POLITECNICO DI TORINO Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica Anno accademico 2020/2021



Sintesi e caratterizzazione di Carbon Dots e Diallildisolfuri per valutare il loro uso come antinfiammatori

**Relatori:** Alberto Tagliaferro Mattia Bartoli

**Candidata:** Ludovica Furlan matricola 259127

#### Sommario ABSTRACT

1.	INT	RODI	JZIONE	5
	1.1	Car	oon Dots	5
	1.1	.1	Struttura	5
	1.1.2	Ρ	roprietà	6
	1.1	.3	Sintesi	6
	1.1	.4	Fluorescenza	7
	1.1	.5	Applicazioni	9
	1.2	DAC	Ds	
	1.2.1	Ρ	roprietà	
	1.2.2	S	intesi	
2.	Ma	terial	i, strumentazione e metodi	
	2.1	Mat	eriali	
	2.2	Stru	mentazione	
	2.2	.1	Strumentazione per le sintesi	
	2.2	.2	Strumentazione per la caratterizzazione	
	2.3	Me	odi di sintesi	
3.	Dise	cussic	ne e risultati	
	3.1	S	trutture	
	3.2	Cara	atterizzazione dei composti derivanti dalla reazione tra la DPA e l'AC	
	3.2	.1	spettroscopia IR	
	3.2	.2	XPS	
	3.2	.3	Raman	
	3.3	Cara	atterizzazione dei composti derivanti dalla reazione tra la DPA AC e PEG	
	3.3	.1	spettroscopia IR	
4.	Sim	ulazi	oni	
	4.1	effi	cienza di carico (TGA)	
	4.2	sim	ulazioni HyperChem	
	4.2	.1	strutture simulate	
	4.2	.2	risultati simulazione	
5.	con	clusio	oni	

#### ABSTRACT

Nell'ambito delle moderne tecniche di diagnostica che cercano di valutare gli effetti di imaging uniti ai principi biologicamente attivi per ottenere piattaforme teragnostiche, si è valutato l'effetto di molecole biologiche in combinazione a nanostrutture. La nanostrutture considerate sono Carbon Dots prodotti dalla sintesi di Acido Citrico con la 1,4-fenilendiammina, invece come molecole biologiche attive sono state selezionate i diallildisolfuri (DAD), composti analoghi agli oli essenziali estraibili dall'aglio che presentano proprietà antinfiammatorie.

Il lavoro di tesi presentato si è svolto creando librerie di Carbon Dots, in modo da avere un ampio spettro di materiali per massimizzare l'efficienza combinativa con i DAD. Queste librerie sono state ottenute variando i parametri di temperatura, tempo di residenza, concentrazioni di glicole polietilenico e procedure sintetiche. Per questo motivo si sono prodotti i composti 'LF' utilizzando il sonicatore, la piastra calda o il bagno ad olio, procedendo poi con la purificazione degli stessi. Successivamente si è passati all'adsormimento dei DAD nei Carbon Dots ritenuti maggiormente adatti al carico.

I composti prodotti sono stati in seguito ampliamente caratterizzati tramite tecniche spettroscopiche avanzate per stabilirne la struttura. Infine si è dedicata una parte di lavoro alla realizzazione di simulazioni delle strutture per valutarne la conformazione spaziale e i parametri energetici.

As part of modern diagnostic techniques that seek to evaluate imaging effects combined with biologically active ingredients to obtain teragnostic platforms, the effect of biological molecules in combination with nanostructures has been evaluated. The nanostructures considered are Carbon Dots produced by the synthesis of Citric Acid with 1,4-phenylendiamine, instead, as active biological molecules diallildisulfide (DADs) have been selected. DADs are compounds similar to essential oils extractable from garlic that have anti-inflammatory properties.

The thesis of the presented work it's about the creation of Carbon Dots libraries, in order to have a wide spectrum of materials to maximize the combined efficiency with DADs. These libraries have been obtained by varying the parameters of temperature, residence time, Polyethylene glycol concentration and synthetic procedures. For this reason, the 'LF' compounds were produced using the sonicator, hot plate or oil bath, then proceeding with the purification of the same. Subsequently, the adsorption of DADs in the Carbon Dots considered most suitable for loading was made.

The compounds produced were subsequently characterized by advanced spectroscopic techniques to establish their structure. Finally, a part of the work was devoted to the realization of simulations of the structures to evaluate their spatial conformation and energy parameters.

# 1. INTRODUZIONE

# 1.1 Carbon Dots

Nel 2004, durante un processo di purificazione di nanotubi di carbonio a parete singola Xu et al<sup>1</sup> scoprirono per la prima volta i Carbon Dots. Da quel momento in poi, sono stati condotti diversi studi riguardo ai metodi di sintesi, alle proprietà e alle loro possibili applicazioni.

# 1.1.1 Struttura

I Carbon Dots, possiedono proprietà fisiche e strutture chimiche simili a quelle dell'ossido di grafene<sup>2</sup> (osservabile in figura 1). A differenza di quest'ultimo tuttavia la forma non è lamellare ma è quasi-sferica con diametro inferiore a 10 nm e la struttura è composta prevalentemente da carbonio di tipo sp<sub>2</sub> con l'aggiunta di altri elementi come ossigeno, azoto e altri eteroatomi (S, P e B) così come riportato nell'articolo di Wang et al.<sup>3</sup>



Figura 1: processo di sintesi e struttura chimica dell'ossido di grafene

<sup>1 &</sup>quot;Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments" Xu Xiaoyou, Ray Robert, Gu Yunlong, Ploehn Harry J., Gearheart Latha, Raker Kyle Scrivens, Walter A.

<sup>2 &</sup>quot;Carbon Nanomaterials for Nanomedicine" Marta d'Amora, Silvia Giordani

<sup>3 &</sup>quot;A review of carbon dots in biological applications" Jilong Wang, Jingjing Qiu

### 1.1.2 Proprietà

Confrontando i CD con i già noti Quantum Dots, sviluppati negli anni precedenti, si possono osservare diverse caratteristiche comuni. Entrambe le strutture sono caratterizzate infatti da proprietà ottiche facilmente controllabili, spettri di emissione ristretti e simmetrici, elevata fotostabilità e fotoluminescenza<sup>4</sup> per le importanti rese quantiche di fluorescenza. Tuttavia i QD sono costituiti da elementi semiconduttori, di solito rappresentati da metalli pesanti che richiedono complesse modifiche superficiali per renderli meno tossici. Per questo motivo solitamente vengono utilizzati per l'imaging preclinico o per i test in vitro, mentre la loro applicazione biologica e ambientale risulta essere abbastanza critica<sup>5,6</sup>. Per cercare di ovviare a questi problemi, per la sintesi dei Carbon Dots si utilizzano polimeri o composti contenenti carbonio. I CD risultano guindi essere biocompatibili, con una bassa citotossicità e un'elevata stabilità e solubilità in acqua. Inoltre si possono facilmente funzionalizzare in superficie, ad esempio tramite i gruppi carbossilici che ne aumentano la solubilità, oppure tramite piccole molecole organiche, metalli o polimeri che invece ne aumentano la fotoluminescenza<sup>7</sup>

# 1.1.3 Sintesi

I processi di sintesi sono relativamente poco complicati: i CD vengono prodotti a basso costo e nel rispetto dell'ambiente. Inoltre gli approcci sintetici sono generalmente classificati in due categorie: top-down e bottom-up.

<sup>4 &</sup>quot;Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence" Ya-Ping Sun, Bing Zhou, Yi Lin, Wei Wang, K. A. Shiral Fernando, Pankaj Pathak, Mohammed Jaouad Meziani, Barbara A. Harruff, Xin Wan,g Haifang Wang, Pengju G. Luo, Hua Yang, Muhammet Erkan Kose, Bailin Chen, L. Monica Veca, Su-Yuan Xie 5 "On the Cyto-Toxicity Caused by Quantum Dots" Amane Shiohara, Akiyoshi Hoshino, Ken-ichi Hanaki,

Kazuo Suzuki Kenji Yamamoto

<sup>6 &</sup>quot;A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors" Ron Hardman

<sup>7 &</sup>quot;A review of carbon dots in biological applications" Jilong Wang, Jingjing Qiu

La prima categoria prevede la scissione di strutture di carbonio più grandi (come nanodiamanti, grafite, nanotubi di carbonio, fuliggine di carbonio, carbone attivo e ossido di grafite) in strutture più piccole, impiegando metodi quali la scarica d'arco, l'ablazione laser e l'ossidazione elettrochimica con l'impiego di forti ossidanti come H2SO4 o HNO3<sup>8</sup>. Tuttavia limitato dai processi produttivi e dalle materie prime usate, l'approccio "top-down" è meno applicato nella sintesi verde<sup>9</sup>. La via sintetica bottom up implica invece la formazione dei CD partendo da precursori organici più piccoli. Il meccanismo coinvolge comunemente accettato la ionizzazione е la polimerizzazione dei precursori, seguito da carbonizzazione<sup>10</sup> e prevede di raggiungere i CD attraverso processi di reazione mediati da riscaldamento termico, idrotermale e microonde e ultrasonicazione<sup>11</sup>.

Recentemente si è passati inoltre a processi green di fabbricazione dei CD. Questi si concentrano principalmente sulla selezione di 'biomassa' come materia prima e sullo sviluppo di tecniche di sintesi sostenibile. Rispetto a molecole organiche come i composti idrocarburici aromatici, la biomassa è più sicura, biocompatibile, economica e più facile da ottenere. Essa inoltre prevede il possibile utilizzo di organismi, materiali di scarto o prodotti proteici<sup>12</sup> come ad esempio acido citrico, amminoacidi, uova, erba ma anche caffe, te e vino, latte e legno. Questi metodi possono essere raggiunti a temperatura ambiente senza alcun dispendio energetico esterno o attrezzature speciali.

## 1.1.4 Fluorescenza

I meccanismi responsabili della fluorescenza dei CD sono molto dibattuti. Probabilmente quelli più rilevanti riguardano lo stato della superficie e le dimensioni delle strutture. Così come riportato

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> "Carbon quantum dots and their applications" Shi Ying Lim, Wei Shen and Zhiqiang Gao

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> "Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications" Meng Li Liu, Bin Bin Chen, Chun Mei Li and Cheng Zhi Huang

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> "Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights" Baker SN, GA Baker

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> "Review on Carbon Dots and Their Applications" Mhetaer Tuerhong , XU Yang, YIN Xue-Bo

<sup>&</sup>lt;sup>12</sup> Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications Meng Li Liu, Bin Bin Chen, Chun Mei Li, Cheng Zhi Huang

nell'articolo di Liu et al <sup>13</sup>e da Wang et al<sup>14</sup> si è notato che lo stato della superficie dipende dalla presenza di gruppi funzionali superficiali, soprattutto quelli C=N e C=O. Se la loro presenza aumenta, aumenta anche il grado di ossidazione superficiale e si provoca un red-shift degli spettri di emissione (figura 2). Lo stesso effetto si è notato se aumentano le dimensioni dei CD (figura 3).

#### Figura 2: meccanismo di fluorescenza dei CD basato sul grado di ossidazione superficiale



<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> "Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications" Meng Li Liu, Bin Bin Chen, Chun Mei Li, Cheng Zhi Huang

<sup>&</sup>lt;sup>14</sup> "A review of carbon dots in biological applications" Jilong Wang Jingjing Qiu



Figura 3: meccanismo di fluorescenza dei CD basato sulla dimensione dei CD

### 1.1.5 Applicazioni

Grazie alle proprietà descritte finora, i CD risultano essere materiali adatti ad applicazioni nel campo della bioimaging, del biosensing e della somministrazione di farmaci.

Alcuni studi hanno dimostrato, data la bassissima citotossicità dei CD, la loro possibile applicazione in imaging clinico. In particolare partendo da studi in vitro<sup>15,16,17</sup> per il tracciamento di cellule tumorali, si è passati ad esperimenti su topi<sup>18,19,20</sup>. La maggior parte di essi ha dimostrato l'assenza di evidenti effetti tossici alla concentrazione necessaria per il bioimaging. Inoltre durante questi esperimenti, anche se tracce di CD

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> "Nano-carrier for gene delivery and bioimaging based on carbon dots with PEI-passivation enhanced fluorescence" Liu C, Zhang P, Zhai X et al (2012).

<sup>&</sup>lt;sup>16</sup> "Carbon-dots derived from nanodiamond: photoluminescence tunable nanoparticles for cell imaging" Zhang XY, Wang SQ, Zhu CY et al (2013)

<sup>&</sup>lt;sup>17</sup> "Photoluminescent Carbon Dots as Biocompatible Nanoprobes for Targeting Cancer Cells *in Vitro*" Qin Li, Tymish Y. hulchanskyy, Ruili Liu, Kaloian Koynov, Dongqing Wu, Andreas Best, Rajiv Kumar, Adela Bonoiu, Paras N. Prasad

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> "Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents" Sheng-Tao Yang, Xin Wang, Haifang Wang, Fushen Lu, Pengju G. Luo, Li Cao, Mohammed J. Meziani, Jia-Hui Liu, Yuanfang Liu, Min Chen, Yipu Huang, Ya-Ping Sun

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> "In vivo NIR fluorescence imaging, biodistribution, and toxicology of photoluminescent carbon dots produced from carbon nanotubes and graphite" Tao HQ, Yang K, Ma Z et al (2012)

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> "Carbon dots for optical imaging in vivo" Yang ST, Cao L, Luo PGJ et al (2009)

sono state trovate in alcuni organi essenziali (tra cui fegato, milza e rene) i livelli di accumulo sono risultati sempre estremamente bassi provando una quasi nulla tossicità residua.

Sempre in merito alle loro proprietà, i CD possono essere usati come biosensori. Infatti possono essere utilizzati per la rilevazione di ioni<sup>21</sup> proteine ed enzimi<sup>22,23</sup> vitamine e acidi nucleici<sup>24,25</sup> nei complessi biologici e per misurare variazioni di pH<sup>26,27</sup>.

Inoltre i CD possono essere utilizzati in biomedicina come nano trasportatori di farmaci: modificando la loro superficie si riesce ad agganciarli a farmaci specifici per il drug delivery<sup>28</sup> e si riesce a controllarne il rilascio<sup>2930</sup> grazie alla sensibilità delle funzionalizzazioni superficiali alla variazione di alcuni parametri come per esempio la temperatura o il PH<sup>3132</sup>. Allo stesso momento grazie alla loro fotoluminescenza si riesce a tracciarne la presenza nel corpo, quindi ne risulta un triplice effetto.

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> "Carbon dots prepared by hydrothermal treatment of dopamine as an effective fluorescent sensing platform for the label-free detection of iron(III) ions and dopamine" Qu KG, Wang JS, Ren JS, Qu XG (2013)

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup> "Carbon nanodot-based self-delivering microRNA sensor to visualize microRNA124a expression during neurogenesis" Noh EH, Ko HY, Lee CH, Jeong MS, Chang YW, Kim S (2013)

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> "Label-free fluorimetric detection of histone using quaternized carbon dot-DNA nanobiohybrid" Maiti S, Das K, Das PK (2013)

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> "Ratio-metric sensor to detect riboflavin via fluorescence resonance energy transfer with ultrahigh sensitivity" Wang JL, Su SH, Wei JH et al (2015. Physica

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> "Carbon dots as a luminescence sensor for ultrasensitive detection of phosphate and their bioimaging properties" Xu JY, Zhou Y, Cheng GF, Dong MT, Liu SX, Huang CB (2015)

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> "Carbon dot-based inorganic-organic nanosystem for two-photon imaging and biosensing of pH variation in living cells and tissues" Kong B, Zhu AW, Ding CQ, Zhao XM, Li B, Tian Y (2012)

<sup>&</sup>lt;sup>27</sup> "A fluorescent biosensor based on carbon dots-labeled oligodeoxyribonucleotide and graphene oxide for mercury (II) detection" Cui X, Zhu L, Wu J et al (2015)

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> "Swarming carbon dots for folic acid mediated delivery of doxorubicin and biological imaging"

Ashmi Mewada, Sunil Pandey, Mukeshchand Thakur, Dhanashree Jadhav and Madhuri Sharon

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> Cysteamine hydrochloride protected carbon dots as a vehicle for the efficient release of the anti-schizophrenic drug aloperidol" Sunil Pandey, Ashmi Mewada, Mukeshchand Thakur, Arun Tank and Madhuri Sharon

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> "Antibiotic Conjugated Fluorescent Carbon Dots as a Theranostic Agent for Controlled Drug Release, Bioimaging, and Enhanced Antimicrobial Activity" *Thakur, Mukeshchand; Pandey, Sunil; Mewada, Ashmi; Patil, Vaibhav; Khade, Monika; Goshi, Ekta; Sharon, Madhuri (2014).* 

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> "Nanomaterials for Theranostics of Gastric Cancer" Daxiang Cui

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> "A review of carbon dots in biological applications" Jilong Wang, Jingjing Qiu

# 1.2 DADs

#### 1.2.1 Proprietà

Le proprietà benefiche dell'aglio sono state ampiamente analizzate fin dai tempi antichi. L'aglio è un ottimo stimolatore del sistema immunitario, ha proprietà antibatteriche, antifungine, antivirus e antiossidanti, come riportato negli articoli di Bordia et al<sup>33</sup>, Conner et al<sup>34</sup>, Imai et al<sup>35</sup>, Lawson et al<sup>36</sup>, Mathew e Augusti<sup>37</sup>, Rees et al<sup>38</sup>. Negli ultimi anni, sono stati inoltre condotti diversi studi sulla sua presunta efficacia contro le malattie cardiovascolari grazie al potenziale antipiastrinico, antiaggregante<sup>39,40</sup> e il ruolo contro l'ipertensione<sup>41</sup>.

Inoltre possiede anche un'importante rilevanza nell'inibizione dell'attività cancerogena, nella riduzione dei lipidi nel sangue<sup>42</sup>, nella stimolazione dei processi disintossicanti e dell'apoptosi cellulare<sup>43</sup>, grazie a particolari composti organosolfuri chiamati 'DADs'.

Essi si ricavano dall'aglio in vari modi ad esempio tramite estrazione in acqua o sintesi chimica e a seconda di alcuni parametri quali temperatura, tempo e polarità del solvente si ottengono diverse composizioni chimiche.

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup> "Effect of the essential oils of garlic and onion on alimentary hyperlipemia" A.Bordia, H.C.Bansal, S.K.Arora, S.V. Singh

<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts" D.E.ConnerL.R.BeuchatR.E.WorthingtonH.L.Hitchcock

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> "Antioxidant and Radical Scavenging Effects of Aged Garlic Extract and its Constituents" J. Imai, N. Ide, S. Nagae, T. Moriguchi, H. Matsuura, Y. Itakura

<sup>&</sup>lt;sup>36</sup> "Inhibition of whole blood platelet-aggregation by compounds in garlic clove extracts and commercial garlic products" Larry D Lawson, Dennis K Ransom, Bronwyn G Hughes

<sup>&</sup>lt;sup>37</sup> "Isolation of hypo & hyperglycaemic agents form allium cepa linn" MATHEW PT; AUGUSTI KT

<sup>&</sup>lt;sup>38</sup> "A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (Allium sativum)" L. P. Rees, S. F. Minney, N. T. Plummer, J. H. Slater D. A. Skyrme

<sup>&</sup>lt;sup>39</sup> "Cardiovascular Benefits of Garlic (*Allium sativum* L)" Brace, Larry

<sup>&</sup>lt;sup>40</sup> "The atherosclerotic heart disease and protecting properties of garlic: contemporary data" Shela Gorinstein, Zenon Jastrzebski, Jacek Namiesnik, Hanna Leontowicz, Maria Leontowicz, Simon Trakhtenberg,

<sup>&</sup>lt;sup>41</sup> "Garlic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis" José Pedraza-Chaverrí, Edilia Tapia, Omar N.Medina-Campos, Maríade los Ángeles Granados, Martha Franco

<sup>&</sup>lt;sup>42</sup> "Antimicrobial properties of allicin from garlic" Serge Ankri, David Mirelman

<sup>&</sup>lt;sup>43</sup> "Biological Properties of Garlic and Garlic-Derived" Małgorzata Iciek , Inga Kwiecien, Lidia Włodek

#### 1.2.2 Sintesi

Facendo riferimento all'articolo di Iciek et al<sup>44</sup> viene riportato il processo di sintesi dell'aglio.

Figura 4: processi iniziali di formazione dell'allicina



Il composto di zolfo iniziale più importante che si trova nei bulbi di aglio è l'allina.

Il danneggiamento di un bulbo d'aglio mediante schiacciamento,

macinatura taglio 0 il rilascio induce dell'enzima allinasi che diversi entro secondi, trasforma l'alliina in allicina attraverso degli intermedi molto reattivi, gli acidi solfenici (R-SOH).

L'acido solfenico, formato in questa reazione, subisce la condensazione con un'altra molecola di acido solfenico che produce l'allicina. L'allicina è scarsamente solubile in acqua, è un composto molto instabile ed è responsabile del caratteristico sapore pungente

<sup>&</sup>lt;sup>44</sup> "Biological Properties of Garlic and Garlic-Derived Organosulfur Compounds" Małgorzata Iciek, Inga Kwiecien, Lidia Włodek1

dell'aglio. Dall'allicina si possono ottenere due tipi di composti, quelli

solubili in olio e quelli solubili in acqua.

I primi si ottengono facilmente dalla trasformazione spontanea dell'allicina in polisolfuro. In figura 5 si può osservare la formazione di tipologie di composti diversi. Essi dipendono da vari parametri quali la temperatura, il tempo e la polarità del solvente. In particolare a temperatura ambiente e dopo circa 20 ore si possono ottenere i DADS ( diallil disolfuro), i DAS (diallil solfuro), i DATS (diallil trisolfuro) e i diallil tertasolfato. Usando un solvente poco polare come l'esano si ottengono invece i composti della vinilditina, mentre eliminando l'allicina b si ottengono i composti ajoene.



Figura 5: formazione dei composti organosolforici solubili in olio dalla sintesi di allicina

A differenza dei composti solubili in olio, quelli idrosolubili sono inodori e hanno un sapore più delicato e meno caratteristico. Questi composti si formano durante l'estrazione acquosa dell'aglio, quando il GSAC composto iniziale viene trasformato in SAC e questa reazione viene catalizzata dalla γ-glutamiltranspeptidasi (γGT) . Le reazioni dell'allicina con i gruppi -SH possono produrre SAC o S-allilmercaptocisteina (SAMC), come osservabile in figura 6.



Figura 6: formazione dei composti organosolforici solubili in acqua dalla sintesi di allicina

Di particolare interesse per lo sviluppo di questa tesi sono stati i DAD di tipo A,B e X che hanno particolare rilevanza per attività antitumorale<sup>45,46</sup>. Inoltre essi risultano essere instabili nei fluidi corporei, sensibili alla

 <sup>&</sup>lt;sup>45</sup> "Diallyl disulfide induces apoptosis of human colon tumor cells" Sujatha G.Sundaram and John A.Milner1
<sup>46</sup> "Sinthesis and preliminary evaluation of the anticancer activity on A549 lung cancer cells of a series of unsaturated disulfides" Fabrizio Olivito, Nicola Amodio, Maria Luisa Di Gioia, Monica Nardi, Manuela Oliverio, Giada Juli, Pierfrancesco Tassone, Antonio Procopio

temperatura e alla luce quindi possono essere ottime molecole attive candidate per il drug delivery<sup>47</sup>.

## 2. Materiali, strumentazione e metodi

# 2.1 Materiali

Per la sintesi dei CD sono stati utilizzati i seguenti materiali: l'acido citrico (acquisito da Nortem Chem SA, Spagna), la 1,4-fenilendiammina (acquistata da Sigma-Aldrich con grado di purezza >99%), e il PEG4000 (acquistato da Sigma-Aldrich).

Per i carichi del CD invece si sono utilizzati l'etere di petrolio (40 °C - 60 °C, acquistato da Carbo Erba) e i diallildisolfuri A,B e X sintetizzati in accordo con l'articolo di Olivito et al.<sup>48</sup>

# 2.2 Strumentazione

### 2.2.1 Strumentazione per le sintesi

Le strumentazioni impiegate per la sintesi sono un sonicatore Vibra Cell (acquistato da Sonics), una piastra calda e un bagno ad olio. Inoltre molti dei prodotti di sintesi sono stati inseriti in un secondo momento in un reattore tubolare realizzato in vetro PYREX.

Per l'essiccazione dei prodotti sono stati adoperati una centrifuga per il processo di purificazione impostata in modo da avere una velocità di 10000 giri/min, un bagno ad ultrasuoni e un forno. Inoltre per i carichi è stata

<sup>&</sup>lt;sup>47</sup> "Application of quality-by-design approach to optimize diallyl disulfide-loaded solid lipid nanoparticles" Siddhartha Venkata Talluri, Gowthamarajan Kuppusamy, Veera Venkata Satyanarayana Reddy Karri ,Karthik Yamjala,Ashish Wadhwani, SubbaRao V. Madhunapantula &Saikiran S. S. Pindiprolu

<sup>&</sup>lt;sup>48</sup> "Synthesis and preliminary evaluation of the anticancer activity on A549 lung cancer cells of a series of unsaturated disulfides" Fabrizio Olivito, Nicola Amodio, Maria Luisa Di Gioia, Monica Nardi, Manuela Oliverio, Giada Juli, Pierfrancesco Tassone and Antonio Procopio

adoperata una piastra calda e una pompa a vuoto per il processo di filtrazione.

#### 2.2.2 Strumentazione per la caratterizzazione

I carbon dots sono stati analizzati tramite FT-IR (Nicolet 5700, Thermoscientific, Waltham, US) in modalità di riflettanza totale attenuata (ATR) (Smartorbit, Thermoscientific) nell'intervallo da 500 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

Le analisi termogravimetriche (TGA) sono state eseguite utilizzando un apparato Pyris1TGA (Perkin Elmer, USA) (con errore sperimentale: ±0,5 wt%, ±1 °C). I campioni (circa 10 mg) sono stati collocati in vaschette di allumina riscsIdate con temperature comprese tra 50 e 900 °C, sia con una velocità di riscaldamento di 10 °C/min sotto azoto a 35 mL/min.

Gli spettri Raman sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Renishaw Inviah dotato di una sorgente verde (514,5 nm) e un obiettivo 50x. La potenza applicata dalla sorgente è compresa nell'intervallo di 10 -100 mW.

I carbon dots sono stati caratterizzati anche tramite spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), in particolare è stato utilizzato il modello PHI 5000 Versa Probe (Physical Electronics) dotato di raggi X Al Kα (1486.6 eV).

# 2.3 Metodi di sintesi

I CD sono stati sintetizzati attraverso varie metodologie.

Il primo metodo di sintesi impiega l'utilizzo di un sonicatore a punta e porta alla formazione dei composti LF01 LF06 e LF07 (questi ultimi due prevendono l'aggiunta del PEG a differenza di LF01 che considera solo la reazione tra AC e DPA). La procedura seguita, è stata mutuata dal lavoro di Leblanc<sup>49</sup> ma con tempo di utilizzo di 45 minuti e una potenza nominale rappresentata da 200 Watt. Durante l'utilizzo si usano cicli di accensione e spegnimento per evitare l'innalzamento puntuale della temperatura promuovendo la formazione di un ambiente di reazione omogeneo. In questo caso\_la parte liquida dei prodotti viene recuperata e poi essiccata in forno a 100°C per una notte senza necessità di un ulteriore processo di purificazione perché con la sonicazione, lavorando direttamente in acqua, non si producono precipitati di reazione.

L'approccio sintetico utilizzato per la produzione di LFO2 riguarda la sintesi allo stato solido di AD e DPA tramite piastra calda<sup>50</sup>: i reagenti vengono inseriti in un crogiuolo e scaldati su piastra senza addizione di solventi a 250°C per un'ora. Il solido recuperato è stato poi disciolto in acqua tramite sonicazione in bagno a ultrasuoni in modo da essere purificato. La frazione liquida che ne risulta, viene separata dalla quella solida tramite centrifugazione e successivamente viene seccata in forno a 100°C per una notte.

Per la sintesi di LF03 LF04 LF05 si utilizza invece il bagno a olio<sup>51</sup>: In questo caso una provetta contenente i reagenti di reazione viene inserita in un bagno ad olio riscaldato a 80°C per una notte. Anche in questa circostanza si è proceduti a purificare i prodotti: dopo il bagno ad olio la parte solida viene disciolta in acqua e trattata con gli ultrasuoni, e la frazione liquida che ne deriva viene centrifugata e successivamente seccata in forno a 100°C per una notte.

<sup>&</sup>lt;sup>49</sup> "Ultrasonic pretreatment of sludge: A review" Sridhar Pilli, Puspendu Bhunia, Song Yan , R.J. LeBlanc , R.D. Tyagi ,R.Y. Surampalli

<sup>&</sup>lt;sup>50</sup> "Greener solid state synthesis of nano-sized mono and homo bi-nuclear Ni(II), Co(II), Mn(II), Hg(II), Cd(II) and Zn(II) complexes with new sulfa ligand as a potential antitumour and antimicrobial agents" Fawaz A. Saad, Abdalla M. Khedr

<sup>&</sup>lt;sup>51</sup> "Fast synthesis of thin high silica SSZ-13 zeolite membrane using oil-bath heating" Hongbo Tang, Lu Bai, Mingquan Wang, Ye Zhang, Meng Li, Mengxin Wang, Lin Kong, Ning Xu, Yanfeng Zhang, Pinhua Rao

Riscaldando LF01 tramite reattore<sup>52,53,54</sup> per 5 minuti a 250°C, 350°C, 450°C e 550°C sono stati ottenuti rispettivamente i composti LF08 LF09 LF10 e LF11. Seguendo lo stesso procedimento sono stati prodotti LF12 e LF13 scaldando LF06 e LF07 a 250°C per 5 min. Dopo i trattamenti termici, come nei casi precedenti, si è passati alla purificazione tramite bagno ad ultrasuoni, centrifugazione ed essiccamento in forno.

Tutti i composti ottenuti sono stati pestellati prima di procedere con la caratterizzazione.

## 3. Discussione e risultati

# 3.1 Strutture

Nella figura 7,8 e 9 vengono riportate le strutture chimiche dei composti utilizzati nelle reazioni di formazione dei campioni.

<sup>&</sup>lt;sup>52</sup>"Coprecipitates of Cd, Cu, Pb and Zn in Iron Oxides: Solid Phase Transformation and Metal Solubility after Aging and Thermal Treatment" Carmen Enid Martínez & Murray B. McBride

<sup>&</sup>lt;sup>53</sup> Jing-Dong Chou, Ming-Yen Wey, Shih-Hsien Chang 'Evaluation of the distribution patterns of Pb, Cu and Cd from MSWI fly ash during thermal treatment by sequential extraction procedure'

<sup>&</sup>lt;sup>54</sup> "Influence of heat treatment on structure and properties of electrodeposited CdSe of Cd(Te, Se) semiconducting coatings" M. Bouroushian, Z. Loïzos, N. Spyrellis, G. Maurin



In figura 10 viene illustrato un possibile meccanismo di reazione tra l'AC e la DPA, similmente a quanto riportato nell'articolo di Keenan et *al* [1]<sup>55</sup>:

<sup>&</sup>lt;sup>55</sup> "A deep investigation into the structure of carbon dots" Keenan J.Mintz, Mattia Bartoli, Massimo Rovere, Yiqun Zhou, Sajin D. Hettiarachchi, Suraj Paudyal, Jiuyan Chen, Justin B.Domen, Piumi Y. Liyanage, Rachel Sampson, Durga Khadka, Raja R. Pandey, Sunxiang Huang, Charles C. Chusuei, Alberto Tagliaferro, Roger M.Leblanc



Figura 10: seguendo la reazione verso destra si notano gli intermedi di reazione tra AC e DPA che portano alla formazione di reazioni di ciclizzazione; seguendo la freccia che punta verso il basso invece si possono osservare le reazioni di ammidazione

Osservando i primi step di reazione tra DPA e AC, seguendo la freccia che punta verso destra in figura 10, si possono notare i meccanismi di reazione dovuti alla ciclizzazione degli intermedi che portano alla formazione di molecole aromatiche a più alto peso molecolare. Queste ultime sono generalmente più apolari del solo AC o della sola DPA perchè formando dei composti aromatici, essi deprimono l'interazione con l'acqua. Ma non è l'unico meccanismo che avviene durante la reazione tra i due composti: seguendo la freccia che punta verso il basso, sempre in figura 10, si osservano invece i processi di ammidazione, dovuti all'interazione tra il gruppo amminico NH<sub>2</sub> della DPA con l'acido carbossilico dell'AC.

Inoltre la DPA ha un meccanismo di reazione addizionale che prevede la possibile formazione di una struttura di risonanza che può sviluppare,

tramite reazioni di condensazione, composti a loro volta aromatici come riportato nell'articolo di Franco Cataldo<sup>56</sup>.

Il metodo sintetico che prevede utilizzo di ultrasuoni fa si che queste reazioni avvengano con particolare efficacia a causa del fenomeno di ultracavitazione<sup>57</sup>: quando le onde ultrasonore si propagano nel mezzo, generano dei cicli di compressione e rarefazione. I primi esercitano una pressione positiva che porta le molecole ad aggregarsi, i secondi una pressione negativa che invece cerca di allontanarle nuovamente. A causa di questi cicli di pressione si formano delle microbolle nelle regioni di rarefazione. Queste microbolle crescono aumentando di diametro che diventa sempre più instabile fino al collasso su se stesse, come illustrato in figura 11.



Figura 11: fenomeno della cavitazione con lo sviluppo e il collasso delle microbolle

Il collasso inoltre comporta il rilascio di energia termica che produce un aumento di temperatura con una durata di pochi microsecondi.

Questo aumento di temperatura è importante nelle sintesi dei CD perchè fa avanzare ulteriormente le reazioni tra i reagenti (come si vedrà in seguito l'LF01 è stato scelto come precursore per questo motivo).

Sottoponendo inoltre i campioni a trattamenti termici, analogamente ai quelli studiati da Keenan et *al<sup>58</sup>*, si promuovono i processi di deidratazione

<sup>&</sup>lt;sup>56</sup> "On the polymerization of *P*-phenylenediamine" Franco Cataldo

<sup>&</sup>lt;sup>57</sup> "Ultrasonic pretreatment of sludge: A review" Sridhar Pillia ,Puspendu Bhuniab , Song Yana, R.J .LeBlanc, cR.D.Tyagia R.Y.Surampallid

<sup>&</sup>lt;sup>58</sup> "A deep investigation into the structure of carbon dots" Keenan J.Mintz, Mattia Bartoli, Massimo Rovere, Yiqun Zhou, Sajin D. Hettiarachchi, Suraj Paudyal, Jiuyan Chen, Justin B.Domen, Piumi Y. Liyanage, Rachel Sampson, Durga Khadka, Raja R. Pandey, Sunxiang Huang, Charles C. Chusuei, Alberto Tagliaferro, Roger M.Leblanc

e decarbossilazione. Questi portano ad un aumento del grado di aromatizzazione e della grandezza delle strutture. Viene infatti favorita la formazione di strutture pseudo grafeniche ricche di carbonio ibridizzato sp<sup>2</sup> in cui si inserisce l'azoto, liberato dalla rottura dei legami ammidici,c60e verrà dimostrato in seguito.

Quando si aggiunge il PEG alla reazione, esso si comporta come un tensioattivo non ionico<sup>59</sup> creando delle pseudo micelle il cui interno è più apolare dell'esterno (l'esterno è costituito dalla fase acquosa pura, l'interno invece contiene anch'esso acqua ma è reso più apolare grazie alla presenza del CH<sub>2</sub>). All'interno di queste pseudo micelle vengono quindi segregati i composti più apolari come quelli formatesi tramite le ciclizzazioni degli intermedi di reazione. Questo aspetto è ben visibile negli spettri IR dei campioni contenenti il PEG poichè si hanno delle bande dovute allo stretching C-C dei composti aromatici molto intense.

Inoltre ad alte temperature il PEG degrada tramite rottura eterolitica tra l'ossigeno e il carbonio, così come spiegato nell'articolo di Zhu et *al*<sup>60</sup>. Quando questo avviene, si formano delle specie radicaliche sull'ossigeno molto reattive che promuovono reazioni di insaturazione (ovvero formazione di doppi legami). Se il processo va avanti esse diventano reazioni di aromatizzazione perchè i doppi legami tendono a riorganizzarsi per formare degli anelli aromatici che sono più stabili e quindi promuovono la ciclizzazione della struttura.

 <sup>&</sup>lt;sup>59</sup> "Preparation, characterization, and properties of polylactide (PLA)–poly(ethylene glycol) (PEG) copolymers: A potential drug carrier" K. J. ZHU, LIN XIANGZHOU, YANG SHILIN
<sup>60</sup> "Preparation, characterization, and properties of polylactide (PLA)–poly(ethylene glycol) (PEG) copolymers: A potential drug carrier" K. J. ZHU, LIN XIANGZHOU, YANG SHILIN



Figura 12a: CD di tipo B-CDs presenti articolo di Keenan, formatesi a seguito della reazione tra nano polvere di carbonio, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HNO<sub>3</sub>. Il cuore è rappresentato da piani di carbonio sp<sub>2</sub> e in superficie si trovano i gruppi funzionali COOH, OH e CO



Figura 12b: CD di tipo Y-CDs presenti articolo di Keenan prodotti dalla reazione tra AC e DPA

In riferimento alle strutture osservate nell'articolo di Keenan et *al*<sup>61</sup>, si può ipotizzare che la figura 12a rappresenti all'incirca il comportamento delle strutture trattate in temperatura e con i bordi funzionalizzati mediante gruppi carbossilici e ossidrilici<sup>62</sup>, mentre la 12b rappresenti le strutture ottenute senza trattamenti termici.

<sup>&</sup>lt;sup>61</sup> "A deep investigation into the structure of carbon dots" Keenan J.Mintz, Mattia Bartoli, Massimo Rovere, Yiqun Zhou, Sajin D. Hettiarachchi, Suraj Paudyal, Jiuyan Chen, Justin B.Domen, Piumi Y. Liyanage, Rachel Sampson, Durga Khadka, Raja R. Pandey, Sunxiang Huang, Charles C. Chusuei, Alberto Tagliaferro, Roger M.Leblanc

<sup>&</sup>lt;sup>62</sup> "surface modification and chemical functionalization of carbon dots: a review" Fanyong Yan, Yingxia Jiang, Xiaodong Sun, Zhangjun Bai, Yan Zhang & Xuguang Zhou

Infine in questa tesi, la scelta delle molecole bioattive per il caricamento dei CD è ricaduta sui DAD: come osservabile in figura 13 sono stati scelti tre tipi di DAD con diverse lunghezze delle catene di carbonio e diverse posizioni del doppio legame, analogamente a quanto svolto da Fabrizio Olivito et  $al^{63}$ .



(diallildisulfuri)

Figura 13: la prima struttura chimica è relativa ai DADs di tipo X, la seconda a quelli di tipo A e la terza di tipo B

# **3.2** Caratterizzazione dei composti derivanti dalla reazione tra la DPA e l'AC

L'analisi tramite spettroscopia IR è rilevante per comprendere quali reazioni chimiche sono avvenute tra i composti utilizzati e che tipi di legami ne sono conseguiti.

# 3.2.1 spettroscopia IR

Si riportano per primi gli spettri ricavati tramite spettroscopia IR dei reagenti e a seguire quelli dei composti LF prodotti.

<sup>&</sup>lt;sup>63</sup> "Synthesis and preliminary evaluation of the anticancer activity on A549 lung cancer cells of a series of unsaturated disulfides" Fabrizio Olivito, Nicola Amodio, Maria Luisa Di Gioia, Monica Nardi, Manuela Oliverio, Giada Juli, Pierfrancesco Tassone and Antonio Procopio



Figura 14: spettroscopia IR del reagente Acido Citrico

Nello spettro dell'Acido Citrico riportato in figura 14, si può osservare la presenza di diverse bande: riferendosi a quanto riportato nell'articolo M. Racuciu et *al*<sup>64</sup>, si osserva nella regione tra 1680-1800 cm<sup>-1</sup> la banda dello stretching C=O dei gruppi carbossilici. Si nota la presenza di due bande nella regione tra 3000 e 3500 cm<sup>-1</sup>: la banda più stretta (quella tra 3400-3500 cm<sup>-1</sup>) relativa allo stretching OH dell'ossidrile dell'AC, e una banda più larga (3000-3400 cm<sup>-1</sup>) relativa invece allo stretching OH carbossile che è coinvolto nella formazione di una complessa rete di legami ad idrogeno.

Tra 2750 e 2900 cm<sup>-1</sup> è presente anche la banda del legame CH stretching della catena polimerica, che tuttavia è poco visibile a causa dell'intensità della banda dell'OH stretching carbossile.

<sup>&</sup>lt;sup>64</sup> "Citric-acid–coated magnetite nanoparticles for biological applications" M. R"acuciu , D.E. Creang"a, A. Airinei3



Figura 15: spettroscopia IR del reagente DPA

Per la DPA<sup>65</sup> si osserva invece nella regione tra 1580-1650 cm<sup>-1</sup> la banda dell'NH bending e a 3200-3500 cm<sup>-1</sup> quella dell'NH stretching del legame amminico. Nella regione tra 1600-1660 cm<sup>-1</sup> inoltre è presente la banda del C=C ring-breathing, tipica della struttura aromatica che presenta anche tra 3000-3100 cm<sup>-1</sup> quella relativa al C-H stretching, presente in questa regione perchè il legame CH in questione è coinvolto nella formazione di composti aromatici, come riportato nell'articolo di Gussoni et *al.*<sup>66</sup>, Nell'AC questa banda è presente invece prima di 3000 cm<sup>-1</sup>, poichè il legame CH si riferisce

<sup>&</sup>lt;sup>65</sup> "On the polymerization of *P*-phenylenediamine" Franco Cataldo

<sup>&</sup>lt;sup>66</sup> "Infrared intensities. Use of the CH-stretching band intensity as a tool for evaluating the acidity of hydrogen atoms in hydrocarbons" M. Gussoni C. Castiglioni

in quel caso a legami saturi come invece spiegato nell'aritcolo di Popescu et *al.*<sup>67</sup>.



Figura 16: spettroscopia IR dei campioni LF01 ottenuto tramite sonicazione, LF02 tramite piastra calda allo stato solido e LF03 tramite bagno ad olio

Facendo reagire la DPA e l'AC tramite sonicazione si è favorito il processo di etero-ciclizzazione aromatica tra i reagenti e si è ottenuto il precursore LF01.

Dall'analisi del suo spettro, di colore blu in figura 16, si può notare la scomparsa nella regione a 1700 cm<sup>-1</sup> della banda C=O stretching relativa ai gruppi carbossilici e tra 3400-3500 cm<sup>-1</sup> quella relativa allo stretching OH diminuisce in ampiezza e viene coperta dalla banda dell'NH stretching a 3400 cm<sup>-1</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>67</sup> "Hydrogen incorporation and its structural effect on a-C:H films deposited by magnetron sputtering" B.Popescu, A.Tagliaferro, F De Zan, E. A Davis

Questo significa che la reazione tra l'AC e la DPA comporta la formazione delle reazioni di ammidazione tra i reagenti a spese dei gruppi carbossilici che per la maggior parte non saranno più liberi ma reagiranno con altri composti.

Inoltre le bande relative all'NH bending a 1500 cm<sup>-1</sup> evolvono mostrando la formazione di una piccola spalla, causata dalla condensazione degli anelli aromatici, che danno origine anche ad una più apprezzabile vibrazione di stretching C=C tra 1600 e 1660 cm<sup>-1</sup>. Tra 3000 e 3100 cm<sup>-1</sup> inoltre la banda del CH stretching insaturo sale perché aumenta la quantità di composti aromatici come riportato dell'articolo già citato di Gussoni et *al.* 

Dalla reazione di DPA e AC su piastra calda allo stato solido si è ottenuto invece il precursore LF02. Lo spettro del segnale, di colore rosa in figura 16, è molto simile a quello dell'LF01, quindi questo metodo è buono per ottenere le reazioni volute tuttavia si è scelto LF01 perché a parità di risultati, esso consente un risparmio energetico di 250 °C di temperatura di reazione.

Infine si è prodotto il precursore LF03 dalla reazione tra DPA e AC in bagno ad olio. Si nota dall'analisi dello spettro verde in figura 16 che nella regione tra 3000 e 3500 cm<sup>-1</sup> non si riesce a stabilire in maniera univoca quali bande sono presenti. Questo significa che il metodo usato per la formazione del campione causa l'aumento della reticolazione della struttura con lo svantaggio che essa comporta la formazione di strutture relativamente grandi rispetto a quelle necessarie per creare i Carbon Dots di interesse.

In conclusione si sono ottenuti risultati migliori tramite il metodo della sonicazione.



Figura 17: Spettroscopia IR dei campioni LF08 (250°C per 5 min), LF09(350°C per 5 min), LF10(450°C per 5 min) e LF11(550°C per 5 min)

I campioni i cui spettri sono riportati in figura 17, sono stati ottenuti tramite riscaldamento di LF01 in atmosfera inerte per 5 min e con temperature differenti, ovvero 250°C, 350°C, 450°C e 550°C producendo rispettivamente i composti LF08 LF09 LF10 LF11.

Per ciascun spettro presente nella figura, si osserva la formazione di una spalla nella regione tra 1500 e 1540 cm<sup>-1</sup> corrispondente all'NH bending, un aumento di intensità della banda dello C=C stretching tra 1600 e 1660 cm<sup>-1</sup> e di quella del CH stretching aromatico tra 3000 e 3100 cm<sup>-1</sup>. Inoltre il picco a 3200 cm<sup>-1</sup> corrispondente all'NH stretching diminuisce di intensità a significare che i gruppi NH hanno reagito.

Osservando i grafici in figura 17, risulta facile notare che questo comportamento dell'intensità delle bande descritte è sempre più visibile mano a mano che aumenta la temperatura. E' quindi possibile affermare che il grado di insaturazione delle strutture aumenta all'aumentare della temperatura e si nota maggiormente dal cambiamento dai rapporti relativi dai picchi del CH stretching saturo e insaturo, e all'incremento del C=C stretching nella regione tra 1600 e 1660 cm<sup>-1</sup>. Si può quindi ipotizzare che

le strutture qui analizzate passino da una sommaria struttura presente in figura 12b (più simile a quella di LF01), ad una più vicina alla 12a.

In questo caso si è scelto di caricare i composti LF08 e LF11 che sottolineano meglio le differenze con il precursore LF01.

# 3.2.2 XPS

Per ogni campione analizzato, dopo aver fittato gli spettri si procede con l'analisi dei campioni tenendo in considerazione che il carbonio ibridizzato sp<sup>3</sup> ha struttura tetraedrica con legami singoli tra i C, quello ibridizzato sp<sup>2</sup> è planare con doppi legami e che atomi in uno stato di ossidazione positiva, presentano una maggiore energia di legame, dovuta ad una maggiore interazione coulombiana fra gli elettroni emessi dallo strumento ed il core ionico della molecola in esame.



Figura 18: spettri XPS relativi all'analisi del carbonio, dell'ossigeno e dell'azoto di LF01

Analizzando lo spettro in figura 18\_A, così come riportato nell'articolo di Raji Atchudan et *al*<sup>68</sup>, si osserva che il 24% dell'area totale è occupata da carboni sp<sup>2</sup> (rappresentati dagli spetti D e G in figura 18\_A) e il 76% da carboni sp<sup>3</sup> (rappresentati dagli spetti E e F in figura 18\_A).

In riferimento all'area occupata dai carboni sp<sup>2</sup>, il 53% di essa è occupata dai carboni che formano legami di tipo C=C identificati dal picco a 284.3 eV, e la restante parte da quelli C=O carbossilici con picco a 288.5 eV.

<sup>&</sup>lt;sup>68</sup> "Highly fluorescent nitrogen-doped carbon dots derived from *Phyllanthus acidus* utilized as a fluorescent probe for label-free selective detection of Fe3+ ions, live cell imaging and fluorescent ink" Raji Atchudan, Thomas Nesakumar Jebakumar Immanuel Edison, Yong Rok Lee

Per quanto riguarda l'area occupata dai carboni sp<sup>3</sup> invece il 90% in questo caso è rappresentata da quelli che formano legami di tipo C-C e il restante 10% da quelli che formano legami di tipo C-N.

Osservando lo spettro dell'ossigeno in figura 18\_B, si nota che il 67% dell'area totale è occupata da ossigeni che formano legami di tipo C=O carbossilici individuati dal picco a 532.9 eV, e la restante parte da quelli che formano legami di tipo OH ossidrilici con picco a 531.7 eV.

Infine per l'azoto, come si può osservare in figura in figura 18\_C, anche se lo spettro è molto rumoroso si nota la presenza due due componenti a 399 eV e 402 eV che rappresentano rispettivamente i legami amminici e quelli ammidici.

Analizzando i risultati ottenuti si riesce ad apprezzare quindi l'avanzamento della reazione tra AC e DPA che comporta la formazione di legami ammidici (evidenziati dal legame C=O e C-N) e di composti aromatici (con formazione di legami C-C e C=C). La componente principale dei carboni è quella ibridizzata sp<sub>3</sub> poiché in LF01 non è stato utilizzato un trattamento in temperatura ne è stato inserito il PEG durante la reazione, quindi come atteso, non si sono create numerose strutture aromatiche ne cicliche.



Figura 19: spettri XPS relativi all'analisi del carbonio, dell'ossigeno e dell'azoto di LF08

Per l'analisi xps relativa ai carboni del campione LF08 in figura 19\_A, si osserva che il 65% dell'area totale è occupata da carboni sp<sup>2</sup> (D-F) e il 35% da carboni sp<sup>3</sup> (E-G). Rispetto a LF01 le attribuzioni cambiano poiché LF08 è stato trattato in temperatura: i composti aromatici tendono a degradarsi favorendo la formazione di strutture grafeniche con carboni ibridizzati sp<sup>2</sup> e per questo motivo si è deciso di attribuire alle aree più ingombranti la rappresentazione dei C con doppi legami.

Dei carboni sp<sup>2</sup> si individua un picco a 284.4 eV per i legami C=C, che rappresentano il 56% dell'area totale occupata dai C sp<sup>2</sup>, e la restante percentuale è rappresentata dal legame C-N individuato dal picco di 286.3 eV. Per quanto riguarda i carboni sp<sup>3</sup> invece si riscontra un picco a 285.5 eV

che individua il legame C-C che occupa l'87% dell'area occupata dai C sp<sup>3</sup>, e uno a 289.7 eV che individua i legami carbossilici con il 13% dell'area occupata.

Per l'ossigeno del campione LF08 si osserva che la componente D occupa il 10% dell'area totale e con il picco a 530.9 eV rappresenta i legami ossidrili della struttura, mentre la maggioranza dell'area totale è a carico della componente E che individua con il picco a 532.2 eV, quelli carbossilici.

Infine per quanto riguarda l'azoto, il 48% dell'area totale è occupata dai legami amminici con picco a 399.2 eV (sono meno ossidati e il carbonio coinvolto è di tipo sp2), e il 52% invece dai legami ammidici della struttura individuati dal picco a 399.8 eV.

Analizzando i risultati ottenuti si nota che rispetto a LF01, sale la percentuale dei carboni ibridizzati sp<sup>2</sup> e questo soddisfa i risultati attesi perché i trattamenti termici favoriscono la formazione di strutture aromatiche e cicliche, quindi il numero di doppi legami cresce così come anche quello dei legami ammidici.

Non è stato possibile analizzare i risultati dei composti LF11, LF12 e LF13 poiché rilasciavano troppi vapori durante l'analisi e non è stato possibile stabilizzare la pressione dello strumento. Tuttavia man mano che la temperatura aumenta, ci si aspetta una più alta percentuale di carboni sp<sup>2</sup> e di ossigeni ossidrili, e una percentuale minore di ossigeni carbossilici, poiché essi di norma, quando previsto PEG o trattamento termico, reagiscono formando altre strutture.

#### 3.2.3 Raman

In tutti i campioni analizzati attraverso il Raman, si è notata una considerevole difficoltà ad individuare le bande degli spettri relativi. Le informazioni ottenute sono dunque parziali perché l'alta funzionalizzazione dovuta ai gruppi carbossilici e le funzioni ossidriliche residue promuovono una massiccia fluorescenza che sopprime in parte le bande normalmente visibili al Raman. Inoltre per ogni spettro si è provato ad individuare il picco D e quello G (intesi come quanto riportato nell'articolo di Ferrari et *al*<sup>69</sup>). Tuttavia le bande relative a questi picchi non sono molto intense: questo significa che i campioni analizzati non hanno strutture aromatiche molto estese, non assomigliano a piani grafenici ma le strutture sono più complicate, con molecole di DPA legate da carbossili ponti OH senza estesi frammenti grafitici, come quanto indicato nell'articolo di Keenan et al.<sup>70</sup>

 <sup>&</sup>lt;sup>69</sup> "Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon" A. C. Ferrari and J. Robertson
<sup>70</sup> "A deep investigation into the structure of carbon dots" Keenan J. Mintz, Mattia Bartoli, Massimo Rovere,
Yiqun Zhou, Sajini D. Hettiarachchi, Suraj Paudyal, Jiuyan Chen, Justin B. Domena, Piumi Y. Liyanage, Rachel
Sampson, Durga Khadka, Raja R. Pandey, Sunxiang Huang, Charles C. Chusuei, Alberto Tagliaferro, Roger M.
Leblanc



Figura 20: spettro ottenuto tramite analisi Raman del campione LF01

Nello spettro Raman del campione LF01 in figura 20, si osserva un addizionarsi di bande nella regione tra 1000 e 1500 cm<sup>-1</sup> in cui si individuano le bande del C-O stretching (1200-1300 cm<sup>-1</sup>), dell'OH bending (1350-1430 cm<sup>-1</sup>), un picco a 1450 cm<sup>-1</sup> relativo al C-C stretching e un altro picco a circa 1370 cm<sup>-1</sup> che potrebbe corrispondere ad un eventuale banda D delle strutture aromatiche.

Anche tra 1550 e 1700 cm<sup>-1</sup> circa si osserva il contributo di più componenti: si osserva infatti la presenza della banda del C=C ring-breathing e del C=O stretching, inoltre in questa regione potrebbe trovarsi il picco G a 1610 cm<sup>-1</sup> circa.

Inoltre, similmente a quanto individuato dall'analisi IR per LF01, si nota nella regione tra 3000 e 3100 cm<sup>-1</sup>, la presenza della banda del CH stretching e tra 3000 e 3400 cm<sup>-1</sup> quella dell'OH stretching.

Considerando parallelamente i risultati dell'IR e del Raman per l'LF01, si nota che lo spettro Raman in questione è caratterizzato dalla presenza di molte bande di complicata interpretazione. Queste suggeriscono una buona interazione tra AC e DPA, ma una struttura disordinata con minima formazione di piani aromatici estesi e strutture simili a quelle dei carbon dots riportati nell'articolo di Keenan et *al*<sup>71</sup> relative alla figura 12b.



Figura 21: spettro ottenuto tramite analisi Raman dei campione LF08

Anche nello spettro del campione LF08, si osserva tra i 1000 e i 1500 cm<sup>-1</sup> la presenza di più bande: si individuano le bande del C-N stretching (1170-1250 cm<sup>-1</sup>), dell'OH bending (1350-1430 cm<sup>-1</sup>) e un picco a circa 1360 cm<sup>-1</sup> che potrebbe corrispondere al picco D. Anche tra 1450 e 1680 cm<sup>-1</sup> circa sono presenti varie componenti: a 1465 cm<sup>-1</sup> è visibile il picco relativo al C-H bending, tra 1450-1580 cm<sup>-1</sup> la banda del C-N bending, tra 1580-1660 cm<sup>-1</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>71</sup> "A deep investigation into the structure of carbon dots" Keenan J. Mintz, Mattia Bartoli, Massimo Rovere, Yiqun Zhou, Sajini D. Hettiarachchi, Suraj Paudyal, Jiuyan Chen, Justin B. Domena, Piumi Y. Liyanage, Rachel Sampson, Durga Khadka, Raja R. Pandey, Sunxiang Huang, Charles C. Chusuei, Alberto Tagliaferro, Roger M. Leblanc

<sup>1</sup> il C=C ring berathing e in questa zona probabilmente a circa 1620 cm<sup>-1</sup> potrebbe trovarsi anche il picco G.

Si nota inoltre un ordine maggiore delle bande nello spettro in figura 21, e inoltre la scomparsa delle bande da 3000 cm<sup>-1</sup> in poi che tuttavia sono presenti nell'IR anche se di bassa intensità. Questo è ancora una volta spiegato dal fatto che i trattamenti in temperatura favoriscono la deidratazione e la condensazione delle strutture aromatiche quindi alcuni dei gruppi carbossilici probabilmente hanno reagito formando altri composti e verosimilmente la struttura potrebbe avvicinarsi a quella in figura 12b.



Figura 22: spettro ottenuto tramite analisi Raman del campione LF11

Per il campione LF11 si individua tra 1200-1280 cm<sup>-1</sup> la banda C-O stretching, tra 1380-1410 cm<sup>-1</sup> quella dell'OH bending seguita da quella del C-N bending (1470-1570 cm<sup>-1</sup>) e del C=C stretching. Infine tra 3000 e 3100 cm<sup>-1</sup>, è presenta la banda del CH stretching. In questo caso, come per LF08, le bande sono ben separate, quindi anche se si individuano difficilmente i picchi D e G, è probabile che ci siano meno funzionalizzazioni e più anelli aromatici di tipo grafenico con struttura più simile alla 12b.

# **3.3** Caratterizzazione dei composti derivanti dalla reazione tra la DPA AC e PEG

#### 3.3.1 spettroscopia IR



Figura 23: spettroscopia IR del reagente Peg

Analizzando lo spettro IR del PEG con l'ausilio dell'articolo K. J. ZHU et *al*<sup>72</sup>, si nota che a circa 1200 cm<sup>-1</sup> è visibile la banda del bending C-O della catena polimerica, a 1465 cm<sup>-1</sup> quella relativa al bending CH e quella dello stretching CH saturo tra 2850 e 3000 cm<sup>-1</sup>. Infine tra 3500 e 3200 cm<sup>-1</sup> si ha la banda dell'OH stretching del gruppo terminale.

Nelle reazioni considerate il PEG ha la funzionalità di promuove l'avanzamento della condensazione radicalica dei composti aromatici e la ciclizzazione dei CD.



Figura 24: spettroscopia IR dei campioni LF04 e LF05 ottenuti tramite bagno ad olio, LF06 e LF07 ottenuti tramite sonicazione

<sup>&</sup>lt;sup>72</sup> "Preparation, Characterization, and Properties of Polylactide (PLA) -Poly( ethylene Glycol) (PEG) Copolymers: A Potential Drug Carrier" K. J. ZHU, LIN XIANGZHOU and YANG SHILIN

I campioni LF04 e LF05 sono stati ottenuti facendo reagire DPA e AC con diverse concentrazioni di PEG tramite bagno ad olio, LF06 e LF07 invece tramite sonicazione.

Per tutti e 4 i campioni si osserva la scomparsa delle bande del C=O stretching carbossilico a 1700 cm<sup>-1</sup> e dell'OH stretching ossidrilico a 3400-3500 cm<sup>-1</sup> a significare che i composti hanno reagito tramite reazioni di ammidazione. Anche la banda a 3200 cm<sup>-1</sup> dell'NH stretching aromatico e quella dell'OH stretching carbossile tra 3000-3400 cm<sup>-1</sup> si semplificano per lo stesso motivo.

Tra 2850-3000 cm<sup>-1</sup> la banda del CH stretching invece diminuisce di intensità perché il PEG promuove l'avanzamento delle reazioni di aromatizzazione (in LF05 e LF07 l'intenistà è più alta perché è presente una concentrazione di PEG maggiore quindi rimangono ancora dei gruppi saturi non reagiti). Di contro l'intensità della banda a 3000-3100 cm<sup>-1</sup> del CH stretching relativa ai composti aromatici aumenta.

Infine tra 1390 e 1500 cm<sup>-1</sup> circa si può notare l'addizionarsi delle bande dell'OH bending e del CH bending, mentre tra 1600 e 1660 cm<sup>-1</sup> è presente quella relativa al C=C ring breathing.

Dall'analisi dei risultati si può concludere che il PEG favorisce effettivamente le reazioni di aromatizzazione e di ciclizzazione tra i reagenti che risultano invece essere minori nei campioni senza PEG,

In LF06 e LF07, si possono osservare i risultati descritti prima riuscendo a risparmiare sulla temperatura quindi, anche in questo caso, si sono esclusi i campioni LF04 e LF05 ottenuti tramite bagno ad olio.



Figura 25: spettroscopia IR dei campioni LF12 e LF13 ottenute trattando termicamente LF06 e LF07 per 5 min a 250°C

Trattando termicamente LF06 e LF07 a 250°C per 5 min si sono prodotti rispettivamente LF12 e LF13.

Confrontando gli spettri di LF12 e LF13 con LF06 e LF07 presenti in figura 25, si apprezzano in maniera più diretta gli aspetti derivanti dalle reazioni di ciclizzazione e di aromatizzazione grazie all'effetto simultaneo dei trattamenti termici e del PEG. Infatti oltre alle bande dell'NH bending a 1500 cm<sup>-1</sup> e del C=C ring-breathing tra 1600 e 1660 cm<sup>-1</sup> aumentano anche quelle del CH stretching tra 3000 e 3100 cm<sup>-1</sup> e quella dell'OH stretching tra 3200 e 3500 cm<sup>-1</sup>.

Per questo motivo si sono portate avanti le analisi sui campioni LF12 e LF13, scartando i LF06 e LF07.

#### 3.3.2 Raman



Figura 26: spettro ottenuto tramite analisi Raman dei campioni LF12 e LF13

Entrambi i campioni sono stati trattati in temperatura ed usando il PEG.

Analizzando il campione LF12 notiamo che tra 1170 e 1340 cm<sup>-1</sup> è presente la banda del C-N stretching, tra 1300-1430 cm<sup>-1</sup> quella dell'OH bending con picco a 1400 cm<sup>-1</sup> che probabilmente corrisponde al picco D.

Inoltre è presente un inviluppo delle bande dell'C-N bending tra 1440 e 1580 cm<sup>-1</sup> e del C=C stretching a 1600-1660 cm<sup>-1</sup>, nella quale è ipotizzabile la presenza del picco G circa a 1600 cm<sup>-1</sup>.

Le bande relative all'OH bending, all'C-N bending e al C=C ring-breathing sono presenti con intensità rilevante anche in LF13, tuttavia in questo caso i picchi D e G sono più difficilmente individuabili.

Si nota infine, per entrambi i composti, un ordine maggiore con comportamento simile agli spettri Raman individuati per i composti in figura 12a e la scomparsa delle bande da 3000 cm<sup>-1</sup> in poi, spiegato dal fatto che i trattamenti in temperatura favoriscono la deidratazione e la

condensazione dei composti aromatici, quindi i gruppi carbossilici probabilmente hanno reagito formando altri composti.

#### 4. Simulazioni

# 4.1 efficienza di carico (TGA)

campione	tiofene wt%	DAD_A wt%	DAD_B wt%	DAD_X2 wt%
LF01	0.31	0.18	0.14	0.17
LF08	0.26	0.15	0.16	0.20
LF11	3.50	0.21	0.17	0.16
LF12	3.00	0.27	0.25	0.21
LF13	0.09	0.24	0.21	0.24

TABELLA-1 con le percentuali in peso dell'efficienza di carico dei CD caricate con tiofene e DAD di tipo A,B,X

Le soluzioni usate per il processo di adsorbimento sono fatte con 50 mg di DAAD in 50 mL di Ethere di Petrolio. Circa 50 mg di *Carbon Dots* vengono agitati in 5 mL di soluzione per una notte.

Successivamente al processo di adsorbimento la filtrazione viene eseguita mediante un filtro di carta e con l'aiuto di una pompa a vuoto che crea un leggero vuoto e mi permette di separare la parte solida dalla soluzione liquida.

Osservando i risultati riportati in tabella 1, ottenuti tramite TGA, si nota innanzitutto che il Tiofene viene adsorbito più efficientemente sul CD, arrivando ad una resa di carico anche del 3.50% mentre le efficienze di adsorbimento dei DAD rimangono < 1%.

Provando ad ipotizzare una possibile spiegazione di questi risultati, si cerca innanzitutto di considerare le tipologie di legami che vengono interessati dall'interazione tra i CD e le molecole attive adsorbite.

Sia per i DAD che per il Tiofene le interazioni che sono maggiormente rilevanti sono quelle deboli<sup>73</sup> come i legami di tipo  $\pi$ -  $\pi$ <sup>74</sup> e i legami ad H.

Per il tiofene nonostante la maggior parte dell'interazione sia dovuta a legami  $\pi$ – $\pi$  (apolari) del doppio legame, si osservano in aggiunta le interazioni di tipo dipolo-dipolo. Queste ultime riguardano i due doppietti liberi dello zolfo<sup>75</sup> che interagiscono con le porzioni polari del CD<sup>7677</sup> rappresentati ad esempio dai gruppi NH e OH, tuttavia risultano essere poco rilevanti. Dunque il motivo per cui il Tiofene risulta avere resa di carico maggiore potrebbe ricondursi al suo ingombro sterico: essendo caratterizzato da un solo atomo di zolfo, a differenza dei DAD che ne hanno due, il Tiofene possiede ingombro sterico minore che permetterebbe alla struttura di stirarsi in modo da trovare una posizione energeticamente più favorita e di massimizzare i legami  $\pi$ – $\pi$  con l'ambiente circostante. Quest'ipotesi verrà consolidata successivamente, a seguito delle analisi delle simulazioni.

Anche se per il tiofene la resa arriva al 3.5%, complessivamente le efficienze di carico risultano basse per ogni tipo di adsorbimento, probabilmente a causa della limitata dimensione dei Carbon Dots. Si può cercare di migliorarle ad esempio emulsionando i carichi insieme al CD come mesofase micellare<sup>78</sup> oppure aumentando il tempo di residenza dei CD nella soluzione, migliorando il processo di filtrazione e aumentando la concentrazione dei DAD nella soluzione.

<sup>&</sup>lt;sup>73</sup> "Accurate DFT Descriptions for Weak Interactions of Molecules Containing Sulfur" Philippe C. Aeberhard,J. Samuel Arey, I-Chun Lin and Ursula Rothlisberge

<sup>&</sup>lt;sup>74</sup> " $\pi$ – $\pi$  Stacking between Polyaromatic Hydrocarbon Sheets beyond Dispersion Interactions" Nadeesha J. Silva, Francisco B. C. Machado, Hans Lischka, Adelia J. A. Aquino

<sup>&</sup>lt;sup>75</sup> "Weakly Polar Interactions In Proteins" S. K. Burley, G. A. Petsko

<sup>&</sup>lt;sup>76</sup> "Morphological, viscoelastic and mechanical characterization of polypropylene/exfoliated graphite nanocomposites" Creusa Iara Ferreira; Otavio Bianchi; Mauro Alfredo Soto Oviedo; Ricardo Vinicius Bof de Oliveira; Raquel Santos Mauler

<sup>&</sup>lt;sup>77</sup> "Tubular titanium oxide/reduced graphene oxide-sulfur composite for improved performance of lithium sulfur batteries" Junhua Song, Jianming Zheng , Shuo Feng, Chengzhou Zhu, Shaofang Fu, Wengao Zhao, Yuehe Lin

<sup>&</sup>lt;sup>78</sup> "Polymeric Micelles for Drug Delivery" Croy S.R, Kwon G.S

# 4.2 simulazioni HyperChem

Vengono qui riportate le immagini ottenute a seguito delle simulazioni svoltesi su HyperChem, riguardanti le ipotetiche strutture geometriche dei CD prima e dopo il caricamento con il Tiofene e con il DAD, tuttavia non è stata considerata l'aggiunta del PEG a causa dei limiti strumentali del programma usato.

#### 4.2.1 strutture simulate





Figura 27: analisi hyperchem di un'ipotetica struttura dei CD senza carichi Analizzando prima l'ipotetica struttura del CD che si formerebbe simulando l'interazione tra l'AC e la DPA e mostrandola con due stili di legami diversi per maggior chiarezza come illustrato in figura 27, si passa all'interazione tra il CD e tre molecole di tiofene che vengono inserite in vicinanza o in prossimità della struttura.



figura 28: analisi HyperChem di tre molecole di tiofene inserite nel CD in vari modi. Nel caso A le molecole di tiofene sono state inserite in 3 lati diversi, nel caso B due molecole sono state posizionate al di fuori del CD e una invece all'interno, nel caso C sono state posizionate al di fuori del CD tutte da un lato solo e infine nel caso D due molecole di tiofene sono posizionate al di fuori del CD dalla stessa parte e una dall'altra

In figura 28, per ogni caso (A,B,C e D) si osserva che, quando il CD interagisce con il tiofene attraverso le parti più mobili, esso si riconforma in modo tale da accogliere in un suo dominio lo zolfo del tiofene. Infatti le distanze di legame tra gli anelli aromatici del CD aumentano: si passa da

circa 3 Å a distanze comprese tra i 3.9 e i 6 Å, a significare che essi cerchino di riarrangiarsi per accogliere il composto solforato.

In tutte e quattro le simulazioni inoltre l'anello di tiofene aumenta a sua volta il proprio ingombro sterico poichè le distanze di legame tra gli atomi che costituiscono la molecola crescono. Infine quando la distanza tra le molecole inserite e il CD non è troppo elevata (<5-6 Å), come in figura 28-A B e D, la singola molecola di tiofene si impila sulla struttura aromatica del CD in modo tale che il sistema  $\pi$  dell'una interagisca con quello  $\pi$  dell'altra, come riportato nell'articolo di Nadeesha J. Silva et al.

Dall'analisi di queste simulazioni si evince quindi che l'interazione tra il Tiofene e il CD tende a minimizzare l'energia del sistema. Infatti come si può osservare nella figura 28 per i casi A B C e D, le molecole attive in questione si riorientano impilandosi in maniera parallela ai gruppi C=O degli anelli aromatici del CD e iniziano a girarsi puntando lo zolfo verso gli idrogeni della struttura del CD, quindi verso la tasca del CD. Inoltre le molecole di Tiofene si stirano per cercare una conformazione energeticamente più favorevole, grazie al fatto che le distanze di legame tra gli atomi possono aumentare e ciò permette un maggior ingombro sterico del tiofene in modo che esso possa essere incorporato nel sito del CD. DAD di tipo A inserito all'interno del CD





figura 29: analisi HyperChem di tre tipi di DAD (A B e X) inserite all'interno del CD

DAD di tipo B inserito all'interno del CD



DAD di tipo X inserito all'interno del CD





DAD di tipo A inserito all'esterno del CD



figura 30: analisi HyperChem di tre tipi di DAD (A B e X) inserite in prossimità del CD

DAD di tipo B inserito all'esterno del CD



DAD di tipo X inserito all'esterno del CD



Analizzando invece le simulazioni che vedono come oggetto di studio l'adsorbimento dei DAD sui CD, per ogni tipologia di DAD si è notato che le lunghezze di legame delle catene cambiano. Infatti, come nel caso del Tiofene, le molecole di DAD modificano leggermente la propria conformazione sterica passando da una forma lineare ad una più contorta con distanze di legame maggiori. Infatti si è notato che le esse passano da circa 0.82- 0.83 Å a valori superiori: tra i carboni si arriva a distanze anche di 1.5 Å ma il maggior cambiamento si verifica tra gli atomi si zolfo che raggiungono lunghezze di legame di circa 2 Å. Questo potrebbe significare che la molecola attiva, come nel caso di Tiofene, cerchi di adattarsi a specifici domini dei CD.

#### 4.2.2 risultati simulazione

Considerando le simulazioni precedenti sono state analizzate le energie di formazione dei reagenti e dei prodotti, riportate nelle tabelle sottostanti, in modo da riuscire a valutare l'intensità delle interazioni tra le molecole adsorbite e i CD.

	energia prodotti (kcal/mol)	energia reagenti (kcal/mol)	$\Delta G$ tot (kcal/mol)
tiofene a	202,91	196,70	6,21
tiofene b	194,06	196,70	-2,64
tiofene c	240,03	196,70	43,33
tiofene d	201,50	196,70	4,80

TABELLA 2: ENERGIE DI LEGAME DELLE MOLECOLE DI TIOFENE POSIZIONATE NEI QUATTRO MODI INDAGATI NELLE SIMULAZIONI HYPERCHEM

	energia prodotti	energia reagenti	∆G tot
	(kcal/mol)	(kcal/mol)	(kcal/mol)
DAADA a	163,2	179,4	-16,2
DAADA b	163,62	179,4	-15,78

TABELLA 3: ENERGIE DI LEGAME DELLE MOLECOLE DI DAD TIPO A, POSIZIONATE ALL'INTERNO (caso a) E ALL'ESTERNO (caso b) DEL CD

	energia prodotti	energia reagenti	$\Delta G$ tot
	(kcal/mol)	(kcal/mol)	(kcal/mol)
DAADB a	141,21	179,43	-38,22
DAADB b	161,29	179,43	-18,14

TABELLA 4: ENERGIE DI LEGAME DELLE MOLECOLE DI DAD TIPO B, POSIZIONATE ALL'INTERNO (caso a) E ALL'ESTERNO (caso b) DEL CD

	energia prodotti	energia reagenti	∆G tot
	(kcal/mol)	(kcal/mol)	(kcal/mol)
DAADX a	153,66	179,78	-26,12

DAADX b	166,82	179,78	-12,96	
TABELLA 5 : EN	NERGIE DI LEGAN	IE DELLE MOLECOI	LE DI DAD TIPO X,	POSIZIONATE ALL'INTERNO
(caso a) E ALL'	ESTERNO (caso b	) DEL CD		

Per i legami da H<sup>79</sup> e dipolo-dipolo<sup>80</sup> esistono dei valori energetici già noti che vanno da poche unità a poche centinaia di Kcal/mol e riguardano l'interazione tra due soli atomi. Osservando invece i risultati ottenuti a seguito delle simulazioni, che sono stati riportati nelle tabelle 2 3 4 e 5, si nota che le energie di legame hanno valori compresi tra i -38 e i 44 Kcal/mol. Quindi si può assumere che il CD in questione interagisca con la molecola caricata con la stessa intensità di un legame ad idrogeno o un legame dipolo-dipolo, tuttavia non si tratta più di interazione tra due soli atomi ma dell'adsorbimento di una molecola su un CD. Ne risulta che le interazioni che si instaurano tra le strutture simulate sono relativamente deboli.

Inoltre valori di interazione positivi definiscono conformazioni strutturali che vengono raggiunte più difficilmente ma risultano poi essere meno degradabili e disassemblabili. Questo comportamento è maggiormente visibile in tabella 2 caso c, per l'adsorbimento di tre molecole di tiofene posizionate tutte da un lato solo del CD. Infatti l'energia assume in questo caso un valore positivo, di 43.33 kcal/mol, definendo quindi un processo endotermico di adsorbimento.

Valori di interazione negativi invece definiscono un processo che risulta essere maggiormente spontaneo anche se meno stabile. Questo comportamento è caratteristico dei DAD, in particolare quelli di tipo B in tabella 4, che hanno tutti valori di energie di interazione negativi.

In conclusione, si osserva che il Tiofene rispetto ai DAD per potersi adsorbire sul CD richiede un'energia esterna maggiore, anche se poi l'adsorbimento risulta essere più stabile, e possiede una resa di carico più alta di quella dei DAD. Infatti quando le molecole attive si avvicinano al CD,

<sup>79 &</sup>quot;Dipole–dipole interactions among CH3Cl molecules on Ru(001): Correlation between work function change and thermal desorption studies" T. Livneh, Y. Lilach, and M. Asscher 80 "The hydrogen bond" A.D.Buckingham, J.E.Del Bene, S.A.C.McDowell

esse riorganizzano le loro strutture oltre che quelle dei domini del CD comportando dunque una buona interazione. Inoltre essendo che gli ordini delle energie di interazione sono dell'ordine di quelle del legame debole, viene ipotizzato un rilascio efficiente.

# 5. conclusioni

Per lo svolgimento di questa tesi sono state sintetizzate varie strutture di CD utilizzando Aido Citrico e 1,4-fenilendiammina (DPA) come reagenti. Sono stati variati i parametri sintetici di temperatura, tempo, concentrazione di PEG e modalità di sintesi in modo da poter analizzare le varie tipologie di risultato. Viene dunque creata una libreria di composti nxm, con n= numero campioni e m= parametri di sintesi, di cui verrà condotto uno screening sperimentale attraverso caratterizzazione tramite tecniche spettroscopiche.

Sono state utilizzate sei temperature (25-80-250-350-450-550) e tre rapporti di concentrazione tra AC e PEG (1:1, 1:2, 1:5) e si sono analizzati i risultati tramite spettroscopia IR, XPS e Raman.

La spettroscopia IR ha mostrato che per i campioni trattati in temperatura si verifica una diminuzione dei gruppi OH dei gruppi carbossilici liberi e un aumento di quelli NH e CH insaturi oltre che dei carboni ibridizzati sp<sub>2</sub>. Questi effetti inoltre sono ancora più visibili se è presente il PEG. Tutto ciò viene supportato, ma solo in parte, dai risultati XPS che evidenziano in LF08, trattato in temperatura, un aumento dei gruppi ammidici e dei carboni ibridizzati sp<sub>2</sub> rispetto a LF01. Anche se non si è riusciti ad analizzare con questa tecnica tutti i campioni scelti per il carico poiché rilasciavano troppi vapori si è concluso che i trattamenti termici e l'uso del PEG riescono a favorire, oltre che i processi di ammidazione tra AD e DPA, la ciclizzazione dei composti aromatici con la produzione di composti eterociclici (che contengono atomi di azoto) che possono evolvere in strutture di tipo grafitico.

La caratterizzazione condotta mediante l'utilizzo del Raman oltre a consolidare queste conclusioni, ha mostrato inoltre che l'uso del PEG e dei trattamenti termici riesce a favorire anche l'ordine della struttura arrivando ipoteticamente ad una configurazione che prevede piani grafenici con carbonio ibridizzato sp<sub>2</sub> impilati l'uno sull'altro e tenuti insieme da legami deboli.

Come riportato in letteratura inoltre, l'utilizzo del PEG dovrebbe portare alla formazione di una struttura con l'interno più apolare rispetto all'esterno, e che quindi dovrebbe riuscire a passare attraverso la membrana cellulare e rilasciare il farmaco in loco. Per supportare questa teoria si è passati all'analisi delle rese di carico e delle simulazioni delle strutture.

L'analisi TGA ha mostrato che le rese di carico sono più efficaci per l'adsorbimento tra il CD e le molecole di tiofene. Il motivo può essere ricondotto alla struttura del tiofene, che avendo un solo atomo di zolfo, riesce probabilmente ad interagire meglio con il CD. Successivamente si è poi passati a cercarne la conferma analizzando i risultati tramite le simulazioni. Esse mostrano che le reazioni di aromatizzazione, ciclizzazione e ammidazione portano i CD a riorganizzarsi appallottolandosi su se stessi creando dei buchi che possono assomigliare in una certa misura alla tasca di un sito attivo, ovvero un dominio adatto a promuovere un'inclusione selettiva di specie chimiche. E come osservabile in figura 28 le specie chimiche che si adattano meglio a queste tasche sono le molecole di tiofene più che quelle dei DAD. Inoltre le simulazione mostrano che le energie di interazione tra le varie molecole adsorbite e i CD sono dell'ordine di quelle dei legami deboli (in particolare di queli  $\pi-\pi$  o dipolodipolo) definendo quindi una struttura superamolecolare e le energie del tiofene sono proprie di reazioni endotermiche ma più stabili. Bisogna tuttavia sottolineare che le energie riportate in tabella 2,3,4 e 5 sono state considerate nel vuoto e non tengono conto del solvente che servirebbe per la somministrazione in vivo.

Infine si ipotizza che il composto ideale dovrebbe essere stabile finchè non arriva a destinazione e instabile nel sito in modo da favorire il rilascio del farmaco. Per arrivare a questo bisognerebbe bilanciare la polarità, l'efficienza di carico e le funzioni superficiali. Non sono quindi sufficienti le analisi riportate in questa tesi, ma andrebbero eseguiti ulteriori test in vivo.

#### RINGRAZIAMENTI

*Mi è doveroso dedicare questo spazio dell'elaborato alle persone che hanno contribuito, con il loro instancabile supporto, alla realizzazione del mio percorso universitario.* 

Innanzitutto vorrei ringraziare il mio relatore di tesi Alberto Tagliaferro e il mio correlatore Mattia Bartoli, per la loro pazienza e per i loro consigli.

Un grazie di cuore va tutti i miei amici, sia quelli di infanzia che quelli conosciuti negli anni successivi, con cui ho condiviso tanti ricordi e senza la quale non ce l'avrei fatta a superare i momenti difficili. Un pensiero speciale va agli amici di Ideificio Torinese.

Vorrei però ringraziare infinitamente i miei genitori che mi hanno sempre sostenuto, appoggiando ogni mia decisione, fin dalla scelta del mio percorso di studi. Li ringrazio per l'educazione, la disciplina e gli insegnamenti che mi hanno trasmesso e che mi hanno aiutato ad affrontare gli anni universitari con serenità e determinazione. Vi voglio un bene immenso