\sigma = 0.400$  mV

**Assorbanza UV-Vis-NIR** (1000 nm): 0.54064 u.a.

**Disperdibilità in acqua:** 1.256 mg/mL

### 3.3.9 Funzionalizzazione di SWCNH con metilsulfonilbenzene (SWCNH-MeS)



	<b>M.M.</b> [g·mol <sup>-1</sup> ]	<b>Densità</b> [g·mL <sup>-1</sup> ]	<b>Massa</b> [mg]	<b>Volume</b> [mL]	<b>Moli</b> [mmol]
<b>SWCNH</b>	12.01	/	20.0	/	1.67
<b>4-(metilsulfonil)anilina</b>	171.21	/	285.4	/	1.67
<b>Isopentil nitrito</b>	117.15	0.872	205.8	0.236	1.67
<b>CHP (solvente)</b>	167.25	1.007	/	14.0	/

In un pallone di vetro a due colli sono stati introdotti SWCNH (20.0 mg, 1.67 mmol di C) e la 4-(metilsulfonil)anilina (285.4 mg, 1.67 mmol) precedentemente sciolta in 14.0 mL di CHP. La miscela è stata portata a 80 °C in atmosfera di N<sub>2</sub> sotto agitazione magnetica. Successivamente è stato aggiunto l'isopentil nitrito (0.236 mL, 1.67 mmol). Dopo 4 ore, il riscaldamento è stato interrotto e sono stati aggiunti 30 mL di MeOH. Una volta raffreddata la miscela, il prodotto è stato recuperato mediante filtrazione su Durapore PVDF 0.1 µm e lavato 4 x 25 mL di acqua MilliQ e 3 x 25 mL di MeOH recuperando su filtri Millipore PC 0.1 µm. I SWCNH funzionalizzati sono stati infine rimossi dal filtro mediante sonicazione in MeOH e la dispersione è stata asciugata sotto flusso di N<sub>2</sub>.

**Perdita di peso (TGA)** (100-600 °C, N<sub>2</sub>): 14.70 %

**Diametro idrodinamico medio:** 266.4 nm

**Pdl:** 0.249

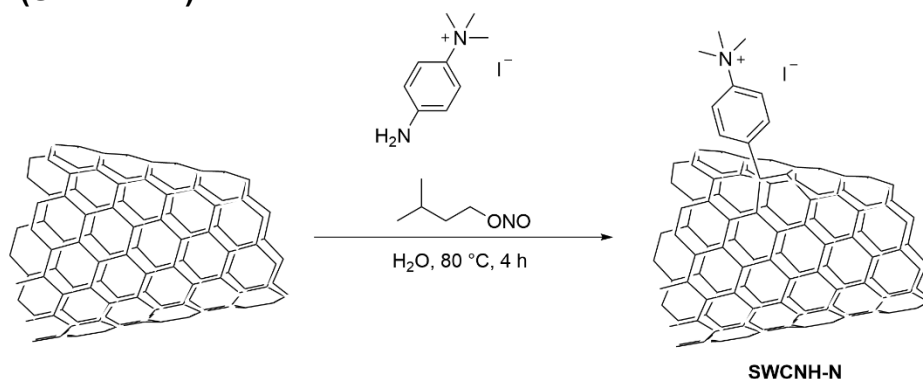
**Zeta potential** (0.5 mS/cm): -21.6 mV  $\sigma = 0.0577$  mV

**Assorbanza UV-Vis-NIR** (1000 nm): 0.16157 u.a.

**Disperdibilità in acqua:** 0.537 mg/mL



### 3.3.10 Funzionalizzazione di SWCNH con N,N,N-trimetilbenzenammonio (SWCNH-N)



	<b>M.M.</b> [g·mol <sup>-1</sup> ]	<b>Densità</b> [g·mL <sup>-1</sup> ]	<b>Massa</b> [mg]	<b>Volume</b> [mL]	<b>Moli</b> [mmol]
<b>SWCNH</b>	12.01	/	20.0	/	1.67
<b>4-ammino-N,N,N-trimetilbenzene ammonio ioduro</b>	278.14	/	463.2	/	1.67
<b>Isopentil nitrito</b>	117.15	0.872	205.8	0.236	1.67
<b>Acqua MilliQ (solvente)</b>	18.01	0.997	/	16.0	/

In un pallone di vetro a due colli sono stati introdotti SWCNH (20.0 mg, 1.67 mmol di C) e la 4-ammino-N,N,N-trimetilbenzene ammonio ioduro (463.2 mg, 1.67 mmol) precedentemente sciolta in 16.0 mL di acqua Milli Q. La miscela è stata portata a 80 °C in atmosfera di N<sub>2</sub> sotto agitazione magnetica. Successivamente è stato aggiunto l'isopentil nitrito (0.236 mL, 1.67 mmol). Dopo 4 ore, il riscaldamento è stato interrotto e, una volta raffreddata la miscela, il prodotto è stato recuperato mediante filtrazione su filtri Millipore PC 0.1 µm e lavato 5 x 25 mL di una miscela MilliQ:MeOH 3:2 e 1 x 25 mL di MeOH. I SWCNH funzionalizzati sono stati infine rimossi dal filtro mediante sonicazione in MeOH e la dispersione è stata asciugata sotto flusso di N<sub>2</sub>.

**Perdita di peso (TGA)** (100-600 °C, N<sub>2</sub>): 19.31 %

**Diametro idrodinamico medio:** 123.8 nm

**Pdl:** 0.131

**Zeta potential** (0.5 mS/cm): 34.4 mV  $\sigma = 0.985$  mV

**Assorbanza UV-Vis-NIR** (1000 nm): 0.48865 u.a.

**Disperdibilità in acqua:** 1.312 mg/mL

### **3.3.11 Preparazione gel di Fmoc-Lys(Fmoc)-RGD-OH**

Per la preparazione dei gel di Fmoc-Lys(Fmoc)-RGD-OH è stata seguita la seguente procedura:

- i. 2 mg di peptide vengono disciolti in 20  $\mu\text{L}$  di DMSO (servendosi di un bagno ad ultrasuoni) per ottenere una soluzione 100 mg/mL.
- ii. 180  $\mu\text{L}$  di acqua MilliQ vengono aggiunti alla soluzione di peptide.
- iii. La soluzione viene mescolata e dopo qualche minuto si osserva la formazione del gel.

### **3.3.12 Preparazione gel di Fmoc-Lys(Fmoc)-RGD-OH con f-MWCNT**

Sono state preparate sei diverse tipologie di idrogel variando la nanostruttura e la sua percentuale rispetto al peso del peptide (0.1 wt% e 0.5 wt%). Sono stati testati i derivati MWCNT-S2, MWCNT-MeS e MWCNT-N.

- i. Per ogni tipologia di f-MWCNT si prepara una dispersione 0.25 mg/mL sonicando a punta per 1min (impulsi di intensità 6 W, intervallati 3 s ON e 3 s OFF) una miscela contenente 1mg di nanostruttura in 4.0 mL di acqua MilliQ.
- ii. In una vial si prepara una soluzione 100 mg/mL di Fmoc-Lys(Fmoc)-RGD-OH sciogliendo 2 mg di peptide in 20  $\mu\text{L}$  di DMSO.
- iii. Per la preparazione di idrogel con 0.1 wt% di nanostruttura, alla soluzione di peptide vengono aggiunti 172  $\mu\text{L}$  di acqua MilliQ e 8  $\mu\text{L}$  di dispersione; mentre per ottenere idrogel con 0.5 wt% di f-MWCNT si aggiungono 140  $\mu\text{L}$  di acqua MilliQ e 40  $\mu\text{L}$  di dispersione.
- iv. Dopo l'aggiunta di acqua MilliQ e della dispersione si agita la vial. Dopo qualche minuto, si osserva la formazione del gel.

Durante la preparazione degli idrogel è importante che le aggiunte di acqua e dispersione vengano fatte in tempi ravvicinato per evitare la formazione di gel disomogenei.

### 3.3.13 Preparazione gel di nanocellulosa carbossilata con f-MWCNT

Il pre-gel di nanocellulosa carbossilata e il mezzo di coltura (DMEM) sono stati forniti dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Brusatin, il quale ha ottimizzato la procedura per la preparazione dell'idrogel.

Sono stati preparati idrogel compositi con percentuale di nanostruttura pari a 0.1 wt% rispetto alla massa di nanocellulosa carbossilata. I derivati testati sono **MWCNT-S1**, **MWCNT-S2**, **MWCNT-MeS** e **MWCNT-N**. Di seguito viene riportata la procedura per la preparazione dei gel da 500  $\mu\text{L}$  ciascuno:

- i. Le dispersioni di **MWCNT-MeS**, **MWCNT-S** e **MWCNT-N** in DMEM, rispettivamente 0.3 mg/mL e 0.75 mg/mL per gli ultimi due, sono state ottenute sonicando a punta le miscele per 3 min (impulsi di intensità 6 W, intervallati 3 s ON e 3 s OFF).
- ii. In ciascuna eppendorf sono stati introdotti 240  $\mu\text{L}$  di DMEM (225  $\mu\text{L}$  per **MWCNT-MeS**).
- iii. Ad ogni eppendorf sono stati aggiunti 10  $\mu\text{L}$  di dispersione concentrata (25  $\mu\text{L}$  per **MWCNT-MeS**).
- iv. Dopo averla trattata con vortex per qualche minuto fino a renderla un liquido molto viscoso, 250  $\mu\text{L}$  di pre-gel di nanocellulosa carbossilata (30 mg/mL) sono stati aggiunti alle soluzioni di DMEM.
- v. La miscela è stata mescolata servendosi di una micropipetta.
- vi. Dopo aver lasciato il composto a temperatura ambiente per circa 1 h si osserva la formazione del gel.

Utilizzando la procedura sopra descritta, sono stati preparati idrogel da 1mL ciascuno con quantità di **MWCNT-S1** pari a 0.1 wt%, 0.2 wt% e 0.5 wt%, rispetto al peso di nanocellulosa carbossilata. Per ottenere tali idrogel, durante la preparazione (*vedi punto iii.*) sono stati aggiunti 20  $\mu\text{L}$ , 40  $\mu\text{L}$  e 100  $\mu\text{L}$  di dispersione rispettivamente.

Una volta formati, gli idrogel sono stati conservati in frigo per evitare, o quantomeno rallentare, lo sviluppo di specie microbiche.



## Bibliografia

1. Yu, Y.; Wang, Q.; Wang, C.; Shang, L. *Engineered Regeneration* **2021**, 2, 96-104.
2. Lee, K. Y.; Mooney, D. J. *Chemical Reviews* **2001**, 101, (7), 1869-1880.
3. El-Sherbiny, I. M.; Yacoub, M. H. *Global Cardiology Science and Practice* **2013**, 2013, (3), 38.
4. Aslam Khan, M. U.; Abd Razak, S. I.; Al Arjan, W. S.; Nazir, S.; Sahaya Anand, T. J.; Mehboob, H.; Amin, R., Recent Advances in Biopolymeric Composite Materials for Tissue Engineering and Regenerative Medicines: A Review. In *Molecules*, 2021; Vol. 26.
5. Hopley, E. L.; Salmasi, S.; Kalaskar, D. M.; Seifalian, A. M. *Biotechnology Advances* **2014**, 32, (5), 1000-1014.
6. Pina, S.; Oliveira, J. M.; Reis, R. L. *Advanced Materials* **2015**, 27, (7), 1143-1169.
7. Hu, Y.; Shenderova, O. A.; Hu, Z.; Padgett, C. W.; Brenner, D. W. *Reports on Progress in Physics* **2006**, 69, (6), 1847-1895.
8. Hale, D. K. *Journal of Materials Science* **1976**, 11, (11), 2105-2141.
9. Gaur, M.; Misra, C.; Yadav, A. B.; Swaroop, S.; Maolmhuaidh, F. Ó.; Bechelany, M.; Barhoum, A., Biomedical Applications of Carbon Nanomaterials: Fullerenes, Quantum Dots, Nanotubes, Nanofibers, and Graphene. In *Materials*, 2021; Vol. 14.
10. Sanchez-Garcia, M. D.; Lagaron, J. M.; Hoa, S. V. *Composites Science and Technology* **2010**, 70, (7), 1095-1105.
11. Heister, E.; Lamprecht, C.; Neves, V.; Tilmaciu, C.; Datas, L.; Flahaut, E.; Soula, B.; Hinterdorfer, P.; Coley, H. M.; Silva, S. R. P.; McFadden, J. *ACS Nano* **2010**, 4, (5), 2615-2626.
12. Vicentini, N.; Gatti, T.; Salice, P.; Scapin, G.; Marega, C.; Filippini, F.; Menna, E. *Carbon* **2015**, 95, 725-730.
13. Vicentini, N.; Gatti, T.; Salerno, M.; Hernandez Gomez, Y. S.; Bellon, M.; Gallio, S.; Marega, C.; Filippini, F.; Menna, E. *Materials Chemistry and Physics* **2018**, 214, 265-276.
14. Ceroni, L. M., E. Functionalized Carbon Nanotubes as Fillers in Nanocomposite Hydrogels for Biomedical Applications. 2021.
15. Velasquez, E. M., E. Idrogel nanocompositi biocompatibili a base di nanotubi di carbonio per applicazioni biomediche. 2022.
16. Koutsopoulos, S. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2016**, 104, (4), 1002-1016.
17. Langer, R.; Tirrell, D. A. *Nature* **2004**, 428, (6982), 487-492.
18. Sathaye, S.; Mbi, A.; Sonmez, C.; Chen, Y.; Blair, D. L.; Schneider, J. P.; Pochan, D. J. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2015**, 7, (1), 34-68.
19. Abou-Yousef, H.; Dacroy, S.; Hasanin, M.; Saber, E.; Kamel, S. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **2021**, 21, 100419.

20. Mendoza, D. J.; Hossain, L.; Browne, C.; Raghuwanshi, V. S.; Simon, G. P.; Garnier, G. *Carbohydrate Polymers* **2020**, 245, 116566.
21. Mendoza, D. J.; Browne, C.; Raghuwanshi, V. S.; Simon, G. P.; Garnier, G. *Carbohydrate Polymers* **2019**, 226, 115292.
22. Hirsch, A. *Nat Mater* **2010**, 9, (11), 868-71.
23. Yuan, X.; Zhang, X.; Sun, L.; Wei, Y.; Wei, X. *Part Fibre Toxicol* **2019**, 16, (1), 18.
24. Liu, H.; Zhang, L.; Yan, M.; Yu, J. *Journal of Materials Chemistry B* **2017**, 5, (32), 6437-6450.
25. Hanein, Y.; Bareket-Keren, L. *Frontiers in Neural Circuits* **2013**, 6.
26. Ma, P.-C.; Siddiqui, N. A.; Marom, G.; Kim, J.-K. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* **2010**, 41, (10), 1345-1367.
27. Dai, H. *Accounts of Chemical Research* **2002**, 35, (12), 1035-1044.
28. Prasek, J.; Drbohlavova, J.; Chomoucka, J.; Hubalek, J.; Jasek, O.; Adam, V.; Kizek, R. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, 21, (40), 15872-15884.
29. Arora, N.; Sharma, N. N. *Diamond and Related Materials* **2014**, 50, 135-150.
30. Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. *Chemical Reviews* **2006**, 106, (3), 1105-1136.
31. Niyogi, S.; Hamon, M. A.; Hu, H.; Zhao, B.; Bhowmik, P.; Sen, R.; Itkis, M. E.; Haddon, R. C. *Accounts of Chemical Research* **2002**, 35, (12), 1105-1113.
32. Chen, Z.; Thiel, W.; Hirsch, A. *ChemPhysChem* **2003**, 4, (1), 93-97.
33. Serban, B.-C.; Bumbac, M.; Buiu, O.; Cobianu, C.; Brezeanu, M.; Nicolescu, C. *Ann. Acad. Rom. Sci. Ser. Math. Appl* **2018**, 11, 5-18.
34. Zhang, Z.; Han, S.; Wang, C.; Li, J.; Xu, G. *Nanomaterials* **2015**, 5, (4), 1732-1755.
35. Karousis, N.; Suarez-Martinez, I.; Ewels, C. P.; Tagmatarchis, N. *Chemical Reviews* **2016**, 116, (8), 4850-4883.
36. Zhu, S.; Xu, G. *Nanoscale* **2010**, 2, (12), 2538-2549.
37. Cioffi, C.; Campidelli, S.; Brunetti, F. G.; Meneghetti, M.; Prato, M. *Chemical Communications* **2006**, (20), 2129-2131.
38. Dyke, C. A.; Tour, J. M. *Chemistry – A European Journal* **2004**, 10, (4), 812-817.
39. Lipińska, M. E.; Rebelo, S. L. H.; Pereira, M. F. R.; Gomes, J. A. N. F.; Freire, C.; Figueiredo, J. L. *Carbon* **2012**, 50, (9), 3280-3294.
40. Stephenson, J. J.; Sadana, A. K.; Higginbotham, A. L.; Tour, J. M. *Chemistry of Materials* **2006**, 18, (19), 4658-4661.
41. Salice, P.; Fabris, E.; Sartorio, C.; Fenaroli, D.; Figà, V.; Casaletto, M. P.; Cataldo, S.; Pignataro, B.; Menna, E. *Carbon* **2014**, 74, 73-82.
42. Bahr, J. L.; Tour, J. M. *Chemistry of materials* **2001**, 13, (11), 3823-3824.
43. Alafogianni, P.; Dassios, K.; Farmaki, S.; Antiohos, S. K.; Matikas, T. E.; Barkoula, N. M. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2016**, 495, 118-124.
44. Bhattacharjee, S. *J Control Release* **2016**, 235, 337-351.
45. Shin, U.-S.; Knowles, J. C.; Kim, H.-W. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2011**, 32, (5), 1635-1639.
46. Barnes, H. A.; Hutton, J. F.; Walters, K., *An introduction to rheology*. Elsevier: 1989; Vol. 3.

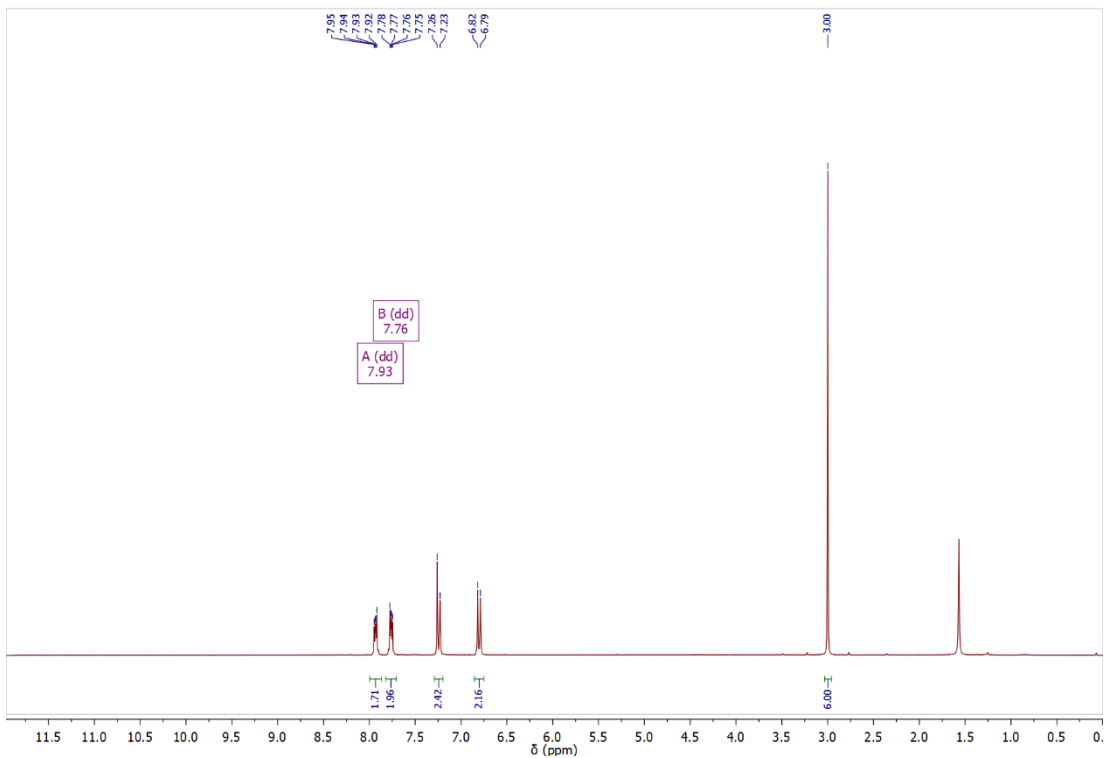
47. Mezger, T., *The rheology handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers*. European Coatings: 2020.
48. Yan, C.; Pochan, D. J. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39, (9), 3528-3540.
49. Benazzato, S. M., E. Studio sull'utilizzo di nanotubi di carbonio funzionalizzati per la rimozione di contaminanti organici da matrici acquose. Università degli Studi di Padova, 2022.
50. Crumrine, D. S.; Shankweiler, J. M.; Hoffman, R. V. *The Journal of Organic Chemistry* **1986**, 51, (25), 5013-5015.
51. Clayton-Smith, M.; Sharma, M.-P. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* **2021**, 22, (7), 415-421.
52. Firme, C. P.; Bandaru, P. R. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, 6, (2), 245-256.
53. Hadad, C.; Ke, X.; Carraro, M.; Sartorel, A.; Bittencourt, C.; Van Tendeloo, G.; Bonchio, M.; Quintana, M.; Prato, M. *Chemical Communications* **2014**, 50, (7), 885-887.
54. Yang, B.; Ren, L.; Li, L.; Tao, X.; Shi, Y.; Zheng, Y. *Analyst* **2013**, 138, (21), 6671-6676.
55. Xie, H.; Wang, D.; Tao, D.; Wang, L. *Journal of Power Sources* **2014**, 262, 328-337.
56. Agresti, F.; Barison, S.; Famengo, A.; Pagura, C.; Fedele, L.; Rossi, S.; Bobbo, S.; Rancan, M.; Fabrizio, M. *Journal of Colloid and Interface Science* **2018**, 514, 528-533.
57. Valentini, F.; Ciambella, E.; Boaretto, A.; Rizzitelli, G.; Carbone, M.; Conte, V.; Cataldo, F.; Russo, V.; Casari, C. S.; Chillura-Martino, D. F.; Caponetti, E.; Bonchio, M.; Giacalone, F.; Syrgiannis, Z.; Prato, M. *Electroanalysis* **2016**, 28, (10), 2489-2499.
58. Ortolani, T. S.; Pereira, T. S.; Assumpção, M. H. M. T.; Vicentini, F. C.; Gabriel de Oliveira, G.; Janegitz, B. C. *Electrochimica Acta* **2019**, 298, 893-900.
59. Scapin, G.; Salice, P.; Tescari, S.; Menna, E.; De Filippis, V.; Filippini, F. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2015**, 11, (3), 621-632.
60. Kumar, V. B.; Tiwari, O. S.; Finkelstein-Zuta, G.; Rencus-Lazar, S.; Gazit, E. *Pharmaceutics* **2023**, 15, (2), 345.
61. Roy, S.; Banerjee, A. *RSC advances* **2012**, 2, (5), 2105-2111.
62. Busetto, R. F. F. Peptide-based scaffold for tissue engineering. 2023.
63. Burgo, S. M., M. Sviluppo di idrogel peptidici supramolecolari come scaffolds per applicazioni in ingegneria tissutale. 2023.
64. Chakraborty, P.; Aviv, M.; Netti, F.; Cohen-Gerassi, D.; Adler-Abramovich, L. *Macromolecular Bioscience* **2022**, 22, (5), 2100439.
65. Kuzmenko, V.; Kalogeropoulos, T.; Thunberg, J.; Johannesson, S.; Hägg, D.; Enoksson, P.; Gatenholm, P. *Materials Science and Engineering: C* **2016**, 58, 14-23.
66. Huh, D.; Hamilton, G. A.; Ingber, D. E. *Trends in cell biology* **2011**, 21, (12), 745-754.
67. Lutisanova, G.; Palou, M. T.; Kozankova, J. *Ceramics-Silikaty* **2011**, 55, (3), 199-207.



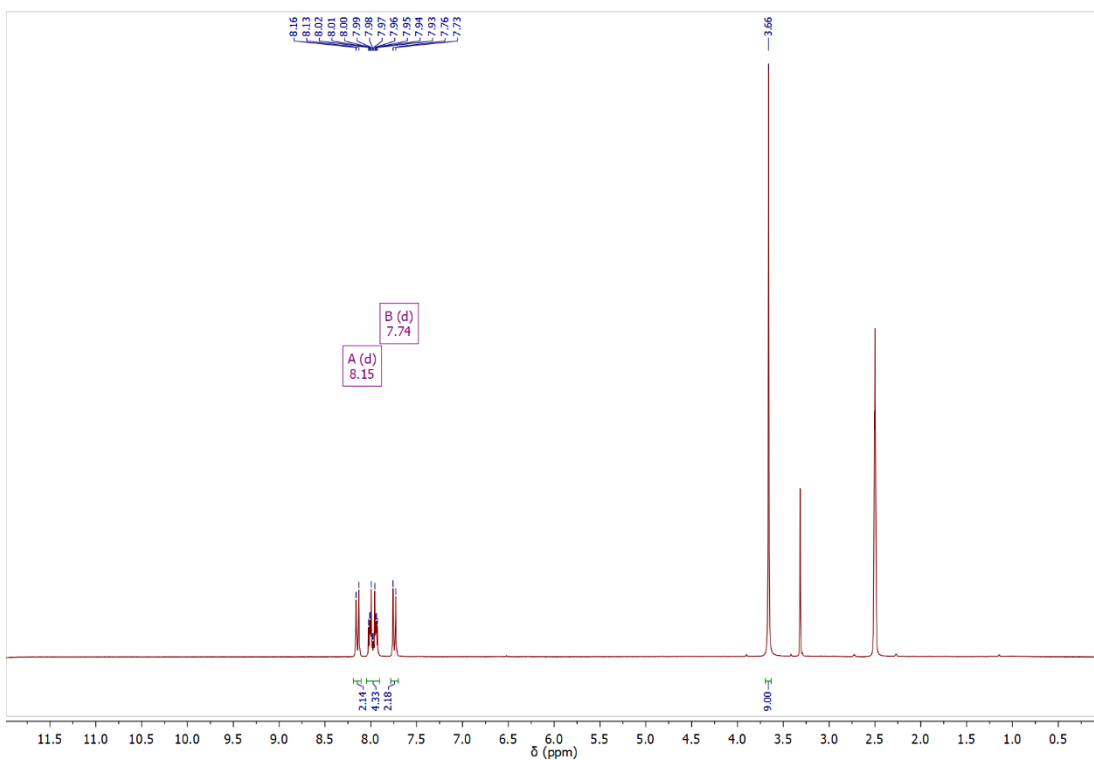


## Appendice

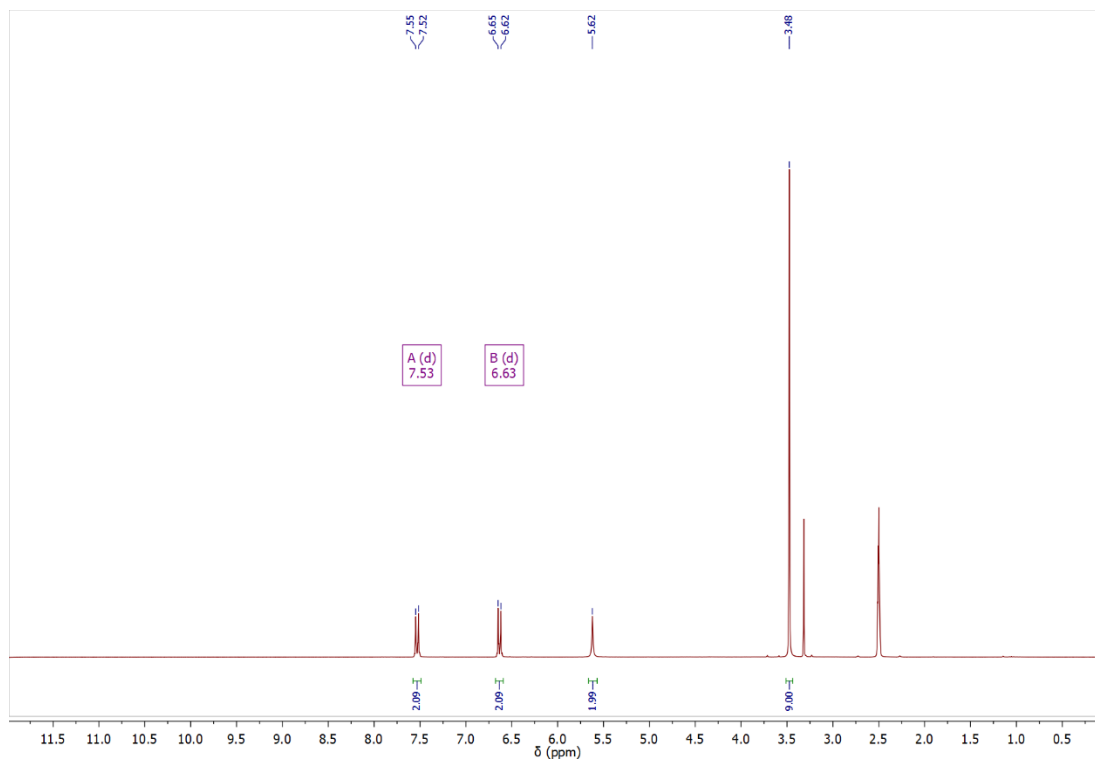
Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di 2-(4-(dimetilammino)fenil)isoindolin-1,3-dione in  $\text{CDCl}_3$ .



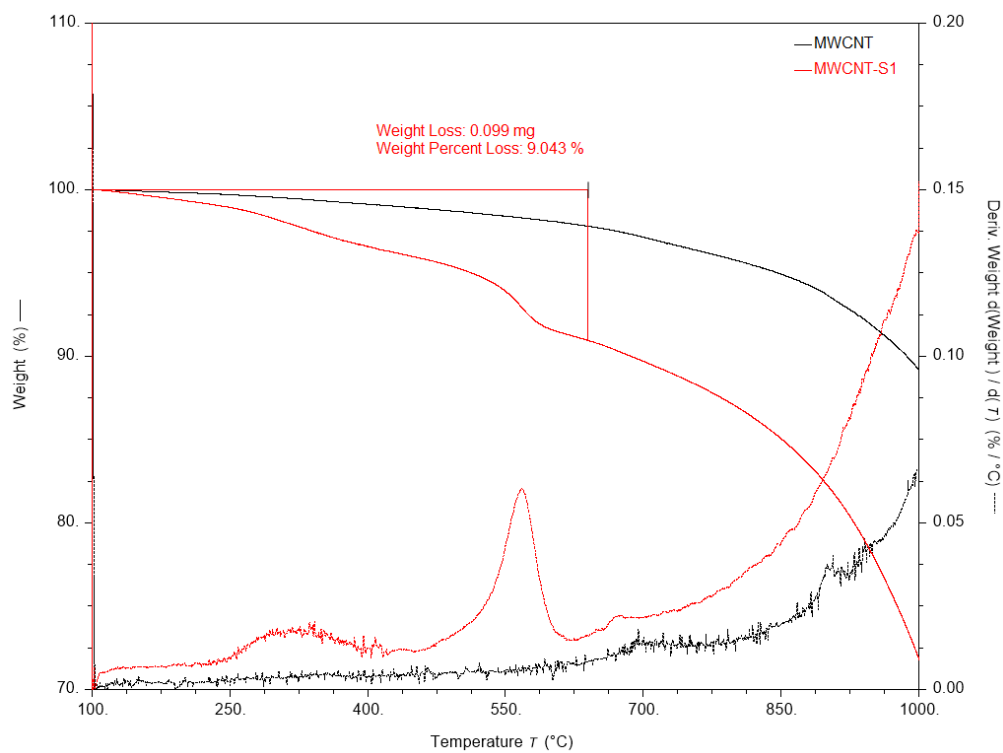
Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di 4-(1,3-dioxisoindolin-2-il)-N,N,N-trimetilbenzenammonio ioduro in  $d_6\text{-DMSO}$ .



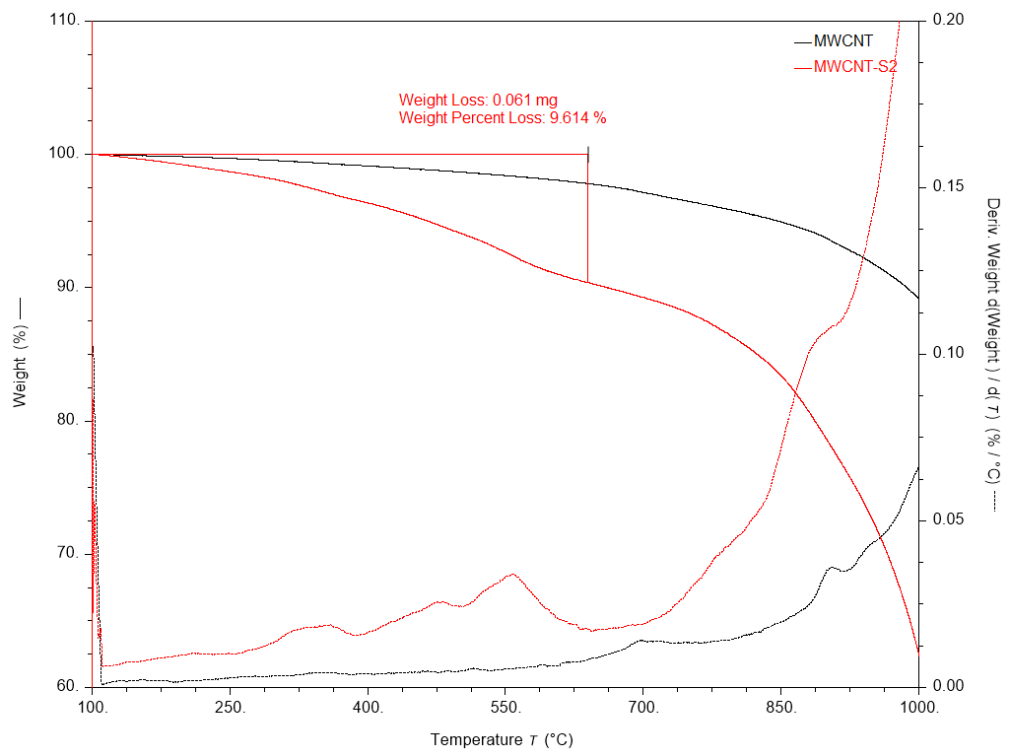
Spettro  $^1\text{H-NMR}$  di 4-ammino-N,N,N-trimetilbenzene ammonio ioduro in  $d_6$ -DMSO.



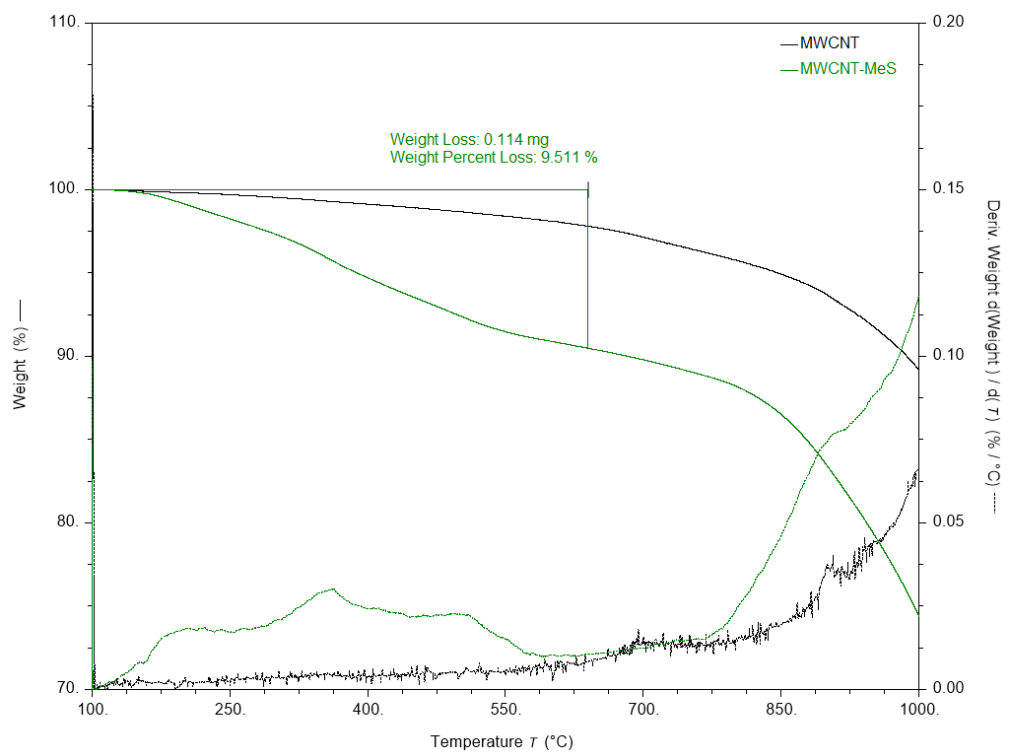
TGA del derivato MWCNT-S1 in  $\text{N}_2$ .



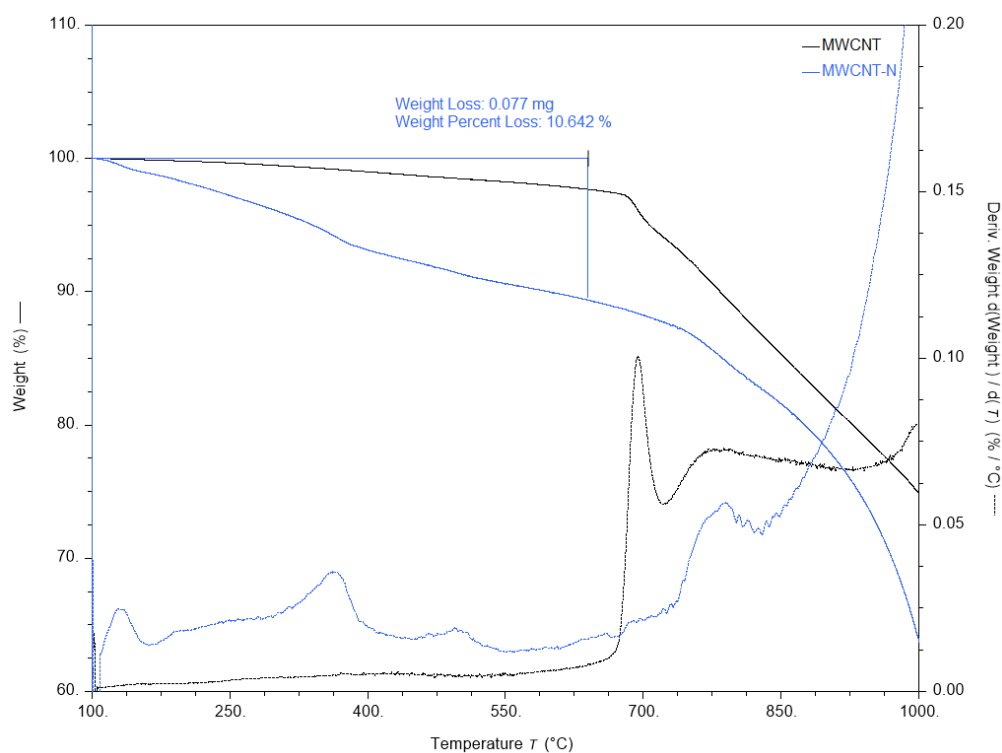
### TGA del derivato MWCNT-S2 in N<sub>2</sub>.



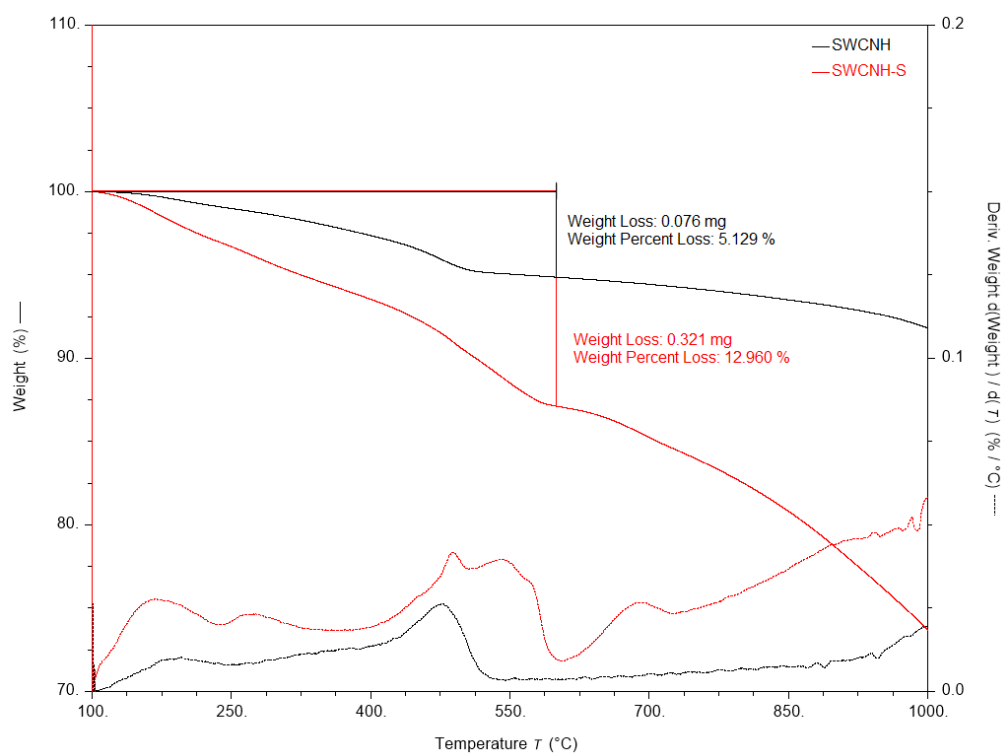
### TGA del derivato MWCNT-MeS in N<sub>2</sub>.



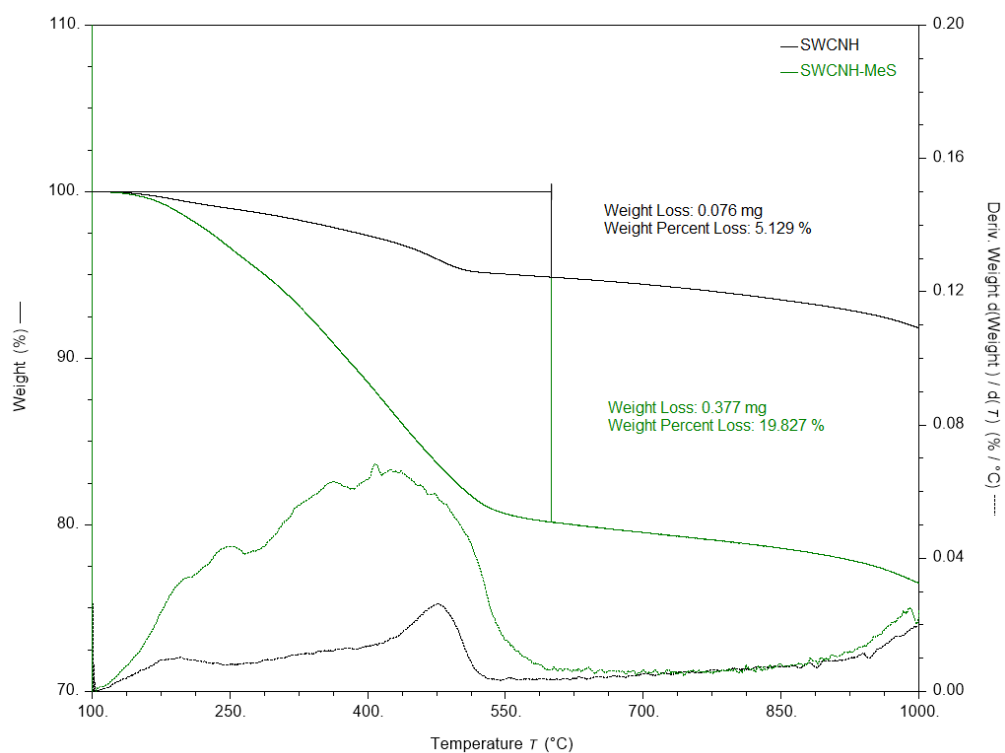
TGA del derivato MWCNT-N in N<sub>2</sub>.



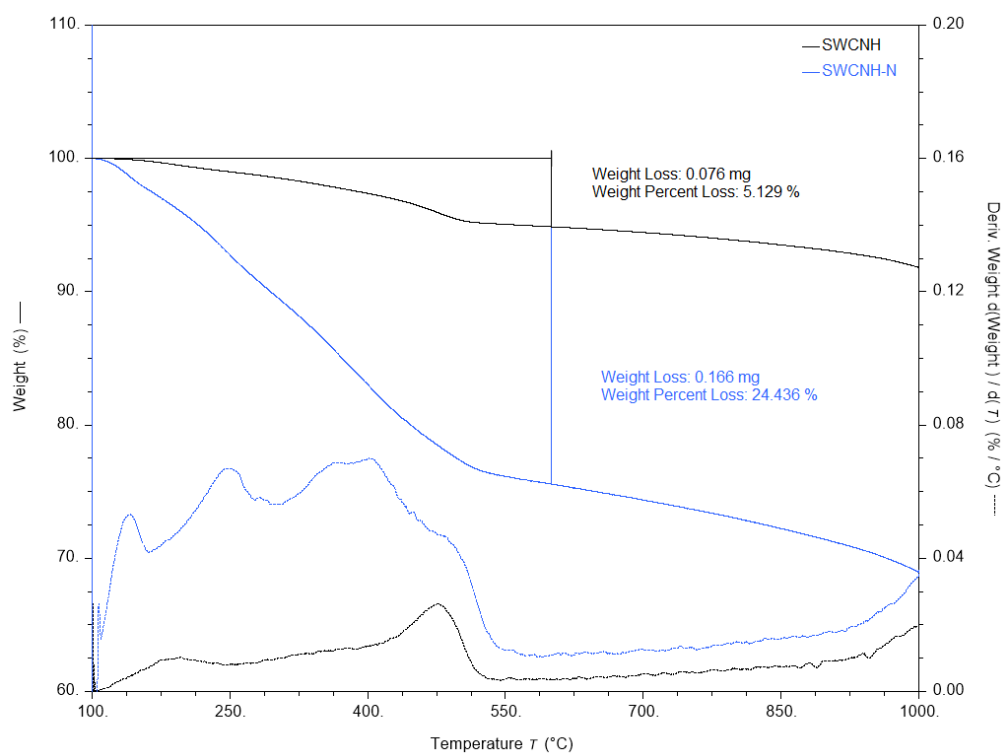
TGA del derivato SWCNH-S in N<sub>2</sub>.



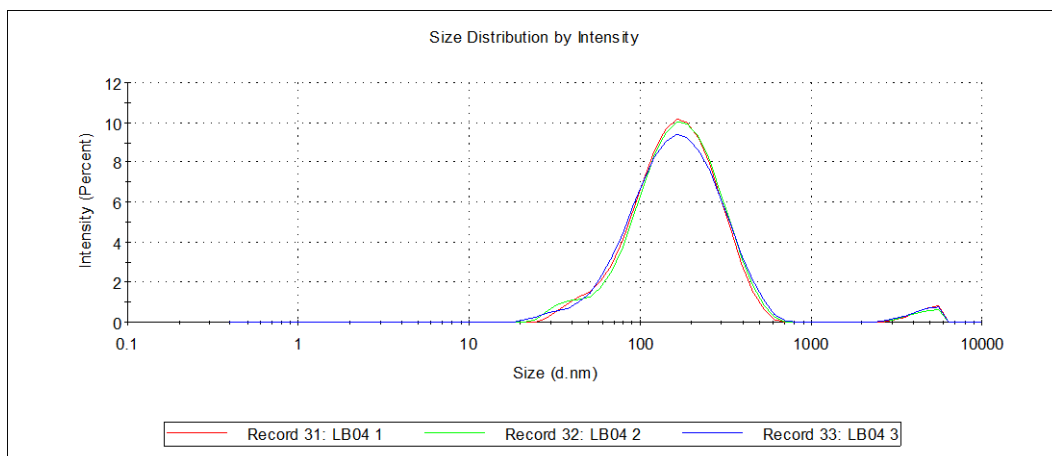
### TGA del derivato SWCNH-MeS in N<sub>2</sub>.



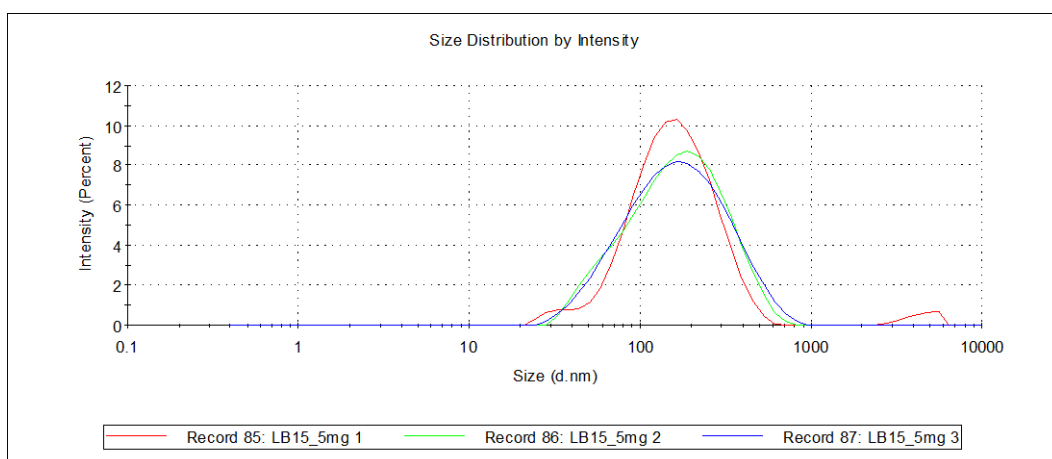
### TGA del derivato SWCNH-N in N<sub>2</sub>.



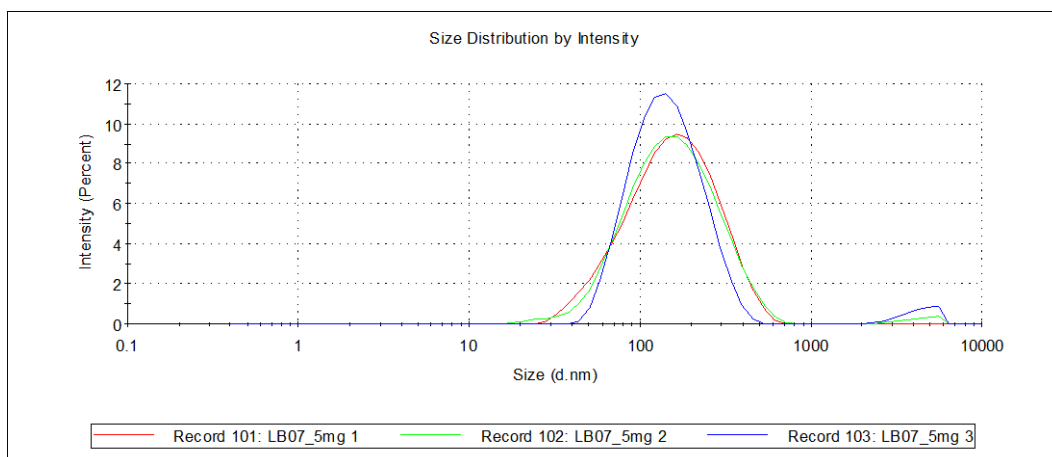
### DLS di MWCNT-S1 in H<sub>2</sub>O.



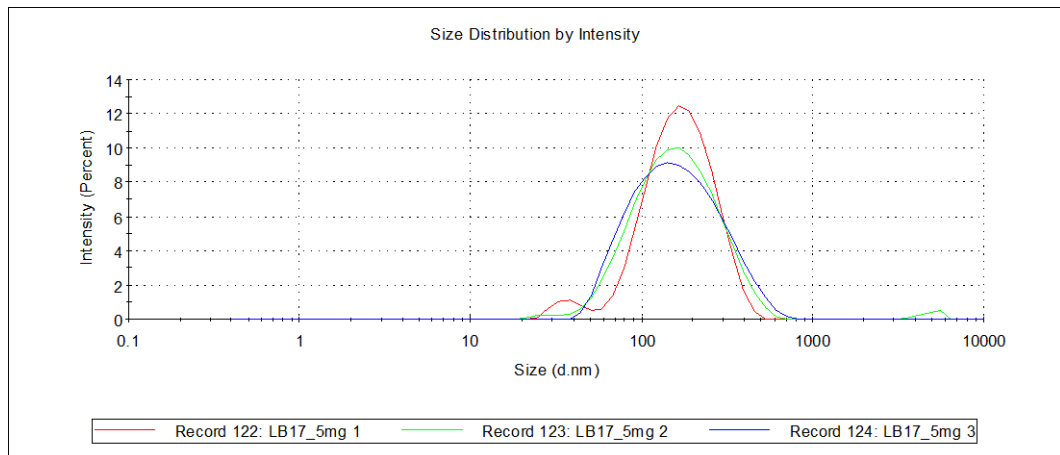
### DLS di MWCNT-S2 in H<sub>2</sub>O.



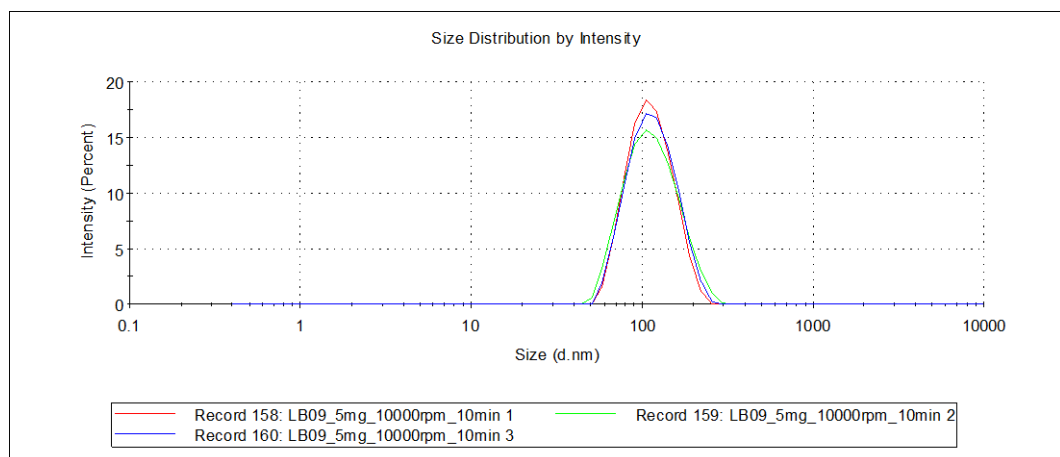
### DLS di MWCNT-MeS in H<sub>2</sub>O.



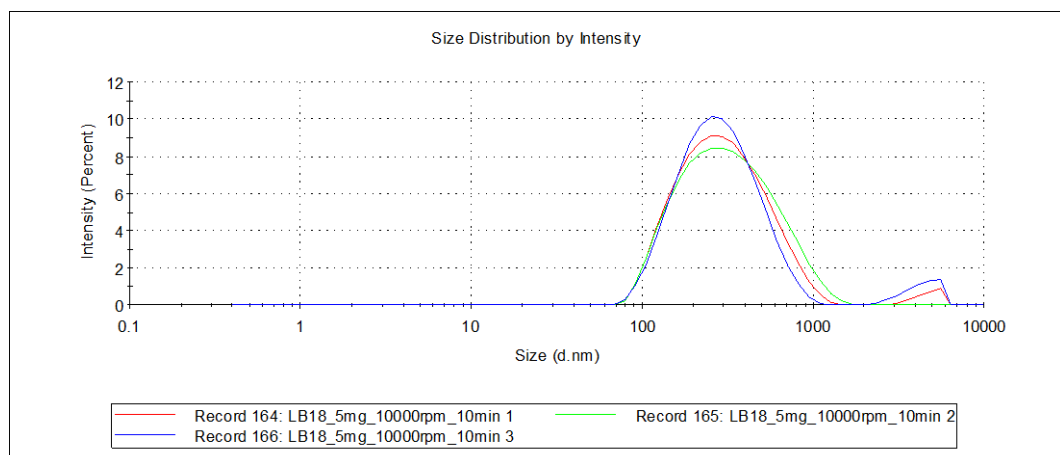
### DLS di MWCNT-N in H<sub>2</sub>O.



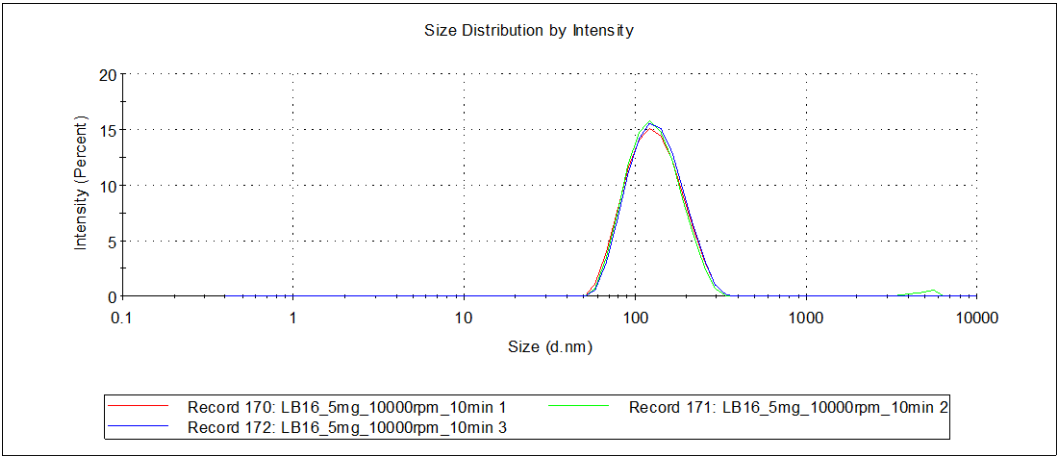
### DLS di SWCNH-S in H<sub>2</sub>O.



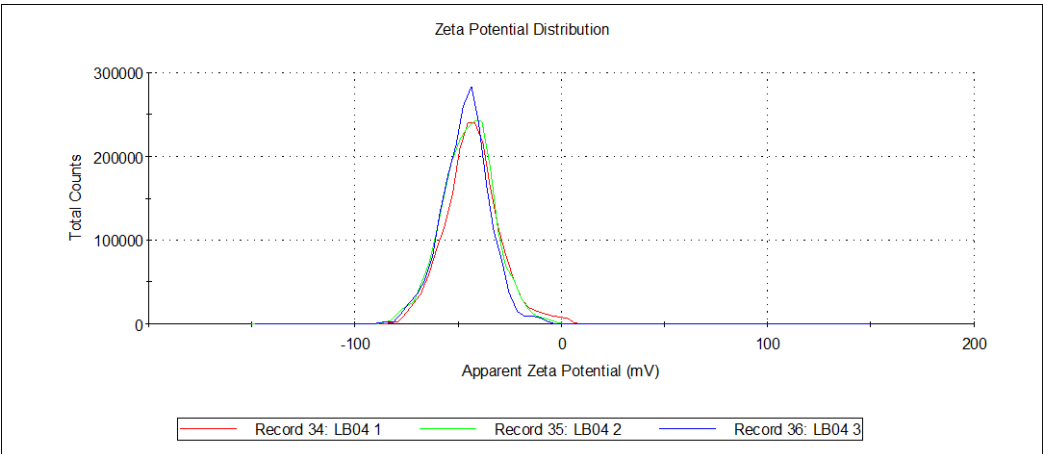
### DLS di SWCNH-MeS in H<sub>2</sub>O.



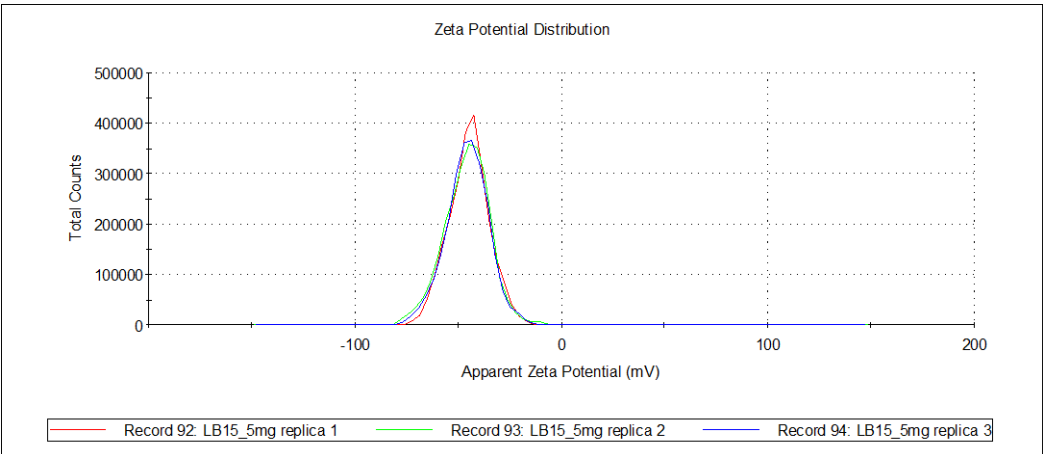
DLS di SWCNH-N in H<sub>2</sub>O.



ZP di MWCNT-S1 in H<sub>2</sub>O.

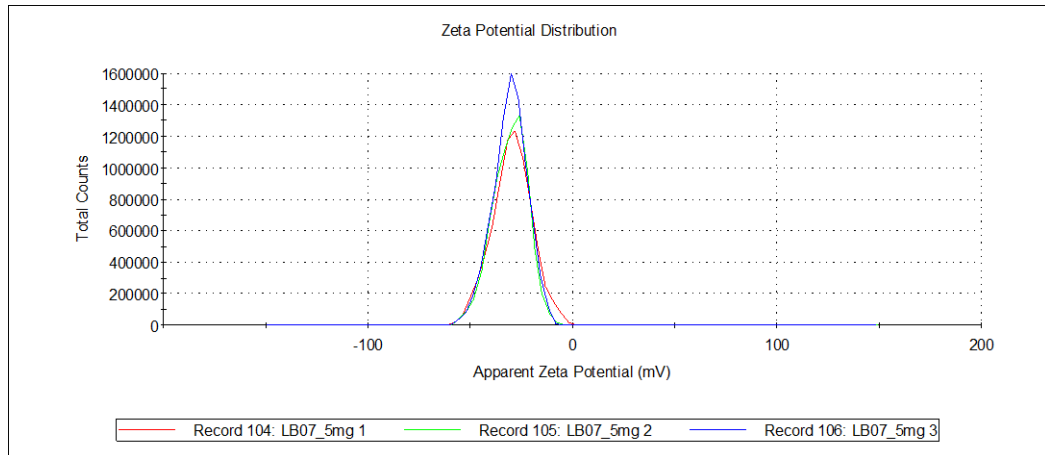


ZP di MWCNT-S2 in H<sub>2</sub>O.

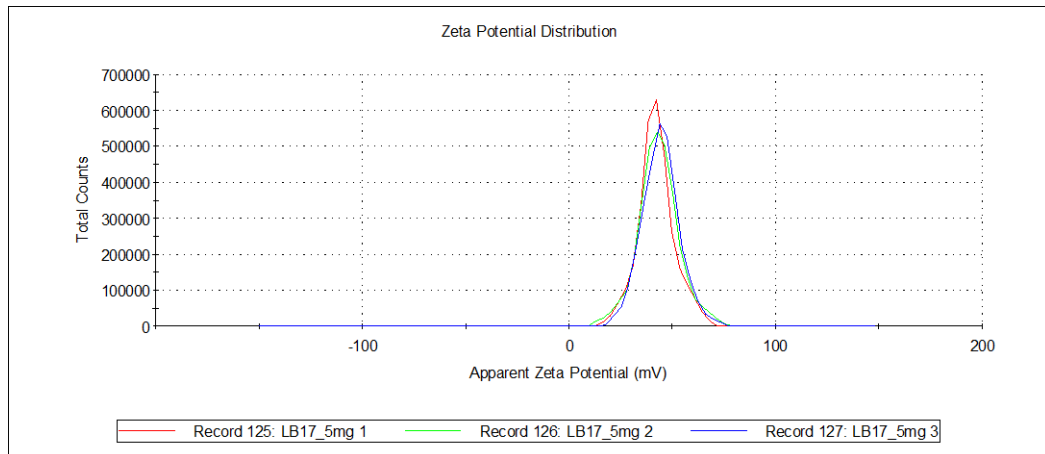




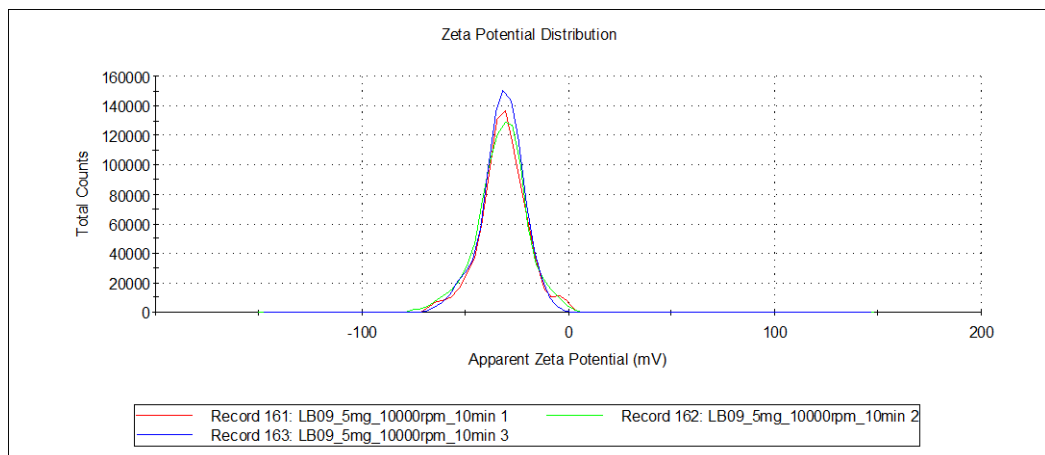
### ZP di MWCNT-MeS in H<sub>2</sub>O.



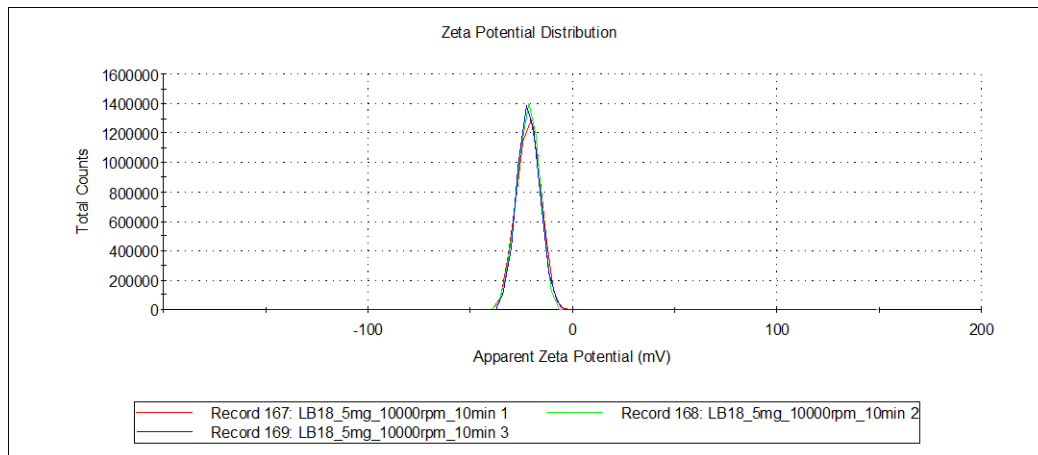
### ZP di MWCNT-N in H<sub>2</sub>O.



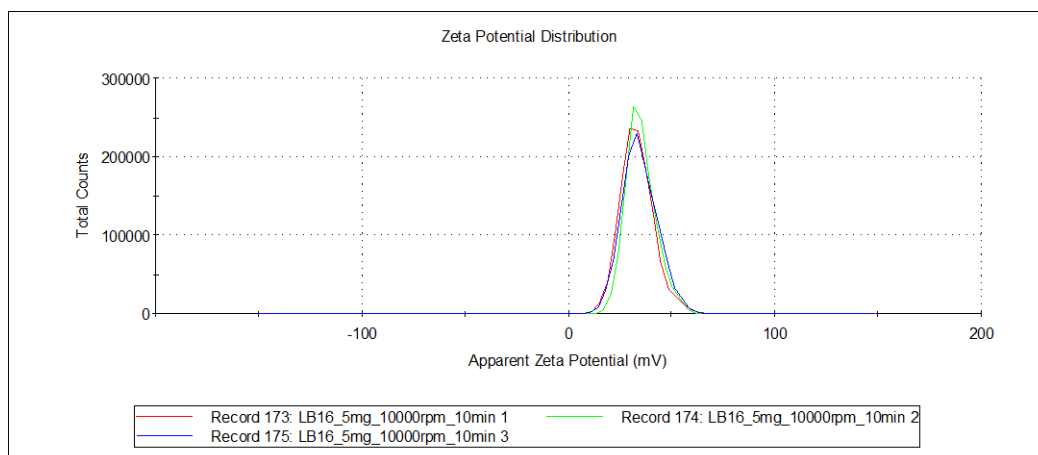
### ZP di SWCNH-S in H<sub>2</sub>O.



### ZP di SWCNH-MeS in H<sub>2</sub>O.



### ZP di SWCNH-N in H<sub>2</sub>O.



Spettri UV-Vis-NIR di *a)* MWCNT-S1, *b)* MWCNT-S2, *c)* MWCNT-MeS, *d)* MWCNT-N, *e)* SWCNH-S, *f)* SWCNH-MeS, *g)* SWCNH-N in H<sub>2</sub>O.

