

Politecnico di Torino
Corso di Laurea Ingegneria Biomedica
A.a. 2020/2021
Sessione di Laurea Luglio 2021



**Politecnico
di Torino**

Sintesi, caratterizzazione e coniugazione di carbon dots grafitici e particelle a base di bismuto

Relatori:
Prof. Alberto Tagliaferro
Dr Mattia Bartoli

Candidato:
Cristian Muscas

Sommario

ABSTRACT	4
1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 Carbon Dots	5
1.1.1 Struttura	5
1.1.2 Proprietà	5
1.1.3 Metodi di sintesi	8
1.1.4 Applicazioni Biologiche	10
1.2 Particelle di Bismuto.....	10
1.2.1 Metodi di sintesi	11
1.2.2 Applicazioni biologiche	12
1.3 Teragnostica	15
2. MATERIALI E METODI	17
2.1 Particelle	18
2.2 Carbon Dots	20
2.3 Coniugazioni	23
3. ANALISI E DISCUSSIONE DEI RISULTATI	24
3.1 Particelle di bismuto.....	24
3.1.1 FE-SEM	25
3.1.2 Raman	29
3.1.3 IR	31
3.2 Carbon Dots	32
3.2.1 FE-SEM	36
3.2.2 IR	37
3.2.3 Raman	39
3.2.4 Fluorimetro	48
3.3 CONIUGAZIONI	52

3.3.1 IR	53
3.3.2 Raman	54
3.3.3 FE-SEM	55
CONCLUSIONI	56
RINGRAZIAMENTI	58
BIBLIOGRAFIA	59

ABSTRACT

I Carbon Dots sono materiali a base di carbonio, con dimensioni inferiori ai 10nm che hanno attratto l'interesse di diversi gruppi di ricerca negli ultimi anni. Questo è dovuto alla loro facilità di fabbricazione e alle loro proprietà come la biocompatibilità, scarsa tossicità, fotoluminescenza e solubilità in acqua. Grazie a queste caratteristiche, la ricerca si è focalizzata sul loro utilizzo nell'ambito del bioimaging e del drug delivery. Lo scopo del seguente lavoro di tesi è stato quello di produrre una libreria di composti utilizzabili in ambito teragnostico composta da carbon dots di tipo grafítico sintetizzati ad elevata temperatura (550, 800 e 1000°C), utilizzando dei precursori a base di acido citrico e urea. Ulteriore CDs sono stati prodotti mediante pirolisi del glucosio e trattamenti di ossidazione con miscela solfonitrica di nanotubi al carbonio e foglie del tè. Sono state prodotte anche delle particelle di bismuto con dimensioni micrometriche, in modo da poterle coniugare con i CDs che hanno mostrato le migliori capacità di sospensibilità in acqua. I materiali ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi IR, spettroscopia Raman, FE-SEM e analisi di fluorescenza.

1. INTRODUZIONE

Sin dalla loro scoperta avvenuta nel XXI secolo, i Carbon dots (CDs) hanno ottenuto una crescente attenzione, dovuta in gran parte alle loro caratteristiche come: la fotoluminescenza, le proprietà fisico – chimiche, la biocompatibilità, le loro dimensioni ridotte e l'elevata fotostabilità [1]. Sono diversi gli ambiti in cui le caratteristiche di questi nanomateriali vengono sfruttate: imaging, sensing, drug delivery e varie applicazioni biomediche. I graphene quantum dots (GQDs) furono sviluppati per la prima volta da Pan et al. [2], che nel 2010 riuscirono a scomporre fogli di grafene tramite trattamenti idrotermali. Attualmente i GQDs sono riconosciuti come un materiale che presenta una miglior cristallinità rispetto ai CDs [3]. L'obiettivo del presente lavoro di tesi è quello di sintetizzare e caratterizzare quantum dots di tipo grafítico ad alta temperatura e particelle a base di bismuto, ottenendo una libreria di composti utilizzabili in ambito teragnostico. Una successiva coniugazione tra i CDs che hanno presentato le migliori caratteristiche di sospensibilità e le particelle prodotte è stata effettuata e caratterizzata. Il seguente lavoro di tesi si articola in quattro capitoli: a valle del seguente capitolo introduttivo, in cui vengono descritti i quantum dots e le particelle, la loro struttura e le loro proprietà, inoltre vengono fornite delle informazioni generali riguardanti la teragnostica; nel capitolo due vengono esposti i materiali utilizzati e le metodologie seguite per la sintesi dei diversi composti. Nel capitolo tre verranno presentati e discussi i risultati ottenuti con rispettive analisi Raman, FE-SEM, IR e fluorescenza. Infine, le conclusioni sul lavoro svolto.

1.1 Carbon Dots

1.1.1 Struttura

I CDs sono materiali a base di carbonio che presentano un diametro inferiore ai 10nm [1], possono essere amorfi o nanocristallini e presentano dei clusters di carbonio di tipo sp^2 , nonostante alcuni studi confermino la presenza di una struttura simil diamante, con presenza di carboni sp^3 [4].

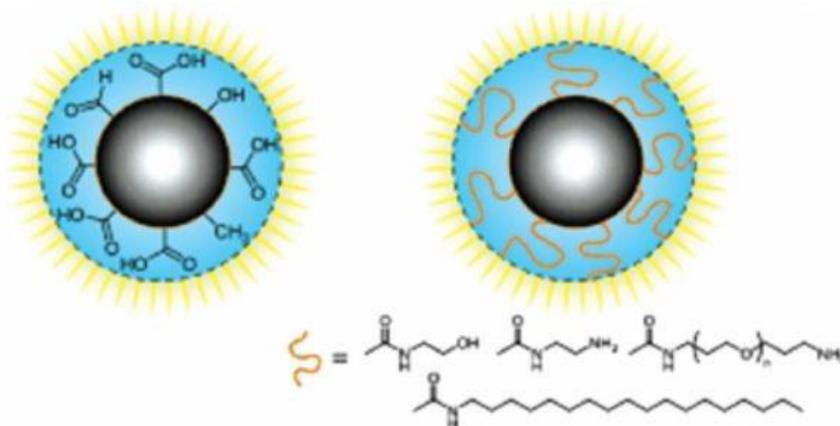


Figura 1: Struttura QDs fonte [1]

D'altra parte, i GQDs presentano caratteristiche derivanti sia dal grafene che dai CDs e possono essere considerati pezzi di grafene con diametro inferiore ai 10-20nm [1]. Solitamente hanno una forma ellittica o circolare, ma ultimamente sono stati sintetizzati GQDs con forme esagonali, quadrate e triangolari. Sono anisotropi, con le dimensioni laterali che risultano essere maggiori rispetto all'altezza [5]. Nonostante le diverse strutture, sia i CDs che i GQDs sono funzionalizzati con gruppi superficiali come ad esempio: il gruppo carbossile (COOH) o il gruppo ossidrilico (OH) [3]. Questi gruppi funzionali risultano molto utili dal momento che contribuiscono alle proprietà ottiche dei CDs e GQDs, consentendone una loro eventuale funzionalizzazione con biomolecole, rendendoli inoltre solubili in acqua [3]. Per quanto riguarda le proprietà elettriche invece, queste possono essere migliorate dalla presenza di alcuni atomi come, ad esempio, azoto e zolfo [3].

1.1.2 Proprietà

Dal punto di vista delle proprietà ottiche, sia i CDs che i GQDs mostrano ottime proprietà di assorbimento alle basse lunghezze d'onda (230-320 nm) [5], dovuto soprattutto alla transizione $\pi - \pi^*$ dei legami $C = C$ per il picco a 230nm [5], mentre per quanto riguarda l'assorbimento a 300 nm, questo è dovuto alle transizioni $n-\pi^*$ dei legami $C=O$ [5]. Solitamente i CDs risultano avere uno spettro di assorbimento maggiore rispetto ai GQDs, nonostante ciò, le caratteristiche di assorbimento possono comunque essere modificate tramite gruppi funzionali o trattamenti di passivazione delle superfici [4].

Una delle chiavi del successo di CDs e QQDs è data dalla loro fotoluminescenza (PL): tale proprietà è tutt'ora al centro di dibattiti dal momento che il meccanismo di luminescenza può variare tra la moltitudine di componenti che possono essere sintetizzati [3]. Infatti, esistono svariati composti con diverse composizioni chimiche, che possono essere ottenuti tramite diverse tecniche di sintesi. Quello che accomuna tutti i composti è il fatto che lo spettro di emissione è ampio ed è dipendente dalla lunghezza d'onda usata per eccitare il nanocomposto [5]. Una delle teorie più discusse, è quella del confinamento quantico, secondo la quale ad un elevato diametro corrisponde un'emissione sul rosso, dal momento che quest'ultima dipenderà dal band gap [1] [6]. Tale fenomeno è comunque maggiormente osservabile nei QQDs rispetto ai CDs. Esso si basa sul fatto che il reticolo cristallino di un materiale nanometrico, influenza fortemente la distribuzione elettronica [6]. In particolare, in alcuni materiali semiconduttori come ad esempio il grafene, possiamo osservare dei foglietti di atomi di carbonio sp^2 che rappresentano un cristallo bidimensionale con bandgap pari a 0 [6]. Nel lavoro di Kim et al [7], è mostrato come all'aumentare delle dimensioni dei QQDs, diminuisca l'energia del picco di assorbimento, con conseguente emissione sul rosso, come illustrato nella fig.2.

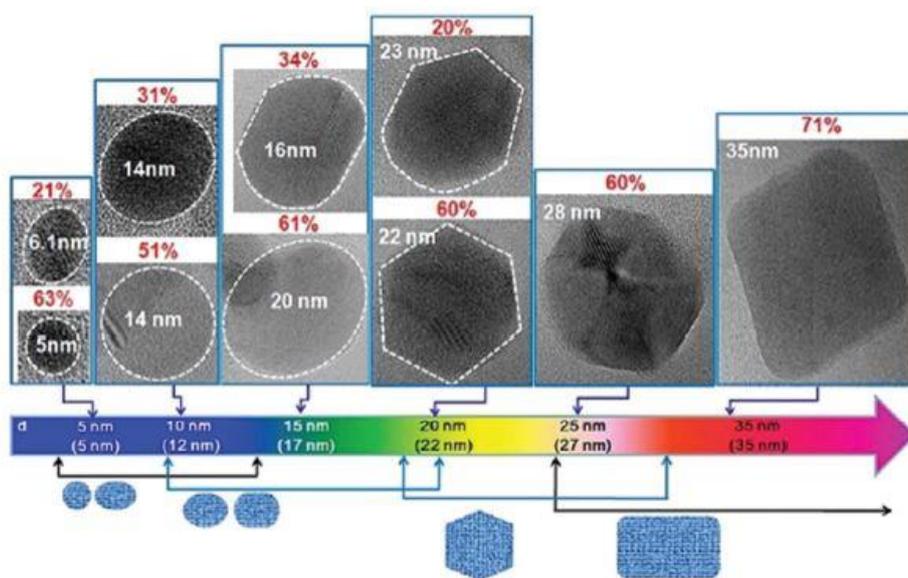


Figura 2: Dipendenza dello spettro di emissione dalle dimensioni, fonte [6]

Secondo un'altra teoria, la fotoluminescenza nei CDs dipende maggiormente dai gruppi presenti in superficie, dal momento che essa può essere influenzata sia da accettori che donatori di elettroni [1]. Alcuni ricercatori hanno individuato i tipi di legami che possono influenzare la fluorescenza che sarebbero: $C = O$ e $C = N$ [6]. Solitamente, una maggiore presenza di ossigeno implica uno spostamento di emissione sul rosso [6]. Altri gruppi funzionali possono comunque introdurre diversi livelli energetici, facendo variare la fluorescenza dei composti, come mostrato da Zang et al [8], i quali fabbricarono diversi CDs accomunati dal fatto di possedere la stessa quantità di ossigeno ma diversi gruppi funzionali superficiali, ottenendo composti con diverse emissioni: dal blu al bianco. Questo può essere spiegato ipotizzando che i gruppi funzionali come: $C = O$ e

$C = N$ possano introdurre dei nuovi livelli energetici. Gli elettroni transiteranno tra questi nuovi livelli energetici e il livello energetico LUMO, facendo shiftare l'emissione quando questi ultimi ritorneranno nel corrispondente livello HOMO [6].

I CDs presentano un solo picco di eccitazione, mentre i QQDs solitamente presentano due picchi di eccitazione [1]. Sono stati osservati anche dei comportamenti dipendenti dal pH, con l'intensità della fluorescenza che decresce sia ad elevati valori di pH che a bassi valori [3]. Questo dimostra l'influenza dei gruppi funzionali sulla fluorescenza, dal momento che un'ossidazione o una riduzione di questi gruppi può incidere sulle proprietà ottiche.

Un altro parametro in grado di condizionare la fluorescenza è il grado di ossidazione superficiale [6]: maggiore è il grado di ossidazione, maggiore saranno i difetti superficiali e di conseguenza, maggiori saranno i possibili difetti in grado di catturare fotoni con conseguente emissione di radiazione sul rosso [6]. Tale colore è dovuto al fatto che ad un aumento del grado di ossidazione, corrisponde una riduzione del band gap con conseguente emissione sul rosso. [6]. Inoltre, aumentando il grado di ossidazione, si ha un incremento delle dimensioni delle particelle, anch'esso responsabile dell'emissione sul rosso [6].

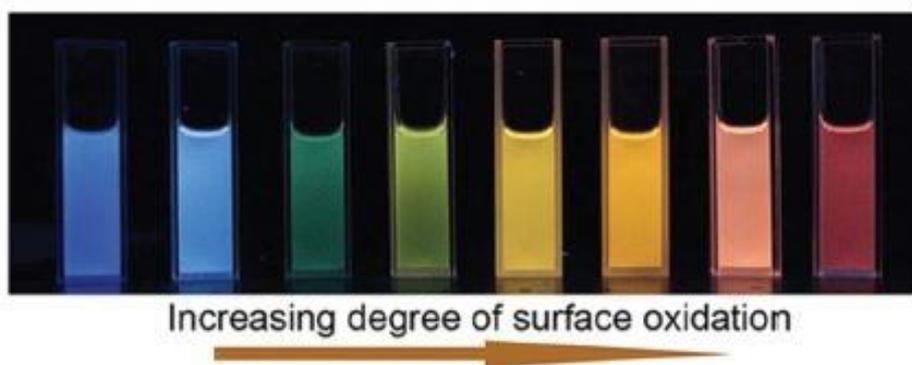


Figura 3: Shift della fluorescenza all'aumentare del grado di ossidazione superficiale. Fonte [6]

Dal punto di vista della biocompatibilità, i CDs forniscono risultati migliori rispetto ad altri nanomateriali. Sono stati condotti studi in vivo, come ad esempio quello di Yang et al. [7], che dopo un'iniezione di CDs (funzionalizzati con PEG_{1500N}) sui topi, non hanno osservato anomalie riguardanti peso corporeo, e accumulo di sostanze su fegato e rene. Bisogna comunque tener presente che le proprietà dei CDs (inclusa la tossicità), varia tra i vari composti, dato che anche il metodo di preparazione può avere la propria influenza [1].

1.1.3 Metodi di sintesi

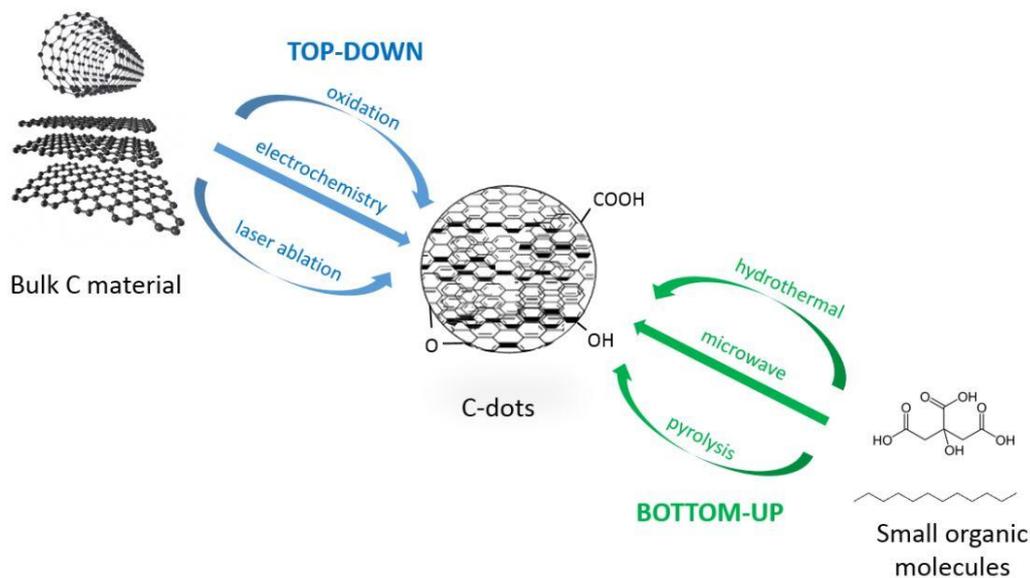


Figura 4: Metodi di Sintesi. fonte Google

Per quanto riguarda le sintesi, queste possono essere classificate in due categorie: top-down e bottom-up [1]. I metodi top – down si basano sulla decomposizione di materiali a base di grafene (solitamente vengono utilizzati fogli di grafene, ma anche polveri di grafite, fibre di carbonio o nanotubi al carbonio) [6] tramite metodi chimici, elettrochimici e fisici [1]. Solitamente sono necessari diversi step prima di ottenere i GQDS e tali procedimenti si basano sull'utilizzo di agenti ossidanti e acidi concentrati [6]. I metodi top down spesso utilizzano delle miscele a base di acido solforico e acido nitrico e differiscono tra loro per il modo in cui i fogli di grafene sono convertiti in carbon dots. Tra queste metodologie distinguiamo: ossidazione acida e esfoliazione elettrochimica. Mediante l'utilizzo di miscele acide è inoltre possibile introdurre nelle strutture dei CDs dei gruppi OH rendendoli solubili in acqua e disponibili ad una eventuale funzionalizzazione, ottenendo inoltre una struttura grafica con più difetti [1]. Sono comunque presenti degli svantaggi come ad esempio: elevata densità di difetti e impossibilità di controllare dimensioni e forma dei prodotti finali [1]. Pan et al. [2], svilupparono dei quantum dots solubili in acqua a partire da ossido di grafene. Il processo richiede diversi steps, tra cui una riduzione termica dell'ossido di grafene in foglietti di grafene che poi verranno trattati successivamente in soluzione acida e mediante metodi idrotermali per ottenere i GQDs.

Per quanto riguarda i metodi bottom – up questi si basano sulla pirolisi o carbonizzazione di precursori organici [3]. Uno dei materiali più utilizzati è l'acido citrico. Riscaldando i composti organici al di sopra della loro temperatura di fusione, si avrà condensazione, nucleazione e conseguente formazione di CDs o GQDs [1]. Nel primo step di reazione solitamente i precursori formano catene di composti intermedi tramite reazione di condensazione, come ad esempio amidazione o condensazione aldolica [6]. Successivamente i composti intermedi formano polimeri mediante reazioni di polimerizzazione o aggregazione ed infine si ha la

carbonizzazione dei polimeri in modo da ottenere un composto con core carbonico [6]. Questi metodi sono solitamente a basso costo, scalabili e permettono di tenere sotto controllo le dimensioni dei CDs [3]. Di contro, i prodotti finali presentano scarsa solubilità [9]. Un esempio è dato dal lavoro di Ji et al [10], i quali sono riusciti a produrre dei GQDs mediante riscaldamento termico di precursori a base di glucosio.

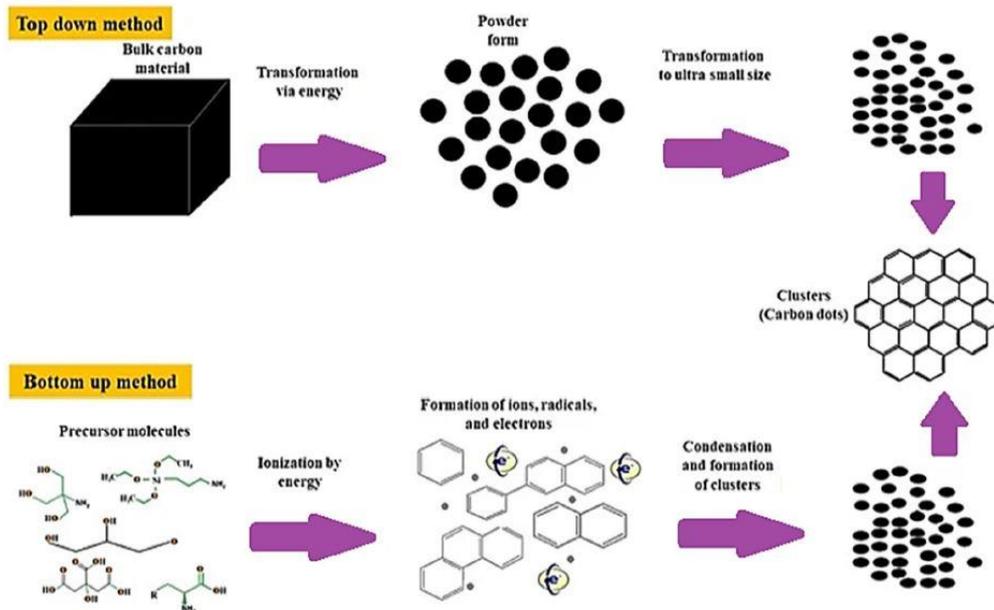


Figura 5: Metodi di sviluppo dei CDs, fonte [7]

Negli ultimi tempi stanno prendendo il largo le cosiddette tecniche “green” che utilizzano materiali di scarto come sorgente di carbonio [3]. Queste tecniche consentono di utilizzare delle risorse naturali e non dannose per l’ambiente (come ad esempio scarti del tè, caffè, buccia dell’anguria, verdura) per la fabbricazione di GQDS. Grazie ai bassi costi delle risorse necessarie per la riuscita della sintesi, queste tecniche risultano essere facilmente scalabili [6]. Solitamente le biomasse vengono trattate tramite metodi bottom up, in modo da polimerizzarle e carbonizzarle ad alta temperatura per ottenere i CDs (è comunque possibile utilizzare anche metodi top – down [6]). È il caso di Bano et al [11], i quali riuscirono a produrre dei CDs altamente biocompatibili e utilizzabili per bioimaging, mediante trattamenti idrotermali di foglie di Tamarindo.



Figura 6: Produzione di carbon dots a partire da scarti di anguria, fonte [3]

1.1.4 Applicazioni Biologiche

Per quanto riguarda le applicazioni biologiche, i QDs hanno trovato diverse applicazioni nella nanomedicina. Un esempio è il loro utilizzo nell'ambito del drug delivery, solitamente grazie alla loro coniugazione con arginina, glicina e acido aspartico o, incorporando doxorubicina, in modo da avere dei rilasci di farmaco mediati dal pH [5]. Essi possono essere utilizzati anche come agenti nel trattamento del cancro [1]. Alcuni QDs sono in grado di generare ossidi reattivi (ROS) se irradiati con luce blu, di conseguenza si ha un aumento dello stress ossidativo con successiva autofagia o apoptosi delle cellule tumorali [1]. Tale proprietà può anche essere utilizzata per le terapie fotodinamiche o per trattamenti di ipertermia. È inoltre possibile sfruttare i QDs come battericidi, sfruttando la possibilità dei QDs di convertire H_2O_2 in radicali OH con elevata attività antibatterica. Grazie alla loro bassa citotossicità, biocompatibilità e PL, i QDs possono venir utilizzati come sonde nell'ambito del bioimaging [5]. Come detto precedentemente la loro tossicità è molto bassa, ciò è stato dimostrato dal lavoro di Zhang et al. [9], nel quale i QDs ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) sono stati messi a contatto con cellule staminali. Dopo tre giorni dal contatto, l'80% delle cellule era ancora vivo. La PL e le proprietà elettroniche e elettrochimiche rendono i QDs e i CDs sensibili alle perturbazioni rendendoli quindi utili nell'ambito della sensoristica [1]. Inoltre, essi sono in grado di interagire con le biomolecole avendo dimensioni molto simili, questo migliora i loro effetti sensoristici [1]. Il metodo solitamente sfruttato per la detection di sali, zuccheri o proteine all'interno di una cellula è quello riguardante l'accensione o lo spegnimento della PL [1].

1.2 Particelle di Bismuto

Il bismuto (Bi) in passato veniva utilizzato spesso in ambito medico, soprattutto per il trattamento di infezioni batteriche, fino a quando non furono verificati casi di encefalite in Francia e Australia dovuti al suo utilizzo [12]. Per quanto riguarda la sintesi delle particelle a base di bismuto, queste solitamente hanno bisogno di strumentazione specializzata e condizioni controllate, ma, nonostante ciò, la loro sintesi può essere effettuata anche in laboratori non specializzati, senza difficoltà.

In ambito biomedico le particelle di bismuto ossido hanno ottenuto un crescente successo negli ultimi tempi grazie alla loro bassa tossicità, e alla elevata reperibilità del bismuto stesso [13]. Solitamente esistono diverse fasi del bismuto ossido come è possibile osservare nella fig.7:

acido citrico o acido acetico), in modo da modificare la morfologia del prodotto finale. Un'altra tecnica utilizzabile è quella della microemulsione, che permette di modificare diverse proprietà delle particelle come ad esempio, morfologia, area superficiale e geometria. Solitamente questa tecnica consiste nell'incorporare gocce d'acqua con un surfattante in una fase organica. La fase acquosa contiene sali metallici e funge da nano reattore per la sintesi delle particelle. Le gocce limitano la crescita delle particelle in termini di dimensioni, mentre la presenza del surfattante riduce la tensione superficiale ed evita la formazione di agglomerati. Altri metodi veloci, semplici e considerati poco inquinanti per l'ambiente, sono quello dell'irradiazione a microonde e l'utilizzo di ultrasuoni.

Il bismuto può essere accoppiato con diversi materiali a base di carbonio, biovetri e polimeri, per poter migliorare le performance in ambito biomedicale. Un esempio può essere l'utilizzo del PEG come shell superficiale in modo da aumentare il tempo di circolazione nel sangue della particella, rendendola "invisibile" al sistema immunitario.

1.2.2 Applicazioni biologiche

Come per altri nanomateriali, le particelle di bismuto possiedono effetti dose dipendenti e la loro citotossicità dipende da carica, diametro e eventuale funzionalizzazione superficiale delle particelle [13]. Diversi studi non mostrano l'eventuale meccanismo di citotossicità nel caso si usassero le nanoparticelle ad altre concentrazioni. Per questo solitamente, dopo un'esposizione alle nanoparticelle di bismuto, bisognerebbe effettuare degli studi riguardanti ROS, danni ai mitocondri o alla membrana cellulare e eventuale frammentazione del DNA [13]. Un esempio è dato dallo studio di Mishra et al [14], dove nanoparticelle a base di Bi_2Se_3 sono state fabbricate e testate su topi. Dopo l'esposizione, sono state rinvenute specie ossidanti nei polmoni e indicatori di infiammazioni, con conseguente promozione di stress ossidativo e morte cellulare.

I problemi derivanti dal bismuto potrebbero essere dovuti al fatto che esso si combina facilmente con gruppi solfidrici i quali sono i maggiori componenti di alcuni enzimi: l'effetto del bismuto è quello di denaturare e distruggere questi enzimi [15]. Gli effetti collaterali dipendono dall'organo su cui il bismuto si accumula e come scritto precedentemente, dalla sua concentrazione: nel caso del sistema nervoso si può addirittura generare encefalite [12].

Come scritto precedentemente, è possibile utilizzare un "coating" con PEG in modo da ridurre i danni che potrebbero subire le cellule a cause delle nanoparticelle di bismuto, inoltre con questa tecnica si riesce a proteggere le particelle stesse dall'attacco del sistema immunitario [13]. Un'altra possibilità per evitare l'azione del sistema immunitario è quella di ricoprire le nanoparticelle mediante la membrana dei globuli rossi, la quale possiede proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità e non immunogenicità [16]. Le particelle, una volta all'interno dell'organismo, devono comunque essere smaltite, questo può avvenire

secondo due diverse modalità: clearance renale e clearance epatica. La clearance renale dipende da diversi fattori, tra cui morfologia, forma e carica delle particelle [17]. Solitamente per poter ottenere una filtrazione glomerulare soddisfacente, le dimensioni delle particelle non dovrebbero superare i 6nm, cosa che invece solitamente accade. Per poter far fronte a questo problema, le particelle dovrebbero venir degradate in residui più piccoli, altrimenti verranno smaltite attraverso la clearance epatica. Le nanoparticelle di bismuto hanno mostrato una preferenza ad accumularsi nel fegato dopo essere state iniettate in via intravenosa, questo dimostra che l'ambiente acido è in grado di degradare le particelle stesse [13].

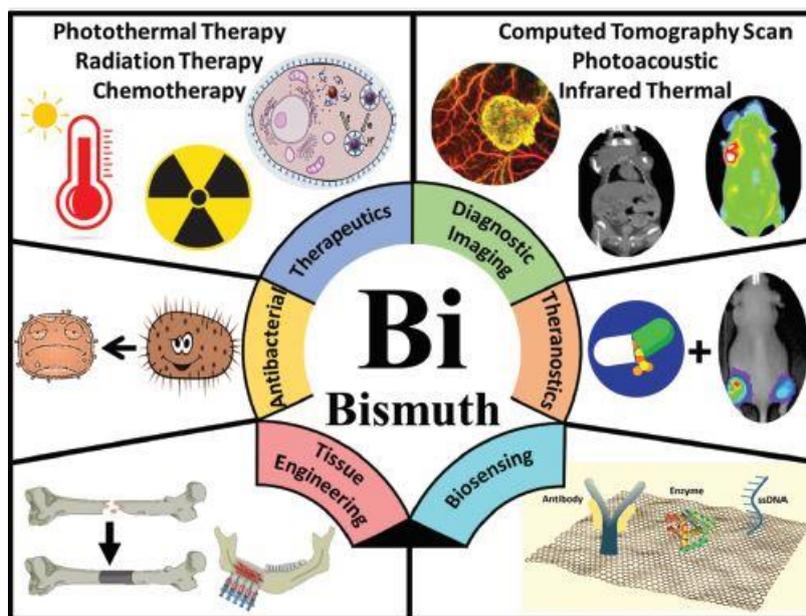


Figura 8: Diverse applicazioni del bismuto, fonte [13]

Le nanoparticelle vengono continuamente usate come battericide dal momento che solitamente hanno un'elevata attività anche se somministrate a piccole dosi e sono efficaci contro diversi tipi di batteri. Spesso queste particelle sono in grado di produrre ROS, in grado di alterare le funzioni vitali dei batteri o interferire con la loro assimilazione di nutrienti; la morte dei batteri può avvenire quindi a causa di alterazione dei segnali di trasduzione e inibizione della riproduzione batterica [13]. Un esempio in letteratura è riportato da Hernandez-Delgadillo et al. [18], i quali hanno mostrato le proprietà antibatteriche di alcune nanoparticelle a base di bismuto. Nonostante le basse concentrazioni (tra 1 e 2 mM) le particelle si sono dimostrate in grado di inibire la crescita del biofilm e del ceppo batterico stesso (*Streptococcus mutans*).

Nanoparticelle a base di bismuto possono essere utilizzate nella terapia del cancro e questo può essere considerato uno dei loro ruoli principali nella biomedicina. Una delle applicazioni è la fototerapia, nella quale il tessuto tumorale viene esposto ad una elevata temperatura (intorno ai 50°C) in grado di danneggiare le strutture tumorali [13]. I tessuti tumorali infatti, presentano una minor sopportazione del calore rispetto alle cellule sane, dal momento che presentano struttura vascolare disordinata che non permette ai vasi sanguigni di trasportare via efficacemente il calore [19]. Le particelle di bismuto possono fungere da agenti per

fototerapia termica (PTT) dato che hanno una forte assorbanza nella regione NIR e un'elevata efficienza di conversione fototermale. Solitamente le particelle di bismuto non sono in grado di raggiungere il sito tumorale, per far fronte a questo problema, esse vengono funzionalizzate mediante elementi in grado di consentire una miglior selettività di trasporto. Un esempio è l'utilizzo della membrana dei macrofagi, utilizzata da Li et al [13], per trasportare dei nanofogli di Bi_2Se_3 : il gruppo di ricerca ha osservato un maggior accumulo (addirittura 3-4 volte superiore) di particelle ricoperte dalla membrana dei macrofagi nel sito tumorale, rispetto alle particelle senza shell. Altre strategie utilizzabili per migliorare la PTT è quella di rivestire le particelle con proteine o polimeri [13].

Le particelle di bismuto ossido sono utili nell'ambito dell'imaging, risultando essere ottimi agenti di contrasto per differenti modalità di imaging [12]. Un esempio è dato dalla tomografia computerizzata (TC), che consente di ottenere immagini ad alta risoluzione anche di tessuti situati in profondità. Particelle di ossido di bismuto risultano essere degli ottimi agenti di contrasto rispetto a molti altri ossidi [12]. Bi et al [20] sintetizzarono nanoparticelle di bismuto ossido modificate mediante PEG, utilizzabili per imaging mediante TC.

Una nuova tecnica non invasiva sta prendendo il largo negli ultimi anni: l'imaging fotoacustico, che utilizza l'effetto fotoacustico per oltrepassare il problema derivante dallo scattering dei fotoni nei tessuti biologici, in modo da ottenere delle immagini con miglior risoluzione spaziale. La luce assorbita dall'agente di contrasto induce uno sbalzo di pressione che produce ultrasuoni che verranno raccolti dai detector acustici in modo da formare l'immagine [13]. Per ottenere migliori risoluzioni, sono necessari agenti di contrasto con elevata efficienza di conversione fototermale, un esempio è dato dal bismuto stesso. Le particelle di bismuto possiedono un'elevata efficienza di conversione fototermale nella finestra del NIR e risultano essere quindi ottimi agenti di contrasto. È possibile combinare questa caratteristica con il drug delivery, come mostrato da Dou et al [21], i quali hanno fabbricato nanofogli di grafene, decorati con particelle di Bi_2S_3 , funzionalizzati con polivinilpirrolidone (PVP) ed inoltre hanno caricato un farmaco: doxorubicina (DOX).

I composti di bismuto hanno trovato applicazione anche nella risonanza magnetica, se integrati con altri elementi quali ferro e manganese [13].

1.3 Teragnostica

Il termine teragnostica è stato coniato nel 2002 da Funkhouser, ed è definito come l'integrazione di due modalità, terapia e diagnosi, in un unico "pacchetto", in modo da superare i problemi causati dalla biodistribuzione e l'efficacia terapeutica che si avrebbero utilizzando diversi materiali [13]. Nonostante il termine inizialmente fosse centralizzato sulla terapia del cancro, oggi questo si espande anche ad altre patologie come diabete, disturbi neurologici e disturbi cardiovascolari.

La nano medicina si propone di utilizzare materiali con dimensioni submicrometriche in grado di migliorare la biodistribuzione dei farmaci, somministrati per via sistemica [22]. Alcuni esempi clinici sono rappresentati da formulazioni di polimeri, liposomi, micelle, nanoparticelle e anticorpi. Mediante la nanomedicina si riesce a trasportare gli agenti farmacologici in maniera più selettiva nel sito patologico, inoltre tali formulazioni possono essere utilizzate in modo soddisfacente anche per l'imaging. I materiali per poter essere utilizzati con successo devono quindi poter consentire di effettuare imaging e, essere in grado di incapsulare e rilasciare farmaci nel sito di interesse, in modo da avere anche una componente terapeutica [22].

Negli ultimi anni, i CDs stanno prendendo posizione in questo settore grazie alle loro proprietà, come l'elevata capacità di immagazzinare farmaci, l'elevata stabilità nei fluidi biologici, biocompatibilità e la possibilità di rilasciare farmaci in maniera controllata [23].

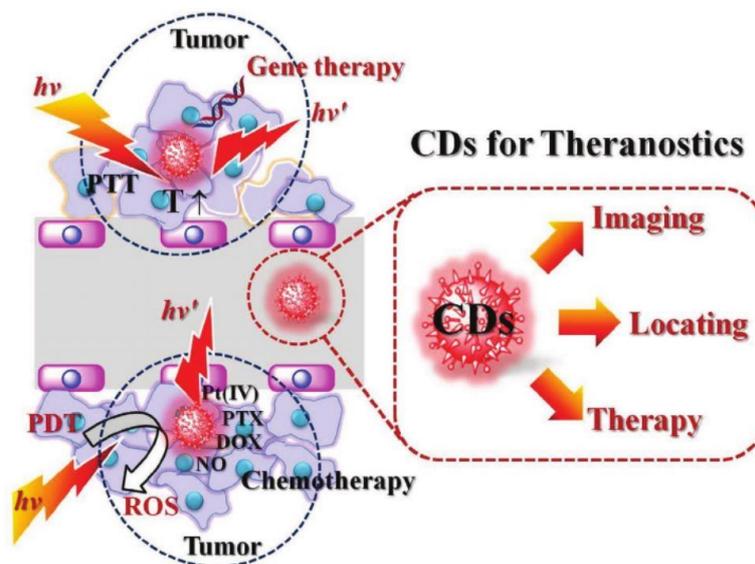


Figura 9: Applicazioni teranostiche dei CDs fonte [24]

Dato che la membrana cellulare è solitamente composta da un doppio strato lipidico con proteine contenute all'interno, è possibile utilizzare determinate proteine e ligandi come biomarkers in modo da distinguere cellule cancerogene da cellule sane [21]. Un esempio è dato dalla transferrina (Tr) una glicoproteina il cui recettore è sovra espresso sulla membrana delle cellule cancerogene. Nel 2010 Li et al. [24] riuscirono a coniugare dei CDs con un ligando della transferrina in modo da trasportare il CDs nel sito tumorale. Dal

momento che esistono svariati tipi di tumore, è necessario riuscire ad effettuare delle diagnosi il più precise possibili, sviluppando piattaforme specifiche per un determinato tumore [21].

Molti farmaci chemioterapici presentano dei problemi come ad esempio: scarsa biocompatibilità e dispersione in acqua; i CDs possono essere in grado di superare questi limiti legando tali farmaci mediante legami di tipo covalente [25]. Un esempio è dato dai farmaci a base di platino, usati nella forma Pt (IV). Nel loro lavoro Zheng et al [25], hanno sintetizzato dei CDs fluorescenti con dei gruppi amminici liberi, in grado di legare il farmaco mediante reazioni di condensazione, formando un complesso (Oxa-CD) che si è dimostrato utile per il trattamento di metastasi colon-rettale.

Un'altra tecnica utilizzata nei trattamenti di tumori è quella del gene-therapy che mira a inibire la crescita del tumore introducendo all'interno delle cellule tumorali dei geni tumore soppressori [21].

Per quanto riguarda le patologie cerebrali, (come ad esempio il Parkinson e l'Alzheimer), al giorno d'oggi risultano essere presenti poche metodologie di diagnosi e trattamento [26]. Un ostacolo è rappresentato dalla "Blood Brain Barrier" (BBB) che non consente il passaggio di sostanze e/o particelle. Questa barriera è formata da cellule endoteliali, microgliali, periciti astrociti e cellule muscolari lisce, tenute insieme a formare delle giunzioni strette mediante interazioni difficilmente scindibili [26]. Al giorno d'oggi si stanno studiando delle tecniche che utilizzano i CDs come vettori per il trasporto di farmaci, dal momento che questi risultano essere in grado di attraversare la BBB grazie alle loro ridotte dimensione e alla loro funzionalizzazione superficiale [27].

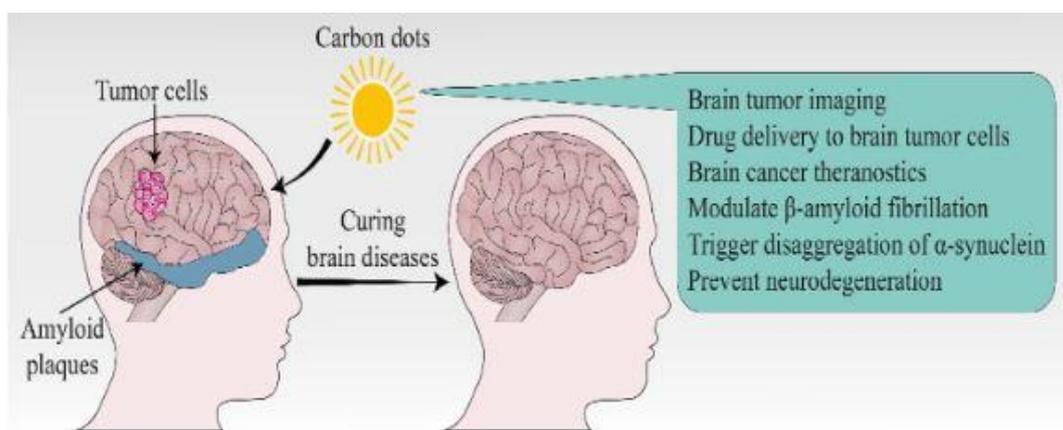


Figura 10: Utilizzo dei CDs in ambito cerebrale, fonte [26]

Nel loro lavoro, Li et al [28], hanno funzionalizzato dei CDs mediante tirosina (Tr) e si è osservato che il composto così formato fosse effettivamente in grado di attraversare la BBB. Per poter confermare ciò, i Tr-CDs sono stati funzionalizzati ulteriormente mediante una proteina fluorescente in grado di marcare i neuroni. Tale fluorescenza è stata effettivamente osservata, suggerendo quindi che il composto avesse attraversato con successo la BBB.

I CDs risultano essere anche un potente mezzo per l'imaging, dimostrandosi utili nella diagnosi precoce di disturbi cerebrali [26]. Questo è in parte dovuto alla loro biocompatibilità e bassa tossicità. Un esempio è dato dal lavoro di Yilin Du et al [29], dove polimeri ricoperti da CDs sono stati funzionalizzati con Gd^{3+} e utilizzati come mezzo di contrasto per l'imaging di glioma, mediante risonanza magnetica.

Grazie alla loro elevata capacità di assorbire energia nell'intervallo NIR, i CDs possono essere usati per poter fungere sia da mezzo di imaging che da mezzo di trattamento [26]. Questo è stato mostrato da Wang et al [24], i quali stati in grado di sintetizzare dei GQDs dopati mediante azoto e boro e, oltre all'elevata capacità di fungere da mezzo di imaging, è stato osservato come irraggiando tale composto mediante una lunghezza d'onda intorno alla finestra NIR, esso fosse in grado di rilasciare un elevato quantitativo di calore in grado di uccidere le cellule tumorali.

2. MATERIALI E METODI

I materiali utilizzati come precursori sono: acido citrico acquistato presso Amazon, urea acquistata presso Sigma Aldrich (Spagna), nanotubi al carbonio MWCNTs ($d = 10-35\text{nm}$, $\text{length} = 18-35\mu\text{m}$) di proprietà del Politecnico di Torino, glucosio, foglie del thè recuperate dopo la preparazione della bevanda: queste sono state successivamente seccate a 105°C per 72h e infine riscaldate a 1500°C . Inoltre, sono stati utilizzati anche surfattanti nella fabbricazione di particelle quali: polietilenglicole (PEG4000) acquistato presso Sigma Aldrich, sodio lauril solfato (SLS) acquistato presso Carlo Erba Reagents, acido laurico acquistato presso Sigma - Aldrich, polivinilpirrolidone (PVP) acquistato presso Alfa Aesar.

Altre sostanze utilizzate: acido nitrico acquistato e acido solforico acquistati presso Sigma – Aldrich, ossido di bismuto acquistato presso Fluka Analytical e bismuto nitrato acquistato presso MERCK.

Alcune reazioni sono avvenute all'interno di un reattore tubulare in vetro Pyrex, ad eccezione della CM07, che data l'elevata temperatura ha richiesto l'utilizzo di un reattore in quarzo. Altre reazioni sono avvenute all'interno di un forno. Le filtrazioni a vuoto sono state effettuate mediante l'utilizzo di una pompa, mentre le purificazioni sono state rese possibili grazie all'utilizzo di una membrana con cutoff pari a 1000 Da acquistata presso Aliexpress. Per alcune reazioni è stato utilizzato un sonicatore (Vibra Cell Sonicator) acquistato presso Sonics. Per poter accelerare alcuni processi di solubilizzazione si è utilizzato un vibratore ad ultrasuoni Elmasonic S15H. La piastra magnetica su cui sono state poste in agitazione alcune soluzioni è la Velp Scientifica.



Figura 11: Da sinistra verso destra: sonicatore e forno

Di seguito vengono riportati i procedimenti eseguiti al fine di ottenere i QGDs. I processi di essiccazione sono avvenuti all'interno di un forno mantenuto ad una temperatura di circa 80°C. Alcune reazioni, prevedono l'utilizzo del sonicatore, che è stato utilizzato con una "Amplitude" pari al 60%: quest'ultimo lavora attraverso cicli on off, impostati rispettivamente a 10 s e 5 s per evitare eccessivi surriscaldamenti delle soluzioni. Altre reazioni sono state eseguite dotando il sonicatore di una "microtip": in questo caso "Amplitude" è stato settato al 20% mentre i tempi di lavoro e di riposo sono rimasti invariati.

2.1 Particelle

Le particelle di Bismuto ossido (CM01) sono state sintetizzate a partire da circa 4g di $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: date le elevate dimensioni delle polveri è stato necessario utilizzare un pestello per renderle più omogenee e facilitare la futura solubilizzazione. A questo punto sono stati inseriti 25ml di H_2O e circa 1.5 ml di HNO_3 . La soluzione ottenuta è stata posta in rotazione su una piastra riscaldata a 90°C per 3 ore. Infine, è stata effettuata una filtrazione a vuoto e il materiale raccolto è stato inserito in un forno in modo da ottenere un composto solido.

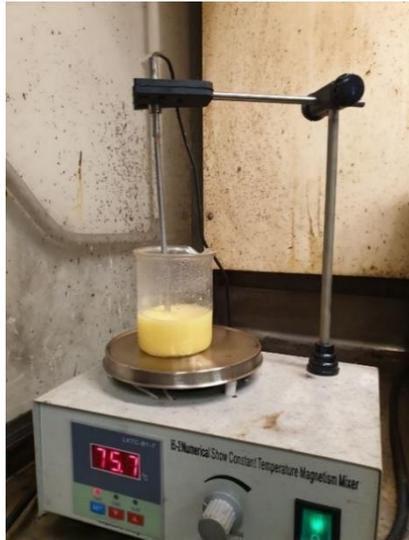


Figura 12: Sintesi di particelle di bismuto

Altre particelle sono state sintetizzate mediante l'utilizzo di quattro tensioattivi: PEG (CM03), PVP (CM04), SLS (CM05) e acido laurico (CM06). In questo caso, sono stati pesati 2g di $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, aggiunti 45ml di acqua e successivamente aggiunti 5ml di HNO_3 . Successivamente la soluzione è stata posta in agitazione a 80°C fino a quando il bismuto non si è completamente solubilizzato. Fatto ciò, si è quindi posta la soluzione su una piastra in agitazione non riscaldata ed è stata aggiunta soda caustica fino a quando il composto non è diventato basico (per verificare ciò, è stata utilizzata una cartina tornasole). Una volta avvenuta la solubilizzazione, è stato inserito il surfattante, in quantità pari al 5% in peso del Bi: questo passaggio è avvenuto a temperatura ambiente. La soluzione così ottenuta è stata messa in agitazione a 80°C per 3h. Infine è stata effettuata una filtrazione a vuoto e il tutto è stato messo in forno a seccare.

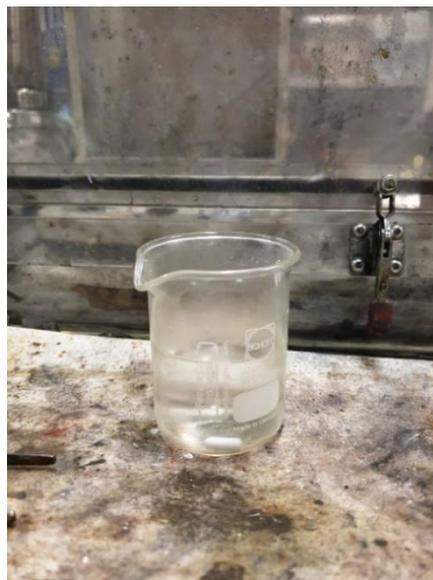


Figura 13: Da sinistra verso destra: Solubilizzazione del bismuto; bismuto solubilizzato, bismuto e surfattante in agitazione

CAMPIONE	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (ore)	TENSIOATTIVO
CM01	90°C	3	Nessuno
CM03	80°C	3	PEG
CM04	80°C	3	PVP
CM05	80°C	3	SLS
CM06	80°C	3	Acido laurico

Tabella 1: Sintesi delle particelle

2.2 Carbon Dots

I CDs sono stati prodotti a partire da diversi precursori. Uno dei primi precursori utilizzati è un composto sintetizzato a partire da acido citrico e urea (CM02). Sono stati pesati acido citrico e urea in egual quantità (circa 2g), poi sono stati aggiunti 50ml di acqua e il composto è stato sonicato per un'ora. Una volta eseguita una delle due operazioni, il prodotto è stato inserito in forno per essiccarlo. I CDs sono stati sintetizzati riscaldando tali precursori a diverse temperature per 30min: 1000°C (CM07), 800°C (CM09) e 550°C (CM10) in ambiente inerte utilizzando azoto



Figura 14: CD ottenuto dal riscaldamento del precursore per 30minuti a 550°C

Un altro precursore utilizzato è il glucosio. In questo caso sono stati pesati 8g di glucosio solido, successivamente scaldati nel forno per 30 min a 800°C (CM08). La reazione è avvenuta in ambiente inerte, utilizzando azoto.



Figura 15: Glucosio riscaldato a 800°C

CAMPIONE	PRECURSORE	T(°C)	t (min)	Peso iniziale (g)	Peso Finale (g)	Resa (%)
CM07	Acido citrico e urea	1000	30	4	0.239	6
CM08	Glucosio	800	30	8	0.600	8
CM09	Acido citrico e urea	800	30	4	0.380	10
CM10	Acido citrico e urea	500	30	4	0.673	17

Tabella 2: CDs prodotti in temperatura e relative rese

È possibile notare come i CDs abbiano delle rese piuttosto basse e che queste tendano a diminuire al salire della temperatura.

Dal momento che i GQDs ottenuti non risultavano solubili in acqua ma solamente poco sospensibili, si è deciso di operare un trattamento mediante miscela solfonitrica e una successiva purificazione tramite dialisi (CM07 PD, CM08 PD, CM09 PD, CM10 PD). Questi trattamenti hanno previsto l'utilizzo di 1ml di miscela acida composta da H_2SO_4 e HNO_3 in rapporto 1:3. Ogni campione è stato lasciato a contatto con 1ml di miscela solfonitrica per 2 giorni, successivamente è stata effettuata una sonicazione e una cottura nel reattore a 350°C per 20 minuti in ambiente inerte (reso possibile grazie alla presenza di azoto) per far decomporre la componente acida dal momento che l' HNO_3 si decompone a circa 83°C, mentre l' H_2SO_4 presenta una temperatura di decomposizione di circa 338°C [30].

Dal momento che post trattamento la sospensibilità in acqua dei campioni è effettivamente aumentata, è stato effettuato un processo di purificazione mediante dialisi, utilizzando membrane con cutoff pari a 1000 Da. Questo è stato effettuato dal momento che durante i processi di sintesi si formeranno delle molecole organiche a basso peso molecolare che rappresentano delle impurezze. Sono stati utilizzati 4ml di acqua distillata, ogni 100mg di campione; prima di inserire i campioni nella membrana, i composti sono stati trattati

mediante sonicazione ad ultrasuoni per 15 minuti per migliorarne la sospensibilità. Al termine della purificazione, i composti sono stati inseriti in forno ad essiccare.

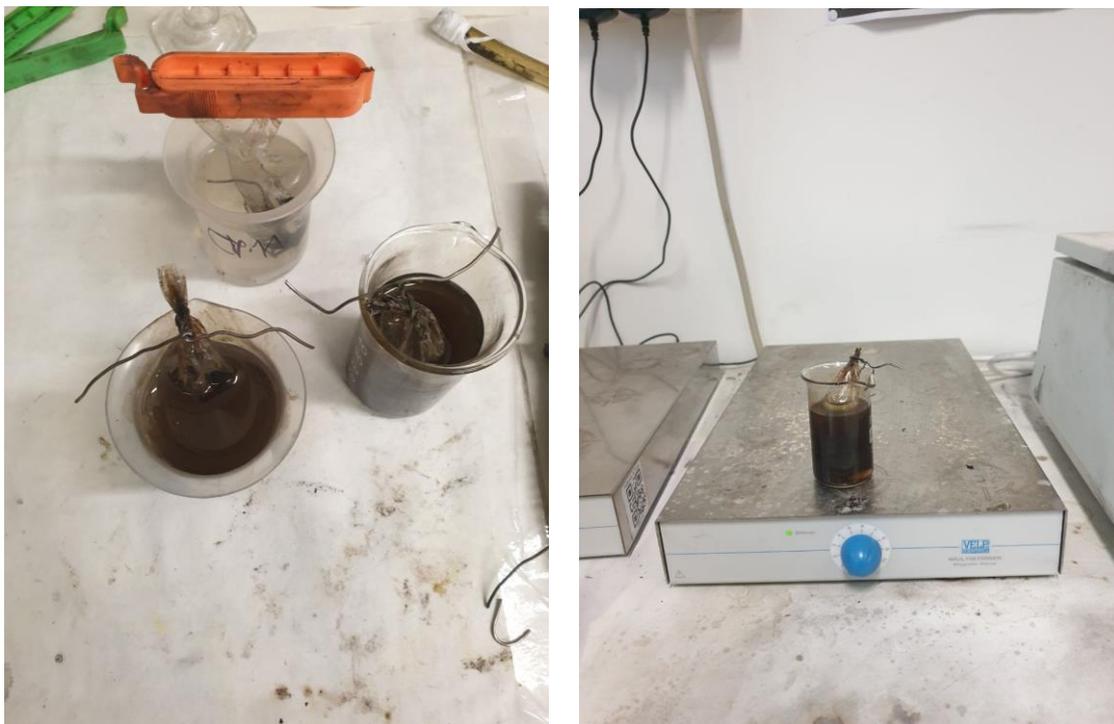


Figura 16: Esempio di preparazione dei campioni per la dialisi

Oltre agli approcci bottom up, sono stati eseguiti degli approcci top down. Uno di questi prevedeva l'utilizzo di 100mg di nanotubi al carbonio (CM11) di tipo multiwall (MWCNTs) messi a contatto con la miscela solfonitrica per due giorni. Successivamente il composto è stato sonicato per 1 ora dotando il sonicatore di "micro tips"; infine il tutto è stato riscaldato a 350°C per 20 minuti in modo da far evaporare la componente acida. Tale riscaldamento è avvenuto in ambiente inerte, utilizzando azoto. La medesima operazione è stata eseguita utilizzando 300mg di foglie del tè precedentemente riscaldate a 1500°C (CM16).

Infine, anche in questo caso è stato eseguito un processo di purificazione mediante dialisi. I CDs risultano altamente sospensibili in acqua grazie all'attività della miscela solfonitrica, quindi è stato possibile operare anche questa volta un processo di purificazione. I CDs sono stati sospesi in 2ml di H₂O distillata ogni 100 mg di materiale, utilizzando anche questa volta una sonicazione ad ultrasuoni per 15 minuti in modo da migliorare la sospensibilità. Il tutto è stato lasciato in agitazione su una piastra magnetica per due giorni, cambiando l'acqua dei becker ogni 24h. Una volta recuperati i materiali purificati, questi sono stati messi in forno ad essiccare.

CAMPIONE	Peso iniziale (g)	Peso finale (g)	Resa(%)
CM11	0.1	0.035	35
CM16	0.3	0.05	16

Tabella 3: Rese campioni sintetizzati con metodo top down, dopo le purificazioni

2.3 Coniugazioni

È stato eseguito un processo di coniugazione tra i CDs che hanno mostrato miglior sospensibilità in acqua, ovvero quelli prodotti a partire da glucosio, con le particelle prodotte con i diversi tensioattivi. Le coniugazioni sono state eseguite disperdendo in 25ml di H₂O distillata, 50mg di CM08 e 50mg di particelle, effettuando successivamente una sonicazione per 15 minuti in modo da ottenere una soluzione omogenea. Infine, la soluzione è stata messa in agitazione nella piastra magnetica per un giorno. Al termine di ciò, si è eseguita una filtrazione a vuoto e poi il materiale recuperato è stato inserito in forno a seccare (CM12, CM13, CM14, CM15)



Figura 17: CM12 post agitazione su piastra

CAMPIONE	PRECURSORE CDs	TENSIOATTIVO PARTICELLA
CM12	Glucosio	PEG
CM13	Glucosio	PVP
CM14	Glucosio	SLS
CM15	Glucosio	Acido laurico

Tabella 4: Riepilogo coniugazioni

3. ANALISI E DISCUSSIONE DEI RISULTATI

I composti sono stati analizzati mediante spettroscopia Raman, spettroscopia a infrarossi IR, analisi in fluorescenza e microscopio a scansione elettronica FE - SEM. Gli spettri ottenuti sono stati elaborati mediante il software Origin Pro, mentre le schematizzazioni delle formule chimiche coinvolte nei diversi processi di reazione sono state realizzate mediante il software ChemDraw.

3.1 Particelle di bismuto

Le particelle di Bi_2O_3 sono state fabbricate sfruttando la seguente reazione, la cui peculiarità è il fatto che permette di ottenere le particelle alla temperatura di 80°C invece che a 500°C [31].

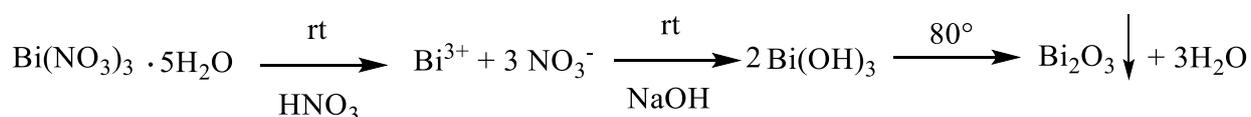


Figura 18: Reazione di formazione di Bi_2O_3

Il precursore iniziale è il bismuto nitrato pentaidrato, che viene mandato in soluzione a temperatura ambiente grazie all'ambiente acido generato dall'acido nitrico dal momento che esso risulta essere poco solubile in acqua. Procedendo a temperatura ambiente, si aggiunge NaOH in modo da avere un ambiente basico e consentire la formazione di idrossido di bismuto. Continuando a riscaldare a 80°C e ponendo in agitazione, il Bi_2O_3 precipiterà in soluzione. Le particelle di bismuto sono state fabbricate anche introducendo i quattro diversi tensioattivi, divisi in due tipi:

- Tensioattivi ionici: in soluzione si dissociano, appartengono a questa categoria SLS e acido laurico. In questo caso, essi dissociandosi formeranno micelle che esporranno alla fase acquosa le teste polari. Entrambi i tensioattivi sono anionici.
- Tensioattivi non ionici: in soluzione non si dissociano, appartengono a questa categoria PEG e PVP; essi svolgono la propria funzione attraverso l'ingombro sterico.

I tensioattivi andranno aggiunti alla soluzione poco prima dello stadio 3, per evitare di avere delle particelle aggregate durante il loro inserimento. Il meccanismo di accrescimento delle particelle è di tipo layer by layer [32]: inizialmente si ha la formazione di microfogli che successivamente si auto assembleranno; il ruolo del tensioattivo sarà quello di andare a fornire una direzione di accrescimento ai microfogli, in modo da ottenere una struttura triangolare. Una volta ottenuta questa morfologia, essa fungerà da seme per l'accrescimento di un'altra struttura triangolare più piccola; il processo proseguirà fino alla formazione del tetraedro come illustrato in fig.19 Il tensioattivo inoltre ha il compito di tagliare la dimensione delle particelle, evitandone l'aggregazione.

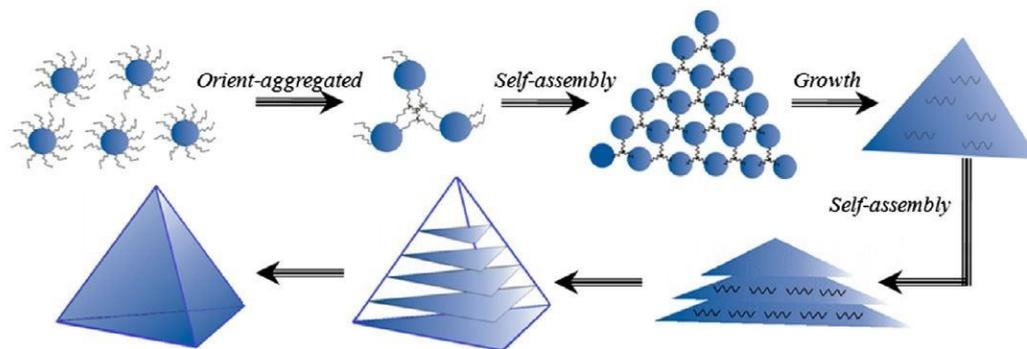


Figura 19: Meccanismo di accrescimento delle particelle, fonte [27]

3.1.1 FE-SEM

La morfologia delle particelle è stata analizzata mediante microscopia a scansione elettronica FE-SEM

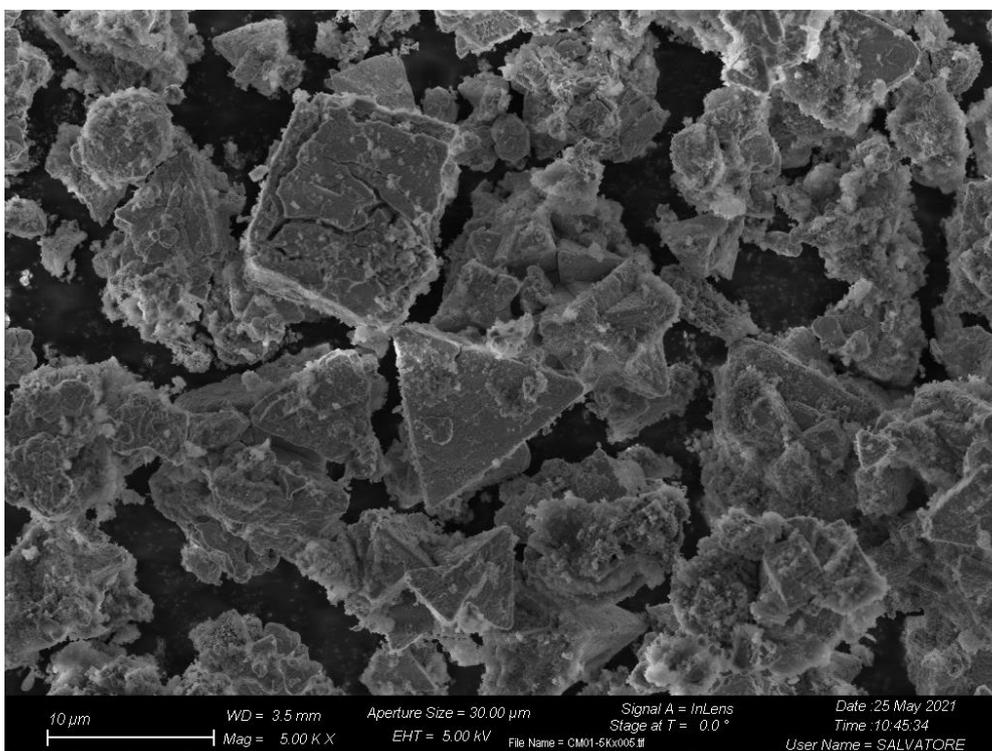


Figura 20: Particelle di bismuto senza tensioattivo

La fig.20 mostra delle particelle di Bi_2O_3 in fase γ [32] in cui non è stato inserito il tensioattivo. È possibile notare come le particelle presentino una dimensione micrometrica, inoltre la geometria non risulta essere uniforme, dato che oltre alla morfologia tetraedrica è possibile osservare anche una forma cubica. Molte particelle sembrano essere aggregate tra loro non mostrando quindi una morfologia ben definita. La mancanza di tensioattivo ha consentito alle particelle di aggregarsi, inoltre non essendoci una direzione preferenziale di crescita, le geometrie non sono uniformi.

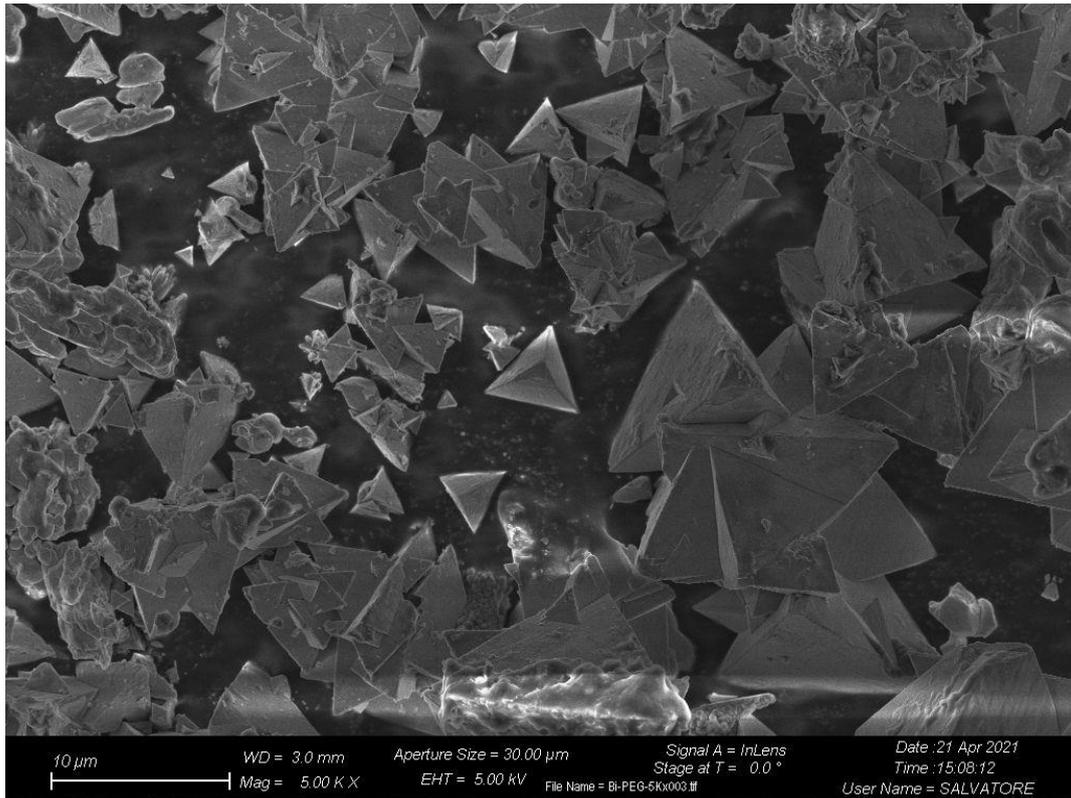


Figura 21: Particelle di Bismuto con tensioattivo PEG

Diversa è la situazione quando si utilizza un surfattante. Sia il PEG fig. 21 che il PVP fig. 22, mostrano come le particelle si organizzino secondo una struttura di tipo tetraedrico. Secondo questi risultati quindi possiamo concludere che tali surfattanti riescono a decomporsi in soluzione formando delle micelle, che andranno ad interagire con le particelle stesse, impedendo loro di aggregarsi e di aumentare le loro dimensioni e al contempo promuovendone la crescita regolare. I due tensioattivi inoltre hanno funto da seme, fornendo alle particelle una direzione preferenziale di accrescimento. Nel caso si volesse continuare a ridurre le dimensioni delle particelle in modo da arrivare a dimensioni nanometriche, si potrebbe aumentare la percentuale in peso del tensioattivo, oppure aumentare la temperatura alla quale condurre la reazione.

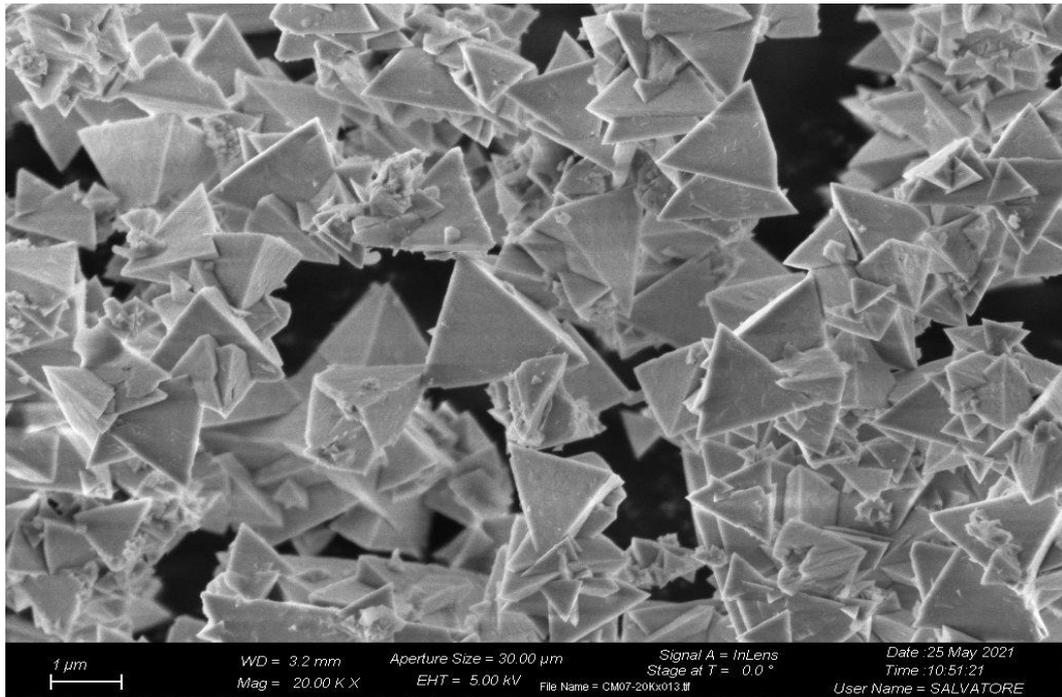


Figura 22: Particelle di Bismuto con tensioattivo SLS

Diverso è il caso dell'acido laurico e del PVP, che hanno prodotto i risultati peggiori, come mostrato nelle fig.23,24:

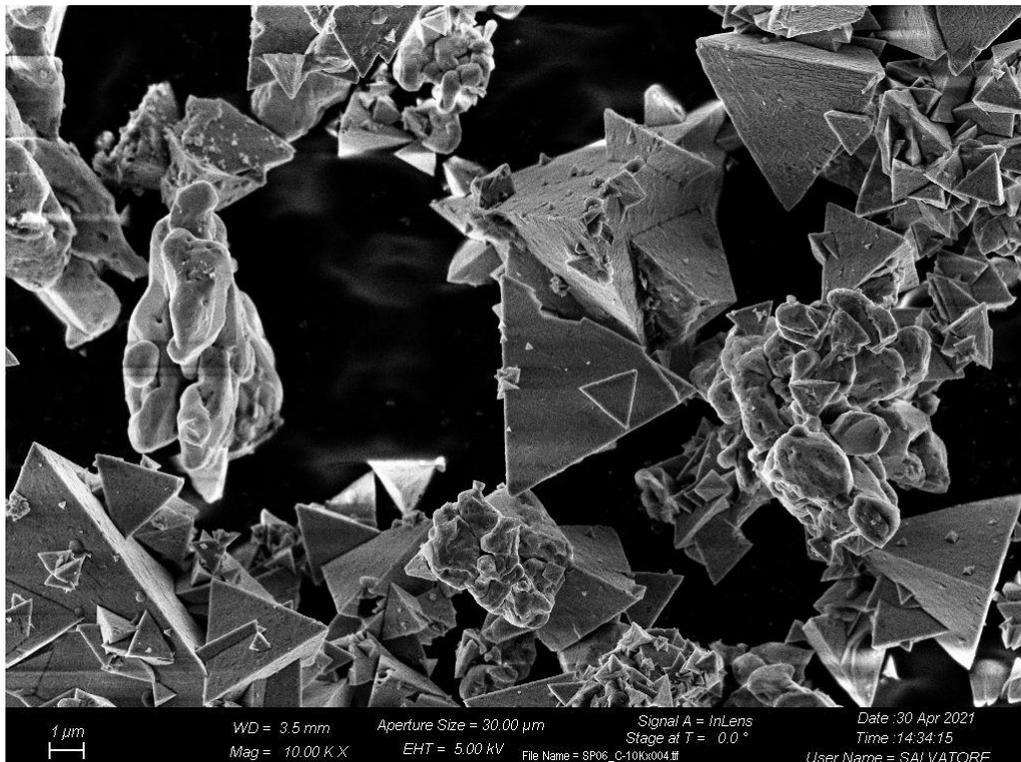


Figura 23: Particelle di Bismuto con tensioattivo PVP

La fig.23 mostra la morfologia delle particelle prodotte utilizzando il PVP come tensioattivo. Data la morfologia abbastanza disordinata delle particelle, possiamo concludere che il surfattante non si è disciolto abbastanza in acqua e non è stato quindi in grado di andare a generare le micelle che dovranno interpersi tra

le particelle, fornendo la direzione preferenziale di crescita. È possibile anche notare che alcune particelle risultano aggregate tra loro a dimostrazione dello scarso effetto del tensioattivo.

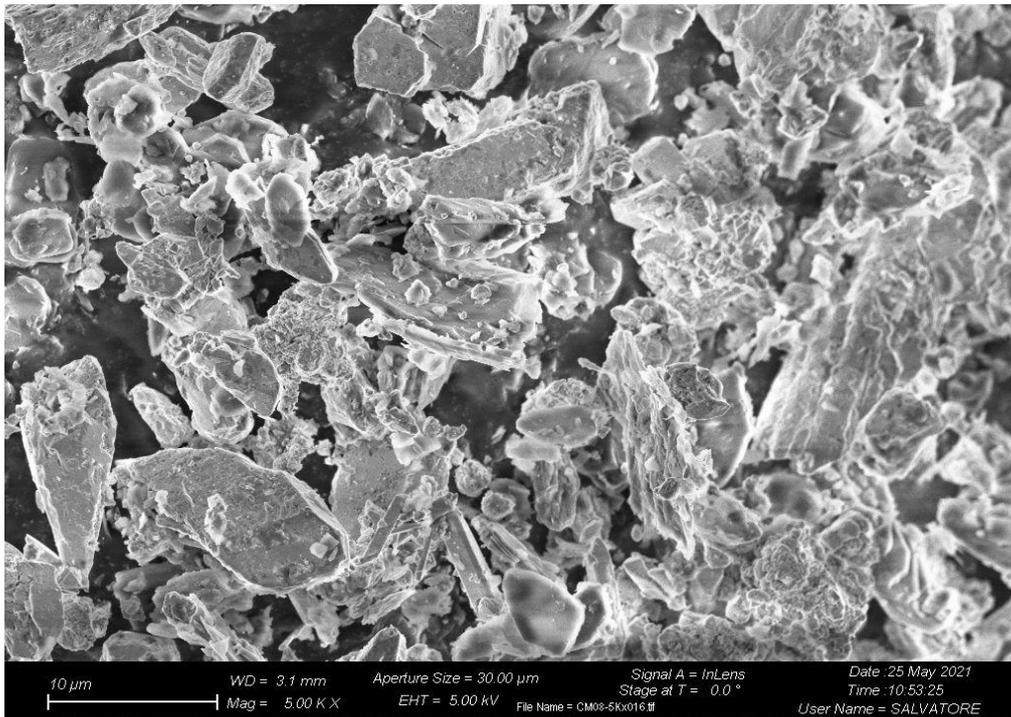


Figura 24: Particelle di Bismuto con tensioattivo acido laurico

L'acido laurico in fig.24 sembra fornire invece i risultati peggiori, dal momento che le particelle presentano diverse geometrie e sembra essere presente un elevato grado di aggregazione. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che l'acido laurico non si dissocia in ambiente basico, non si avrà quindi una sua strutturazione in micelle, di conseguenza non riesce ad esplicare la sua funzione.

Tutte le particelle analizzate presentano dimensione micrometrica, questo si rivela utile nel caso di approcci in vivo, dal momento che viste le loro dimensioni si riuscirebbe ad evitare il loro ingresso all'interno delle cellule o il loro attraversamento della barriera ematoencefalica, dove il rilascio di specie ossidanti potrebbe causare problemi.

3.1.2 Raman

La spettroscopia Raman è stata utilizzata per poter investigare la struttura dei composti a livello del core.

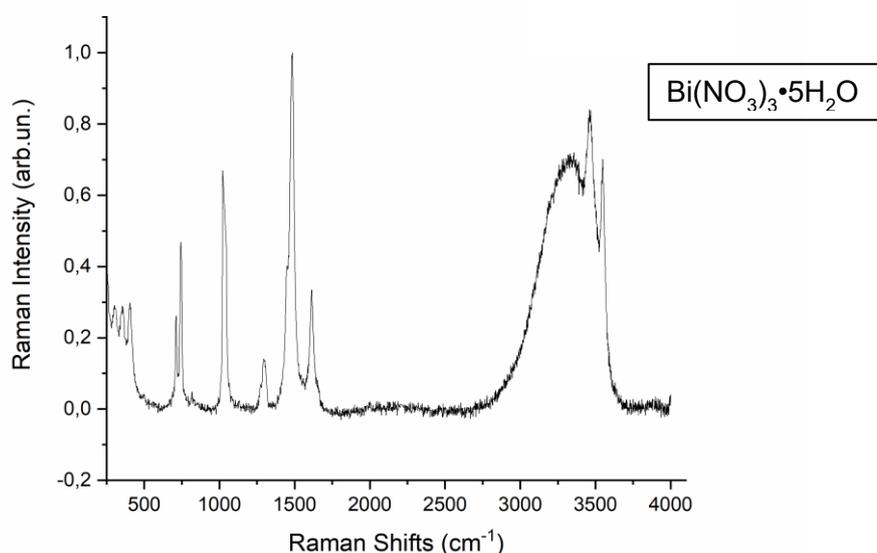


Figura 25: Spettro Raman $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Dal momento che il precursore delle particelle è stato il $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ possiamo ad analizzare il suo spettro, visibile in fig. 25. È possibile osservare dei picchi presenti intorno a circa 1000 cm^{-1} (ν simmetrico) e 1500 cm^{-1} (ν antisimmetrico) relativi a NO_3^- . Il composto è un pentaidrato e questo trova riscontro nel picco osservabile nella regione tra 3000 e 3500 cm^{-1} essendo tale intervallo solitamente attribuito alla presenza di acqua. I picchi del bismuto solitamente si trovano tra i 200 e i 300 cm^{-1} , come è osservabile anche nello spettro in figura.

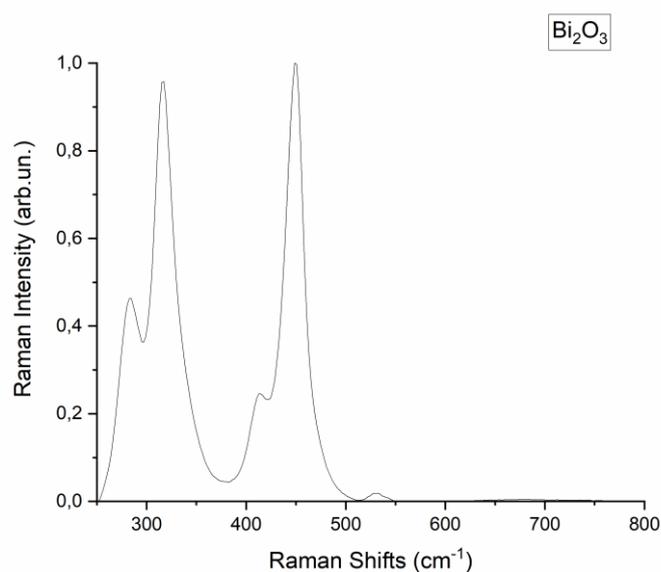


Figura 26: Spettro Raman Bi_2O_3

Nella fig.26 è invece possibile osservare lo spettro Raman del Bi_2O_3 componente delle particelle finali. Possiamo notare come i picchi relativi al nitrato, presenti oltre i 1000 cm^{-1} , siano spariti, mentre il picco presente a 317 cm^{-1} è caratteristico degli $\nu\text{ Bi-O}$. Il materiale è stato fabbricato dalla precipitazione di particelle in soluzione e inoltre ha subito un trattamento di essiccazione: notiamo come effettivamente non siano più presenti picchi relativi alla presenza di acqua oltre la banda dei 3000 cm^{-1} (il segnale presenta componenti utili solo fino a circa 800 cm^{-1}). In definitiva, tutti i picchi oltre i 1000 cm^{-1} sono scomparsi, segno del fatto che si è arrivati ad ottenere una struttura diversa, tetraedrica dal momento che il bismuto post reazione si trova in fase γ . Alcuni dei picchi osservabili, sono tipici della fase gamma, come ad esempio il picco a circa 280 cm^{-1} , 320 cm^{-1} e il piccolo picco osservabile a circa 530 cm^{-1} [32] [33].

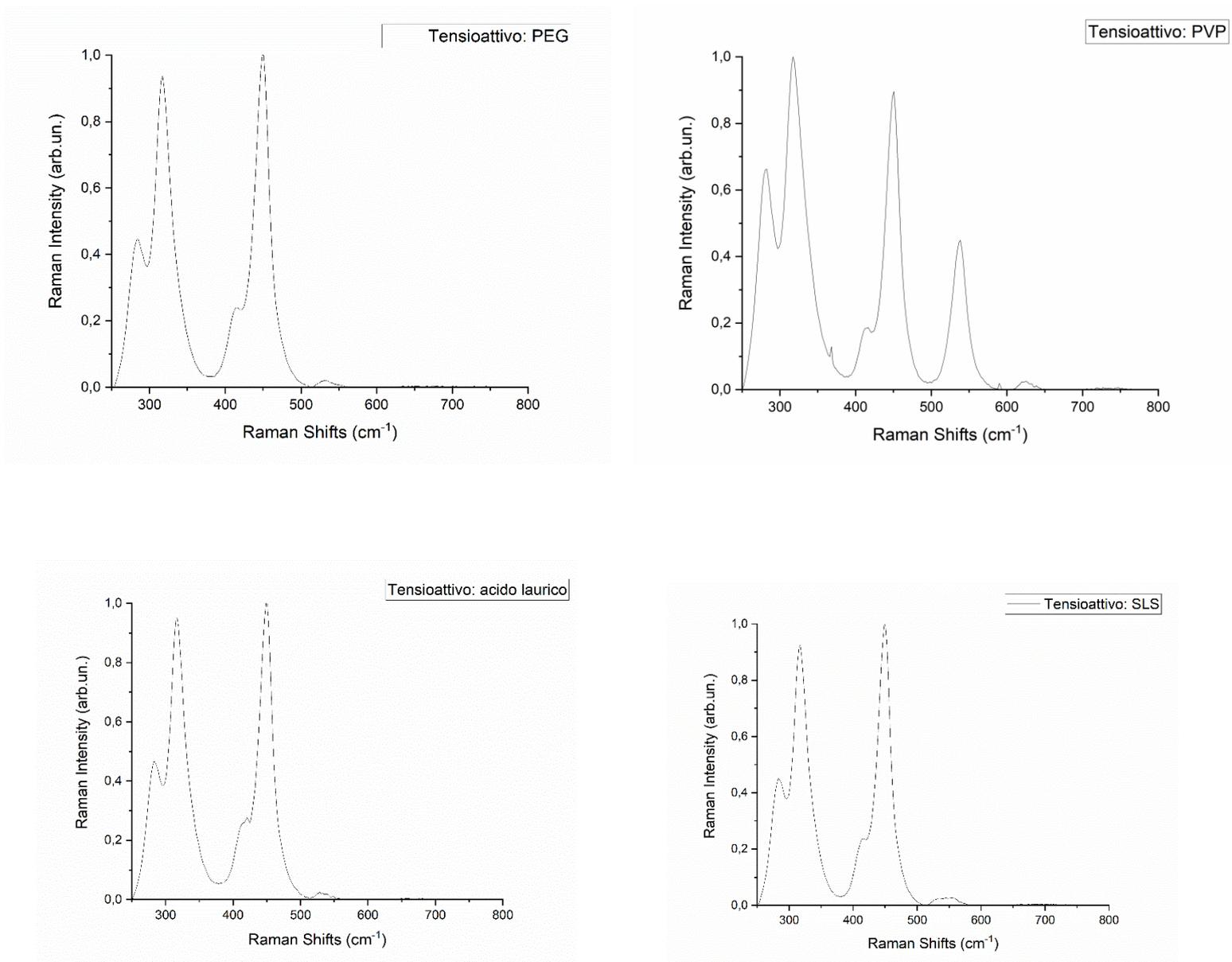


Figura 27: Raman particelle fabbricate con i 4 diversi tensioattivi

Nella fig.27 sono presentati i Raman delle particelle fabbricate utilizzando i quattro diversi tensioattivi. Possiamo notare come le particelle presentino lo stesso spettro osservabile nella fig.26, segno del fatto che i tensioattivi non hanno intaccato il meccanismo di reazione.

3.1.3 IR

L'analisi IR è stata condotta per poter andare ad investigare la superficie dei composti per individuare i gruppi superficiali presenti in modo da poter capire che tipo di reazioni sono avvenute tra i precursori durante la formazione dei composti.

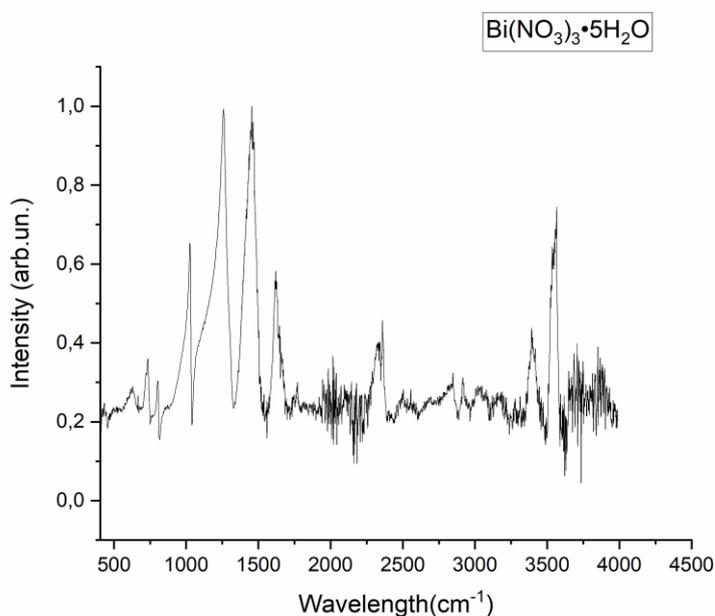


Figura 28: Spettro IR $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

In fig.28 possiamo osservare lo spettro del precursore da cui sono state ottenute le particelle. Intorno ai 1500 cm^{-1} è possibile osservare lo ν N-O, mentre intorno ai 3500 cm^{-1} è possibile osservare il segnale proveniente dallo ν OH dell'acqua.

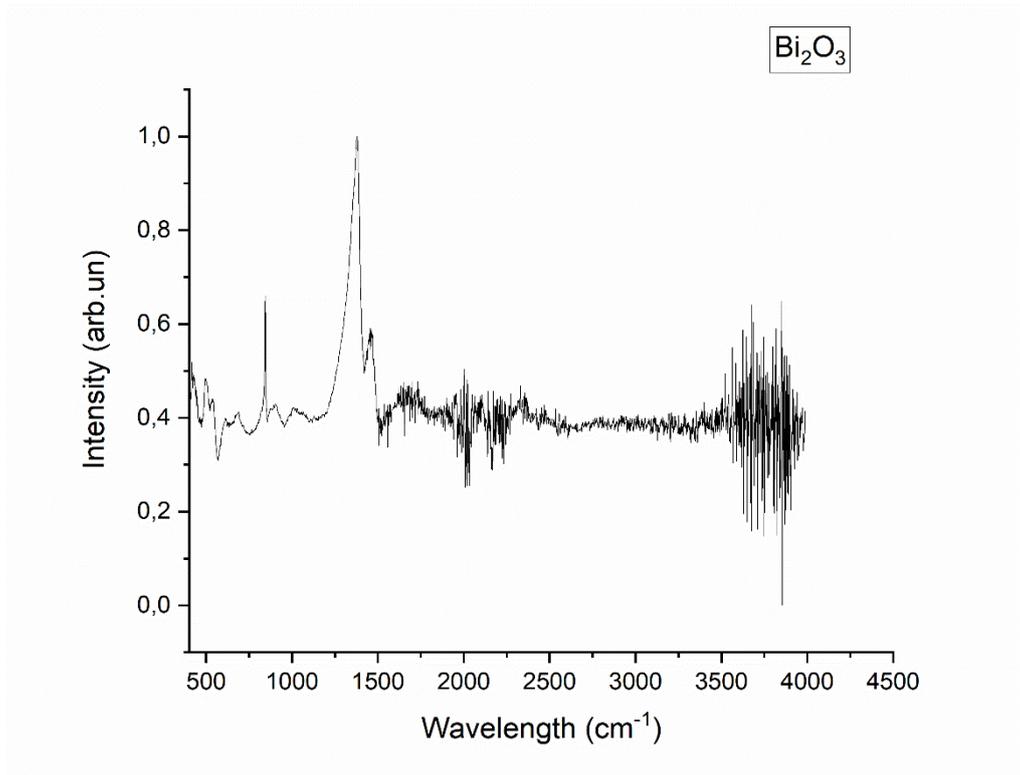


Figura 29: Spettro IR particella Bi_2O_3

Osservando lo spettro della di Bi_2O_3 , è possibile osservare l'assenza della banda tra i 3100 e 3500 cm^{-1} dovute allo ν OH indice del fatto che il materiale è stato seccato correttamente; è presente un picco intorno ai 1300 - 1500 cm^{-1} caratteristico del gruppo NO_3^- [34], mentre i piccoli picchi visibili intorno ai 500 - 800 cm^{-1} potrebbero essere dovuti allo ν Bi-O [35].

3.2 Carbon Dots

I CDs, sono stati prodotti mediante diverse preparazioni, di conseguenza anche il meccanismo di formazione è diverso. I carbon dots sintetizzati a partire da acido citrico e urea sono stati trattati a diverse temperature 550 , 800 e 1000 °C . Il lavoro, si basa sull'articolo di Mintz et al [36], di seguito viene presentato il processo di formazione:

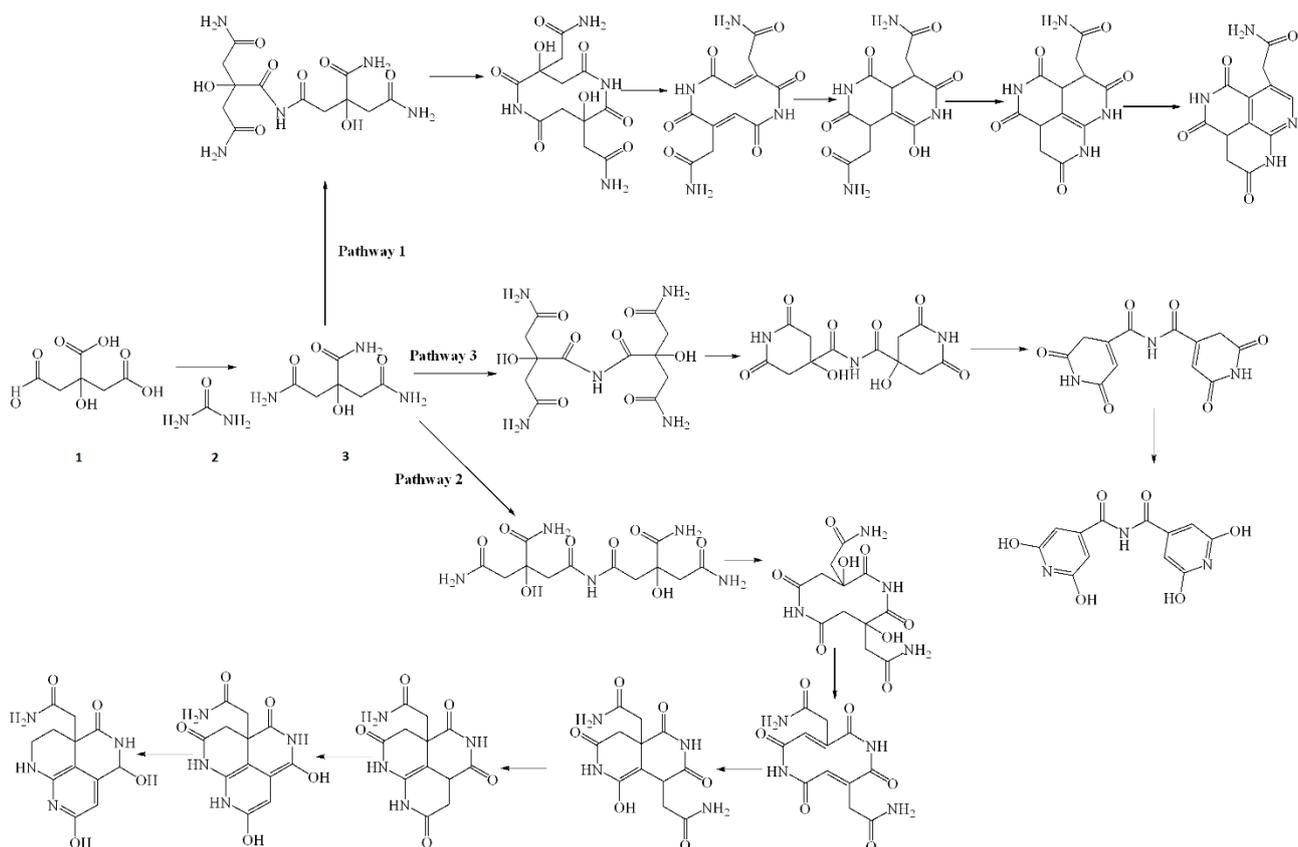


Figura 30: Processo di formazione del precursore dei CDs, fonte [36]

Acido citrico (1) e urea (2) reagendo formano un dimero (3), il quale sarà un composto intermedio che successivamente può seguire diversi percorsi di reazione e stabilizzarsi in una determinata struttura ciclica. L'obiettivo è quello di "bloccare" una delle strutture mediante la sonicazione dei composti e successivamente riscaldare il composto stesso. Tali composti finali presenteranno strutture complesse, presentanti diverse funzionalità: carbossiliche, amidiche e aminiche. Dal momento che acido citrico e urea si decompongono a diverse temperature (246°C per quanto riguarda l'acido citrico e 131°C per quanto riguarda l'urea), è fondamentale che per il riscaldamento venga evitata una rampa di temperatura, ed è per questo che il forno è stato pre-riscaldato fino alla temperatura desiderata. L'obiettivo è quello di fare in modo che le strutture intermedie si decompongano e si ricombinino, ottenendo una struttura carboniosa presentate un doping a base di azoto. La struttura finale ipotizzata da Mintz et al. è osservabile in fig.31: si avrà la presenza di piani carbonio sp^2 e altri piani triazinici con diversi gruppi funzionali disposti attorno al perimetro.

Nel momento in cui la molecola di glucosio viene scaldata, essa comincerà a perdere diversi gruppi OH con conseguente rilascio di molecole H_2O , mediante processi di condensazione (1). Si formeranno degli anelli aromatici e si instaurerà quindi un equilibrio tra le specie enoliche appena formatesi e le rispettive forme chetoniche (2). Col proseguimento del meccanismo di reazione avverranno delle condensazioni aldoliche (3), con la formazione di piani grafittici e di uno shell ricco di funzionalità ossidriliche e carbossiliche. Riscaldando a temperature più elevate, tale struttura evolverà, si otterrà un core di tipo grafittico con ossigeno come dopante.

Altri carbon dots sono stati prodotti a partire da MWCNTs e foglie del thè. Questi precursori sono stati trattati mediante una miscela solfonitrica come descritto nel capitolo 2 in modo da osservare che tipo di strutture carboniose si potessero ottenere. Nella fig. 33 viene illustrato il meccanismo di azione della miscela stessa:

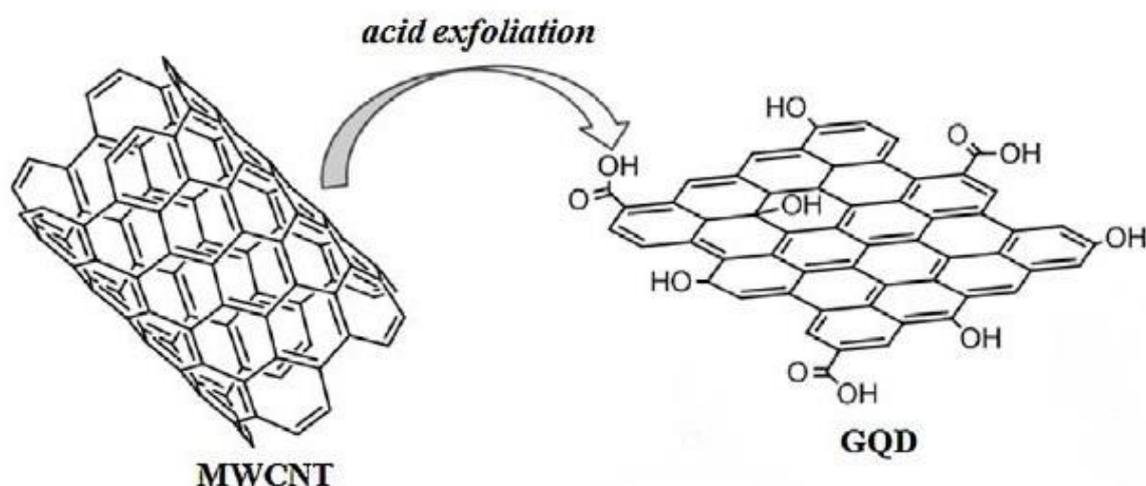


Figura 33: Meccanismo di azione della miscela solfonitrica fonte [29]

La miscela solfonitrica va ad attaccare la superficie del precursore scelto, andando a spezzare i legami C-C [37] (nel caso dei MWCNTs la miscela va ad “aprire” il tubo). Inoltre, essa effettua dei trattamenti di passivazione sulle superfici stesse, che consente di formare sulla superficie dei campioni, dei gruppi OH, che si riveleranno fondamentali per la solubilità del composto. Solitamente il primo step del processo è un attacco ad alcuni difetti presenti sui MWCNTs in modo da generare gruppi carbossilici, carbonili e nuovi difetti [38]. I nuovi difetti renderanno la struttura ancora più attaccabile dagli agenti ossidanti, generando altri gruppi carbossilici e carbonilici. Col passare del tempo, la struttura viene divisa in frammenti grafittici. Il riscaldamento ad alta temperatura, oltre a far decomporre la componente acida, consente di ottenere delle particelle più piccole. Dal momento che la miscela solfonitrica è in grado di passivare le superfici dei CDs, essa è stata sfruttata per poter rendere i CDs descritti precedentemente maggiormente sospensibili in acqua. Infatti, il fatto che le strutture siano grafittiche implica la presenza di numerosi legami carbonio-carbonio, il

quale non consente la solubilità del composto in acqua. Grazie ai processi di passivazione della miscela solfonitrica, è stato possibile rendere maggiormente sospensibili in acqua i campioni, di conseguenza, questi hanno potuto subire un processo di purificazione mediante dialisi, in modo da separare le componenti aventi dimensione maggiore rispetto al cutoff della membrana semipermeabile, da quelle con dimensioni minori. Il processo avviene utilizzando acqua distillata come buffer e sfruttando la pressione osmotica: i composti tenderanno a migrare dalle zone a concentrazioni maggiori verso quelle a concentrazioni minori, fino a giungere ad un equilibrio. Dopo il trattamento con miscela solfonitrica, i campioni hanno effettivamente mostrato un aumento della sospensibilità in acqua.

3.2.1 FE-SEM

In fig.34 possiamo osservare un'immagine FE-SEM del composto prodotto dalla combustione del precursore a base di acido citrico e urea a 1000°C.

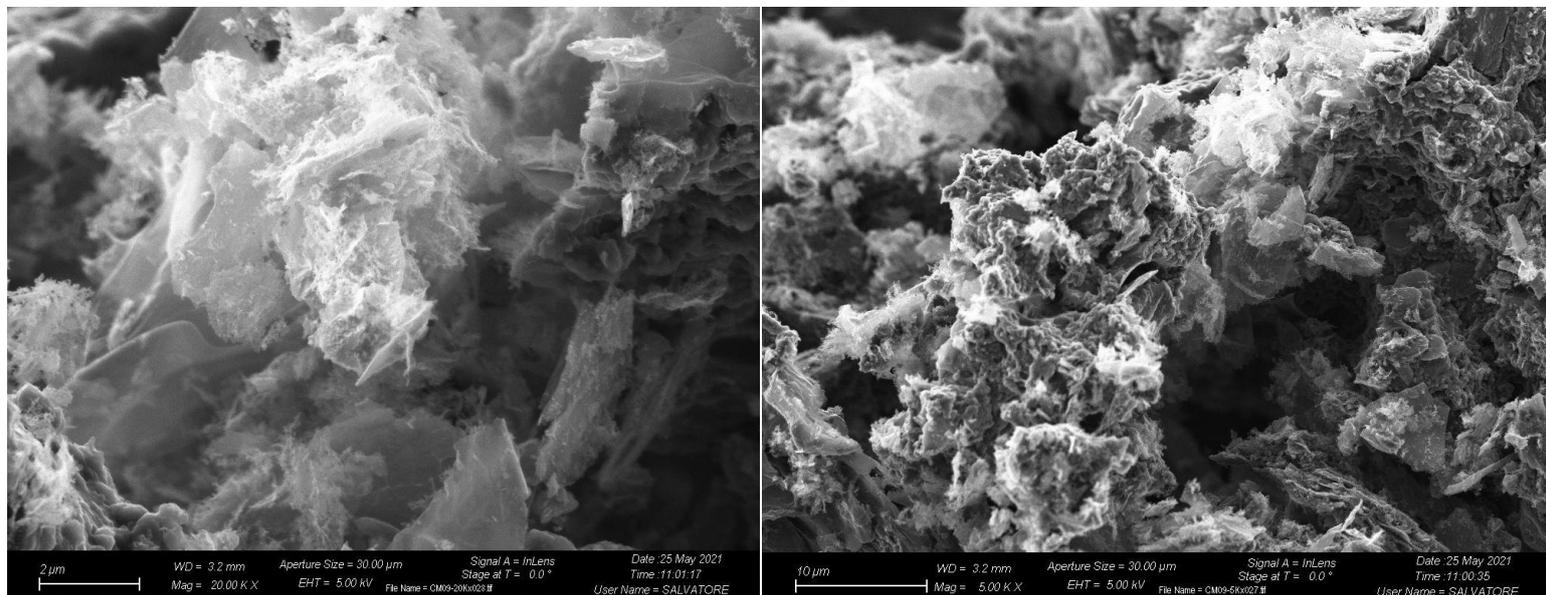


Figura 34: FE-SEM CDs prodotti a 1000°C

È possibile osservare delle strutture lamellari (le regioni più ricche nelle zone ad alto contrasto), associabili a pochi layers di grafite, le quali si disperderanno una volta sonicate in strutture submicrometriche e nanometriche, ovvero i CDs.

3.2.2 IR

Nella figura sottostante è possibile osservare lo spettro IR dei precursori acido citrico e urea:

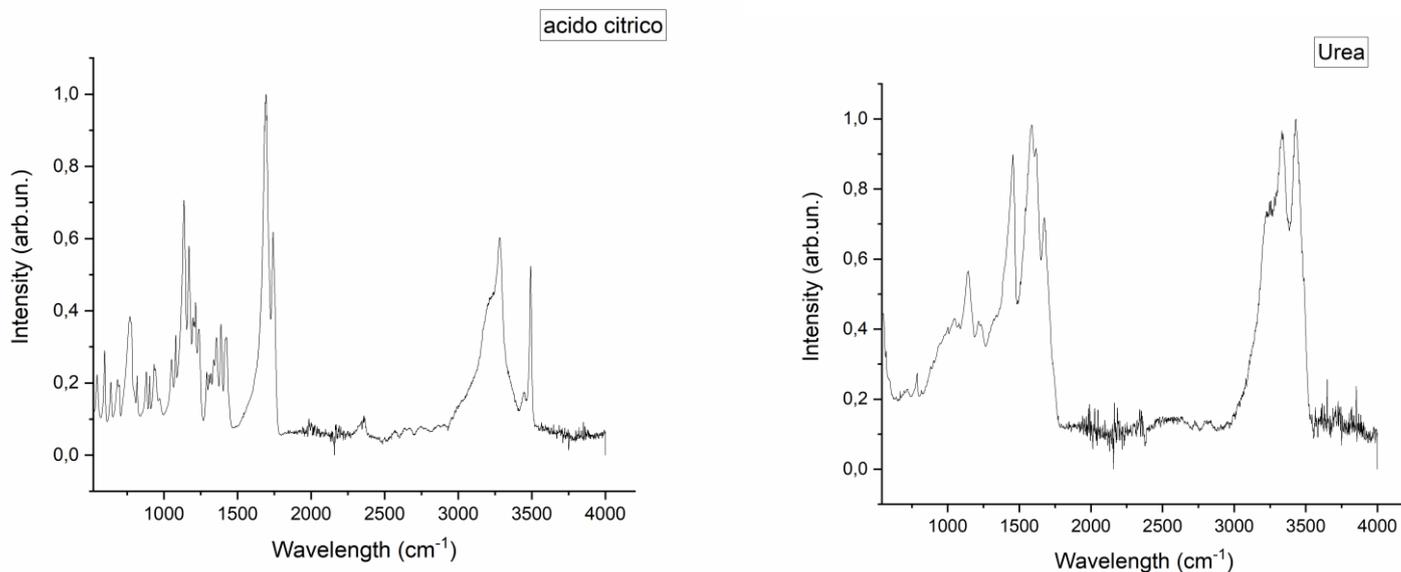


Figura 35: A destra: spettro IR acido citrico, a sinistra: spettro IR urea

L'acido citrico presenta una banda intorno ai 3500 cm^{-1} dovuto allo ν OH dei gruppi carbossilici. Il picco a 1700 cm^{-1} è relativo allo ν C=O mentre la banda visibile intorno ai 1400 cm^{-1} è relativa allo ν dei gruppi CO [39]. Per quanto riguarda l'urea invece, osserviamo anche in questo caso una banda intensa compresa tra 3000 e 3500 cm^{-1} attribuibile allo ν dei gruppi NH_2 , mentre la banda presente intorno ai 1500 cm^{-1} è imputabile allo ν C=O.

La figura sottostante consente di analizzare l'IR di un altro precursore, il glucosio:

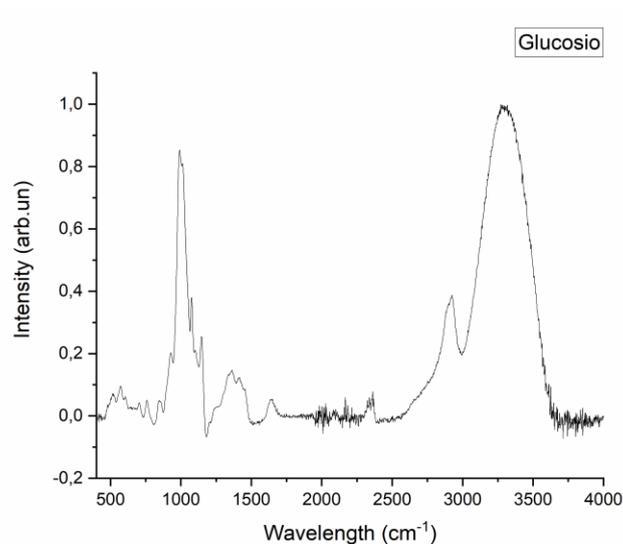


Figura 36: Spettro IR glucosio

Analizzando lo spettro IR del glucosio: notiamo i picchi tra 3000 e 3500 cm^{-1} che sono attribuiti allo ν OH, è possibile osservare un picco intorno ai 2800-2900 cm^{-1} relativo allo ν CH, mentre la banda visibile intorno ai 1000 cm^{-1} è attribuito ai δ C-C e C-O.

Un altro precursore utilizzato sono le foglie del tè, qui è possibile osservare il loro IR prima e dopo il riscaldamento a 1500°C:

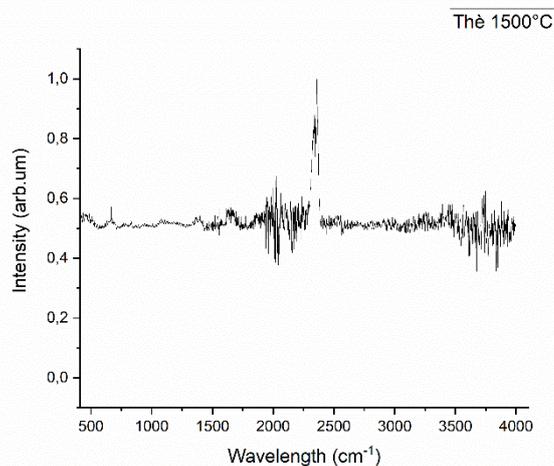
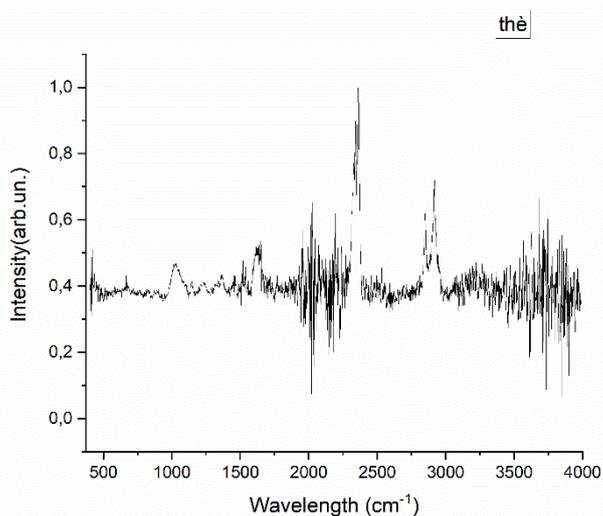


Figura 37: A sinistra: Spettro IR foglie del tè, a destra: Spettro IR delle foglie riscaldate a 1500°C

Nel primo caso è possibile notare un ν C-H nella regione tra 2800 e 3000 cm^{-1} , inoltre sono presenti delle piccole bande intorno ai 1100 cm^{-1} , riferiti a δ C-O-C, mentre la banda a 1600 cm^{-1} potrebbe essere dovuta a residui di tipo carbonilico. Dopo l'annealing a 1500°C notiamo che queste bande non sono più visibili, dal momento che avrò una struttura a base di carbonio che non consente di ottenere spettri analizzabili all'IR. Il trattamento in temperatura ha quindi eliminato le molecole presenti sulla superficie.

Dal momento che i materiali prodotti sono altamente carboniosi, lo spettro IR risulta essere molto disturbato e non fornisce informazioni utili a caratterizzare i composti, come è possibile notare nella fig.38.

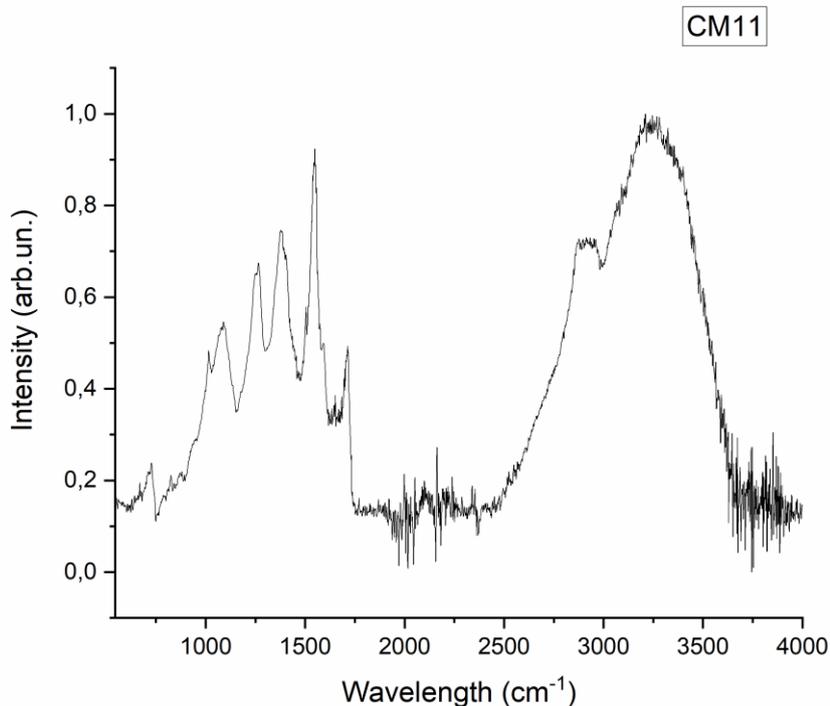


Figura 38: IR CDs prodotto a 1000°C

È possibile osservare la banda intorno ai 1500 cm⁻¹ relativa allo ν C=C e, l'enorme banda nell'intervallo 2800-3600 cm⁻¹, attribuibile agli ν CH NH e OH. La banda intorno ai 1200 cm⁻¹ relativa allo ν C-C, dal momento che i materiali sono grafitici. Visto comunque l'elevato grado di disturbo, risulta difficile reperire informazioni dagli spettri IR, di conseguenza, non verranno presentati gli spettri IR degli altri composti prodotti.

3.2.3 Raman

Tutti i CDs prodotti sono osservabili al Raman, consentendone quindi una caratterizzazione. Tutti gli spettri sono stati normalizzati rispetto al loro valore massimo. Sono state effettuate osservazioni su posizioni dei picchi D e picchi G, il valore del rapporto I_D/I_G , in modo da poter verificare se il core dei materiali fosse effettivamente grafitico. Tali analisi sono state condotte seguendo il modello di Ferrari et al [40], osservabile nella fig.39. Esso descrive una curva di amorfizzazione del materiale, in relazione al valore di I_D/I_G . Partendo da un materiale perfettamente grafitico, avente un I_D/I_G pari a 0, si aggiungono alla struttura dei difetti, valutando la posizione del picco G e del valore I_D/I_G . Inizialmente abbiamo una transizione da materiale grafitico a grafite nanocristallina, seguita da una transizione verso il carbonio amorfo ed infine un carbonio

amorfo tetraedrico. La fig.39 illustra le variazioni di I_D/I_G e della posizione del picco G, durante queste transizioni:

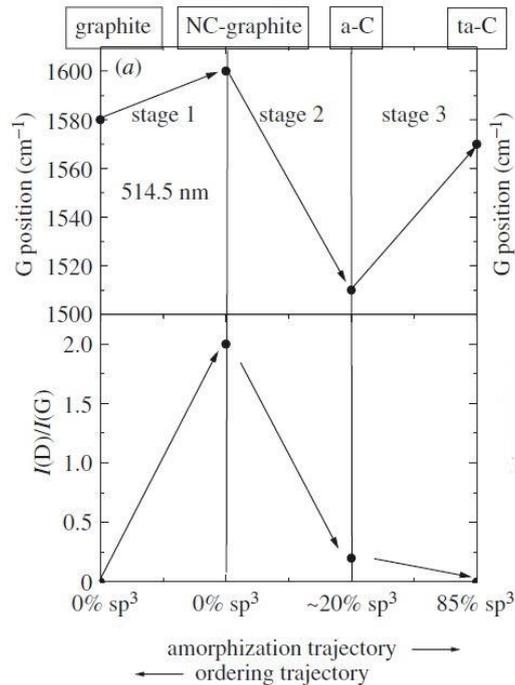


Figura 39: Modello Ferrari per descrivere la traiettoria di amorfizzazione. Fonte [33]

Gli spettri ottenuti sono stati fittati mediante una curva Gaussiana, utilizzando 2 curve per il picco D (D1 a sinistra del picco D e D2 a destra del picco D), due curve per il picco G (G1 a sinistra del picco G e G2 a destra del picco G) e tre curve per la banda 2D [41]. Talvolta l'eccessiva presenza di rumore di fondo non permetteva di fittare in modo adeguato la curva G con due componenti; essa è quindi stata processata utilizzando una componente centrata nel picco stesso. Le aree delle diverse curve sono state utilizzate per poter calcolare il rapporto I_D/I_G . In figura è mostrato un esempio di fitting eseguito, sul campione riscaldato a 800°C dopo la dialisi:

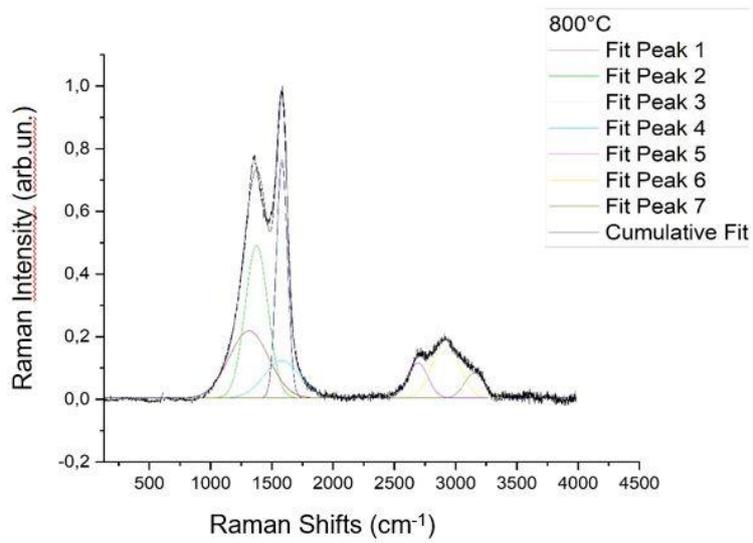
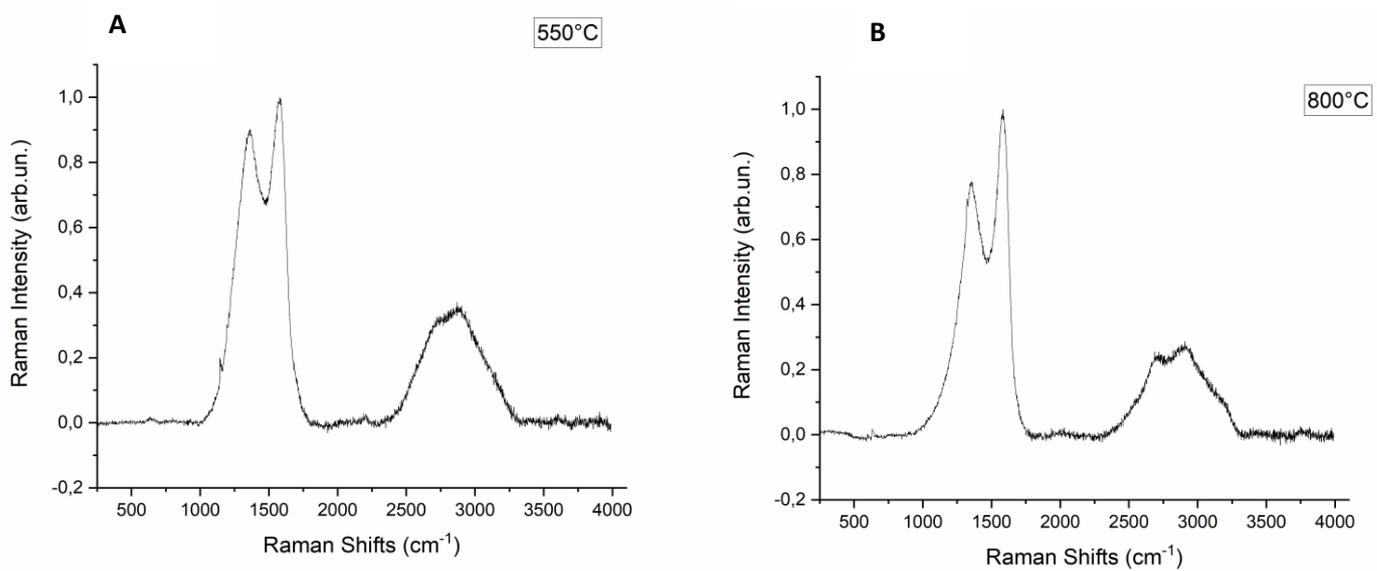


Figura 40: Esempio di fitting

Nella fig. 41 è possibile osservare gli spettri dei carbon dots prodotti mediante riscaldamento di precursori a base di acido citrico e urea:



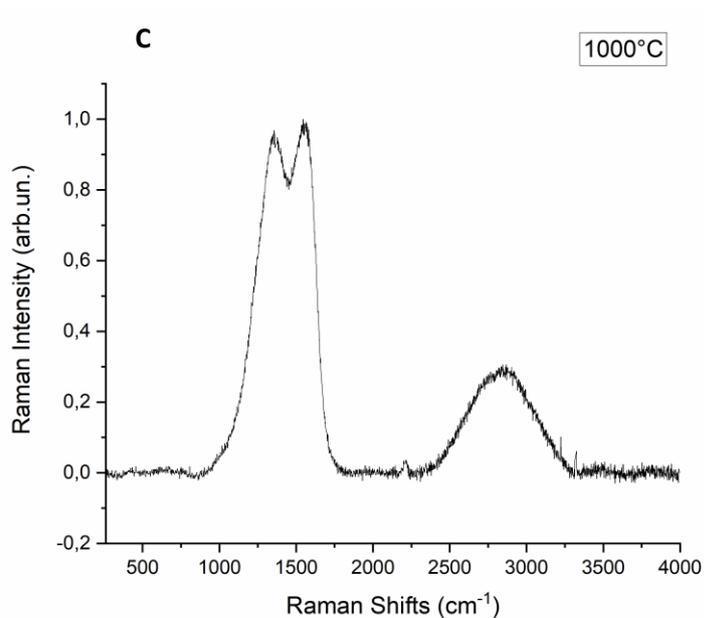


Figura 41: A: spettro Raman CDs sintetizzato a 550°C, B : spettro Raman campione riscaldato a 800°C; C: spettro Raman campione riscaldato a 1000°C

Gli spettri ottenuti sono quelli tipici del carbonio sp^2 . Possiamo notare la presenza dei picchi D e G, segno di una struttura grafitea, con la banda D che deriva dalla presenza di anelli aromatici intrappolati nel reticolo grafiteo, mentre la banda G deriva dallo ν dei legami sp^2 nel piano [42]. Nella Tab.5 è possibile osservare posizioni dei picchi D e G e valore del rapporto I_D/I_G alle diverse temperature.

TEMPERATURA (°C)	ID/IG	POSIZIONE D (cm ⁻¹)	POSIZIONE G (cm ⁻¹)
1000	1,1	1356	1565
800	1,2	1348	1589
550	1,3	1353	1582

Tabella 5: I_D/I_G e posizione picchi dei CDs prodotti a partire da urea e acido citrico

Dalla Tab.1 notiamo come il rapporto I_D/I_G diminuisca progressivamente, passando dalla temperatura di 550°C a quella di 1000°C, segno del fatto che la struttura è più grafitea come indicato nel modello sviluppato da Ferrari et al [40].

Per quanto riguarda la posizione del picco D questa non mostra spostamenti apprezzabili; fatto che invece avviene per quanto riguarda il picco G che passa da 1582 cm^{-1} a 1565 cm^{-1} . È possibile affermare che

aumentando la temperatura e mantenendo costanti i tempi di reazione, si riescano a formare delle strutture sempre più grafite.

I dati sono stati raccolti anche per i CDs trattati con la miscela solfonitrica, in modo da valutarne gli effetti, nella fig.42 sono osservabili i diversi spettri, mentre nella Tab.2 sono presentati i risultati ottenuti:

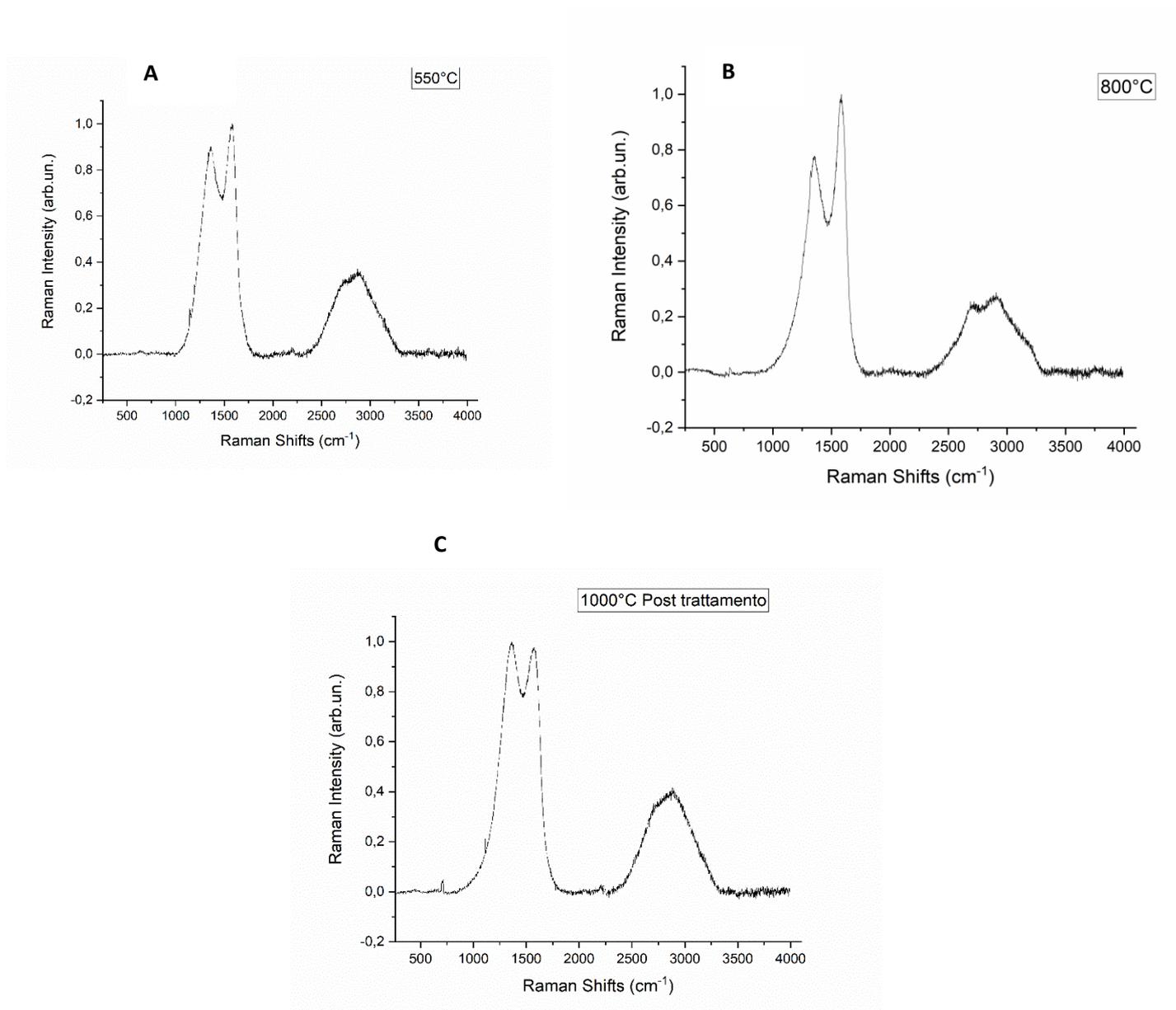


Figura 42: Spettri Raman Dei CDs prodotti a diverse temperature, post trattamento con solfonitrica e dialisi. A) CDs sintetizzato a 550°C, B) CDs sintetizzato a 800°C, C) CDs sintetizzato a 1000°C

TEMPERATURA (°C)	ID/IG	POSIZIONE D (cm ⁻¹)	POSIZIONE G (cm ⁻¹)
1000	1,2	1366	1572
800	1,2	1360	1582
550	1,4	1363	1577

Tabella 6: ID/IG e posizione picchi dei CDs prodotti a partire da urea e acido citrico post trattamento in solfonitrica e dialisi

Per quanto riguarda i campioni preparati a 1000°C e 550°C notiamo come la miscela solfonitrica abbia effettivamente reso le strutture meno grafitiche e più ricche di difetti, dal momento che si nota un aumento del valore I_D/I_G per ognuna di esse. Tale aumento non è comunque molto elevato per quanto riguarda il campione sintetizzato 1000°C, segno del fatto che la miscela potrebbe aver bisogno di più tempo per agire, oppure eventuali difetti introdotti (come, ad esempio, alcuni gruppi OH) potrebbero essere stati eliminati durante il trattamento di dialisi. Stesse considerazioni possono essere fatte per il campione trattato a 800°C, Anche questa volta il CD prodotto a 1000°C risulta avere la struttura più grafitica rispetto agli altri composti, avendo un rapporto I_D/I_G minore ad essi. Si può quindi affermare che la miscela abbia introdotto distorsioni in ognuna delle strutture, mediante rottura dei legami C-C, e inserimento di gruppi funzionali come COOH e OH. I campioni una volta trattati con la miscela si sono rivelati maggiormente sospensibili in acqua, consentendone un'analisi in fluorescenza mediante fluorimetro. I risultati verranno presentati nel paragrafo successivo.

In fig.43 è rappresentano lo spettro Raman, dei CDs ottenuto dal riscaldamento del glucosio a 800°C

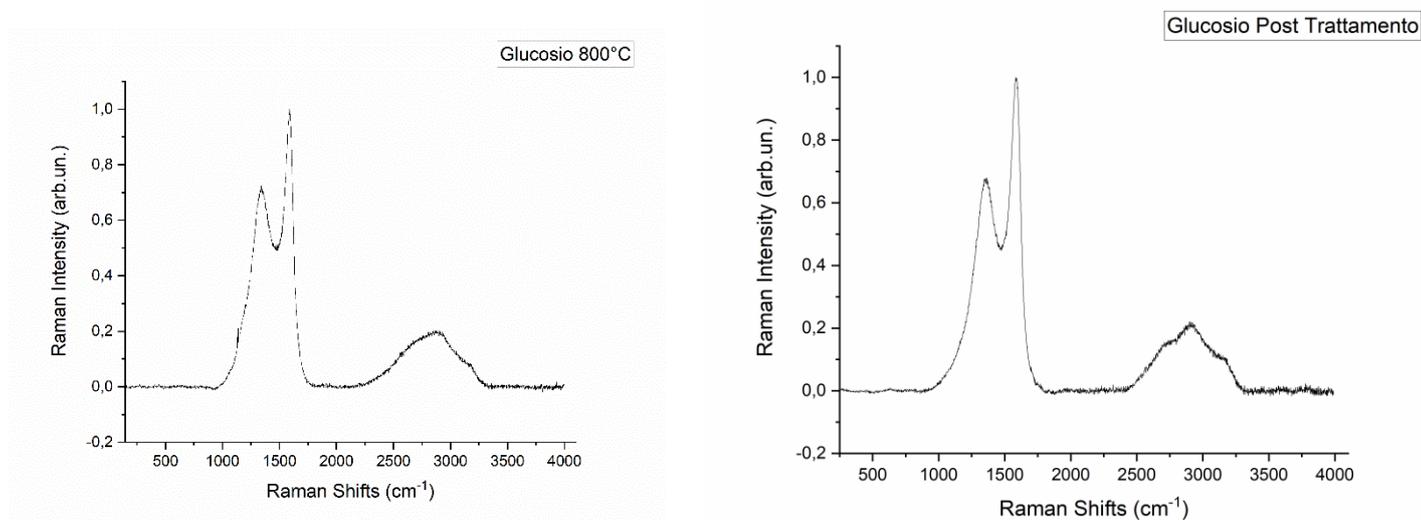


Figura 43: A sinistra: spettro Raman CDs prodotti dal glucosio riscaldato a 800°C, a destra spettro Raman dello stesso campione trattato con miscela solfonitrica e dializzato

CAMPIONE	ID/IG	POSIZIONE D (cm ⁻¹)	POSIZIONE G (cm ⁻¹)
Glucosio	1,2	1341	1586
Glucosio Post trattamento	1,6	1356	1586

Tabella 7: ID/IG e posizione picchi dei CDs prodotti a partire da glucosio

Anche in questo caso osserviamo la presenza di picco D e picco G e anche una banda 2D leggermente più strutturata. Il rapporto I_D/I_G è simile ai casi precedenti, segno del fatto che anche in questo caso si è ottenuta una struttura grafita. Dopo il trattamento con solfonitrica e relativa dialisi, il rapporto I_D/I_G subisce un incremento, fino ad arrivare a 1.6, segno del fatto che il trattamento con miscela solfonitrica ha effettivamente introdotto dei difetti all'interno della struttura.

La figura sottostante mostra lo spettro ottenuto dai nanotubi:

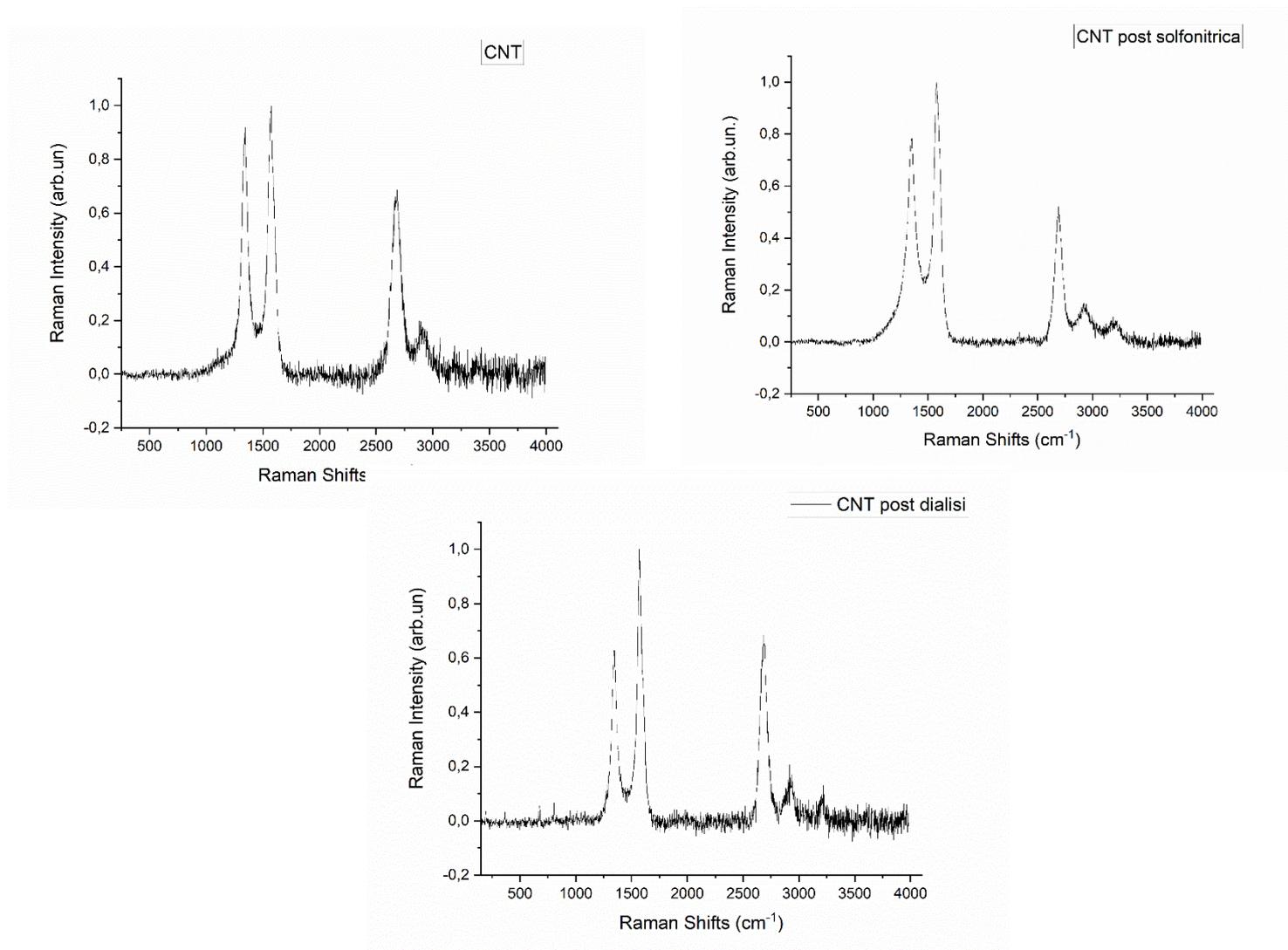


Figura 44: Spettri Raman CDs prodotti a partire da MWCNTs, a sinistra precursore, a destra campione trattato con solfonitrica e in basso lo spettro del segnale post dialisi

Per quanto riguarda lo spettro Raman dei MWCNTs solitamente questo è simile a quello della grafite [43]. Notiamo la presenza della banda G (solitamente presente intorno ai 1580 cm^{-1}) e della banda D a circa 1342 cm^{-1} [44] Rispetto ai casi precedenti è possibile osservare una regione 2D molto più strutturata, dove si possono distinguere chiaramente le diverse sottobande. Nella Tab.2 è possibile osservare i dati raccolti:

CAMPIONE	ID/IG	POSIZIONE D (cm^{-1})	POSIZIONE G (cm^{-1})
CNT	1,1	1340	1575
CNT solfonitrica 48h	1.5	1350	1573
Post dialisi	0.9	1344	1567

Tabella 8: ID/IG e posizione picchi dei CDs prodotti a partire da MWCNTs

Analizzando i dati relativi al trattamento con miscela solfonitrica per 48h, notiamo invece come questa vada ad aumentare il grado di disordine all'interno della struttura, dato che il rapporto I_D/I_G raddoppia. Non si apprezzano shift notevoli del punto G. Mediante il trattamento di dialisi, si ha il recupero di una struttura più grafitea, questo potrebbe essere dovuto al fatto che tali difetti introdotti presentassero delle dimensioni minori rispetto alle dimensioni di taglio della membrana per dialisi e che quindi questi siano stati eliminati durante il processo.

Nella fig.45 sottostante sono invece presenti gli spettri Raman dei CDs prodotti a partire dalla carbonizzazione e successivo trattamento con solfonitrica del tè:

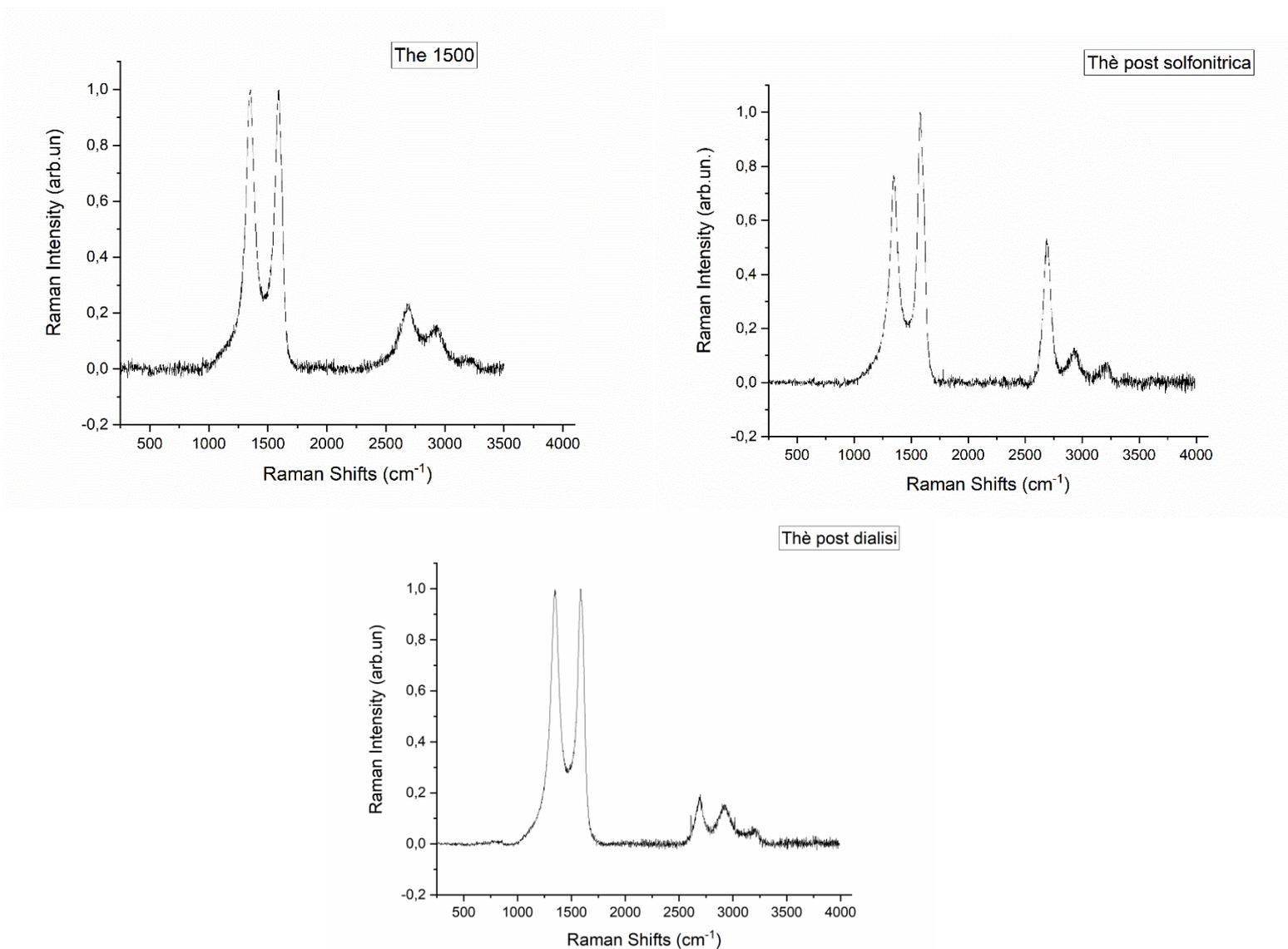


Figura 45: Da sinistra: Spettro Raman del thè a 1500, post trattamento con solfonitrica e post dialisi

Anche in questo caso, come nel caso precedente, notiamo come la banda 2D sia più strutturata rispetto ai CDs ottenuti mediante approccio bottom up. Nella Tab.3 sono riportati i valori ottenuti:

CAMPIONE	ID/IG	POSIZIONE D (cm ⁻¹)	POSIZIONE G (cm ⁻¹)
Thè 1500°C	1.1	1355	1591
Thè post solfonitrica	1.3	1349	1580
Thè post dialisi	1.2	1344	1588

Tabella 9: I_D/I_G e posizione picchi dei CDs prodotti dalle foglie del thè

Anche il thè sottoposto ad un trattamento in temperatura ha mostrato valori di I_D/I_G associabili ad una struttura grafita. La miscela solfonitrica è riuscita ad introdurre difetti nella struttura e parte di questi sembrano essere andati persi durante il trattamento di dialisi, proprio come nel caso dei CNT. È possibile osservare anche graficamente che lo spettro ottenuto post dialisi sia molto simile allo spettro del campione trattato a 1500°C.

3.2.4 Fluorimetro

I CDs sintetizzati mediante trattamenti in temperatura sono stati caratterizzati anche tramite fluorimetro. Questo è avvenuto disperdendo 2mg di campione in 40ml di acqua distillata.

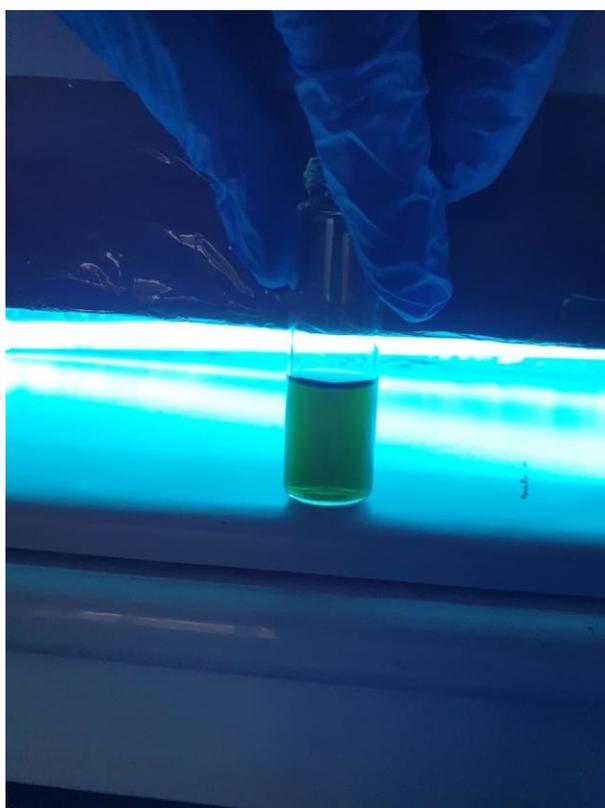


Figura 46: Emissione dei CDs irradiati mediante lampada UV

I campioni sono stati eccitati a diverse lunghezze d'onda, a partire da 275nm sino a 525nm con step di 25nm tra una misurazione e la successiva. Di seguito è possibile osservare i grafici ottenuti:

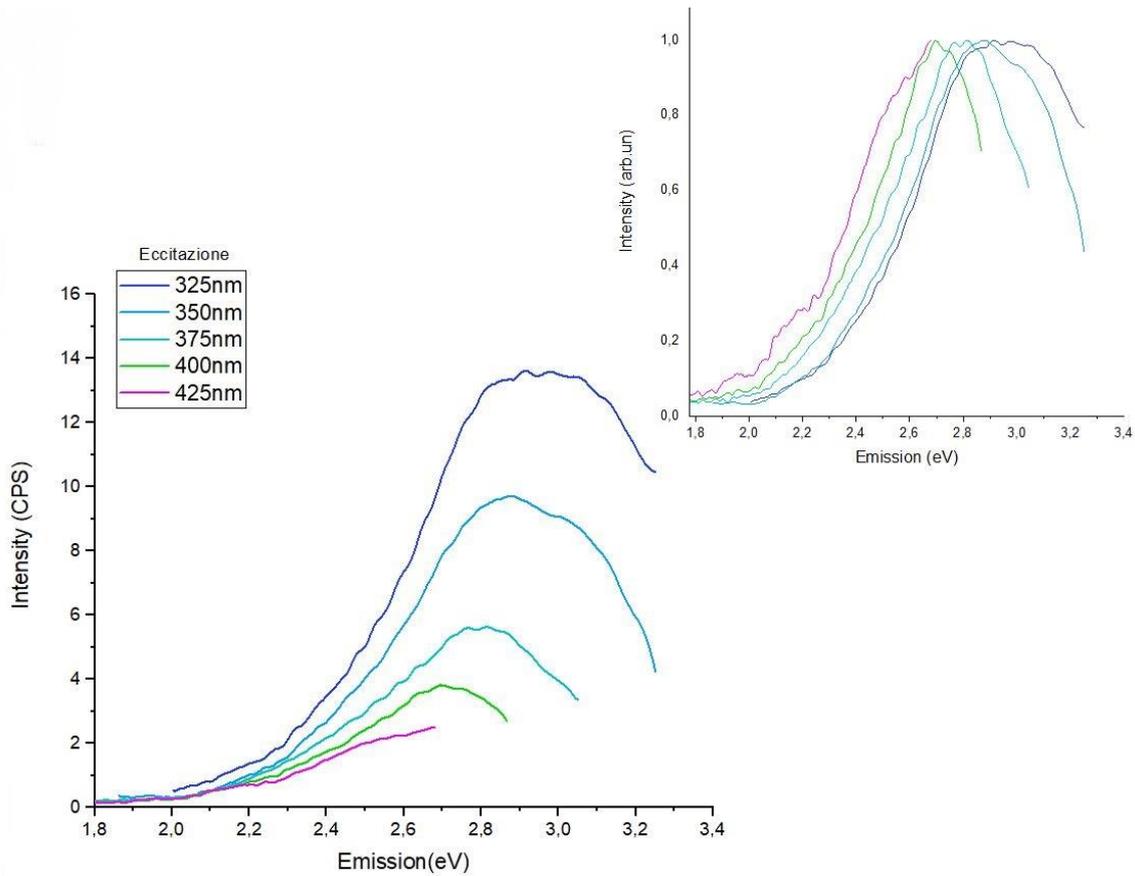


Figura 47: Spettro di emissione CDs prodotti dal precursore a base di acido citrico e urea, riscaldato a 1000°C

È possibile notare come il campione in questione sia in grado di emettere fluorescenza per un'eccitazione di al massimo 425nm. Il massimo dell'emissione viene raggiunta per le basse lunghezze d'onda che sembrano presentare anche un'ampiezza maggiore dei picchi. All'aumentare della lunghezza d'onda dell'eccitazione si ha una diminuzione dell'energia emessa, si può concludere che il campione per quanto riguarda l'intensità della fluorescenza presenti un comportamento dipendente dall'eccitazione.

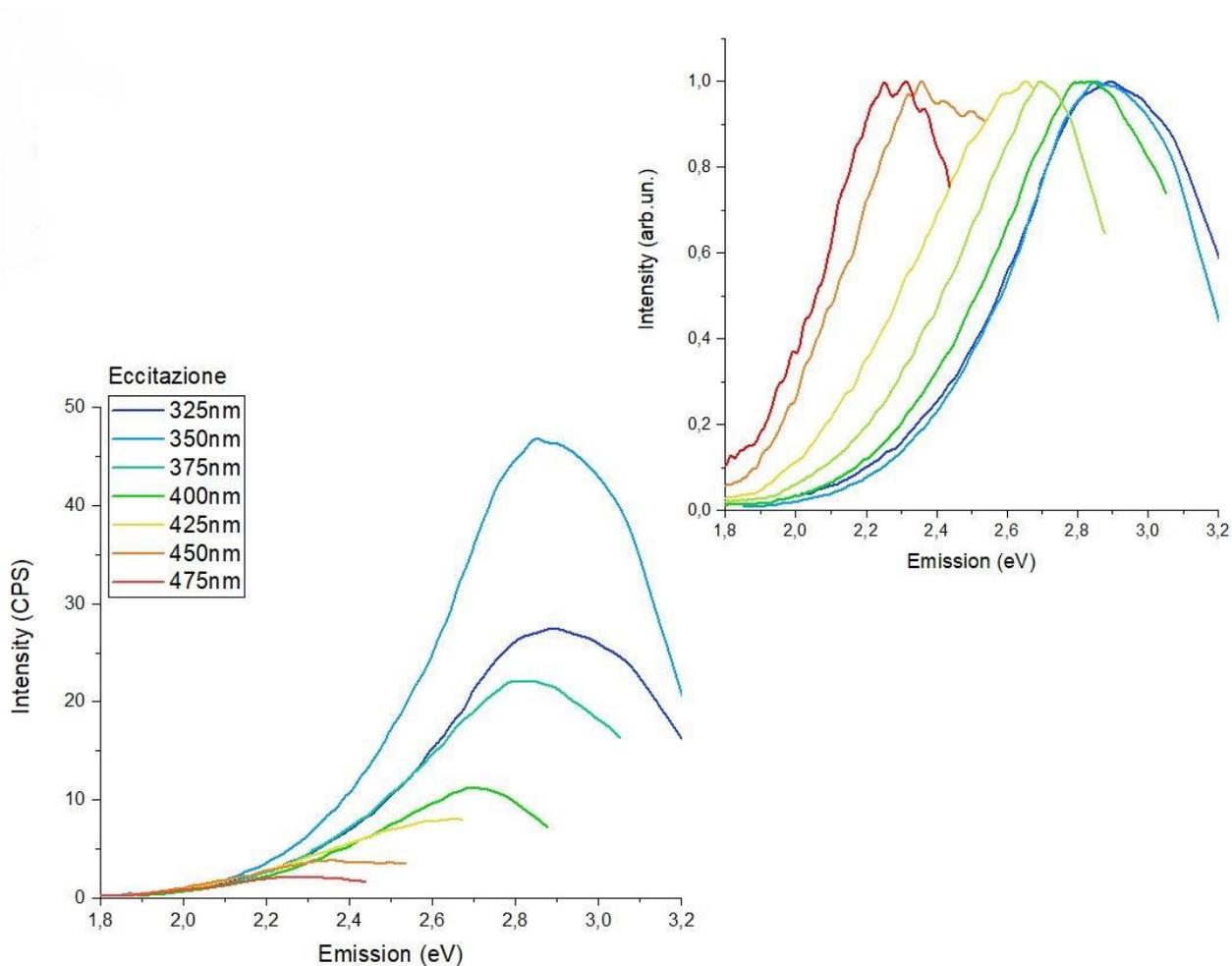


Figura 48: Spettro di emissione dei CDs prodotti dal precursore a base di acido citrico e urea, riscaldato a 800°C

Per quanto riguarda il campione prodotto a 800°C è osservabile un comportamento simile al campione analizzato precedentemente, con il campione che presenta elevata intensità di emissione alle basse lunghezze d'onda, per poi decrescere con l'aumentare di quest'ultima. Ancora una volta i picchi risultano essere più ampi alle basse lunghezze d'onda, ma possiamo notare come questi siano più intensi rispetto al caso precedente. Anche il presente campione presenta uno spettro dipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione.

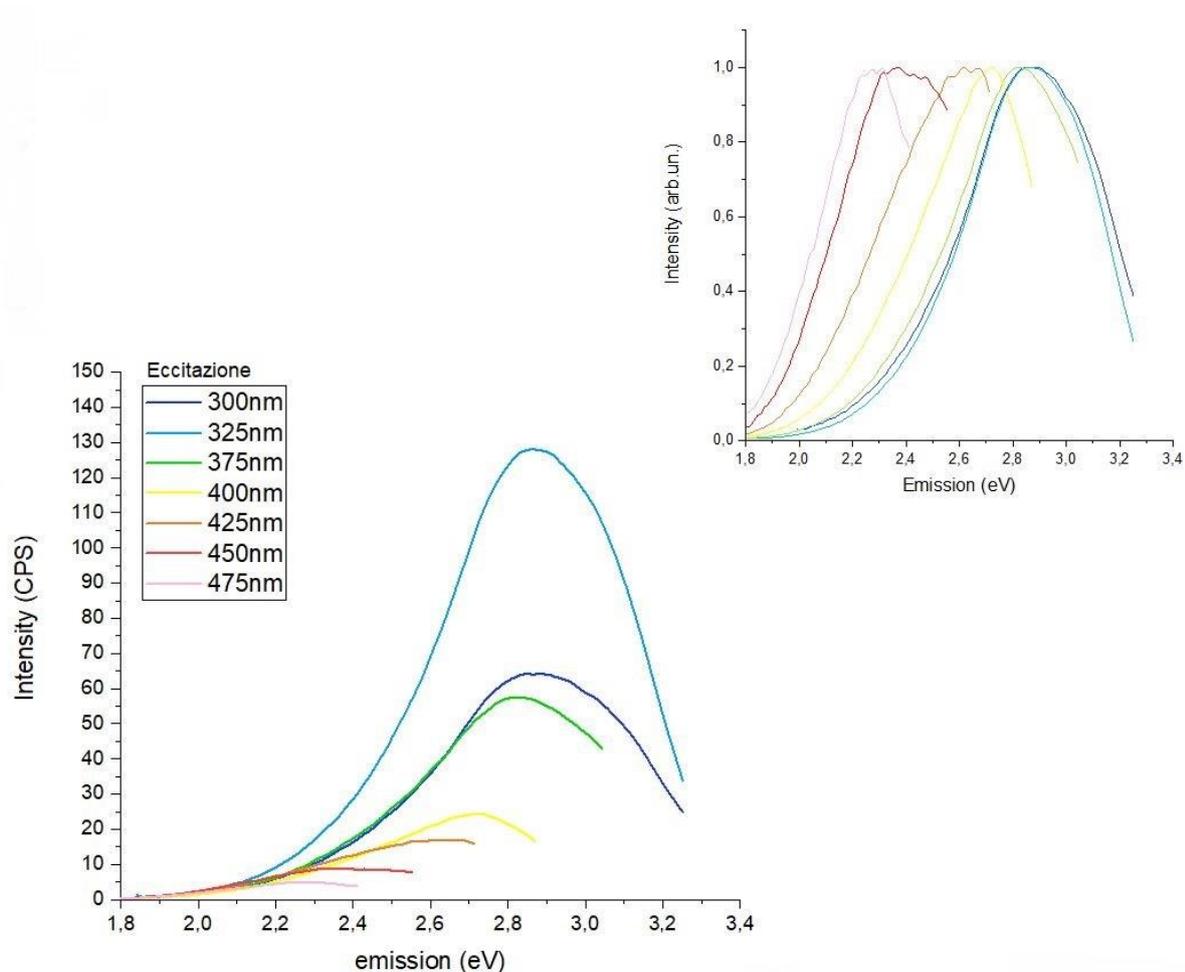


Figura 49: Spettro di emissione dei CDs prodotti dal precursore a base di acido citrico e urea, riscaldato a a 550°C

Il campione prodotto a 550°C presenta un comportamento dipendente dall'eccitazione. Notiamo come quest'ultimo abbia dei picchi decisamente più intensi rispetto ai due campioni precedenti. Ancora una volta l'intensità di emissione risulta essere maggiore quando il campione è eccitato con basse lunghezze d'onda. Sia il campione sintetizzato a 550°C che quello sintetizzato a 800°C, risultano emettere anche per lunghezze d'onda pari a 450 nm e 475 nm, rispetto a quello a 1000°C che invece è in grado di emettere per una lunghezza d'onda massima di 425nm. L'intensità massima di fluorescenza raggiunta dal campione risulta essere decisamente maggiore rispetto agli altri due campioni.

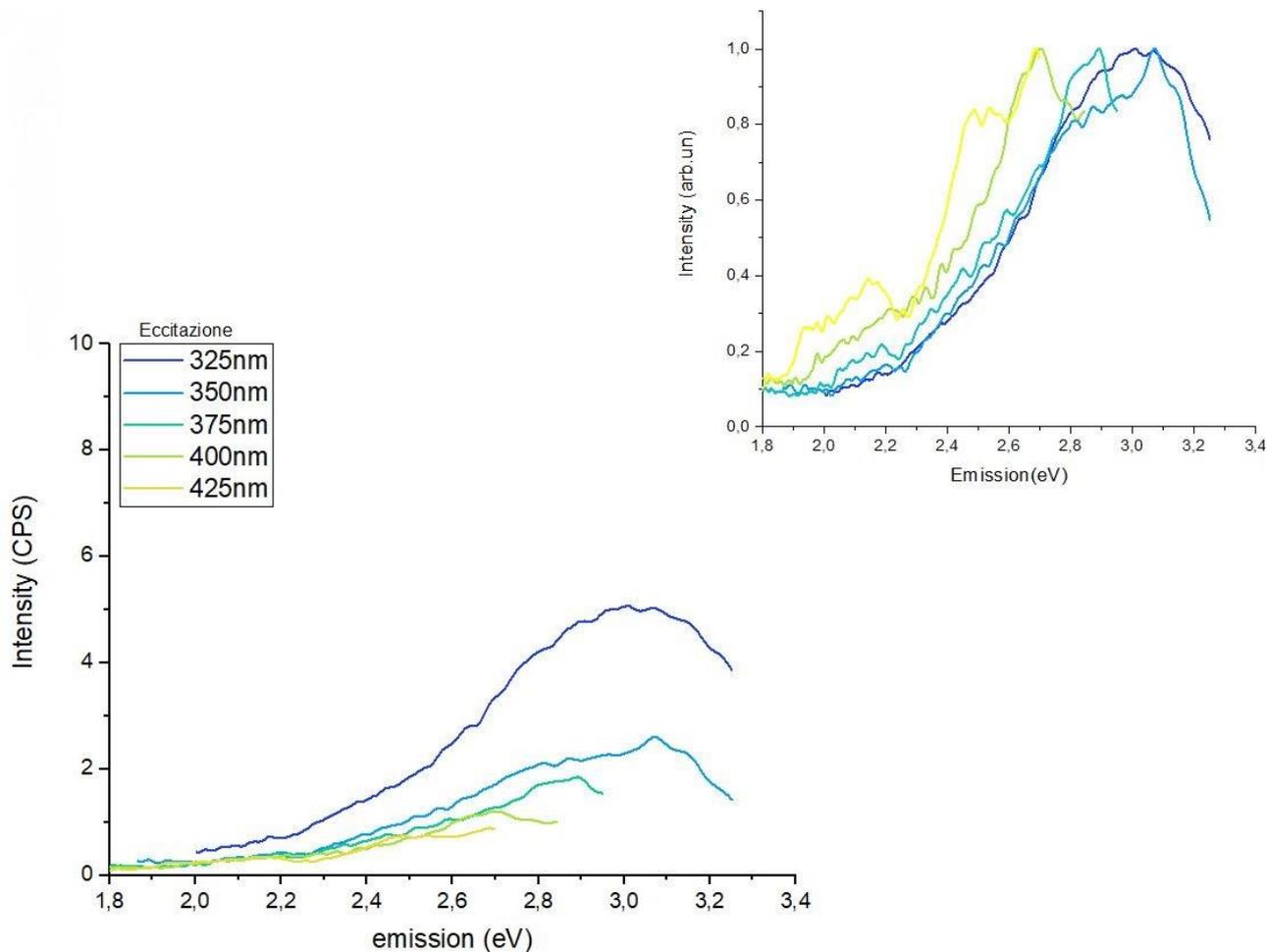


Figura 50: Spettro di emissione dei CDs prodotti dal glucosio riscaldato a 800°C

Nella fig.50 è possibile osservare lo spettro di emissione dei CDs sintetizzati a 800°C. Quest'ultimo presenta dei picchi di emissione decisamente più bassi rispetto ai casi precedenti, inoltre esso è in grado di emettere fluorescenza per un range minore rispetto ai casi precedenti: tra i 325 nm e i 425 nm. Il comportamento si dimostra essere ancora una volta dipendente dalla lunghezza d'onda dell'eccitazione, con le emissioni maggiori riscontrabili, anche in questo caso, per eccitazioni a basse lunghezze d'onda.

3.3 CONIUGAZIONI

I CDs sono stati coniugati con le particelle prodotte, dal momento che le loro dimensioni micrometriche risultano ottime per alcune applicazioni teragnostiche. I CDs a base di carbonio risultano essere un'eccellente piattaforma di trasporto per ospitare le particelle dal momento che è possibile funzionalizzarli con diverse biomolecole e inoltre dopo i trattamenti mediante miscela solfonitrica risultano essere sospensibili in acqua grazie alla presenza di gruppi OH e COOH. Durante la coniugazione, sono presenti una serie di interazioni che permettono l'adesione tra CDs e particelle. Una delle prime interazioni che avviene è l'interazione idrogeno, dato che nella particella di Bi possono essere presenti dei gruppi OH (a causa di alcuni difetti superficiali di

tipo morfologici o chimici) che interagiscono con gli O dei CDs. Altre interazioni che possono avvenire sono le interazioni deboli, ovvero quelle di Van der Waals, dipolo-dipolo e dipolo-dipolo indotto. Sono presenti anche interazioni orbitaliche, che rappresentano una polarizzazione degli orbitali e che portano all'interazione tra due sistemi orbitalici. Le interazioni possono avvenire tra gli orbitali p che presentano due lobi e orbitali d che presentano lobi con polarità opposte a quelle p. Le polarità degli orbitali fanno in modo che i vari orbitali possano interagire tra di loro. Oltre all'interazione $\pi - d$, nel Bi sono presenti anche orbitali f, di conseguenza si avrà anche un'interazione $\pi - f$.

Le coniugazioni sono state effettuate tra i quattro diversi tipi di particelle prodotte con i diversi surfattanti e il CDs prodotti dal glucosio, dal momento che questi sono risultati essere i migliori nelle prove di sospensibilità effettuate.

3.3.1 IR

Anche in questo caso, il fatto che i materiali siano ad alto contenuto di carbonio non consente di ricavare informazioni dall'analisi IR dei campioni, dal momento che come detto precedentemente, i materiali altamente carboniosi sono poco visibili all'IR. Nella fig.51 viene riportato un esempio:

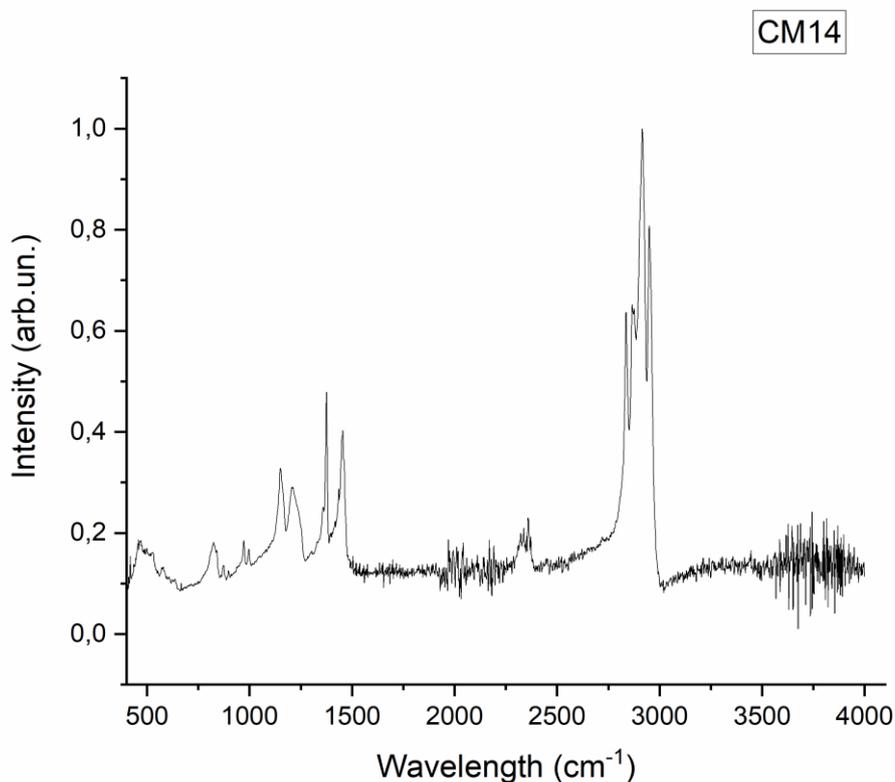


Figura 51: IR CM14 (coniugazione)

È possibile notare come sia ancora presente il segnale C-C intorno ai 1000-1500 cm^{-1} e un picco intorno ai 2900-3000 cm^{-1} probabilmente relativo ad un CH ν , indice del fatto che la coniugazione sia avvenuta con successo tramite interazioni a ponte idrogeno.

3.3.2 Raman

Gli spettri delle diverse coniugazioni sono visibili al Raman e osservabili nella fig.52

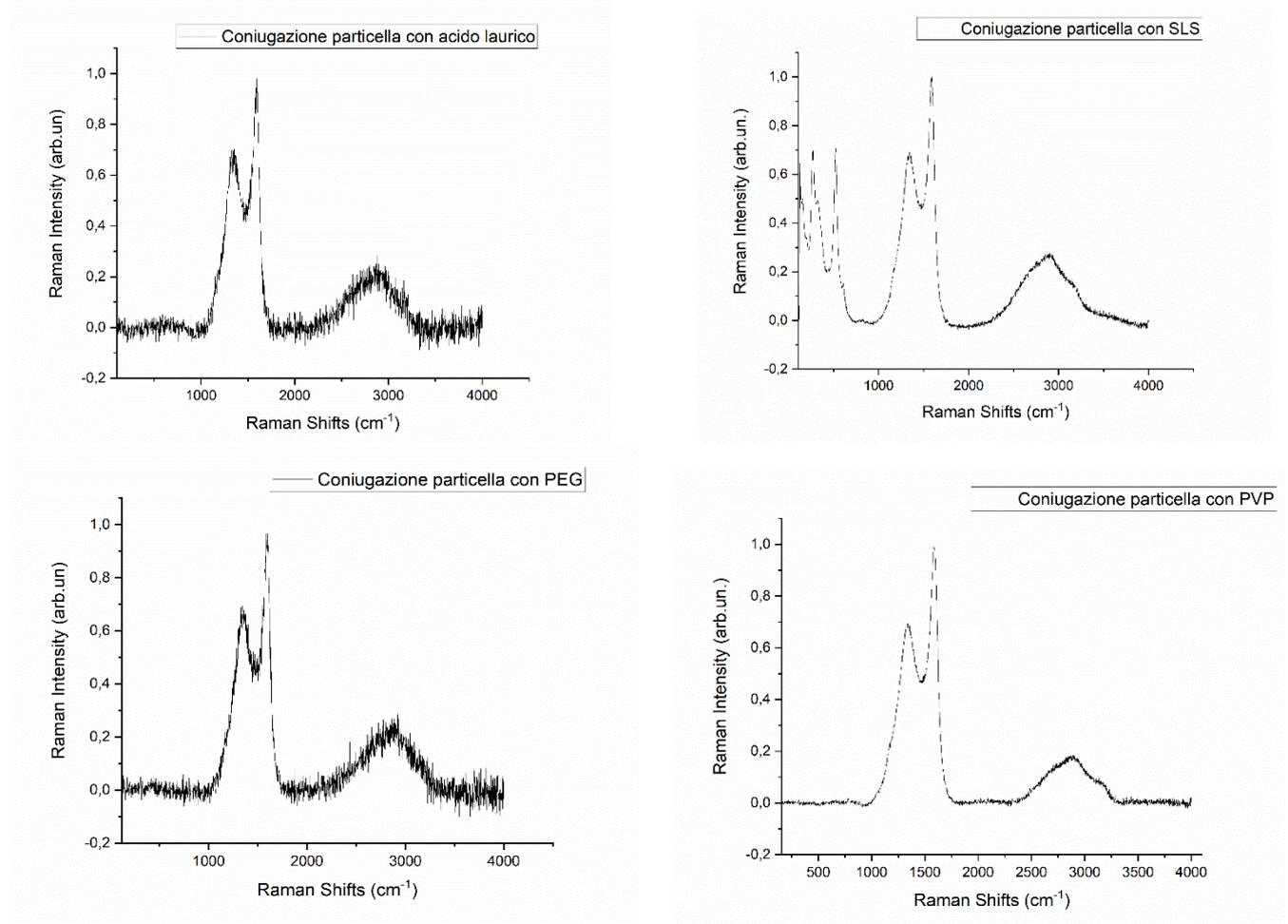


Figura 52: Spettro Raman coniugazioni

Dagli spettri possiamo notare come in tre casi il carbonio mascheri completamente il segnale proveniente dalla particella di bismuto. Dal momento che il carbonio è maggiormente Raman attivo rispetto al bismuto, possiamo ipotizzare che durante il processo di coniugazione i CDs si siano disposti sulle particelle di bismuto, avvolgendole, formando uno shell a base di carbonio. È interessante notare come nel caso delle particelle fabbricata utilizzando SLS come tensioattivo, i picchi relativi al bismuto siano visibili. Questo potrebbe essere indice del fatto che in questo caso ci sia comunque uno shell a base di carbonio, ma tale rivestimento non è abbastanza spesso, consentendo quindi al bismuto di essere visibile al Raman.

3.3.3 FE-SEM

Le analisi FE-SEM sono state condotte solo sulle coniugazioni avvenute con le particelle che hanno dato risultati migliori in termini morfologici (ovvero quelle fabbricate mediante PEG e SLS).

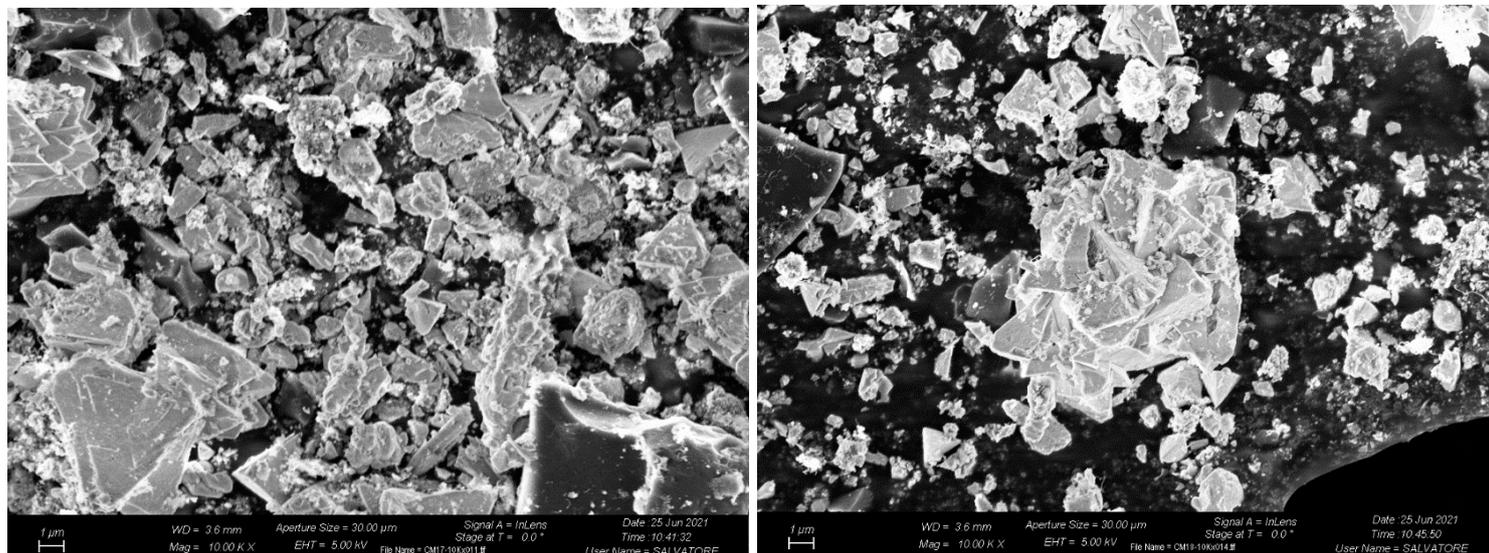


Figura 53: A sinistra: FE-SEM CM 12; A destra: FE-SEM CM 14

Si ipotizza che durante il processo di coniugazione le particelle si sfaldino, esse presentano una morfologia a piani a causa della formazione di composti di intercalazione. Possiamo quindi osservare che le particelle non sono più un singolo cristallo tetraedrico ma cristalli tetraedrici formati da lamelle. In futuro si potrebbe lavorare sul processo di coniugazione utilizzando dei CDs trattati con solfonitrica dal momento che presenteranno una sospensibilità in acqua maggiore, un maggior numero di gruppi superficiali sfruttabili per i legami con le particelle di bismuto. Un'altra possibilità è quella di migliorare il processo di coniugazione aumentando di tempi di sonicazione.

CONCLUSIONI

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di sintetizzare dei CDs ad alta temperatura e mediante trattamenti con miscela solfonitrica. Oltre ai CDs sono stati prodotti delle particelle di ossido di bismuto, utilizzando diversi tensioattivi di tipo ionico e non ionico per valutare i loro effetti sulla crescita delle particelle. Infine, è stata eseguita una coniugazione tra i CDs trattati in temperatura con le migliori caratteristiche di sospensibilità e le diverse particelle di bismuto sintetizzate con i diversi surfattanti. In questo modo è stato possibile ottenere una libreria di composti utilizzabili in ambito teragnostico.

I CDs trattati in temperatura sono stati prodotti a partire da diversi precursori: in un caso si sono utilizzati acido citrico e urea riscaldati a 550, 800 e 1000°C in modo da ottenere una struttura grafite contenente un doping con azoto, nel secondo caso è stato utilizzato il glucosio riscaldato a 800°C in modo da ottenere una struttura grafite presentante un doping con ossigeno. Dato che le strutture ottenute sono altamente carboniose, queste non presentano uno spettro IR di facile interpretazione. Mediante analisi Raman è stata confermata la presenza di strutture grafite, ottenendo uno spettro tipico del carbonio sp^2 . Dal momento che i CDs risultavano essere poco sospensibili in acqua, questi sono stati trattati con una miscela solfonitrica in modo da inserire sulla superficie dei campioni dei gruppi OH e COOH mediante trattamenti di passivazione; è stato notato come la miscela abbia prodotto delle strutture meno grafite rispetto ai casi precedenti, segno quindi dell'ottenimento di difetti nella struttura stessa.

La migliorata sospensibilità in acqua ha consentito un'analisi mediante fluorimetro, dove è stato possibile osservare come i diversi CDs risultino emettere fluorescenza per eccitazioni aventi lunghezze d'onda comprese tra circa 325nm e 475nm. È inoltre emerso che il comportamento dei campioni è dipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione: minore è il suo valore, maggiore è l'intensità di eccitazione dei CDs. In particolare, il CDs prodotto a 550°C è risultato essere quello con le maggiori intensità di emissione. Le analisi FE-SEM del campione sintetizzato a 1000°C hanno confermato l'effettiva presenza di strutture lamellari associabili a pochi layers di grafite, le quali si disperderanno una volta sonicate in strutture submicrometriche e nanometriche, ovvero i CDs.

Altre tipologie di CDs sono state prodotte mediante trattamento con miscela solfonitrica: come precursori sono stati utilizzati MWCNTs e foglie del tè precedentemente riscaldate a 1500°C, per poter osservare che tipo di strutture carboniose si riuscisse ad ottenere. Anche in questo caso si nota come l'utilizzo della miscela solfonitrica comporti l'evoluzione verso strutture meno grafite, mentre i trattamenti di dialisi consentono il recupero di tale struttura, ciò potrebbe essere dovuto al fatto che le dimensioni dei difetti introdotti mediante la miscela, siano talmente piccoli da oltrepassare la membrana semipermeabile.

I CDs sintetizzati risultano utili per applicazioni di drug delivery grazie alla possibilità di essere facilmente funzionalizzati, diagnosi e imaging grazie alla loro fluorescenza. Viste le dimensioni nanometriche, questi

possono penetrare all'interno della cellula. Un esempio di applicazioni potrebbe essere il loro impiego come sonde per diagnosi di tumore, sfruttando il loro meccanismo di fluorescenza: si potrebbe verificare in vitro l'effettiva presenza di cellule tumorali su tessuti estratti mediante biopsia. Visto l'elevato metabolismo dei tumori, legando ai CDs una proteina (come, ad esempio, la transferrina dal momento che molte cellule tumorali, sovra esprimono il recettore di questa proteina), e inserendo il complesso così formato nel tessuto da analizzare, una eventuale diminuzione o assenza di fluorescenza potrebbe essere indice del fatto che il tessuto analizzato sia effettivamente tumorale.

Il meccanismo di sintesi delle particelle consente di ottenere particelle micrometriche a base di bismuto in fase γ a 80°C, a differenza della classica sintesi che invece consente di ottenere tale forma del bismuto solo a 500°C. Il bismuto possiede elevate proprietà antibatteriche, e può essere sfruttato per fototerapia. Dal momento che una sua presenza nell'encefalo può generare encefalite, sono da preferire delle particelle con dimensioni micrometriche in modo che esse non possano attraversare la barriera ematoencefalica.

Le analisi FE-SEM delle particelle prodotte hanno mostrato come solo il PEG e il SLS abbiano prodotto delle strutture con morfologia tetraedrica, evitando di avere particelle altamente aggregate e con diverse morfologie. Il meccanismo di accrescimento è di tipo layer by layer con i tensioattivi che riescono a dissociarsi in soluzione producendo micelle in grado di guidare la crescita delle particelle verso una determinata direzione. Mediante analisi Raman si è osservato come lo spettro delle particelle fabbricate con tensioattivo sia comunque uguale a quello delle particelle fabbricate senza tensioattivo, segno che il meccanismo di reazione non viene alterato.

Infine, sono state effettuate delle coniugazioni tra i CDs prodotti dal glucosio e le particelle prodotte con i diversi tensioattivi, in modo da sfruttare la possibilità del carbonio di venir funzionalizzato per poter targettare la particella di bismuto nei distretti corporei voluti e sfruttarne le sue proprietà terapeutiche. Le coniugazioni effettuate hanno evidenziato mediante analisi IR la presenza di uno ν CH che potrebbe essere associato alla formazione di un legame a idrogeno tra CDs e particelle segno della riuscita del processo. Dall'analisi FE-SEM si può ipotizzare che durante il processo di coniugazione le particelle si sfaldino, dal momento che è osservabile una loro morfologia a piani a causa della formazione di composti di intercalazione. Esse non risultavano più essere un singolo cristallo tetraedrico ma cristalli tetraedrici formati da lamelle. In futuro si potrebbero comunque migliorare il processo di coniugazione aumentando il tempo di sonicazione e utilizzando i CDs trattati con la miscela solfonitrica, dal momento che questi presenteranno delle migliori caratteristiche di sospensibilità in acqua.

RINGRAZIAMENTI

Per prima cosa vorrei ringraziare il Prof. Alberto Tagliaferro per avermi concesso l'opportunità di poter collaborare con il suo gruppo di ricerca. Vorrei ringraziare anche il Dott. Mattia Bartoli, per la sua pazienza, i suoi consigli, per essere stato il Mr Wolf della situazione e per avermi fatto capire cosa significhi avere una passione.

Un enorme grazie a mia mamma, mio papà, Pamela e Alex, per esserci sempre stati, aver sempre creduto in me e avermi incoraggiato continuamente.

Un grazie ai miei colleghi di laboratorio, Andrea, Filippo, Giovanni e Myia per tutto il tempo trascorso insieme durante questa esperienza.

Ringrazio anche tutte le persone che mi hanno accompagnato durante questa avventura torinese: Alessio, Ambra, Elisabetta, Emanuela, Erica, Francesco, Giancarlo, Giovanni, Giuseppe, Marianna, Maria Teresa, Matteo, Nicolò, Sofia, Valentina.B e Valentina.T

E un sentito ringraziamento a tutti i miei amici che anche un messaggio o una videochiamata mi son sempre stati vicini nonostante la distanza: Alberto.A, Alberto.L, Alessandro.C, Alessandro.G, Daniele, Davide.P, Davide.Z, Edoardo, Giuliano, Lorenzo, Marco, Mauro, Michele e Riccardo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Zheng, X.T., Ananthanarayanan, A., Luo, K.Q. and Chen, P. (2015), Glowing Graphene Quantum Dots and Carbon Dots: Properties, Syntheses, and Biological Applications. *Small*, 11: 1620-1636. <https://doi.org/10.1002/sml.201402648>
- [2] Pan, D., Zhang, J., Li, Z. and Wu, M. (2010), Hydrothermal Route for Cutting Graphene Sheets into Blue-Luminescent Graphene Quantum Dots. *Adv. Mater.*, 22: 734-738. <https://doi.org/10.1002/adma.200902825>
- [3] Li, X., Rui, M., Song, J., Shen, Z. and Zeng, H. (2015), Carbon and Graphene Quantum Dots for Optoelectronic and Energy Devices: A Review. *Adv. Funct. Mater.*, 25: 4929-4947. <https://doi.org/10.1002/adfm.201501250>
- [4] Hu, Sheng-Liang & Niu, Kai-Yang & Sun, Jing & Yang, Jing & Zhao, N.Q. & Du, Xi-Wen. (2009). One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation[J]. *Journal of Materials Chemistry - J MATER CHEM*. 19. 10.1039/b812943f.
- [5] Zhu, S., Song, Y., Zhao, X. et al. The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. *Nano Res*. 8, 355–381 (2015). <https://doi.org/10.1007/s12274-014-0644-3>
- [6] Liu, Meng & Chen, Bin & Li, Chun & Huang, Cheng. (2019). Carbon dots: Synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications. *Green Chemistry*. 21. 10.1039/C8GC02736F
- [7] Kim, S., et al. (2012). "Anomalous Behaviors of Visible Luminescence from Graphene Quantum Dots: Interplay between Size and Shape." *ACS Nano* 6(9): 8203-8208
- [8] Zhang, Y., et al. (2017). "Multicolour nitrogen-doped carbon dots: tunable photoluminescence and sandwich fluorescent glass-based light-emitting diodes." *Nanoscale* 9(45): 17849-17858.
- [9] Tian, P., et al. (2018). "Graphene quantum dots from chemistry to applications." *Materials Today Chemistry* 10: 221-258.
- [10] Tang, L., Ji, R., Li, X., Teng, K.S. and Lau, S.P. (2013), Size-Dependent Structural and Optical Characteristics of Glucose-Derived Graphene Quantum Dots. *Part. Part. Syst. Charact.*, 30: 523-531. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201200131>
- [11] Bano, D., et al. (2018). "Green synthesis of fluorescent carbon quantum dots for the detection of mercury(ii) and glutathione." *New Journal of Chemistry* 42(8): 5814-5821.
- [12] Bartoli M, Jagdale P, Tagliaferro A. A Short Review on Biomedical Applications of Nanostructured Bismuth Oxide and Related Nanomaterials. *Materials (Basel)*. 2020 Nov 19;13(22):5234. <https://doi.org/10.3390/ma13225234>
- [13] Shahbazi, M.-A., et al. (2020). "The versatile biomedical applications of bismuth-based nanoparticles and composites: therapeutic, diagnostic, biosensing, and regenerative properties." *Chemical Society Reviews* 49(4): 1253-1321.
- [14] Mishra, V., Baranwal, V., Mishra, R.K. et al. Immunotoxicological impact and biodistribution assessment of bismuth selenide (Bi₂Se₃) nanoparticles following intratracheal instillation in mice. *Sci Rep* 7, 18032 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18126-y>
- [15] DiPalma, Joseph R. MD Bismuth Toxicity, Often Mild, Can Result in Severe Poisonings, *Emergency Medicine News*: April 2001 - Volume 23 - Issue 3 - p 16
- [16] Mahmoud Abudayyak, Ezgi Öztaş, Merve Arici, Gül Özhan, Investigation of the toxicity of bismuth oxide nanoparticles in various cell lines, *Chemosphere*, Volume 169, 2017, Pages 117-123, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.018>
- [16] Yang, S.-T., et al. (2009). "Carbon Dots for Optical Imaging in Vivo." *Journal of the American Chemical Society* 131(32): 11308-11309.
- [17] Roberto Vazquez-Munoz, M. Josefina Arellano-Jimenez, Jose L. Lopez-Ribot, Fast, facile synthesis method for BAL-mediated PVP-bismuth nanoparticles, *MethodsX*, Volume 7, 2020, 100894, ISSN 2215-0161, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100894>.
- [18] Hernandez-Delgado R, Velasco-Arias D, Diaz D, et al. Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2109-2113.
- [19] Yang, C. Y., Chen, Y. D., Guo, W., Gao, Y., Song, C. Q., Zhang, Q., Zheng, N. N., Han, X. J., Guo, C. S., *Adv. Funct. Mater.* 2018, 28, 1706827. <https://doi.org/10.1002/adfm.201706827>

- [20] Bi, H.; He, F.; Dong, Y.; Yang, D.; Dai, Y.; Xu, L.; Lv, R.; Gai, S.; Yang, P.; Lin, J. Bismuth Nanoparticles with "Light" Property Served as a Multifunctional Probe for X-ray Computed Tomography and Fluorescence Imaging. *Chem. Mater.* 2018, 30, 3301–3307.
- [21] Dou, R., et al. (2016). "The polyvinylpyrrolidone functionalized rGO/Bi₂S₃ nanocomposite as a near-infrared light-responsive nanovehicle for chemo-photothermal therapy of cancer." *Nanoscale* 8(22): 11531-11542.
- [22] Lammers T, Aime S, Hennink WE, Storm G, Kiessling F. Theranostic nanomedicine. *Acc Chem Res.* 2011 Oct 18;44(10):1029-38. doi: 10.1021/ar200019c. Epub 2011 May 5. PMID: 21545096.
- [23]] Du, J. J., Xu, N., Fan, J. L., Sun, W., Peng, X. J., *Small* 2019, 15, 1805087. <https://doi.org/10.1002/sml.201805087>
- [24] Li, Q., et al. (2010). "Photoluminescent Carbon Dots as Biocompatible Nanoprobes for Targeting Cancer Cells in Vitro." *The Journal of Physical Chemistry C* 114(28): 12062-12068.
- [25] Zhang, M., et al. (2012). "Facile synthesis of water-soluble, highly fluorescent graphene quantum dots as a robust biological label for stem cells." *Journal of Materials Chemistry* 22(15): 7461-7467.
- [26] Ashrafizadeh, M., et al. (2020). "Carbon dots as versatile nanoarchitectures for the treatment of neurological disorders and their theranostic applications: A review." *Advances in Colloid and Interface Science* 278: 102123.
- [27] Zheng, M., Liu, S., Li, J., Qu, D., Zhao, H., Guan, X., Hu, X., Xie, Z., Jing, X. and Sun, Z. (2014), Integrating Oxaliplatin with Highly Luminescent Carbon Dots: An Unprecedented Theranostic Agent for Personalized Medicine. *Adv. Mater.*, 26: 3554-3560. <https://doi.org/10.1002/adma.201306192>
- [28] Li, S., et al. (2016). "Crossing the blood–brain–barrier with transferrin conjugated carbon dots: A zebrafish model study." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 145: 251-256.
- [29] Du, Y., et al. (2018). "Facile marriage of Gd³⁺ to polymer-coated carbon nanodots with enhanced biocompatibility for targeted MR/fluorescence imaging of glioma." *International Journal of Pharmaceutics* 552(1): 84-90.
- [30] Iannazzo D, Pistone A, Salamò M, Galvagno S, Romeo R, Giofrè SV, Branca C, Visalli G, Di Pietro A. Graphene quantum dots for cancer targeted drug delivery. *Int J Pharm.* 2017 Feb 25;518(1-2):185-192. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.060>. Epub 2017 Jan 2. PMID: 28057464.
- [31] M.M. Patil, V.V. Deshpande, S.R. Dhage, V. Ravi, Synthesis of bismuth oxide nanoparticles at 100 °C, *Materials Letters*, Volume 59, Issues 19–20, 2005, Pages 2523-2525, ISSN 0167-577X, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2005.03.037>
- [32] Wang Y, Li Y. Metastable γ -Bi₂O₃ tetrahedra: Phase-transition dominated by polyethylene glycol, photoluminescence and implications for internal structure by etch. *J Colloid Interface Sci.* 2015 Sep 15;454:238-44. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.05.001> Epub 2015 May 14. PMID: 26037273.
- [33] Franklin D. Hardcastle, Israel E. Wachs, The molecular structure of bismuth oxide by Raman spectroscopy, *Journal of Solid State Chemistry*, Volume 97, Issue 2, 1992, Pages 319-331, ISSN 0022-4596, [https://doi.org/10.1016/0022-4596\(92\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0022-4596(92)90040-3)
- [34] SALAZAR-PEREZ, A. J. et al. Structural evolution of Bi₂O₃ prepared by thermal oxidation of bismuth nano-particles. *Superf. vacío* [online]. 2005, vol.18, n.3 [citado 2021-07-03], pp.4-8.
- [35] Mallahi, M. & Shokuhfar, Ali & Vaezi, M.R. & Esmailirad, Ahmad & Mazinani, Vahid. (2014). Synthesis and characterization of Bismuth oxide nanoparticles via sol-gel method. *Am. J. Eng. Res.* 3. 162-165.
- [36] 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, A deep investigation into the structure of carbon dots, *Carbon*, Volume 173, 2021, Pages 433-447, ISSN 0008-6223, <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.11.017>.
- [37] Kushwaha N, Mittal J, Pandey Sh, Kumar R. High temperature acidic oxidation of multiwalled carbon nanotubes and synthesis of graphene quantum dots. *Int. J. Nano Dimens.*, 2018; 9 (2): 191-197
- [38] Huan Wang Chaoqun Liu Zhen Liu Jinsong Ren Xiaogang Qu, Specific Oxygenated Groups Enriched Graphene Quantum Dots as Highly Efficient Enzyme Mimics, *Small* 2018, 14, 1703710. <https://doi.org/10.1002/sml.201703710>

- [39] Răcuciu M, Creangă DE, Airinei A. Citric-acid-coated magnetite nanoparticles for biological applications. *Eur Phys J E Soft Matter*. 2006 Oct;21(2):117-21. <https://doi.org/10.1140/epje/i2006-10051-y> Epub 2006 Nov 27. PMID: 17180642.
- [40] Ferrari Andrea Carlo and Robertson John 2004 Raman spectroscopy of amorphous, nanostructured, diamond-like carbon, and nanodiamond. *Phil. Trans. R. Soc.A*. **362**2477–2512
<http://doi.org/10.1098/rsta.2004.1452>
- [41] Tagliaferro, A.; Rovere, M.; Padovano, E.; Bartoli, M.; Giorcelli, M. Introducing the Novel Mixed Gaussian-Lorentzian Lineshape in the Analysis of the Raman Signal of Biochar. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1748. <https://doi.org/10.3390/nano10091748>
- [42] F. Tuinstra and J. L. Koenig, "Raman Spectrum of Graphite", *The Journal of Chemical Physics* **53**, 1126-1130 (1970) <https://doi.org/10.1063/1.1674108>
- [43] Lehman, J.H.; Terrones, M.; Mansfield, E.; Hurst, K.E.; Meunier, V. Evaluating the characteristics of multiwall carbon nanotubes. *Carbon* **2011**, *49*, 2581-2602.
- [44] Maciel, I.O.; Anderson, N.; Pimenta, M.A.; Hartschuh, A.; Qian, H.; Terrones, M.; Terrones, H.; Campos-Delgado, J.; Rao, A.M.; Novotny, L. Electron and phonon renormalization near charged defects in carbon nanotubes. *Nature materials* **2008**, *7*, 878-883