

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

---

FACOLTÀ DI CHIMICA INDUSTRIALE

*Dipartimento di Chimica Organica*

*Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale*

**SINTESI DI NANOPARTICELLE  
POLIMERICHE BASATE SU  
ACIDO(D,L-LATTICO-CO-GLICOLICO)  
PER APPLICAZIONI IN NANOMEDICINA**

**ELABORATO FINALE IN CHIMICA ORGANICA**

Presentato da:  
*Federico Saraga*

Relatore:  
*Prof. Mauro Comes Franchini*

Co-Relatore:  
*Erica Locatelli*

---

Terza Sessione  
Anno Accademico 2010-2011



# ***Indice***

<b>1. Introduzione</b>	1
<b>1.1. Il progetto SaveMe</b>	1
<b>1.2. Le nanotecnologie e la nanomedicina</b>	1
<b>1.3. I polimeri nel settore biomedico</b>	3
1.3.1. PMMA	4
1.3.2. PU	4
1.3.3. PLA	5
1.3.4. PGA	6
1.3.5. PLGA	6
1.3.6. PEG	7
<b>1.4. Biodegradabilità: la decomposizione idrolitica</b>	9
<b>2. Obiettivo della ricerca</b>	10
<b>3. Discussione dei risultati</b>	11
<b>3.1. Sintesi di PLGA modificato</b>	11
3.1.1. Sintesi di PLGA-H	11
3.1.2. Sintesi di PLGA-A	13
3.1.3. Sintesi di PLGA-b-PEG-(C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> N <sub>3</sub> )-PEG-NH <sub>2</sub>	18
<b>3.2. Sintesi di nanoparticelle polimeriche (PNPs)</b>	21
3.2.1. Oil/Water (O/W)	21
3.2.2. Nanoprecipitazione (NP)	22
3.2.3. PNPs-C	23
3.2.4. PNPs-CH	24
3.2.5. PNPs-CA	26
3.2.6. Decorazione superficiale di PNPs con nanoparticelle di CAN-Maghemite	30
3.2.7. Test biologici	33
<b>4. Conclusioni e prospettive future</b>	35
<b>5. Parte sperimentale</b>	36
<b>5.1. Note generali</b>	36
<b>5.2. Test colorimetrici</b>	37

5.2.1. Test alla ninidrina per ammine	37
5.2.2. Test al Fe(III) per acidi idrossamici	37
<b>5.3. Concentrazione, purificazione e sterilizzazione delle PNPs</b>	38
<b>5.4. Attivazione di PLGA-COOH</b>	39
5.4.1. Sintesi di PLGA-COCl	39
5.4.2. Sintesi di PLGA-NHS	39
<b>5.5. Sintesi di derivati del PLGA</b>	40
5.5.1. Sintesi di PLGA-H	40
5.5.2. Sintesi di PLGA-A	41
5.5.2.1. Sintesi di PLGA-CONH-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> (PLGA-NO <sub>2</sub> )	41
5.5.2.2. Sintesi di PLGA-CONH-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>	42
5.5.2.3. Reazione di PLGA-COCl con 4,7,10-trioxa-1,13-tridecandiammina (TDA)	43
<b>5.6. Click chemistry</b>	44
5.6.1. Sintesi di PLGA-b-PEG-C≡CH	44
5.6.2. Cicloaddizione azide-alchino catalizzata da Cu(I)	45
<b>5.7. Sintesi di PNPs</b>	46
5.7.1. Sintesi di PNPs-C via Oil/Water	46
5.7.2. Sintesi di PNPs-C via nanoprecipitazione	47
5.7.3. Sintesi di PNPs-CH via nanoprecipitazione	47
5.7.4. Sintesi di PNPs-CA via nanoprecipitazione	48
<b>5.8. Decorazione esterna di PNPs</b>	49
5.8.1. Decorazione superficiale di PNPs-C con nanoparticelle di CAN-Maghemite	49
5.8.2. Decorazione superficiale di PNPs-CA con nanoparticelle di CAN-Maghemite	50
<b>6. Schede di sicurezza</b>	51
6.1. Scheda di sicurezza dell'acido poli(D,L-lattico-co-glicolico)	51
6.2. Scheda di sicurezza del cloruro di tionile	58
6.3. Scheda di sicurezza del dicitloesilcarbodimmide	67
6.4. Scheda di sicurezza del N-idrossisuccinimmide	72





# ***1. Introduzione***

## ***1.1 Il progetto SaveMe***

Il SaveMe è un progetto finanziato (Grant Agreement no.: 263307) dalla comunità europea nell'ambito del settimo programma che ha avuto inizio nel marzo 2011. SaveMe è un acronimo per il titolo “*A modular active nano-platform for advanced cancer management*”. Il capofila dei 20 gruppi che lo compongono (tra università e industrie) è l'università israeliana di Tel Aviv ed il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio periodo di tesi magistrale è parte di questo progetto. Il SaveMe durerà 4 anni ed ha come obiettivo generale la sintesi di innovative piattaforme modulari nanotecnologiche formate da sistemi nanoparticellari centrali (*core nanosystems*), decorate sulla superficie esterna da agenti attivi, in grado di permettere diagnosi e terapia di forme tumorali. Tra gli agenti attivi saranno studiate varie biomolecole (proteine, peptidi e anticorpi monoclonali) e agenti nanostrutturati metallici tipo nanoparticelle magnetiche. L'obiettivo finale è ottenere nuovi sistemi nanotecnologici per diagnosi e terapia del tumore del pancreas.

L'unità di Bologna è stata coinvolta in questo progetto con l'obiettivo di sintetizzare e caratterizzare dei nuovi *core nanosystems* e di studiare le modalità di aggancio degli agenti attivi grazie alle competenze di chimica organica relative alla trasformazione di gruppi funzionali di sistemi nanostrutturati.

## ***1.2 Le Nanotecnologie e la Nanomedicina***

Con il termine nanotecnologia ci si riferisce a svariati ambiti della scienza e della tecnica che hanno come obiettivo l'investigazione e la manipolazione di materiali le cui dimensioni ricadono in un range compreso tra uno e cento nanometri. Quando la materia raggiunge tali dimensioni, le sue proprietà cambiano radicalmente rispetto a quelle comunemente conosciute e questo apre le porte a tantissime applicazioni non solo in

campo chimico ma anche tecnologico, biologico e soprattutto medicale.<sup>1</sup> Nello specifico la nanomedicina si occupa dello sviluppo e dell'utilizzo di sistemi derivanti dalle nanotecnologie per applicazioni mediche, sia di tipo terapeutico sia diagnostico. Da qui il termine recentemente coniato di "teranostica" ovvero la possibilità di fondere in un unico sistema entrambi i principali aspetti della medicina.<sup>2,3</sup> In questo ambito particolare attenzione è posta allo sviluppo di sistemi per *drug delivery*, termine col quale si indica il trasporto e rilascio controllato di farmaci all'interno dell'organismo: questo aspetto è fondamentale per lo sviluppo di nuovi farmaci o per consentire a quelli già noti di avere una migliore selettività verso il sito attivo bersaglio ma anche una più lunga circolazione all'interno del corpo minimizzando le interazioni col metabolismo e ottenendo così un più alto indice terapeutico. A questo scopo le nanotecnologie dispongono di svariati sistemi tra i quali sempre maggiore spazio stanno avendo le nanomicelle a matrice polimerica biodegradabile basate su polimeri approvati dalla Food And Drug Administration (FDA): esse consentono infatti di veicolare farmaci o altri sistemi di dimensione nanometrica all'interno del corpo per poi rilasciarli solo una volta giunte a destinazione, ovvero sulla cellula bersaglio che si desidera colpire, minimizzando in questa maniera anche i possibili effetti collaterali. Per quanto riguarda invece lo sviluppo dell'aspetto diagnostico molte possibilità sono riposte nelle nanoparticelle metalliche, in particolar modo nanoparticelle a base di ossidi di ferro; grazie alle particolari proprietà magnetiche che le caratterizzano esse sono infatti ideali per applicazioni nel campo dell'imaging diagnostico quali ad esempio imaging a risonanza magnetica (MRI). La possibilità di unire sotto un unico sistema nanostrutturato questi due aspetti apre dunque le porte ad applicazioni dal potenziale enorme.

---

<sup>1</sup> Royal Society & Royal Academy of Engineering, "*Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties*", **2004**.

<sup>2</sup> Dullaart, A., Bock, A. K., Zweck, A., *Nat Biotechnol.*, **2006**, *24*, 1211-1217

<sup>3</sup> Freitas, R. A., *Nanotech. Biol. Med.*, **2005**, *1*, 2-9

### ***1.3 I polimeri nel settore biomedico***

“Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo” (II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Gran Bretagna, 1991). Questi materiali possono essere di origine naturale (proteine, polisaccaridi, polimeri ecc), metallici o ceramici ma ultimamente i polimeri sintetici sono quelli con le applicazioni e gli usi più ampi e studiati.<sup>4</sup> Questa varietà è dovuta alla possibilità di giocare su vari parametri (struttura chimica, peso molecolare ecc.) in fase di progettazione e ottenere così materiali con proprietà chimiche, fisiche e meccaniche mirate per le applicazioni previste. Così troviamo polimeri sintetici inerti utilizzati per la costruzione di organi artificiali ma anche con funzione strutturale in protesi e chiodi chirurgici. Polimeri biodegradabili invece sono utilizzati per la produzione di suture e, soprattutto, per il rilascio controllato di farmaci. I requisiti da soddisfare perché un polimero sintetico possa essere utilizzato in campo medico sono:

- Biocompatibilità: il materiale deve essere in grado di entrare in contatto con l'organismo ospite senza subire l'attacco del sistema immunitario, senza liberare specie tossiche né cancerogene;<sup>5</sup>
- Elevata purezza;
- Emocompatibilità: il materiale non deve scatenare la risposta immunitaria dell'organismo di cui è ospite. A tal fine esso non può essere tossico (come i suoi additivi o prodotti di degradazione), non può essere cancerogeno e non deve indurre la formazione di coaguli sanguigni.

La FDA, il già citato ente governativo americano che si occupa della legislazione in ambito alimentare e farmacologico, ha ammesso all'uso medico un discreto numero di polimeri di sintesi.

---

<sup>4</sup> Ratner B. D., *Pergamon Press*, **1989**, 7, 201

<sup>5</sup> Y. Ikada, W. Shalaby, *ACS Symp.*, **1994**, 540

### 1.3.1 Polimetilmetacrilato (PMMA)

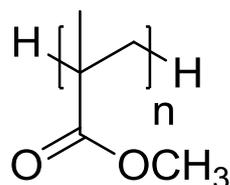


Figura 1. PMMA

Il polimetilmetacrilato è il polimero del metilmetacrilato. Gli impieghi principali che trova sono dovuti alla sua trasparenza, alla facilità di lavorazione e alle buone proprietà meccaniche che lo rendono un sostituto del vetro in impieghi particolari, quali vetri infrangibili e di sicurezza. Tuttavia ha anche usi in medicina: è stato il primo polimero usato per la creazione di lenti a contatto e lo è tuttora benché in mescola con altri polimeri o in suoi derivati più ricchi di gruppi ossidrilici (HEMA, poliidrossietilmetacrilato); è biocompatibile<sup>6</sup> e utilizzato in medicina come cemento per ossa e in nanomedicina, sotto forma di nanoparticelle collegate ad una grande quantità di sistemi quali nanoparticelle di diamante, nanotubi di carbonio ma anche proteine ed enzimi.<sup>7</sup> Il PMMA non è biodegradabile<sup>8</sup> e non è utilizzato puro per il *drug delivery* ma solo miscelato con altri polimeri quali polietilenglicole o acetato di cellulosa.<sup>9</sup>

### 1.3.2 Poliuretano (PU)

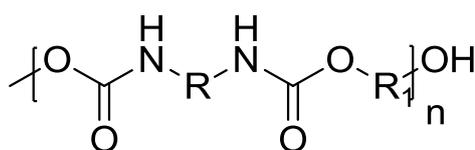


Figura 2. PU

I poliuretani sono una famiglia di polimeri, ottenuti dalla polimerizzazione di un diisocianato e un diolo, che contengono legami uretanici all'interno della catena. Variando la struttura dei monomeri possono essere ottenuti materiali con proprietà molto diverse tra loro che trovano impiego, infatti, in campi molto diversi: in edilizia come

<sup>6</sup> Jäger M, Wilke A., *J Biomater Sci Polym.*, **2003**, 14(11), 1283-98

<sup>7</sup> *Nanomedicine* - Volume - IIA - Biocompatibility

<sup>8</sup> Mader J. T., Calhoun J., Cobos J., *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **1997**, 415-418

<sup>9</sup> Krishna Bhat D., Selva Kumar M., *J. Polym. Environ.*, **2006**, 14, 385-392

schiume isolanti morbide e rigide, come materiali antiusura in meccanica, molle, rivestimenti e persino lame. In medicina i poliuretani sono utilizzati per la realizzazione di protesi, rivestimenti per organi artificiali e per il rilascio controllato dei farmaci sotto forma di microgel<sup>10</sup> o come rivestimenti gastrici degradabili per medicinali ad assunzione orale.<sup>11</sup> Per questi usi vengono utilizzati dioli biocompatibili, principalmente PEG, e isocianati derivati dall'acido L-lattico.

### 1.3.3 Acido polilattico (PLA)

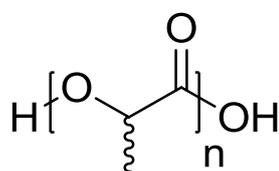


Figura 3. PLA

Il PLA è il polimero ottenuto dalla polimerizzazione dell'acido lattico; questo monomero può esistere in due forme enantiomeriche, l'acido D-lattico e l'acido L-lattico. Questo porta alla possibilità di ottenere tre tipi di polimero: il PLLA è il polimero composto di solo enantiomero L, il PDLA è composto di solo enantiomero D e il PDLLA, ottenuto dalla polimerizzazione dei due enantiomeri. Il PLLA e il PDLA sono polimeri isotattici semicristallini, hanno buone proprietà meccaniche e sono impiegati per la costruzione di protesi temporanee.<sup>12</sup> Benché entrambi biocompatibili e biodegradabili, è nettamente più impiegato il PLLA perché più semplice da smaltire per il corpo (viene eliminato allo stesso modo dell'acido L-lattico prodotto nei muscoli).<sup>13</sup> Il PDLLA invece è un polimero atattico, amorfo, con proprietà meccaniche più scarse dei suoi omologhi isotattici ma dalla biodegradabilità più spiccata e per questi motivi è utilizzato per il *drug delivery*, per lo più sottoforma di nano- e microparticelle.<sup>14</sup>

<sup>10</sup> Oh J. K., Drumright R., Siegwart D. J., Matyjaszewski K., *Progress in Polymer Science*, **2008**, 448-477

<sup>11</sup> Kimura Y., Makita Y., Kumagai T., Yamane H., Kitao T., *Polymer*, **1992**, 33 (24), 5294-5299

<sup>12</sup> Nakamura T., Gitomi S., Shimamoto T., *Biomaterials and Clinical Application*, **1987**, 7, 759-765

<sup>13</sup> Barrows T. H., *Clinical Materials*, **1986**, 1, 233-257

<sup>14</sup> Lassalle V., Ferreira M. L., *Macromolecular Bioscience*, **2007**, 7 (6)

### 1.3.4 Acido poliglicolico (PGA)

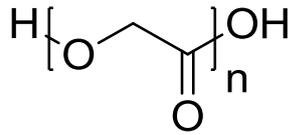


Figura 4. PGA

L'acido poliglicolico è il polimero risultante dalla polimerizzazione dell'acido glicolico; è semicristallino con buone proprietà meccaniche ma molto biodegradabile per la presenza di legami esterei. Grazie a queste caratteristiche è stato il primo polimero ad essere utilizzato per la produzione di suture riassorbibili, brevettate già nel 1962. In seguito è stato utilizzato anche per la produzione d'impianti biodegradabili, quali chiodi, viti e spilli;<sup>15</sup> infine è molto usato nella sintesi di copolimeri per il rilascio controllato dei farmaci.

### 1.3.5 Acido Poli(lattico-co-glicolico)

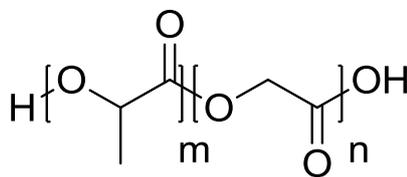


Figura 5. PLGA

L'acido poli(lattico-co-glicolico), il cui acronimo è PLGA, è un copolimero sintetico ottenuto dalla polimerizzazione tra gli omodimeri ciclici dell'acido lattico e dell'acido glicolico. È un materiale biocompatibile e biodegradabile, approvato dalla FDA per l'uso interno.<sup>16</sup> È amorfo con una temperatura di transizione vetrosa compresa tra i 40 e i 60 °C e solubile nella maggior parte dei solventi organici. A seconda del rapporto tra i monomeri possono essere ottenuti PLGA con diverse proprietà, utili a scopi diversi: aumentando la quantità di acido lattico aumenta il tempo di degradazione (anche in base all'enantiomero usato per la sintesi) e le proprietà meccaniche migliorano, a parte per il

<sup>15</sup> Middleton J., Tipton A., *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*, **1998**

<sup>16</sup> Lü J. M., Wang X., Marin-Muller C., Wang H., Lin P. H., Yao Q., Chen C., *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, **2009**, 9 (4), 325-341

PLGA 50:50 che si dimostra il meno stabile.<sup>17</sup> Per questo motivo il PLGA è utilizzato sia per la fabbricazione di suture, grappette e impianti, sia per nano e microparticelle biodegradabili per il *drug delivery* di una grande quantità di farmaci: proteine, siRNA e antigeni, somministrabili in diversi modi (iniezioni intramuscolari, inalazione e per via orale).<sup>18</sup> Ad esempio nanoparticelle a base di PLGA caricate con agenti di crescita per fibroblasti (FGF) vengono immerse in una matrice di altri polimeri filabili, allo scopo di produrre suture in grado di stimolare la riparazione dei tessuti danneggiati da malattie cardiovascolari.<sup>19</sup> Nanoparticelle dello stesso tipo, ma caricate con anticoagulanti, vengono usate per il lento rilascio del farmaco nel flusso sanguigno come misura contro l'arteriosclerosi.<sup>20</sup> La stessa capacità di queste nanoparticelle di decomporsi lentamente è sfruttata per la somministrazione di vaccini: trattamenti che richiedevano frequenti richiami per portare i loro effetti sono stati sostituiti da nanoparticelle caricate con antigeni che vengono così rilasciati lentamente nel flusso sanguigno.<sup>21</sup>

### 1.3.6 Polietilenglicole (PEG)

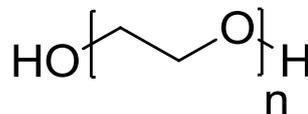


Figura 6. PEG

Il polietilenglicole è un polietere, polimero del glicole etilenico, sintetizzato via catalisi acida o basica. Può essere ottenuto con un enorme intervallo di peso molecolare, da 300 fino a 10000000 g/mol, oltre che in oligomeri. Si presenta liquido a bassi pesi molecolari, solido ma con una bassa temperatura di fusione man mano che le catene si allungano; quando solido si presenta come un polimero cristallino.<sup>22</sup> Tutti i PEG hanno proprietà chimiche simili, a parte la viscosità che aumenta con il peso molecolare, sono biocompatibili e sono espulsi dal corpo senza essere modificati (non sono molto biodegradabili). Ha una grandissima quantità d'impieghi nei più svariati campi: è la base

<sup>17</sup> Astete C. E., Sabliov C. M., *Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition*, **2006**, 17 (3), 247-289

<sup>18</sup> Xie H., Smith J.W., *Journal of Nanobiotechnology*, **2010**, 8-18

<sup>19</sup> Lee B. H., Nam H. Y., Kwon T., et al., *Nephrol. Dial. Transplant*, **2006**, 21(9), 2432-2438

<sup>20</sup> Suh H., Jeong B., Rathi R., Kim S.W., *J. Biomed. Mater. Res*, **1998**, 42(2), 331-338

<sup>21</sup> Zhao Z., Leong K. W., *J. Pharm. Sci*, **1996**, 85(12), 1261-1270

<sup>22</sup> French A. C., Thompson A.L., Davis B.G., *Angew. Chem. Intl Ed.*, **2009**, 48, 1248-1252

di creme e gel in cosmetica, come addensante in cucina, come lubrificante, come surfattante non ionico,<sup>23</sup> come solvente elettrolitico in batterie al litio, persino nel restauro per preservare oggetti sommersi; in biologia è largamente utilizzato per imporre alte pressioni osmotiche, grazie alla sua alta solubilità in acqua. I suoi impieghi in medicina sono forse ancora più numerosi: è largamente usato come eccipiente, come lubrificante o rivestimento, è comunemente usato come lassativo ma ha anche usi nella riparazione di nervi lesionati.<sup>24</sup> Studi recenti mostrano che farmaci funzionalizzati con PEG hanno un tempo di permanenza all'interno del flusso sanguigno maggiore, il che aumenta il loro periodo di efficienza.<sup>25</sup> Questo perché il PEG è in grado di rallentare il processo di opsonizzazione delle nanoparticelle: quando un corpo estraneo entra nell'organismo attiva le difese immunitarie che rispondono liberando anticorpi. Le opsonine sono una classe di anticorpi che hanno la capacità di legarsi alla superficie dell'intruso (sia esso un microorganismo o una nano particella); le cellule fagocitarie hanno invece particolari recettori sulla membrana cellulare capaci di legarsi alle opsonine e accelerare così il processo di fagocitosi e conseguente eliminazione.<sup>26</sup> Il PEG va ad inserirsi in questo processo bloccando l'aggancio delle opsonine sulla superficie della nanoparticella, rendendola "invisibile" al sistema immunitario. La FDA ha approvato una grande quantità di usi interni di questo polimero accoppiato a biomolecole: molecole dalla struttura lineare e proteine coniugate a PEG sono usate per trattare l'immunodeficienza in sostituzione del trapianto di midollo spinale;<sup>27</sup> il Camptosar<sup>®</sup> è un farmaco antitumorale molto efficace contro il tumore del colon ma aveva i problemi di subire una forte degradazione enzimatica ed essere poco solubile in acqua. Il suo accoppiamento con PEG ha risolto entrambi i problemi.<sup>28</sup> La capacità del PEG e di suoi copolimeri di formare micelle ha aperto la strada ad un'altra quantità incredibile di studi e usi nel *drug delivery*: le micelle, caricate con antitumorali, antigeni, blocchi di RNA sintetico, possono facilmente portare queste molecole all'interno delle cellule. La semplicità con cui le micelle oltrepassano la barriera cellulare è dovuta alla somiglianza tra la struttura delle nanoparticelle e della barriera fosfolipidica.<sup>29</sup>

---

<sup>23</sup> Susan C., *Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients*, **1992**, 287

<sup>24</sup> Krause T. L., Bittner G. D., *PNAS*, **1990**, 87 (4), 1471-1475

<sup>25</sup> Tomiya N., Watanabe K., Awaya J., Kurono M., Fujii S., *Febs Letters*, **1985**, 193 (1), 44-48

<sup>26</sup> Shan X., Yuan Y., Liu C., Tao X., Sheng Y., Xu F., *Biomed. Microdevices.*, **2009**, 11 (6), 1187-94

<sup>27</sup> Greenwald R. B., Choe Y. H., McGuire J., Conover C. D., *Drug delivery Rev.*, **2003**, 55, 217-250

<sup>28</sup> U.S. Food and Drug Administration Approved Drug Products/Approval History NDA 020571.

<http://www.fda.gov/cder/foi/label/2006/020571s0301bl.pdf> (January **2007**).

<sup>29</sup> Joralemon M. J., McRae S., Emrick T., *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 1377-1393/1377

## ***1.4 Biodegradabilità: la decomposizione idrolitica***

Per degradazione si intende un “processo irreversibile, che porta ad un cambiamento della struttura del materiale, sotto forma di perdita di proprietà meccaniche, danneggiamento, frammentazione o depolimerizzazione. La degradazione è influenzata dall'ambiente e può presentare una velocità costante o variabile nel tempo”.<sup>30</sup> Il corpo umano utilizza principalmente due processi per decomporre molecole di grandi dimensioni: l'idrolisi e la degradazione enzimatica. I polimeri di sintesi utilizzati in medicina vengono decomposti grazie alla reazione di idrolisi. La velocità di questa reazione e, di conseguenza, il tempo di permanenza del polimero nell'organismo, è regolata da diversi fattori:<sup>31,32,33</sup>

- interazione del polimero con l'acqua: sono importanti il coefficiente di diffusione e, soprattutto, di assorbimento dell'acqua nel polimero. Maggiore è l'idrofilicità del materiale, maggiore è la velocità di decomposizione;
- cristallinità del polimero: le regioni amorfe del materiale hanno catene più allargate, non compatte che permettono una miglior penetrazione dell'acqua. Quanto più un materiale è cristallino, tanto più resisterà alla degradazione;
- temperatura: ha due effetti ovvero accelera la cinetica di reazione e rende più mobili le catene (se si supera la temperatura di transizione vetrosa);
- struttura del polimero: la presenza di eteroatomi, di gruppi idrofilici e, in particolare modo, di legami eterei, esterei e uretanici rende più agevole la degradazione.

Anche fattori quali concentrazione dell'acqua, pH e concentrazione dei sali modificano la velocità di idrolisi. I prodotti d'idrolisi dei polimeri biocompatibili sono spesso i monomeri stessi che vengono smaltiti grazie ai normali processi metabolici dell'organismo. Il PLGA ad esempio viene decomposto in acido lattico e acido glicolico: il primo viene smaltito, similmente a quello prodotto durante un'intensa attività fisica nei muscoli, attraverso i reni oppure trasformato in piruvato, il quale entra nel ciclo di Krebs; l'acido glicolico invece viene utilizzato dall'organismo per la sintesi della glicina e altri amminoacidi.

---

<sup>30</sup> Definizione ASTM D-6400

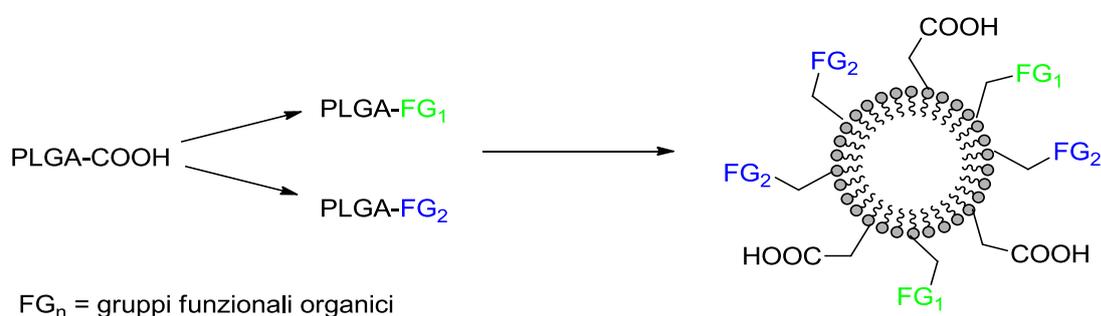
<sup>31</sup> Canciello M., “Sistemi polimerici multicomponenti biorassorbibili per applicazioni biomediche e farmaceutiche”, tesi di dottorato di ricerca in scienze chimiche, Università degli studi di Napoli, **2008**

<sup>32</sup> Scott G., “*Mechanisms of polymer degradation and stabilization*”, **1990**

<sup>33</sup> Hamid S. H., Amin M. B, Maadhah A. G, “*Handbook of polymer degradation*”, **1992**

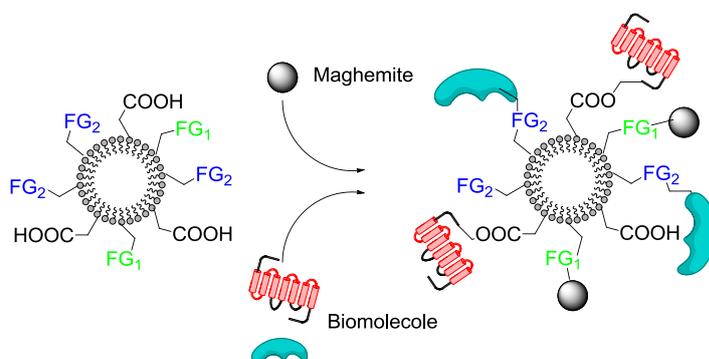
## 2. Obiettivo della ricerca

Obiettivo di questa ricerca è sintetizzare nuove nanoparticelle polimeriche basate sul copolimero PLGA e trovare inoltre vie sintetiche semplici e riproducibili per derivati ulteriormente funzionalizzati del citato copolimero a blocchi. L'ulteriore obiettivo è quindi l'ottenimento di NP polimeriche ricche di funzionalità diverse sulla superficie esterna ed in grado di fungere da sistemi nanostrutturati centrali sui quali attaccare ulteriori frammenti interessanti per possibili applicazioni biomedicali.



Schema 1. Modifica di PLGA-COOH e sintesi di micelle miste

La possibilità di avere gruppi funzionali diversi al termine della catena polimerica permetterà di attaccare sulla superficie esterna delle nanoparticelle diversi tipi di biomolecole (proteine, peptidi, anticorpi monoclonali), specifiche per terapie su linee cellulari e/o sistemi metallici nanostrutturati: essi sono in grado di fornire i vantaggi tipici delle nanoparticelle metalliche, quali ad esempio le applicazioni di *imaging* come nel caso delle nanoparticelle magnetiche che verranno fornite dal gruppo coordinatore del progetto SaveMe della Bar-Ilan University (Tel Aviv, Israele).



Schema 2. Decorazione esterna delle nanoparticelle

### ***3. Discussione dei risultati***

Il lavoro è stato svolto su due principali binari:

- la modificazione di acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) (PLGA, 7000 Da) in modo tale da avere come gruppo terminale un acido idrossamico (H) per ottenere un PLGA-H o un'ammina primaria (A) per ottenere un PLGA-A;
- la sintesi di nanoparticelle polimeriche (PNPs), basate sui polimeri sintetizzati, ovvero con gruppi acidi, amminici e idrossamici sulla superficie per poi rendere possibile l'aggancio di nanoparticelle metalliche e sistemi biologicamente attivi.

#### ***3.1. Sintesi di PLGA modificato***

##### ***3.1.1. Sintesi di PLGA-H***

Il gruppo idrossamico (C(O)NHOH) ha ottime capacità chelanti ed è in grado di coordinare facilmente ossidi di ferro<sup>34</sup>. Il gruppo di ricerca in cui ho svolto la tesi ha recentemente dimostrato<sup>35</sup> questa capacità e proprio per questo è stato scelto per il progetto SaveMe: nanoparticelle aventi acidi idrossamici superficiali sono in grado di legarsi alle nanoparticelle di maghemite, le quali, essendo superparamagnetiche, possono essere usate in medicina diagnostica oppure possono essere guidate da campi magnetici esterni verso la zona malata, così da massimizzare la selettività del trattamento.

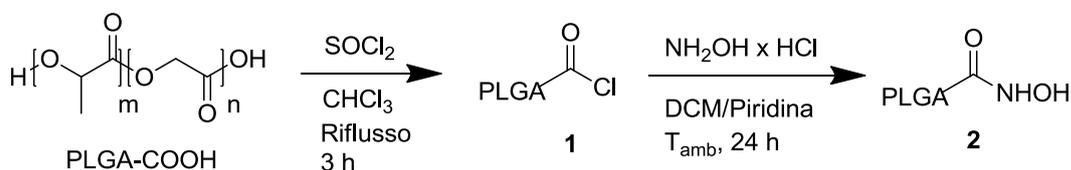
La sintesi di PLGA-H è stata fatta seguendo una procedura già utilizzata e ottimizzata dal gruppo di ricerca del laboratorio. Questo consiste nel sintetizzare il cloruro acilico del polimero così da renderlo reattivo; l'attivazione è fatta con cloruro di tionile (SOCl<sub>2</sub>) in cloroformio per tre ore. Una volta terminata questa reazione si elimina il solvente, il cloruro di tionile non reagito e i sottoprodotti della reazione (HCl ed SO<sub>2</sub>) con una pompa ad alto vuoto. Il polimero attivato viene ripreso con diclorometano (DCM) anidro e vengono aggiunte cloridrato di idrossilammina (NH<sub>2</sub>OH x HCl) e piridina quale base

---

<sup>34</sup> Fauconnier N., Bée A., Roger J., Pons J. N., *Journal of Molecular Liquids*, **1999**, *83 (1-3)*, 233-242

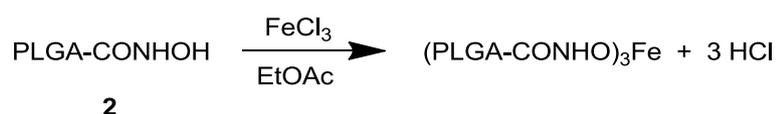
<sup>35</sup> Baldi G., Bonacchi D., Comes Franchini M., Gentili D., Lorenzi G., Ricci A., Ravagli C., *Langmuir*, **2007**, *23*, 4026-4028

di Lewis. La presenza della base è necessaria perché l'idrossilammina va attivata e l'acido prodotto dal coupling (HCl) va rimosso per non decomporre il PLGA. Dopo una notte il prodotto viene lavato e seccato. Si presenta come un solido bianco e la sintesi ha una resa del 67%.



**Schema 3. Sintesi di PLGA-H (2)**

Il prodotto è stato caratterizzato tramite analisi  $^1\text{H-NMR}$ , la quale mostra che il polimero non si è decomposto poiché i picchi sono invariati rispetto al polimero di partenza; ovviamente i picchi degli idrogeni del gruppo idrossamico non sono visibili perché il rapporto tra i protoni del polimero e quelli dell'unico gruppo terminale è troppo alto, inoltre questi protoni sono molto mobili e difficili da vedere anche in condizioni più propizie. Per assicurare la presenza del gruppo idrossamico e, quindi, la buona riuscita della reazione è stato fatto un test colorimetrico qualitativo che sfrutta le capacità chelanti dell'acido idrossamico nei confronti del ferro<sup>36</sup>.



**Schema 4. Saggio con Fe(III) per acido idrossamico**

<sup>36</sup> Agrawal Y. K., *Russ. Chem. Rev.* **1979**, 48, 948

In una provetta si discioglie del cloruro ferrico ( $\text{FeCl}_3$ ) in etil acetato e si scalda fino a che il sale non è sciolto e la soluzione non è gialla; si aggiunge quindi il polimero e si scalda ancora fino a scioglierlo. Se il test è positivo la soluzione assume una colorazione rosso porpora, dovuta al complesso formato dal  $\text{Fe(III)}$  con il polimero.



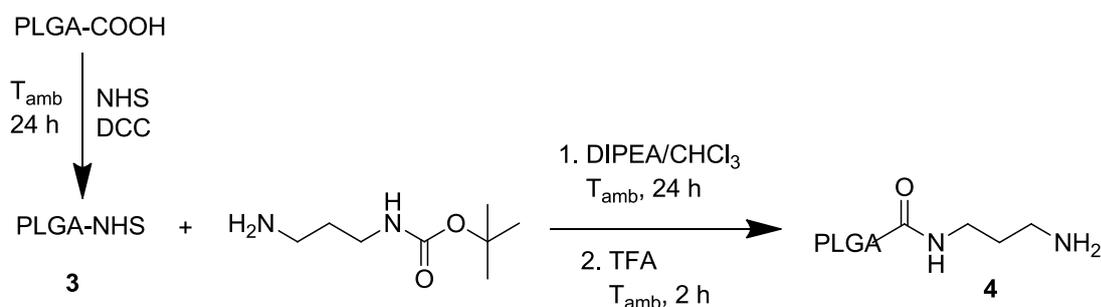
**Figura 7. Test con  $\text{Fe(III)}$ : positivo (sinistra) e negativo (destra)**

Il polimero sintetizzato ha prodotto una forte colorazione rossa che indica il buon risultato della sintesi. Questo polimero modificato è stato usato per la sintesi di nanoparticelle miste, ovvero con gruppi superficiali acidi e idrossamici, richieste dal progetto SaveMe come obiettivo del primo anno di ricerca.

### **3.1.2. Sintesi di PLGA-A**

Le ammine sono ottimi nucleofili e sono in grado di reagire facilmente con acidi carbossilici attivati. Ottenere PLGA con un'ammina terminale per poter poi sintetizzare nanoparticelle polimeriche (*polymeric nanoparticles*, PNPs) con ammine sulla superficie esterna è uno dei punti fondamentali richiesti al gruppo di ricerca di Bologna. Questo perché avere PNPs con superficie funzionalizzata in maniera differente permetterà di agganciare selettivamente e in quantità conosciute le biomolecole aventi effetti antitumorali e protettivi per il farmaco stesso.

La sintesi di questo polimero modificato ha richiesto molte prove che sono iniziate tentando l'attacco di 1,3-diamminopropano sui gruppi COOH superficiali di PNPs ottenute da PLGA-COOH, utilizzando come attivante dell'acido carbossilico la *N*-ethyl-*N'*-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide (EDC) poiché solubile in acqua, ambiente in cui si trovano disperse le PNPs. Fin da subito però è apparso chiaro che il reagente bifunzionale provocava l'aggregarsi delle nanoparticelle, probabilmente per doppio attacco su entrambe le ammine. Per evitare questo inconveniente si è deciso di utilizzare boc-1,3-diamminopropano e di tentare la reazione sul polimero lineare, attivato con *N*-idrossisuccinimide (NHS) in solvente organico, in modo da poter utilizzare le condizioni di reazione tipiche della chimica organica e senza rischiare la degradazione di sistemi labili quali le PNPs.

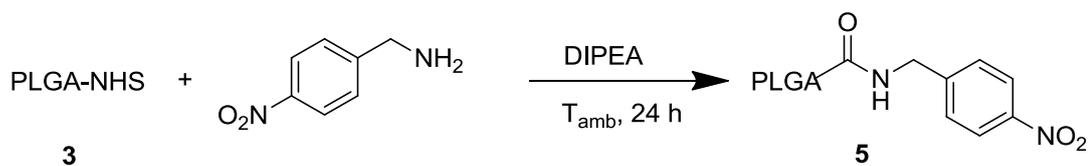


**Schema 5. Sintesi di PLGA-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>**

La reazione è stata ripetuta più volte ma non si sono mai ottenuti buoni risultati: la prima parte della reazione si è rivelata un successo, tanto che gli spettri <sup>1</sup>H-NMR mostrano chiaramente il picco dei protoni del CH<sub>3</sub> del gruppo Boc (un singoletto a circa 1,41 ppm, i segnali dei CH<sub>2</sub> non sono visibili), tuttavia il secondo passaggio, ovvero la deprotezione, si è rivelata critica. Nei vari tentativi è stata variata la natura (HCl e TFA) e la concentrazione dell'acido ma i risultati sono sempre stati invariabilmente due: o il polimero si decomponeva o il gruppo protettore non veniva rimosso. Queste difficoltà hanno portato all'abbandono di questa sintesi.

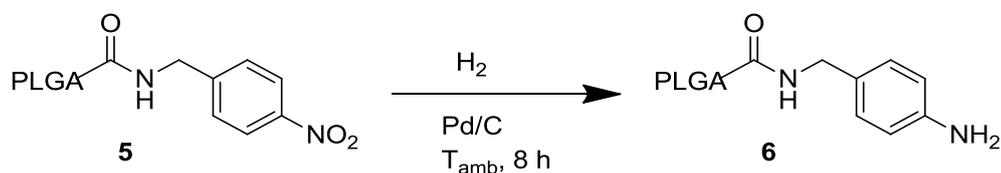
La seconda molecola testata per sintetizzare il PLGA-A è stata la 4-nitrobenzilammina. È stata scelta perché non in grado di dare doppio attacco e perché composta da un fenile, i cui segnali NMR sono tipici e cadono in una zona libera dai segnali del polimero, caratteristica utile a comprendere se l'ammidazione avviene. La sintesi è stata fatta in

cloroformio, usando un eccesso di 2 equivalenti di 4-nitrobenzilammina rispetto al PLGA attivato con NHS, in presenza di N,N-diisopropilettilammina (DIPEA) come base.



**Schema 6. Sintesi di PLGA-CONH-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> (PLGA-NO<sub>2</sub>)**

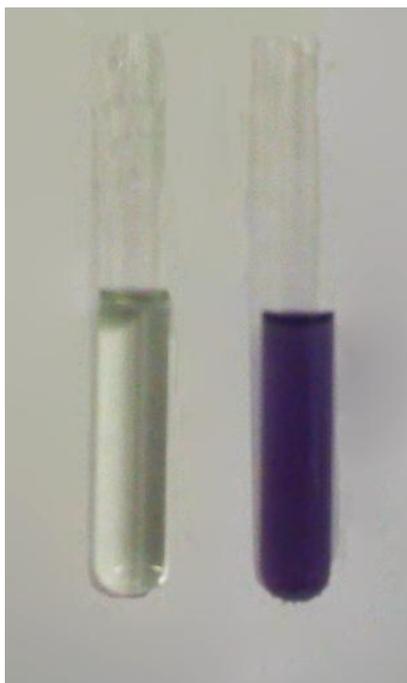
Questa sintesi ha avuto un buon risultato: lo spettro <sup>1</sup>H-NMR mostra chiaramente i picchi di CH del fenile a 8,20 e 7,42 ppm e si ottiene una resa del 70%. Il passo successivo è stato ridurre il gruppo nitro ad ammina: dapprima la riduzione è stata tentata usando ammonio formiato e Pd/C come catalizzatore ma in un caso il polimero si è decomposto mentre in un secondo non si è formata ammina. Per quanto chiaramente il problema sarebbe stato ottimizzare il tempo di reazione, si è deciso di tentare la riduzione con idrogeno gassoso e Pd/C, in un idrogenatore ad agitazione meccanica.



**Schema 7. Riduzione del PLGA-NO<sub>2</sub>**

Questa riduzione è andata a buon fine, infatti, il polimero **5** non ha subito degradazione. Per avere la certezza della presenza del gruppo amminico è stato fatto, in modo analogo al PLGA-H, un test colorimetrico qualitativo, il test alla ninidrina. Questo test si basa sulla capacità del 2,2-diidrossi-1,3-diossoidrindene (ninidrina) di reagire selettivamente con ammine primarie e formare un dimero della ninidrina dalla colorazione viola (Ruhemann's Purple).<sup>37</sup>

<sup>37</sup> Bottom C. B., Hanna S. S., Siehr D. J., *Biochemical Education*, **1978**, 6 (1)

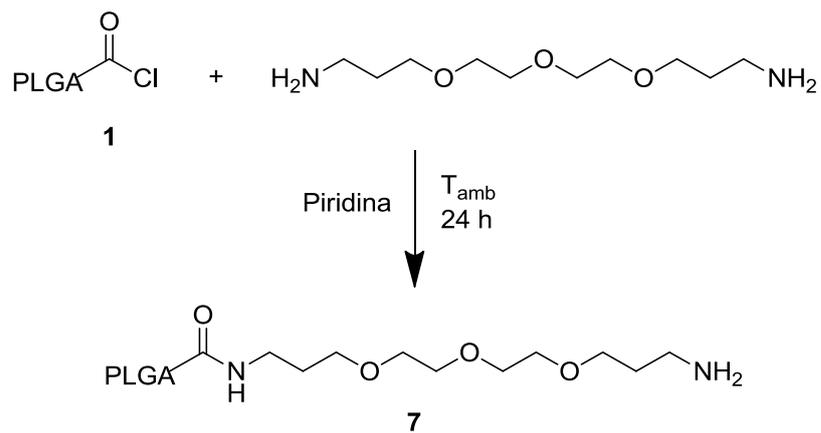


**Figura 8. Test alla ninidrina negativo (sinistra) e positivo (destra)**

Questo test non è altro che una versione rapida e qualitativa del Kaiser Test utilizzato come analisi quantitativa nella caratterizzazione di amminoacidi e proteine sintetiche.<sup>38</sup> Anche se questa reazione è stata un successo, si è deciso di testare anche un'altra reazione, infatti dall'esperienza del gruppo di ricerca del dipartimento è noto che il PLGA reagisce molto bene con PEG avente ammina terminale, producendo copolimeri con alte rese. In base a questo si è deciso di utilizzare una diammina simile al PEG, la 4,7,10-triossi-1,13-tridecandiammina (TDA). Inizialmente la reazione di amidazione è stata provata partendo da PLGA-NHS (**3**) ma l'attivazione non si è rivelata abbastanza efficace perciò è stato scelto il PLGA-COCl (**1**) come polimero di partenza. Anche la quantità di diammina ha subito una variazione, salendo fino a 5 equivalenti, perché in quantità inferiori, in 24 ore di reazione, non sono stati ottenuti risultati (test alla ninidrina negativi). Questo eccesso è anche utile per evitare il doppio attacco del polimero su entrambe le ammine primarie del TDA. Inoltre l'eccesso è stato ulteriormente maggiorato nelle prime fasi della reazione sgocciolando il PLGA-COCl in una soluzione di diammina. Si è rivelata molto importante la velocità con cui il polimero attivato viene sgocciolato perché una velocità eccessiva porta ad una produzione di HCl troppo rapida e alla decomposizione del prodotto, nonostante la presenza della base.

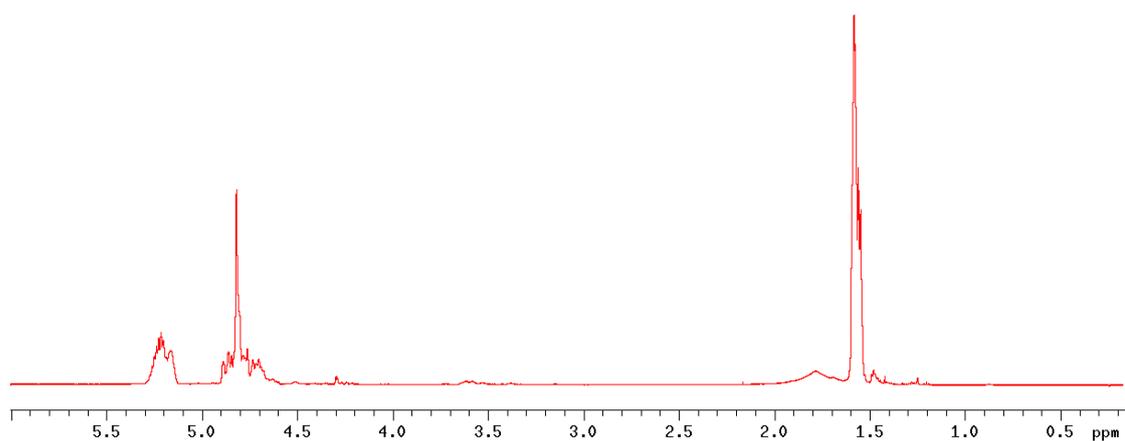
---

<sup>38</sup> Sarin V. K., Kent S. B. H., Tam J. P., Merrifield R. B., *Analytical Biochemistry*, **1981**, 117, 147-157



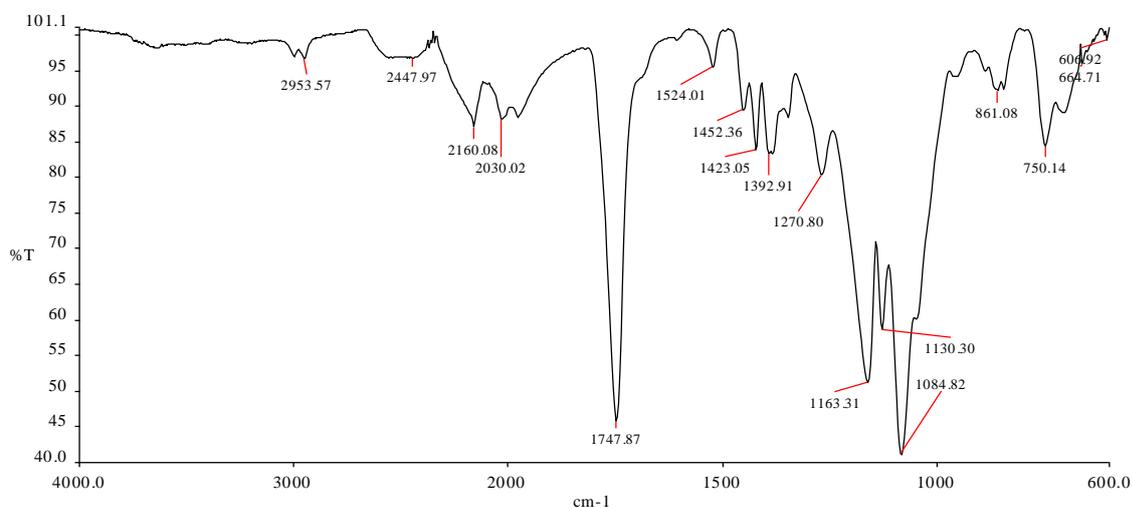
**Schema 8. Sintesi di PLGA-CONH-(C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>)-NH<sub>2</sub>**

Questa sintesi ha dato i migliori risultati: il polimero **7** è rimasto intatto e il test alla ninidrina è stato positivo.



**Figura 9. <sup>1</sup>H-NMR di PLGA-CONH-(C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>)-NH<sub>2</sub>**

È stato registrato anche lo spettro IR di questo prodotto che evidenzia, con un picco a  $1524\text{ cm}^{-1}$ , la presenza dell'ammina primaria (bending N-H).



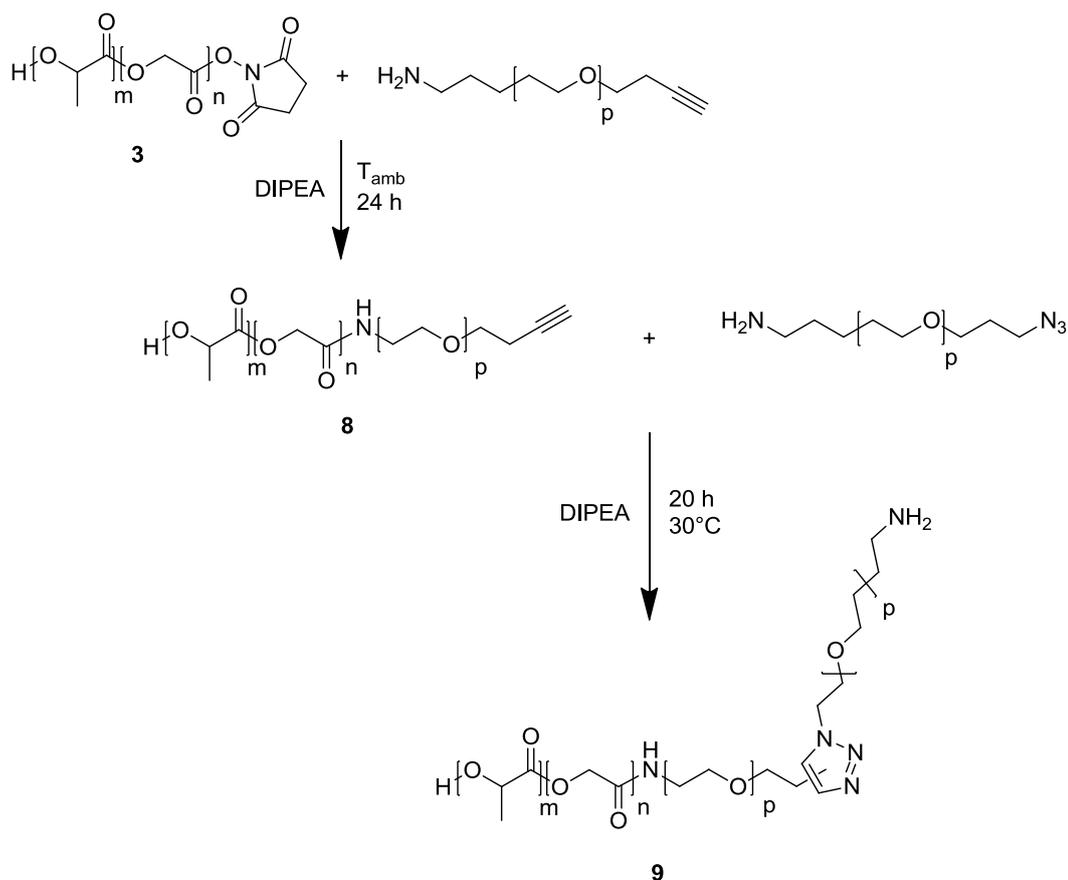
**Figura 10. Spettro IR di PLGA-A (7)**

Come sarà illustrato più avanti con questo polimero modificato sono state realizzate le nanoparticelle miste (con gruppi superficiali acidi e amminici) che erano obiettivo del primo anno di ricerca del progetto SaveMe.

### **3.1.3. Sintesi di PLGA-b-PEG-(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>)-PEG-NH<sub>2</sub>**

Nel mio gruppo di ricerca vengono sintetizzate nanoparticelle polimeriche basate su un copolimero di PLGA e PEG. Questo copolimero è sintetizzato con ottime rese e le nanoparticelle ottenute hanno piccole dimensioni e alta stabilità. Cercando quindi di migliorare i risultati ottenuti con la sintesi precedente, si è cercato di ottenere il copolimero PLGA-b-PEG con ammina terminale sfruttando una reazione click, la cicloaddizione azide-alchino catalizzata con rame (I). Questa reazione, famosissima nel campo della sintesi organica, è stata scelta perché molto flessibile (tollera una grande variazione delle catene dell'alchino e dell'azide impiegate), ha rese molto alte e non produce sottoprodotti<sup>39</sup>. Come reagenti sono stati scelti il PLGA-NHS e due PEG eterobifunzionali: uno con un'ammina e un alchino terminali e uno con un'azide e un'ammina, entrambi del peso di 3000 Da, disponibili commercialmente.

<sup>39</sup> Bock V. D., Hiemstra H., van Maarseveen J. H., *European Journal of Organic Chemistry*, **2006**

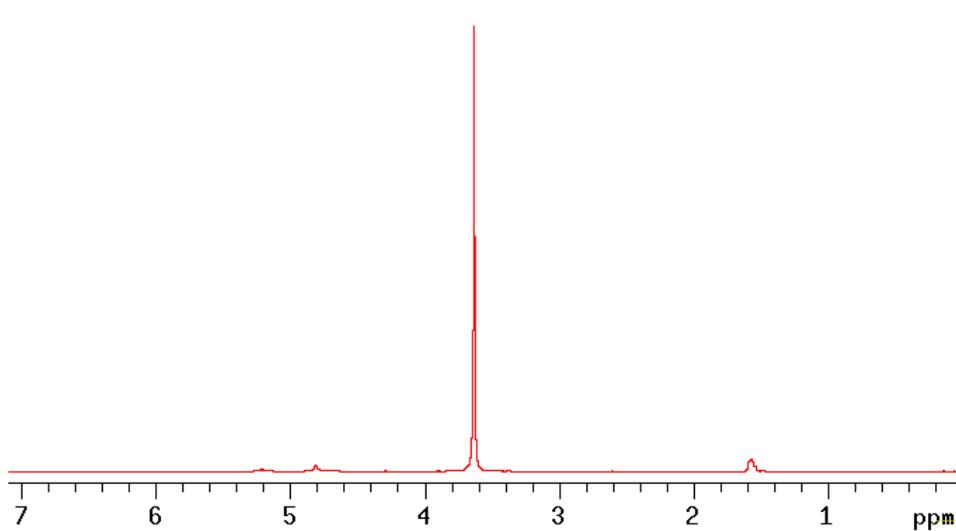


**Schema 9. Sintesi di PLGA-b-PEG-(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>)-PEG-NH<sub>2</sub> (9)**

La reazione di sintesi di **8** è stata fatta, come tutte le altre reazioni di ammidazione su PLGA-NHS, mantenendo un eccesso di ammina, in presenza di DIPEA in cloroformio anidro per una notte. Il secondo passaggio, la ciclo addizione vera e propria, ha invece richiesto diverse prove per trovare le condizioni adatte: sono state provate diverse basi di Lewis e la migliore si è dimostrata ancora una volta la DIPEA ma, soprattutto, la temperatura è stata determinante. Inizialmente conducendo la reazione a temperatura ambiente si otteneva una bassa resa, alzando la temperatura a 50°C invece il polimero veniva decomposto; alla fine una temperatura di 30°C e un tempo di reazione di 20 h si sono rivelati un buon compromesso.

Il polimero che si ottiene (**9**) da questa reazione ha un colore azzurro/verde e la consistenza di un fluido molto viscoso che tende a diventare liquido se scaldato. Il colore è dato probabilmente da complessi del rame usato come catalizzatore con il triazolo che si forma dall'aggancio dell'azide sull'alchino. Per cercare di rimuovere il metallo sono stati fatti numerosi lavaggi con una soluzione di ammoniaca con il risultato di rimuovere parzialmente il metallo. Lo spettro <sup>1</sup>H-NMR registrato mostra che il PLGA è integro e

mostra il grosso picco dovuto ai molti CH<sub>2</sub> del PEG, tanto alto da rendere i segnali del PLGA quasi invisibili se messi in scala. Il test alla ninidrina ha dato esito positivo.



**Figura 11.** <sup>1</sup>H-NMR di PLGA-b-PEG-(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>)-PEG-NH<sub>2</sub> (9)

## 3.2. Sintesi di nanoparticelle polimeriche (PNPs)

### 3.2.1. Oil/Water (O/W)

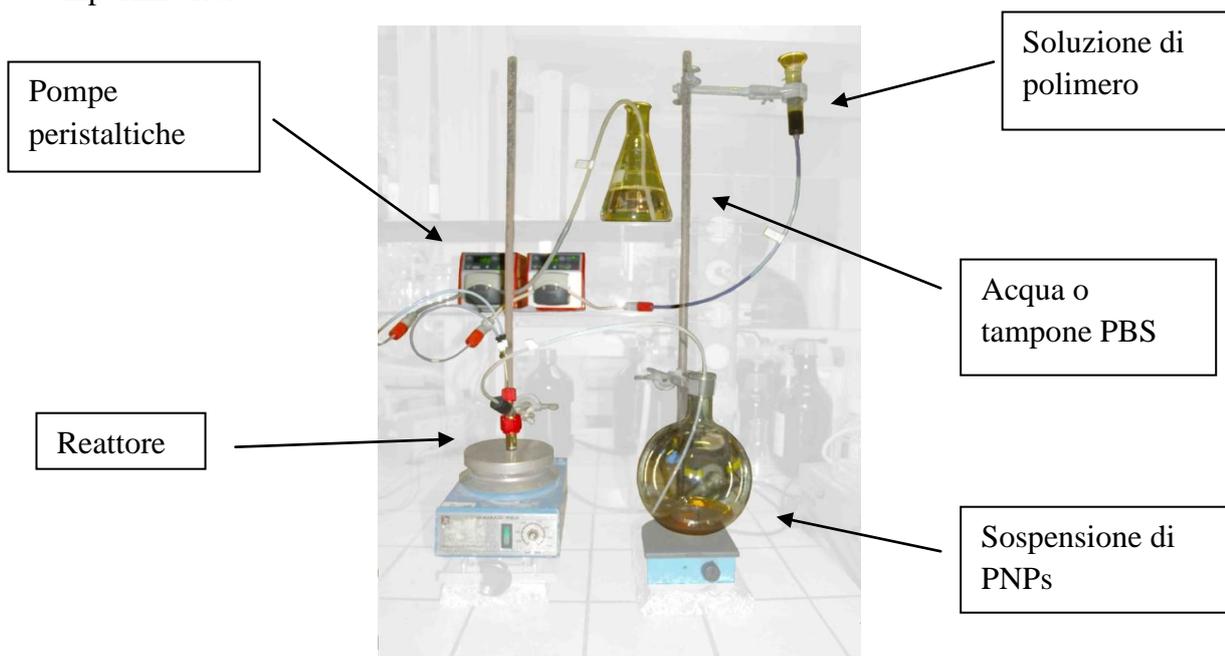
La Oil/Water è una delle due tecniche impiegate per la sintesi di nanoparticelle polimeriche in questo lavoro. Consiste nel mescolare vorticosamente, utilizzando un sonicatore a punta, un solvente organico nel quale è disciolto il polimero e acqua o tampone fosfato (PBS, pH = 7,4). In questa tecnica il solvente organico non deve essere solubile in acqua. La procedura prevede che venga preparata in un becker una soluzione del polimero in solvente organico e, sopra di esso vada lentamente versata l'acqua, senza che le due fasi si mescolino. La punta del sonicatore viene quindi immersa nel liquido ed avviata la vibrazione: la violenta agitazione rimescola le due fasi e il polimero si sistema alle interfacce formando una sospensione colloidale di micelle. La sospensione nanoparticellare viene infine ottenuta per evaporazione del solvente. Questa tecnica ha il pregio di essere estremamente rapida (la sospensione si forma in meno di due minuti) ma le nanoparticelle ottenute hanno mediamente un indice di polidispersità (PDI) superiore a quelle ottenute per nanoprecipitazione.



Figura 12. Sonicatore Sonics Vibracell VC 505

### 3.2.2. Nanoprecipitazione (NP)

La nano precipitazione è la seconda tecnica utilizzata per formare sospensioni colloidali e poi nanoparticellari del polimero. Consiste nel mescolare, sotto forte agitazione, una soluzione del polimero in solvente organico con acqua o PBS. Il solvente organico deve essere solubile in acqua. L'apparecchiatura necessaria per questa tecnica consiste in due organi di pompaggio dei liquidi (in questo caso o due siringhe temporizzatrici o due pompe peristaltiche) che spingono l'acqua e la soluzione di polimero in solvente all'interno di un piccolo reattore con agitazione magnetica. In questo reattore le due correnti si mescolano e il polimero, a contatto con l'acqua che è un suo non solvente, precipita formando piccoli nuclei che poi aggregano formando le nanoparticelle in sospensione. Il prodotto viene quindi raccolto in un pallone, anch'esso agitato. Le siringhe temporizzatrici o le pompe sono tarate in maniera tale da mantenere il rapporto tra le due soluzioni costanti all'interno del reattore, questo perché le dimensioni delle nanoparticelle dipendono molto dalla concentrazione di polimero. La scelta tra siringhe temporizzatrici e pompe peristaltiche è fatta in base al volume di sospensione nanoparticellare da produrre: le pompe peristaltiche sono in grado di produrre più di 50 mL/min di sospensione quindi sono state usate per nanoprecipitazioni da 1 L. Per sospensioni per analisi, del volume di 50 mL, sono state usate invece le siringhe temporizzatrici.



**Figura 13. Nanoprecipitatore con pompe peristaltiche**

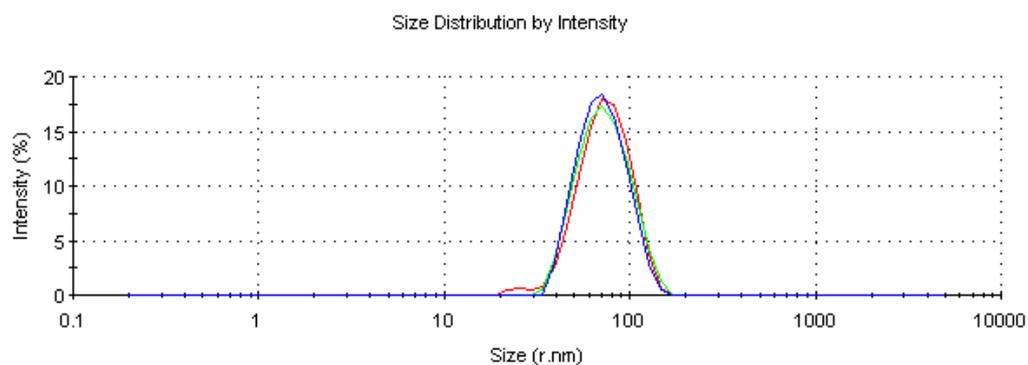
### 3.2.3. PNP<sub>s</sub>-C

Le nanoparticelle polimeriche PNP<sub>s</sub>-C (PNP<sub>s</sub>-C-11, PNP<sub>s</sub>-C-12) sono state sintetizzate utilizzando il solo PLGA-COOH commerciale. Sono state utilizzate principalmente come riferimento per le nanoparticelle miste e per eseguire prove di reazioni di ammidazione direttamente sulla superficie. Inoltre sono state utilizzate per effettuare una prova di decorazione superficiale con CAN-Maghemite.

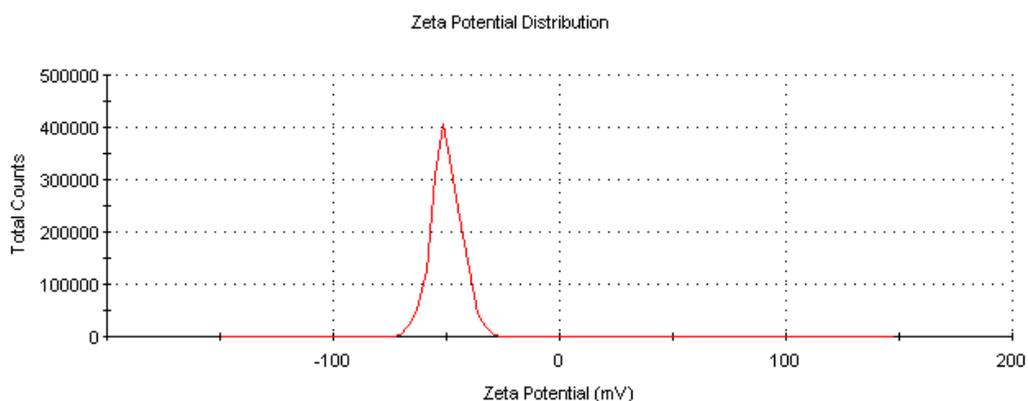
<i>Tecnica</i>	<i>Diluente</i>	<i>Solvente</i>	<i>Rapporto (solvente/ polimero/ diluente)</i>	<i>pH</i>	<i>∅ (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Pot(Z) (mV)</i>
NP	H <sub>2</sub> O	Acetone	1/10/10	6,58	154,3	0,061	-39,5
O/W	H <sub>2</sub> O	DMC	1/10/10	3,67	160,6	0,194	-47,8
NP	PBS	Acetone	1/10/10	7,35	158,1	0,065	-41,3
O/W	PBS	DMC	1/10/10	4,23	186,8	0,273	-46,6

**Tabella 1.** Riassunto dei parametri di PNP<sub>s</sub>-C

Come si può vedere queste nanoparticelle risentono della tecnica di sintesi, soprattutto per quanto riguarda la polidispersità: il PDI delle nanoparticelle sintetizzate per O/W sono maggiori.



**Grafico 1.** Distribuzione della dimensione di PNP<sub>s</sub>-C



**Grafico 2. Potenziale Z di PNPs-C**

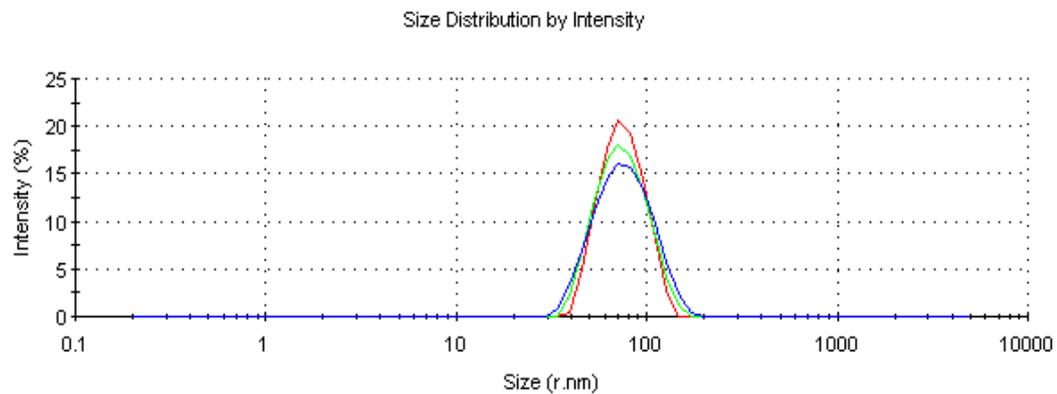
### 3.2.4. PNPs-CH

Dato che i gruppi funzionali presenti sul PLGA possono influire sulle dimensioni finali e sul PDI delle micelle è stato necessario, in questo caso, indagare diverse condizioni di reazione al fine di ottenere il minor diametro e il minor PDI possibile. Perciò sono state sintetizzate diverse sospensioni nanoparticellari a base di PLGA-H e PLGA-COOH, modificando i rapporti e le diluizioni, nonché la tecnica di sintesi.

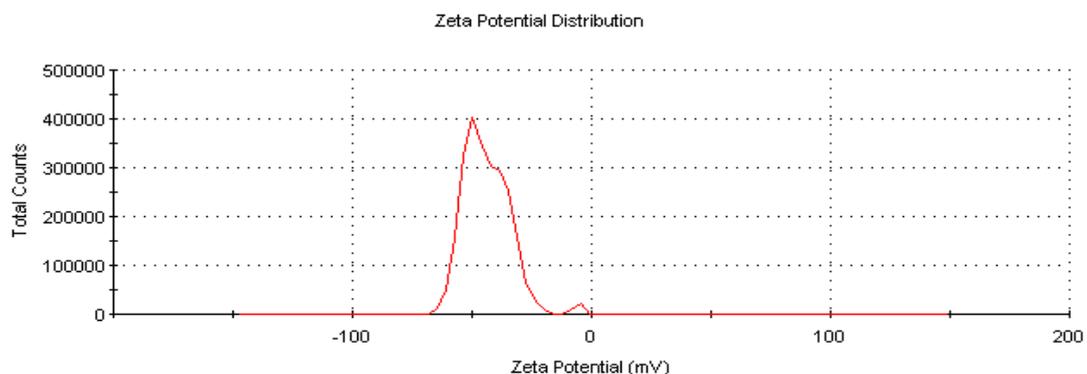
<i>Tecnica</i>	<i>Diluente</i>	<i>Solvente</i>	<i>Rapporto (C/H)</i>	<i>Rapporto (solvente/ polimero/ diluente)</i>	<i>pH</i>	<i>Ø (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>Pot(Z) (mV)</i>
NP	H <sub>2</sub> O	Acetone	1/1	1/10/10	5,10	150,3	0,141	-35,8
O/W	H <sub>2</sub> O	DMC	1/1	1/10/10	4,75	150,5	0,186	-55,0
NP	PBS	Acetone	1/1	2/10/20	7,35	215,1	3,029	-38,4
O/W	H <sub>2</sub> O	DMC	9/1	1/10/10	4,23	155,7	0,194	-54,4
NP	H <sub>2</sub> O	Acetone	5/1	1/10/10	4,60	160,9	0,065	-63,5
O/W	H <sub>2</sub> O	DMC	5/1	1/10/10	4,27	160,5	0,191	-51,1
O/W	PBS	DMC	9/1	1/10/10	7,35	150,5	0,187	-46,7
NP	PBS	Acetone	1/1	1/10/10	7,40	185,9	0,225	-46,5
NP	PBS	Acetone	1/1	1/10/10	7,07	152,2	0,101	-29,3

**Tabella 2. Riassunto dei parametri di alcune PNPs-CH sintetizzate**

Sono state anche sintetizzate PNPs di solo PLGA-H le quali mostrano parametri medi al DLS di 135 nm di diametro, con PDI di 0,12 e  $\text{pot}(Z)$  di -50 mV. Paragonando quindi i risultati relativi alle PNPs-CH con quelli delle nanoparticelle basate su solo PLGA-H si nota come la sintesi di micelle miste porta ad un aumento delle dimensioni medie e della polidispersità. Le nanoparticelle sintetizzate con rapporto solvente/polimero/diluyente di 2/10/20, ovvero diluite del doppio rispetto a tutte le altre, mostrano che la diluizione porta ad un aumento delle dimensioni ma soprattutto ad una grande polidispersità, dovuta probabilmente alla formazione di aggregati. Un'altra cosa emersa dalle prove è che la sintesi è molto ripetibile: la modifica del rapporto tra i due polimeri non modifica molto la dimensione né il PDI, neppure il metodo di sintesi modifica molto la sospensione finale. Il potenziale Z invece subisce notevoli variazioni benché si mantenga sempre negativo; l'uso del PBS porta una maggior costanza al parametro, che si attesta su circa -44 mV in media, per cui si è optato per usare il tampone come diluyente (forte anche della stabilità che porta in fase di filtrazione). Le prove sono state sintetizzate in piccole quantità, 50 mg di polimero, mentre le ultime due sono state scalate a 200 mg (**PNPs-CH-13**).

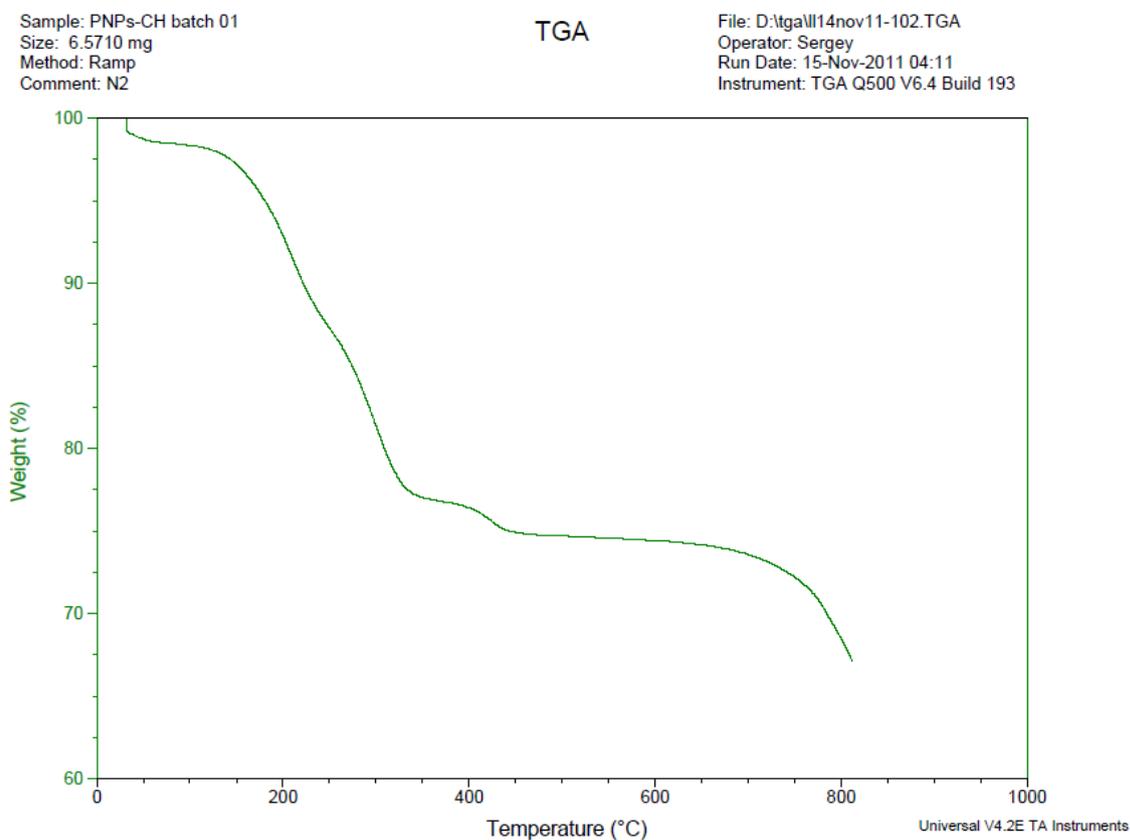


**Grafico 3. Distribuzione della dimensione di PNPs-CH**



**Grafico 4. Potenziale Z di PNPs-CH**

La TGA delle nanoparticelle secche mostra due perdite di peso: uno di circa il 25 % da 150°C a 425°C prodotto dalla decomposizione dell'organico e il secondo oltre i 750°C dovuto alla decomposizione dei sali del PBS.



**Figura 14.**TGA di PNP<sub>s</sub>-CH-13

### 3.2.5. PNP<sub>s</sub>-CA

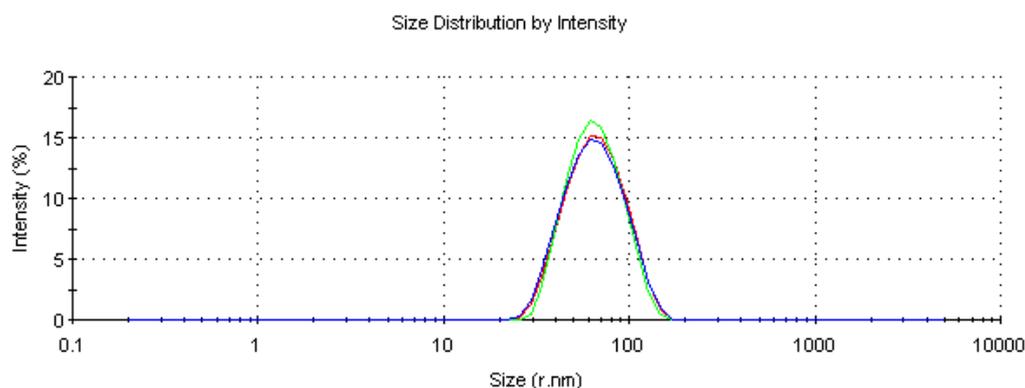
Le prime nanoparticelle di questo tipo sono state sintetizzate con PLGA-COOH e PLGA-A **4**. Le nanoparticelle ottenute hanno dimensioni molto variabili, da 140 ad oltre i 200 nm con PDI compresi tra 0,066 e 0,200 e potenziali Z tutti negativi con valori che si attestano su una media di -50 mV. Come descritto precedentemente però il polimero **4** risultava ancora protetto alla risonanza magnetica perciò queste nanoparticelle in realtà hanno sulla superficie acidi carbossilici, i quali a pH sopra 4,5 sono ionizzati e conferiscono il pot(Z) negativo, e i gruppi ter-butilici del gruppo protettori, inutili agli scopi finale della ricerca. Il secondo tentativo di sintesi di PNP<sub>s</sub>-CA è stato fatto a partire dal polimero **6**. I risultati sono stati deludenti: il polimero non si è mostrato in grado di

formare micelle con la tecnica O/W mentre con la tecnica NP si è osservata la precipitazione del polimero in aggregati visibili ad occhio nudo. Il motivo è probabilmente l'eccessiva idrofobicità e l'ingombro del fenile al termine della catena polimerica; per questo motivo, nonostante la buona riuscita della sintesi del polimero modificato, questo prodotto è stato abbandonato in favore delle sintesi successive. La sospensione ottenuta da NP è stata comunque filtrata ed analizzata al DLS dove si osservano dimensioni medie di 940 nm, PDI di 0,413 e  $\text{pot}(Z)$  di 3,3 mV. Quest'ultimo dato, oltre a dimostrare la tendenza ad aggregare delle poche nanoparticelle presenti in soluzione, ha avuto però l'utilità di mostrare come queste nanoparticelle miste, soprattutto a bassi pH, hanno valori di  $\text{pot}(Z)$  positivi. Questo è spiegabile con il fatto che i gruppi amminici superficiali sono protonati; da questa prova infatti tutti i potenziali  $Z$  delle sospensioni sono stati misurati anche dopo acidificazione, così da avere un'ulteriore conferma, oltre a quella del test colorimetrico sul polimero, della presenza dell'ammina. La terza serie di PNPs-CA è stata sintetizzata a partire da polimero **7**, quello che in fase di sintesi ha dato i migliori risultati. Con questo polimero sono state sintetizzate anche delle nanoparticelle senza PLGA-COOH così da avere una chiara prova, data dal  $\text{pot}(Z)$  della presenza dell'ammina. L'acidificazione delle sospensioni è stata fatta aggiungendo gocce di HCl diluito e misurando il pH in continuo. È stato osservato che a pH inferiori a 3 le sospensioni non sono stabili e aggregano velocemente benché mostrino potenziali positivi, tra pH 3 e 4 sono stabili solo per pochi minuti, a pH vicini a 5,5 è addirittura impossibile fare misure perché si ha precipitazione in pochi secondi. In ogni caso però l'acidificazione porta alla formazione di aggregati con il risultato di aumentare la dimensione media delle nanoparticelle e la polidispersità. Questo è dovuto al fatto che il  $\text{pot}(Z)$  al calare del pH da 7,5 a 3 si avvicina a 0 (una sospensione è considerata stabile quando il potenziale è maggiore di 30 o minore di -30 mV), punto in cui si formano gli aggregati e poi sale verso valori positivi.

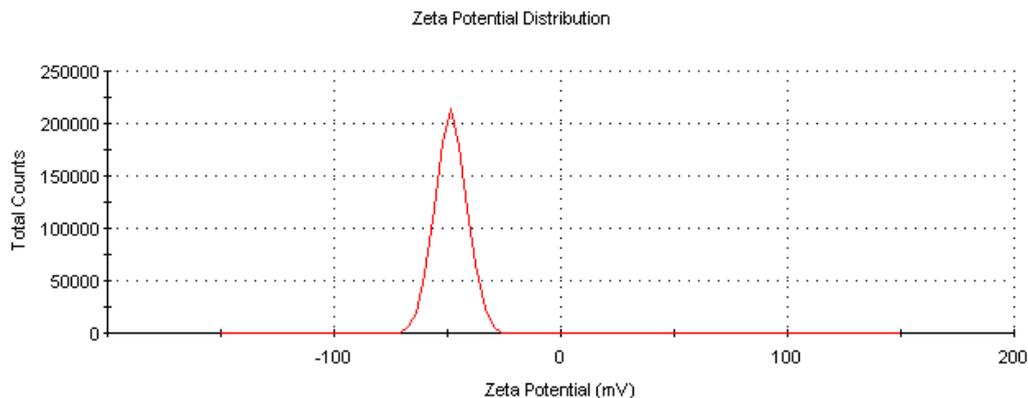
<i>Tecnica</i>	<i>Diluente</i>	<i>Solvente</i>	<i>Rapporto (C/A)</i>	<i>Rapporto (solvente/ polimero/ diluente)</i>	<i>pH</i>	$\varnothing$ (nm)	<i>PDI</i>	<i>Pot(Z) (mV)</i>
NP	H <sub>2</sub> O	Acetone	0/1	1/10/10	7,16	124,4	0,115	-43,9
					3,98	296,7	0,216	35,5
NP	PBS	Acetone	6/4	1/10/10	7,30	119,1	0,108	-42,3
					3,63	/	/	-3,15 (98%) 64,8 (2%)

**Tabella 3. Riassunto dei parametri di alcune PNPs-CA sintetizzate**

Come si può notare dalle analisi DLS le PNPs ottenute da questo polimero hanno ottime caratteristiche: hanno piccole dimensioni e PDI contenuti nonché potenziali Z molto bassi che testimoniano la stabilità delle sospensioni, risultati indipendenti dalla quantità di acido carbossilico presente (notare che la separazione tra PLGA-COOH e PLGA-A in fase di sintesi è praticamente impossibile viste le poche differenze strutturali e perciò anche nelle nanoparticelle ottenute da solo PLGA-A è presente dell'acido carbossilico non reagito).



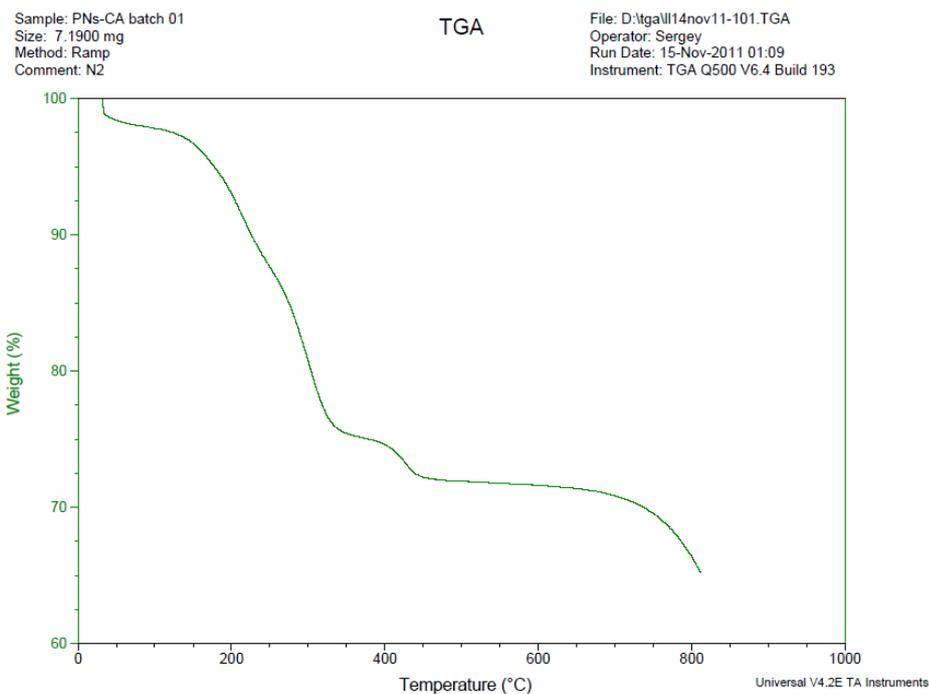
**Grafico 5. Distribuzione della dimensione di PNPs-CA**



**Grafico 6. Potenziale (Z) di PNPs-CA**

Una caratteristica curiosa è stato il comportamento del potenziale Z delle PNPs-CA 6/4 (**PNPs-CA-14**) acidificate: è stata ottenuta una distribuzione bimodale che mostra un picco molto consistente a valori vicini a zero e un piccolo picco a valori molto positivi. La strana distribuzione potrebbe essere riconducibile ad una separazione dei due polimeri durante l'acidificazione e alla conseguente formazione di aggregati di PNPs-CA, con entrambi i gruppi funzionali in superficie e potenziale vicino a zero, e di aggregati di sole PNPs-A (nettamente in minoranza) con potenziale molto alto.

L'analisi termogravimetrica mostra, analogamente a quelle delle PNPs-CH, due perdite di peso.



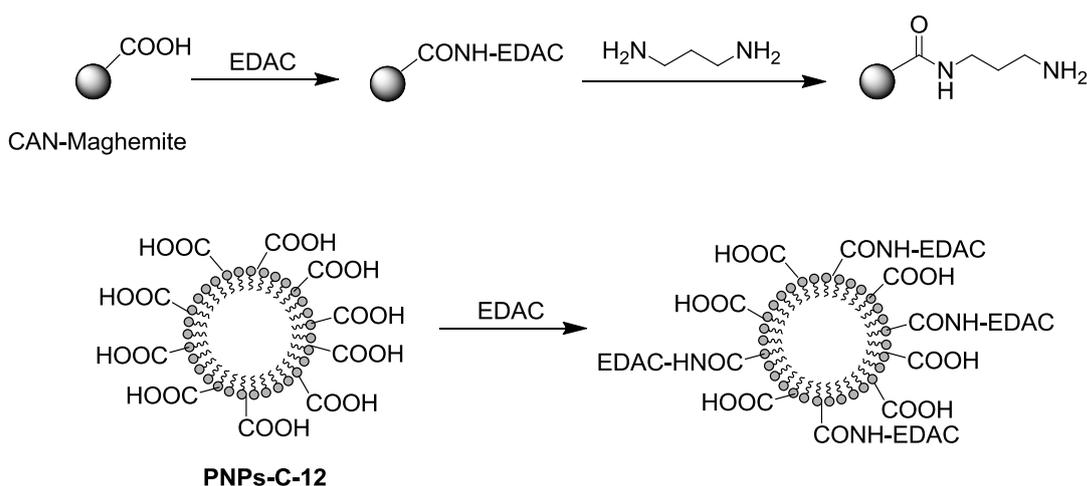
**Figura 15. TGA di PNPs-CA-14**

La prima, del 25,6 %, da 150°C a 425°C, è data dalla decomposizione dell'organico mentre la seconda, che inizia a 750°C, è data dalla decomposizione dei sali del tampone PBS.

### 3.2.6. Decorazione superficiale di PNPs con nanoparticelle di CAN-Maghemite

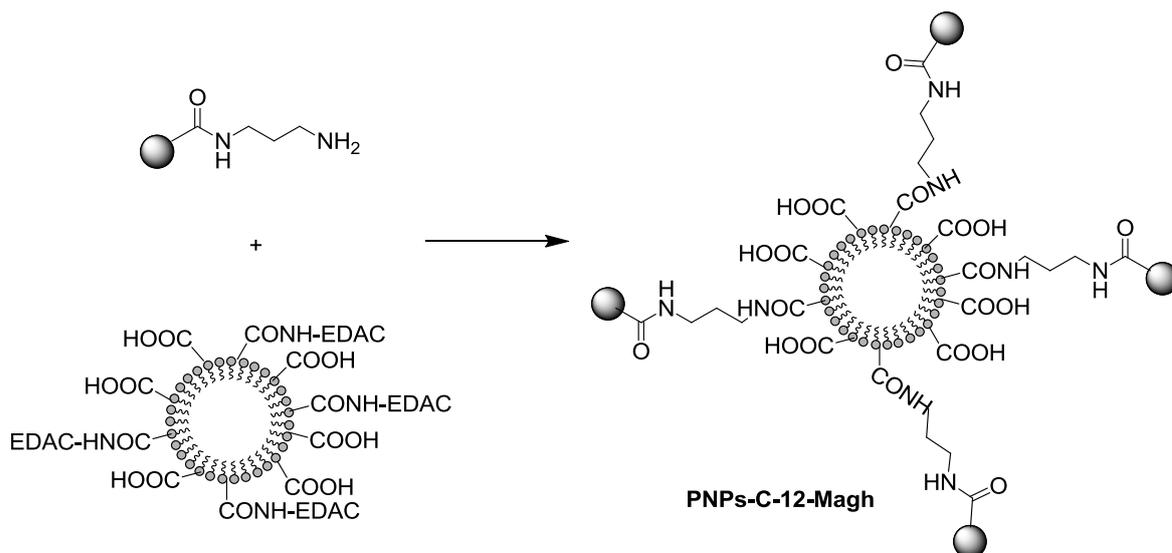
Sui *core nanosystems* sintetizzati è stato tentato l'aggancio di nanoparticelle metalliche di CAN-Maghemite fornite dal partner israeliano. Queste nanoparticelle hanno un diametro compreso tra 10 e 15 nm e sono stabilizzate con un complesso di ammonio nitrato di cerio (IV) (CAN,  $[\text{Ce}^{\text{IV}}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6]$ ) per renderle solubili in acqua. Sulla superficie di tali particelle sono presenti anche gruppi alcolici e, soprattutto, acidi<sup>40</sup> che vengono sfruttati nell'aggancio con le **PNPs-C-12** e con le **PNPs-CA-14**, per formare legami ammidici. La decorazione è stata fatta in due modi:

- su **PNPs-C-12**, seguendo una procedura consigliata dal gruppo di ricerca di Tel Aviv, usando una diammina quale linker legato alle nanoparticelle di CAN-Meghemite le quali vengono in seguito fatte reagire con le PNPs, anch'esse attivate con EDAC;



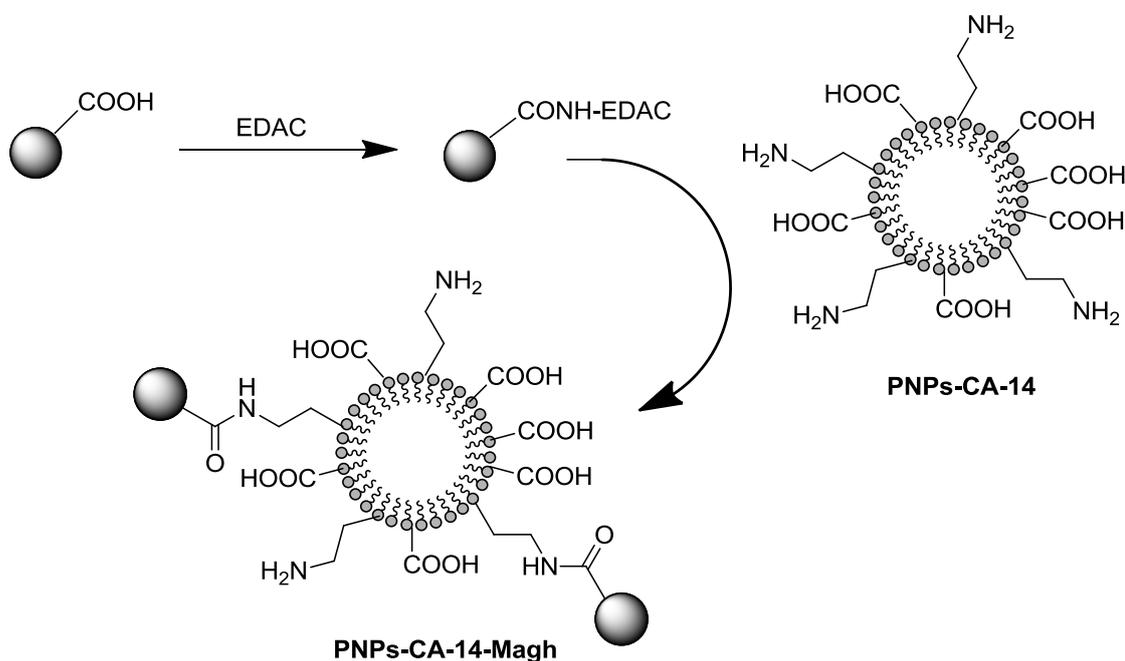
**Schema 10. Attivazione con EDAC di CAN-Maghemite NP e PNPs-C-12**

<sup>40</sup> Haviv A. H., Grene`che J. M., Lellouche J. P., *J. Am. Chem.*, **2010**, 132 (36)



**Schema 11. Decorazione superficiale di PNP-C-12 con CAN-Maghemite**

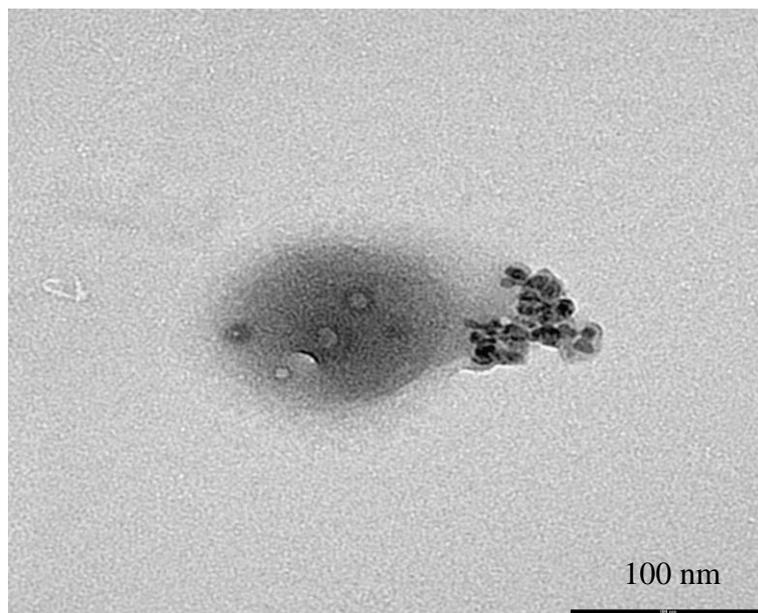
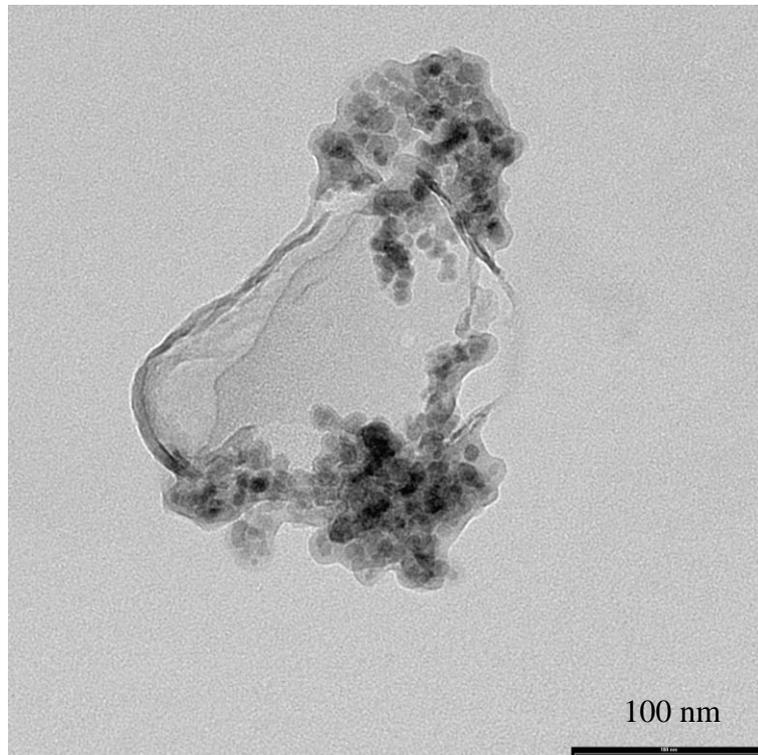
- su **PNPs-CA-14** sfruttando l'ammina presente sulla superficie, ovvero attivando i gruppi acidi delle nanoparticelle metalliche e facendole poi reagire con le ammine delle nanoparticelle polimeriche.



**Schema 12. Decorazione di PNP-CA-14 con CAN-Maghemite NP**

Queste nanoparticelle decorate sono state analizzate al TEM (Trasmittance Electron Microscope) grazie al quale è stato osservato che la reazione con il linker non è avvenuta, infatti le immagini del prodotto **PNPs-C-12-Magh** non mostrano la presenza di

nanoparticelle metalliche. Le immagini del prodotto **PNPs-CA-14-Magh** invece mostrano le nanoparticelle di CAN-Maghemite raccolte attorno ad aloni sferici, realisticamente identificabili con le PNP-CA, che non sono visibili con questo microscopio.



**Figura 16. Immagini TEM di PNP-CA-14-Magh NP**

Infine un'analisi DLS di questa sospensione mostra una dimensione media delle nanoparticelle di 4098 nm, una polidispersità (PDI) di 0,066 ed un potenziale ( $Z$ ) di -9,88 mV. Proprio questi dati spiegano perché la sospensione non è stabile e si osserva la precipitazione dei grossi aggregati in pochi minuti. La decorazione delle PNPs-CH tramite chelazione, tentata dal partner di Tel Aviv, si è rivelata anch'essa funzionale tuttavia molto meno performante di quelle illustrate in precedenza.

### 3.2.7. Test biologici

Ai *core nanosystems* prodotti è richiesta una certa flessibilità di impieghi: saranno la base sui quali verranno agganciate proteine in grado di riconoscere selettivamente le cellule tumorali e ucciderle ma devono anche essere utilizzate per scopi diagnostici tramite l'*imaging*, grazie proprio alle CAN-Maghemite NP. Questo significa che le nanoparticelle polimeriche non devono essere citotossiche per non nuocere al paziente quando l'uso non lo richiede. Per verificare la non citotossicità le **PNPs-CH-13** e le **PNPs-CA-14** prodotte sono state quindi inviate ai laboratori di Filarete Servizi, uno dei centri di ricerca coinvolti nel progetto SaveMe, con sede a Milano, attrezzato allo studio degli effetti di queste nanoparticelle su numerose linee cellulari. Qui sono stati condotti test in vitro di viabilità cellulare su vari tipi di cellule tumorali pancreatiche (i cui identificativi sono riportati in legenda nei grafici sottostanti) e modificando la concentrazione delle PNPs.

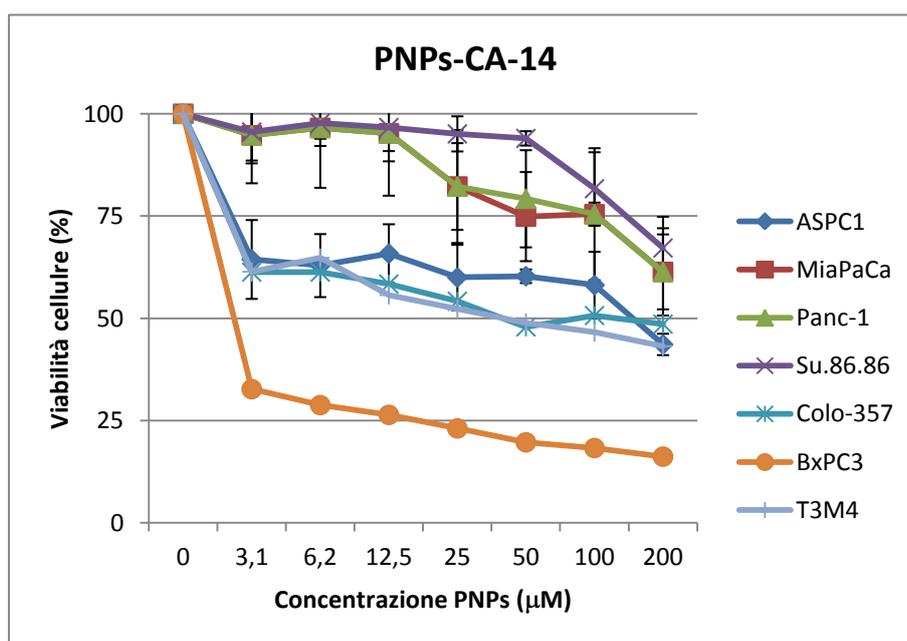


Grafico 7. Viabilità cellulare di PNPs-CA-14

La conta delle cellule e il conseguente calcolo della percentuale di viabilità cellulare è stata fatta dopo 72 ore dall'aggiunta delle nanoparticelle.

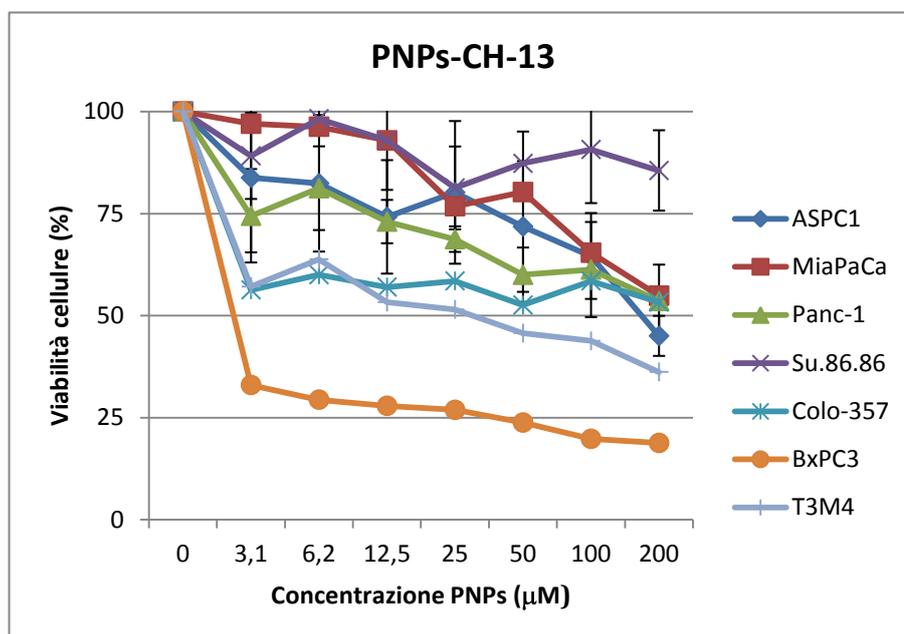


Grafico 8. Viabilità cellulare di PNP-CH-13

Come si può vedere dai grafici i test hanno avuto dei buoni risultati; le PNP-CH si dimostrano le meno tollerate dalle cellule benché quasi tutte presentino una viabilità cellulare superiore al 50 % fino ad una concentrazione di 25 µM (una concentrazione molto alta per un farmaco), solo la coltura di BxPC3 si dimostra assolutamente intollerante. Aumentando la concentrazione tutte le colture tendono a morire ma per un effetto di “soffocamento” dovuto alle nanoparticelle, non ad un effetto tossico di natura chimico/biologica. Le PNP-CA sono meglio tollerate invece dalle cellule testate, in particolare le SU.86.86 e le Panc-1 che mantengono una viabilità di quasi il 100 % fino ad una concentrazione 16 µM di nanoparticelle. Come per le PNP-CH oltre 100 µM si ha un effetto di soffocamento che provoca la morte delle cellule. Si può affermare quindi che questi risultati, ottenuti dai primi prototipi di *core nanosystems* prodotti, sono estremamente incoraggianti.

## ***4. Conclusioni e prospettive future***

Durante la mia attività di tirocinio nel gruppo di ricerca del dipartimento di chimica organica ho preso parte agli studi inerenti il progetto europeo SaveMe, avente come scopo finale la produzione di medicinali antitumorali basati su nanoparticelle polimeriche. In questo periodo siamo riusciti a produrre due *core nanosystems*, obiettivi del primo anno di ricerca; questi sistemi non sono altro che nanoparticelle polimeriche (PNPs) aventi gruppi acidi e idrossamici o acidi e amminici superficiali. Questi gruppi funzionali hanno permesso la decorazione di queste nanoparticelle polimeriche con nanoparticelle metalliche di CAN-Maghemite, che avranno come scopo finale l'impiego in MRI (Imaging con risonanza magnetica). Infine sono stati effettuati test biologici che dimostrano come le PNPs prodotte non siano citotossiche se non a concentrazioni elevatissime. I sistemi prodotti, forti dei risultati ottenuti, sono stati molto bene accettati ed al gruppo di ricerca è stato permesso di procedere con entrambi alle fasi successive del progetto.

In futuro le nanoparticelle prodotte saranno soggette alla decorazione superficiale con una grande varietà di molecole diverse aventi vari scopi: sia nella diagnostica che nel trattamento del tumore al pancreas grazie ad anticorpi monoclonali, proteine, molecole atte al mascheramento e alla protezione del farmaco (quali PEG derivati). Inoltre il polimero ottenuto da reazione click dovrà subire gli stessi studi dei precedenti per poter vedere se la parte PEG che lo compone comporta miglioramenti nelle caratteristiche delle nanoparticelle: diminuzione del diametro, del PDI, aumento della stabilità, ulteriore diminuzione della citotossicità.

## 5. *Parte sperimentale*

### 5.1. *Note generali*

Tutti i reattivi sono stati reperiti dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) ed usati tal quali. L'acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) (50/50) (PLGA-COOH, MW ~7 kDa) è stato reperito dalla Lactel Absorbable Polymers (Birmingham, AL, USA). Il polietilene glicole variamente funzionalizzato (MW~3 kDa) è stato reperito dalla Rapp Polymere GmbH (Tübingen, Germany). Tutte le soluzioni acquose sono state preparate con acqua deionizzata, proveniente da un sistema di ultrafiltrazione (Milli-Q, Millipore) con una resistività misurata di circa 18 MW. Il THF è stato distillato da sodio/benzofenone prima di ogni utilizzo e conservato sotto Ar. Il CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ed il CHCl<sub>3</sub> sono stati passati su allumina basica prima dell'uso. Tutte le reazioni che richiedono condizioni anidre sono state condotte in flusso o in pressione di gas inerte (N<sub>2</sub>) seccato per passaggio successivo attraverso CaCl<sub>2</sub> e silica gel con indicatore. Le reazioni sono state controllate tramite TLC su fogli di gel di silice (Baker-flex IB2-F), mentre le colonne cromatografiche sono state utilizzate con Merck silica gel 60 (70-230 mesh). I punti di fusione sono stati determinati con un apparato Büchi SMP-20. Gli spettri <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR sono stati registrati utilizzando soluzioni in CDCl<sub>3</sub>, DMSO d<sub>6</sub>, o CD<sub>3</sub>OD a 300, 400 MHz per <sup>1</sup>H e 75.46, 100.6 MHz per <sup>13</sup>C. Gli spettri UV-Visibile sono stati registrati su di uno spettrometro Perkin-Elmer Lambda 12. Gli spettri di massa sono stati registrati dal Sig. L. Zuppiroli con uno spettrometro MICROMASS ZQ 4000 in *Electron Spray Ionisation (ESI)*. La microscopia a trasmissione elettronica ad alta risoluzione (HRTEM) è stata condotta su di un Jeol JEM 2010 a 200 keV presso il Centro di Spettroscopia Elettronica di Trieste (CSPA). I campioni sono stati preparati immergendo una griglia di rame da 200 mesh ricoperta da un sottile film carbone-Formvar (200C-FC) direttamente nelle soluzioni di PNPs. Le misurazioni DLS sono state eseguite tramite un Malvern Zetasizer nano-S operante con raggio laser a 532 nm. Le centrifugazioni sono avvenute in una centrifuga Rotofix 32 A, Hettich Zentrifugen. I filtri Millipore Amicon Ultra per centrifuga hanno un cut off di 100000 KDa e, al fine di evitare la precipitazione delle micelle, sono stati condizionati lasciandoli 2 ore immersi in una soluzione al 5% di copolimero Polietilenglicole Bisfenolo A Epicloridrina poi sciacquati con acqua ultrapura.

## **5.2. Test colorimetrici**

### **5.2.1. Test alla ninidrina per ammine**

È un test qualitativo eseguito sui polimeri modificati con ammina terminale per verificare la presenza del gruppo funzionale voluto. In una provetta usa e getta da 10x75 mm vengono messi una punta di spatola di 2,2-diidrossi-1,3-diossoidrindene (ninidrina), una spatola di polimero solido, circa 6 mL di etilacetato e due gocce di acido acetico glaciale. Dopo aver disciolto la ninidrina e il polimero grazie ad un bagno ad ultrasuoni, la soluzione è stata scaldata per circa 3 minuti fino ad incipiente ebollizione del solvente. La soluzione si presenta inizialmente grigia per poi assumere una colorazione viola/rosso in caso di test positivo, ovvero presenza di ammine primarie, o incolore se il test è negativo.

### **5.2.2. Test al Fe(III) per acidi idrossamici**

È un test qualitativo eseguito sul polimero modificato con gruppo idrossamico terminale per verificare la riuscita della sintesi. In una provetta usa e getta da 10x75 mm vengono posti una punta di spatola di cloruro di ferro ( $\text{FeCl}_3$ ) e circa 5 mL di etilacetato, agitando il sale si scioglie e la soluzione assume una colorazione gialla. Si aggiunge una spatola di polimero modificato con gruppo idrossamico terminale, si agita fino a dissoluzione (anche con ultrasuoni) e si scalda fino ad ebollizione incipiente del solvente. Il test è positivo se la soluzione assume una colorazione fortemente rossa.

### 5.3. *Concentrazione, purificazione e sterilizzazione delle PNPs*

Lo scopo della sintesi di PNPs in questo lavoro è stato l'ottenere nanoparticelle con funzioni superficiali acide, idrossamiche ed amminiche. I *core nanosystems* sintetizzati sono stati, tra le altre analisi, testati su linee cellulari per controllare che non fossero citotossiche. Questi test richiedono che le nanoparticelle siano sterili (per non avere dubbi che impurezze siano le responsabili dell'esito delle prove) e ad alta concentrazione (i test richiedono diverse diluizioni successive). Per ottenere PNPs sterili, adatte ad essere substrato di altre sintesi e per i test, sono stati impiegati due metodi di filtrazione:

1. concentrazione e rimozione di piccole molecole: sono stati utilizzati un filtro a membrana Millipore Pellicon XL<sup>®</sup> in continuo per sospensioni di grosso volume e filtri per centrifuga Millipore Amicon Ultra<sup>®</sup> per volumi più contenuti. Questi filtri hanno pori di dimensioni ridotte, con cut-off di 500000 NMWCO (Nominal Molecular Weight Cut-Off) per il primo e 100000 NMWCO i secondi, e sono quindi in grado di rimuovere dalla sospensione piccole molecole (impurezze, residui, sali e polimeri in soluzione) e l'acqua. Le membrane dei due filtri sono diverse infatti il filtro in continuo ha una membrana in polieteresulfone mentre i filtri per centrifuga hanno membrane in cellulosa rigenerata. Questa differenza ha creato alcuni problemi in quanto le PNPs non si sono rivelate stabili a contatto con le membrane di cellulosa, precipitando e producendo una patina polimerica sui filtri che li rendeva inutilizzabili. Il problema è stato risolto, come consigliato dall'assistenza Millipore, trattando i filtri con una soluzione acquosa di copolimero di bisfenolo A ed epiclorigidrina. Inoltre è stato subito chiaro come l'uso durante la preparazione di un tampone fosfato (PBS) piuttosto che acqua ultrapura abbia aumentato la stabilità in filtrazione, probabilmente per effetto della maggior concentrazione di ioni in soluzione;
2. sterilizzazione e rimozione di grosse particelle: per rimuovere invece grossi aggregati di nanoparticelle, polvere, batteri e ogni altra impurezza di grossa dimensione sono stati utilizzati dei filtri per siringa Millipore Sterivex<sup>®</sup> con membrane in polieteresulfone e pori di 0,22  $\mu\text{m}$ .

## 5.4. Attivazione di PLGA-COOH

### 5.4.1. Sintesi di PLGA-COCl

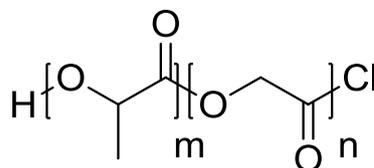


Figura 17. PLGA-COCl (1)

In un pallone da 100 mL a due colli anidro, con agitazione magnetica, setto perforabile e flusso di azoto, si scioglie il PLGA-COOH (1 g, 0,143 mmol, 1 eq) in 30 mL di cloroformio anidro. In un vial a parte si prepara una soluzione di cloruro di tionile ( $\text{SOCl}_2$ ) (203  $\mu\text{L}$ , 2,8 mmol, 20 eq) in 5 mL di cloroformio anidro. Quando il PLGA-COOH è completamente sciolto si sgocciola nel pallone la soluzione di  $\text{SOCl}_2$  con una siringa e si lascia la reazione a riflusso con refrigerante per 3 ore, sotto azoto. Si lascia poi raffreddare la soluzione e la si secca con pompa ad alto vuoto. Il solido ottenuto ha una colorazione bianca o leggermente giallina.

#### Dati spettroscopici:

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,20$  (m, mH, CH), 4,80 (m, 2nH,  $\text{CH}_2$ ), 1,59 (m, 3mH,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

### 5.4.2. Sintesi di PLGA-NHS

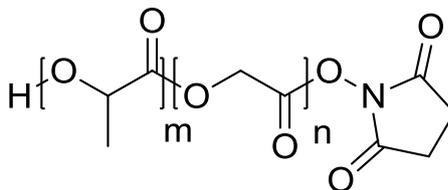


Figura 18. PLGA-NHS (3)

In un pallone ad un collo da 50 mL, con agitazione magnetica e flusso di azoto, si scioglie il PLGA-COOH (1 g, 0,14 mmol, 1 eq) in 10 mL di cloroformio anidro. Si

aggiungono poi N-idrossisuccinimide (NHS, 66 mg, 0,57 mmol, 4 eq) e, dopo aver raffreddato la miscela di reazione con bagno di ghiaccio, dicicloesilcarbodiimide (DCC, 132 mg, 0,64 mmol, 4,5 eq). La reazione è lasciata una notte a temperatura ambiente e sotto azoto quindi si filtra su celite e si lava con cloroformio. Il filtrato viene ridotto ad un volume di circa 5 mL con rotavapor e sgocciolato in un pallone da 250 mL contenente circa 200 mL di etere etilico freddo (in bagno di ghiaccio). Il polimero in sospensione si raccoglie tramite centrifugazione. Il PLGA-NHS viene raccolto in un pallone ad un collo da 100 mL e seccato, prima al rotavapor poi alla pompa ad alto vuoto. Il polimero attivato si presenta come un solido bianco. Sono stati ottenuti 980 mg di prodotto per una resa del 98%.

Dati spettroscopici:

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,20$  (m, mH, CH),  $4,80$  (m, 2nH,  $\text{CH}_2$ ),  $2,82$  (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ),  $1,59$  (m, 3mH,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

## 5.5. Sintesi di derivati del PLGA

### 5.5.1. Sintesi di PLGA-H

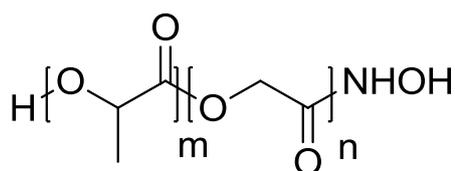


Figura 19. PLGA-H (2)

In un pallone da 100 mL ad un collo, con agitazione magnetica e flusso di azoto, si scioglie il PLGA-COCl (2 g, 0,29 mmol, 1 eq) in circa 30 mL di diclorometano anidro. In una provetta a parte si scioglie l'idrossilammina cloridrata (40 mg, 0,57 mmol, 2 eq) in 2 mL di piridina; questa soluzione viene quindi sgocciolata nel pallone contenente il polimero. La reazione viene lasciata una notte a temperatura ambiente e sotto azoto. Si rimuove quindi il solvente al rotavapor e si secca il polimero alla pompa ad alto vuoto. Il precipitato bianco ottenuto viene ripreso con 60 mL di etilacetato e lavato tre volte con acqua e soluzione satura di NaCl (40 mL). La fase organica viene infine raccolta e

seccata prima al rotavapor poi alla pompa ad alto vuoto. Il polimero modificato come idrossamico si presenta come un precipitato bianco. La resa della sintesi è del 67% essendo stati ottenuti 1,34 g di prodotto.

Dati spettroscopici:

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 5,20$  (m, mH, CH),  $4,80$  (m, 2nH,  $\text{CH}_2$ ),  $1,59$  (m, 3mH,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

### 5.5.2. Sintesi di PLGA-A

#### 5.5.2.1. Sintesi di PLGA-CONH- $\text{CH}_2$ - $\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$ (PLGA- $\text{NO}_2$ )

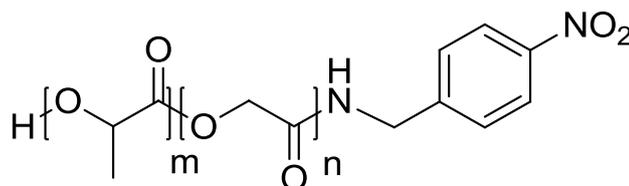


Figura 20. PLGA-CONH- $\text{CH}_2$ - $\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$  (5)

In un pallone da 50 mL, con agitazione magnetica e flusso di azoto, si scioglie il PLGA-NHS (300 mg, 0,04 mmol, 1 eq) in 20 mL di cloroformio anidro. Vengono aggiunti quindi 4-paranitrobenzilammina (17 mg, 0,084 mmol, 2 eq) e N-Etildiisopropilammina (DIPEA) (22  $\mu\text{L}$ , 0,126 mmol, 3 eq). La reazione procede per una notte a temperatura ambiente. Tolta l'ancoretta la soluzione di reazione viene ridotta fino ad un volume di circa 5 mL al rotavapor e addizionata di 50 mL di etere etilico freddo poi lasciata 15 minuti in bagno di ghiaccio. Il polimero precipita o resta parzialmente in sospensione. Il surnatante viene rimosso e centrifugato così da raccogliere il polimero in sospensione. Il lavaggio del prodotto precipitato viene ripetuto finché le acque non sono limpide. Infine il polimero raccolto dalla centrifugazione viene riunito al precipitato, seccato alla pompa ad alto vuoto, ripreso con circa 50 mL di etilacetato e lavato 3 volte con acqua e soluzione satura di NaCl. La fase organica ottenuta viene seccata prima al rotavapor e poi alla pompa ad alto vuoto. Si ottiene un solido bianco con una resa del 70% (210 mg).

Dati spettroscopici:

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,20$  (d, 2H, CH), 7,42 (d, 2H, CH), 5,20 (m, mH, CH), 4,80 (m, 2nH,  $\text{CH}_2$ ), 1,59 (m, 3mH,  $\text{CH}_3$ ) ppm

**5.5.2.2. Sintesi di PLGA-CONH- $\text{CH}_2$ - $\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$**

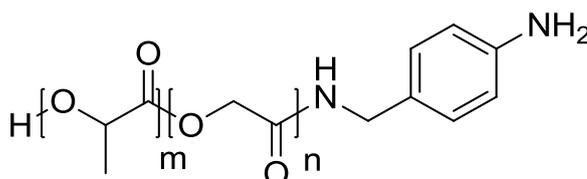


Figura 21. PLGA-CONH- $\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$  (6)

Per ridurre il gruppo nitro terminale si pone il catalizzatore Pd/C (60 mg, circa 10 %  $^m/m$  del polimero) nel vial dell'idrogenatore in circa 25 mL di etilacetato e si lascia circa 30 minuti sotto pressione di  $\text{H}_2$  per attivare il metallo. Si riapre il vial e si aggiunge il PLGA- $\text{NO}_2$  (400 mg, 0,57 mmol), agitando vigorosamente per sospendere il catalizzatore e sciogliere il polimero. Si sigilla il vial e si lascia 8 ore sotto pressione di  $\text{H}_2$  (20 PSI) con agitazione meccanica. La soluzione viene quindi filtrata a vuoto su celite e seccata, prima al rotavapor poi alla pompa ad alto vuoto, fino ad ottenere un solido bianco. La resa della riduzione è praticamente quantitativa.

Dati spettroscopici:

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 8,20$  (d, 2H, CH), 7,41 (d, 2H, CH), 5,20 (m, mH, CH), 4,80 (m, 2nH,  $\text{CH}_2$ ), 1,59 (m, 3mH,  $\text{CH}_3$ ) ppm



## 5.6. Click chemistry

### 5.6.1. Sintesi di PLGA-b-PEG-C≡CH

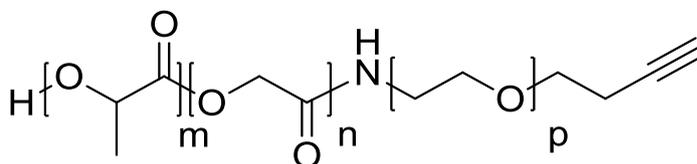


Figura 23. PLGA-b-PEG-C≡CH (8)

In un pallone da 50 mL, con agitazione e sotto flusso di azoto, viene posto il PLGA-NHS (300 mg, 0,04 mmol, 1 eq) e sciolto in 20 mL di cloroformio anidro. Vengono aggiunti l'NH<sub>2</sub>-PEG-alcino (154 mg, 0,05 mmol, 1,2 eq) e la N-Etildiisopropilammina (DIPEA) (22 μL, 0,13 mmol, 3 eq). La reazione viene lasciata andare per una notte. Si toglie l'ancoretta magnetica, si aggiunge del solvente (circa 20 mL) e si lava 3 volte in imbuto separatore con acqua fredda e soluzione satura di NaCl. La fase organica ottenuta viene ridotta fino ad un volume di circa 5 mL e sgocciolata in un pallone da 250 mL contenete circa 150 mL di etere etilico freddo. Il copolimero ottenuto in parte precipita e in parte resta in sospensione quindi l'etere viene centrifugato e il prodotto raccolto viene seccato alla pompa ad alto vuoto. Il copolimero PLGA-b-PEG-alcino si presenta come un solido bianco.

#### Dati spettroscopici:

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5,20 (m, mH, CH), 4,80 (m, 2nH, CH<sub>2</sub>),

3,61 (q, 4oH, OCH<sub>2</sub>), 1,59 (m, 3mH, CH<sub>3</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 170 (C=O), 166 (C=O), 70 (2oCH), 69 (mCH), 61 (nCH<sub>2</sub>), 17 (mCH<sub>3</sub>) ppm.

### 5.6.2. Cicloaddizione azide-alchino catalizzata da Cu(I)

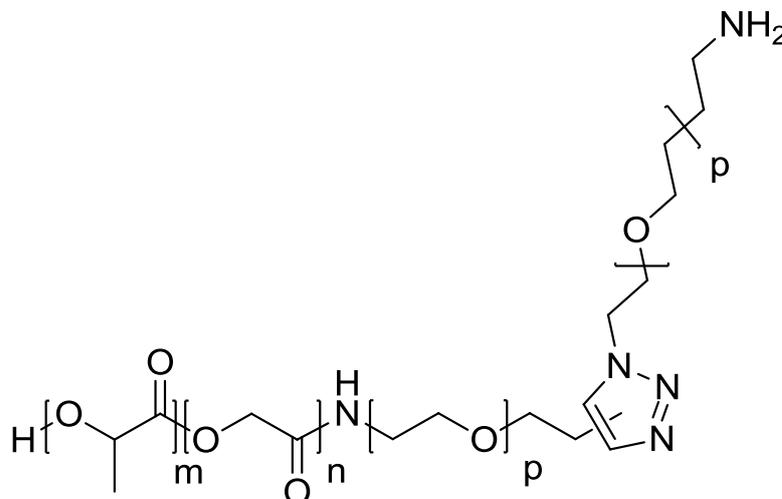


Figura 24. PLGA-b-PEG-(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>)-PEG-NH<sub>2</sub> (9)

In un pallone a due colli da 50 mL con agitazione magnetica, setto perforabile, refrigerante e flusso di azoto si scioglie l'NH<sub>2</sub>-PEG-N<sub>3</sub> (258 mg, 0,09 mmol, 2 eq) in 15 mL di tetraidrofurano anidro. Con una siringa, attraverso il setto, si aggiungono N-Etildiisopropilammina (DIPEA) (22  $\mu$ L, 0,13 mmol, 3 eq) e il PLGA-b-PEG-alchino (430 mg, 0,04 mmol, 1 eq) sciolti ciascuno in 5 mL di tetraidrofurano. Infine si aggiunge il catalizzatore ioduro di rame (16 mg, 0,09 mmol, 2 eq). La reazione viene condotta per 20 ore a 30°C, dopodiché si secca il prodotto al rotavapor e poi alla pompa ad alto vuoto, si riprende con circa 20 mL di cloroformio e si filtra su celite lavando con circa 40 mL di solvente. Il filtrato viene quindi lavato 3 volte con una soluzione acquosa di ammoniaca 5 M. La fase organica viene ridotta di volume al rotavapor fino a circa 5 mL e sgocciolata in un pallone contenente etere etilico freddo (bagno di ghiaccio). Il copolimero prodotto precipita e in parte resta in sospensione quindi l'etere viene centrifugato e il solido ottenuto seccato alla pompa ad alto vuoto. Il copolimero PLGA-b-PEG-(C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>N<sub>3</sub>)-PEG-NH<sub>2</sub> appare come un olio molto viscoso di colore giallo/verde.

#### Dati spettroscopici:

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5,20 (m, mH, CH), 4,80 (m, 2nH, CH<sub>2</sub>), 3,61 (q, 8(o+p)H, OCH<sub>2</sub>), 1,59 (m, 3mH, CH<sub>3</sub>) ppm.

## 5.7. Sintesi di PNPs

### 5.7.1. Sintesi di PNPs-C via Oil/Water

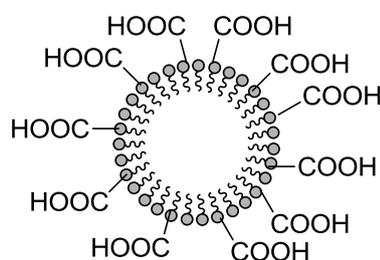


Figura 25. PNPs-C-11

In un becker da 100 mL viene posto il PLGA-COOH (50 mg, 0,007 mmol) e sciolto in 5 mL di diclorometano. Una volta che il polimero è completamente sciolto si versano lentamente nel becker 50 mL di tampone fosfato 0,1 M (PBS) facendo in modo che le due fasi non si mescolino; in questo modo si ottiene un rapporto solvente organico/polimero/PBS di 1 mL/10 mg/10 mL. Il becker viene quindi posto all'interno della camera di un sonicatore Sonics Vibra-Cell VC505 la cui punta viene immersa nel liquido (senza toccare le pareti del recipiente). La vibrazione viene applicata per circa 2 minuti: la formazione delle micelle è indicata dal cambiamento del sibilo provocato dal sonicatore in funzione il quale cambia quando l'emulsione è completamente formata. Il diclorometano viene infine rimosso tramite rotavapor. La sospensione di nanoparticelle viene purificata e concentrata tramite filtrazione in centrifuga con filtri Millipore Amicon Ultra condizionati, lavando più volte con PBS, e con filtri da siringa da 0,2  $\mu\text{m}$  Millipore Sterivex. La sospensione concentrata è stata portata ad un volume di 50 mL con PBS. La miscela bifasica, inizialmente incolore, si mostra come una sospensione bianco latte quando viene rimossa dal sonicatore e opaca una volta rimosso il solvente organico. La sospensione ha un pH di 3,67.

#### DLS:

Diametro = 80 nm; PDI = 0,19; pot(Z) = -47 mV

### 5.7.2. Sintesi di PNPs-C via Nanoprecipitazione

In un becker da 25 mL si prepara una soluzione di PLGA-COOH (50 mg, 0,007 mmol) in 5 mL di acetone. Grazie a due siringhe temporizzatrici, impostate in modo tale da mantenere costantemente il rapporto solvente organico/PBS di 1/10, la soluzione di polimero e il tampone (50 mL) vengono sgocciolate in un vial sigillato, con vigorosa agitazione magnetica, e raccolte in un pallone da 100 mL anche questo con agitazione magnetica. Una volta sgocciolate le soluzioni le siringhe vengono bloccate e la sospensione lasciata riposare sotto agitazione per 30 minuti. L'acetone è infine rimosso con un rotavapor. Le PNPs vengono purificate per filtrazione: prima con filtri da centrifuga Millipore Amicon Ultra condizionati, poi con filtri da siringa da 0,2  $\mu\text{m}$  Millipore Sterivex. La sospensione concentrata (**PNPs-C-12**) è stata portata quindi a 50 mL con PBS. La sospensione ottenuta ha un colore bianco ed è opaca e ha un pH di 4,30.

#### DLS:

Diametro = 79 nm; PDI = 0,06; pot(Z) = -41 mV

### 5.7.3. Sintesi di PNPs-CH via Nanoprecipitazione

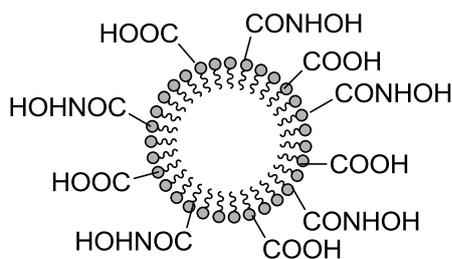


Figura 26. PNPs-CH-13

In un becker da 50 mL si prepara una soluzione di PLGA-C (100 mg, 0,014 mmol) e PLGA-H (100 mg, 0,014 mmol) in 20 mL di acetone. Due siringhe temporizzatrici, una caricata con la soluzione dei due polimeri e una con tampone fosfato 0,1 M (PBS, 200 mL), sono impostate in modo da mantenere il rapporto tra soluzione organica/tampone fosfato pari a 1/10. In questo modo le due soluzioni vengono sgocciolate in un vial sigillato con forte agitazione magnetica e la sospensione ottenuta viene raccolta in un

pallone da 500 mL, anch'esso con agitazione magnetica. Una volta terminate le soluzioni si bloccano le siringhe e la sospensione è lasciata sotto agitazione per 30 minuti. L'acetone è quindi rimosso grazie ad un rotavapor. La sospensione ottenuta viene purificata e concentrata tramite filtrazione in centrifuga su filtri Millipore Amicon Ultra condizionati fino ad un volume finale di 20 mL, lavando 3 volte con tampone fosfato. Inoltre la sospensione viene filtrata su filtri per siringhe Millipore Sterivex da 0,2  $\mu\text{m}$  per rimuovere gli aggregati e sterilizzare. La sospensione finale è stata portata ad un volume di 200 mL con PBS. La sospensione concentrata appare bianca opaca, con un pH di 7,30.

DLS:

Diametro = 152,8 nm; PDI = 0,101; pot(Z) = -28,8 mV

#### 5.7.4. Sintesi di PNPs-CA via Nanoprecipitazione

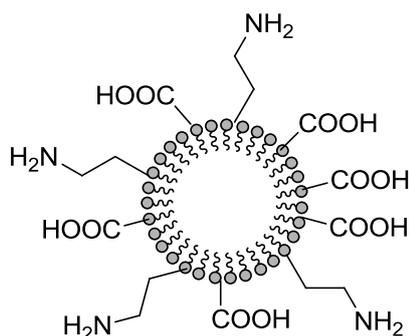


Figura 27. PNPs-CA-14

In un becker da 250 mL si prepara una soluzione di PLGA-C (600 mg, 0,086 mmol) e PLGA-A (7,400 mg, 0,055 mmol) in 100 mL di acetone; in un pallone da 1 L si pone 1 L di tampone fosfato 0,1 M. Grazie a due pompe peristaltiche, le cui portate sono regolate per mantenere un rapporto soluzione organica/tampone fosfato di 1/10, le due soluzioni vengono sgocciolate in un vial sigillato con forte agitazione magnetica e raccolte in un pallone da 2 L con agitazione magnetica. Una volta sgocciolata tutta la soluzione di polimero, le pompe vengono fermate e la sospensione lasciata sotto agitazione per 30 minuti. La sospensione viene quindi purificata e concentrata, grazie ad un filtro in continuo Millipore Pellicon XL e a filtri per siringhe da 0,2  $\mu\text{m}$  Millipore

Sterivex, fino ad un volume di 200 mL. La sospensione concentrata e purificata appare bianca opaca, con un pH di 7,30.

DLS:

Diametro = 118,9 nm; PDI = 0,108; pot(Z) = -42,3 mV

mmol NH<sub>2</sub>/gr organico = 0,14 mmol/gr.

## 5.8. Decorazione esterna di PNPs

### 5.8.1. Decorazione superficiale di PNPs-C con nanoparticelle di CAN-Maghemite

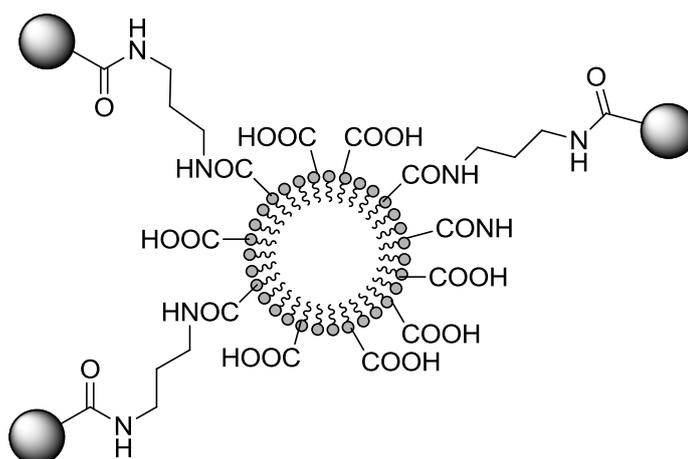


Figura 28. PNPs-C-12-Magh

In un pallone ad un collo da 50 mL con agitazione magnetica viene diluita una soluzione di CAN-Maghemite (700  $\mu$ L) in circa 20 mL di acqua ultrapura. Alla soluzione è aggiunta 1-etil-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide (EDAC, 40  $\mu$ L, 0,22 mmol) e lasciata sotto agitazione per 30 minuti. La soluzione viene quindi filtrata con filtri per centrifuga Millipore Amicon Ultra e raccolta in un pallone a un collo da 50 mL. Si aggiunge 1,3-diamminopropano (800  $\mu$ L, 9,60 mmol) e si lascia proseguire la reazione per un'ora. In un altro pallone da 50 mL ad un collo, con agitazione magnetica, sono diluite le **PNPs-C-12** (500  $\mu$ L) in circa 20 mL di acqua ultrapura, aggiunta EDAC (40  $\mu$ L, 0,22 mmol) e lasciata avvenire l'attivazione per 30 minuti. Dopodiché anche questa soluzione viene centrifugata con filtri Millipore Amicon Ultra. In un pallone da 250 mL

ad un collo, con agitazione magnetica, vengono infine unite la soluzione di CAN-Maghemite-diamminopropano e PNPs-C attivate. La reazione viene lasciata sotto agitazione per 2 ore e poi filtrata in centrifuga; si ottiene così una soluzione di colore giallo/marroncino.

### 5.8.2. Decorazione superficiale di PNPs-CA con nanoparticelle di CAN-Maghemite

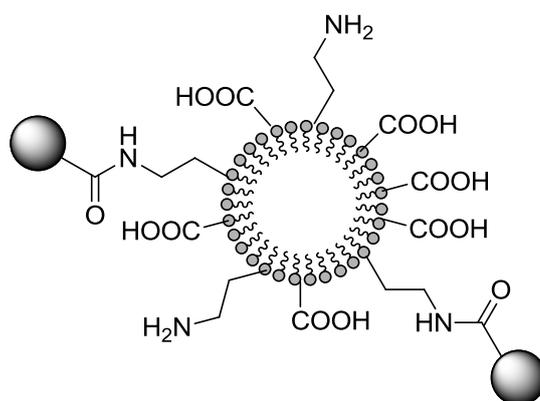


Figura 29. PNPs-CA-14-Magh

In un pallone ad un collo da 50 mL, con agitazione magnetica, si pone una sospensione di CAN-Maghemite (700  $\mu$ L) e la si diluisce con circa 20 mL di acqua ultrapura. Viene aggiunta 1-etil-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide (EDAC, 60  $\mu$ L, 0,34 mmol) e lasciata in agitazione per 30 minuti; al termine dell'attivazione si centrifuga il tutto con filtri Millipore Amicon Ultra, si raccoglie in un pallone da 50 mL con agitazione magnetica e si aggiungono le **PNPs-CA-14** (500  $\mu$ L). La reazione viene condotta per due ore e, al termine, si centrifuga nuovamente. Si ottiene una soluzione di colore giallo/marroncino.

## **6. Schede di sicurezza**

### **6.1. Scheda di sicurezza dell'acido poli(D,L-lattico-co-glicolico)**

#### **1. IDENTIFICAZIONE DELLA SOSTANZA O DELLA MISCELA E DELLA SOCIETÀ/IMPRESA**

##### **1.1 Identificatori del prodotto**

Nome del prodotto : Poly(D,L-lactide-co-glycolide)

Codice del prodotto : 719919

Marca : Lactel

N. CAS : 26780-50-7

##### **1.2 Usi pertinenti identificati della sostanza o miscela e usi sconsigliati**

Usi identificati : chimici di laboratorio, produzione di sostanze chimiche

##### **1.3 Informazioni sul fornitore della scheda di dati di sicurezza**

Società : Lactel Absorbable Polymers 2200 Riverchase Center, Suite 501 Birmingham, AL 35244 USA

Telefono : +39 (877) 705-8072

Fax : +39 (408) 865-1406

Indirizzo e-mail : [absorbables@direct.com](mailto:absorbables@direct.com)

##### **1.4 Numero telefonico di emergenza**

Telefono per le emergenze: +39 (205) 620-0025

#### **2. IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI**

##### **2.1 Classificazione della sostanza o della miscela**

Sostanza o miscela non pericolosa secondo la regolamentazione (CE) N. 1272/2008.

Questa sostanza non è classificata come pericolosa secondo la Direttiva 67/548/CEE.

##### **2.2 Elementi dell'etichetta**

Il prodotto non è soggetto ad etichettatura secondo le direttive CE o le corrispondenti normative nazionali.

Attenzione: sostanza non ancora completamente sottoposta a test.

##### **2.3 Altri pericoli**

Nessuno(a)

### **3. COMPOSIZIONE/ INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI**

#### **3.1 Sostanze**

Sinonimi : RESOMER® RG 752 H, PLGA

Formula :  $[(C_6H_8O_4)_x(C_4H_4O_4)_y]_n$

### **4. MISURE DI PRIMO SOCCORSO**

#### **4.1 Descrizione delle misure di primo soccorso**

##### **Se inalato**

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. Se non respira, somministrare respirazione artificiale.

##### **In caso di contatto con la pelle**

Lavare con sapone e molta acqua.

##### **In caso di contatto con gli occhi**

Come precauzione sciacquare gli occhi con acqua.

##### **Se ingerito**

Non somministrare alcun ch  a persone svenute. Sciacquare la bocca con acqua.

#### **4.2 Principali sintomi ed effetti, sia acuti e che ritardati**

Al meglio della nostra conoscenza, le propriet  chimiche, fisiche e tossicologiche non sono state oggetto di studi approfonditi.

#### **4.3 Indicazione dell'eventuale necessit  di consultare immediatamente un medico oppure di trattamenti speciali**

Nessun dato disponibile

### **5. MISURE ANTINCENDIO**

#### **5.1 Mezzi di estinzione**

##### **Mezzi di estinzione idonei**

Utilizzare acqua nebulizzata, schiuma alcool resistente, prodotti chimici asciutti o anidride carbonica.

#### **5.2 Pericoli speciali derivanti dalla sostanza o dalla miscela**

Ossidi di carbonio, ossidi di azoto (NO<sub>x</sub>)

#### **5.3 Raccomandazioni per gli addetti all'estinzione degli incendi**

Indossare in caso di incendio, se necessario, dispositivi di protezione delle vie respiratorie con apporto d'aria indipendente.

#### **5.4 Ulteriori informazioni**

Nessun dato disponibile

## **6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE**

### **6.1 Precauzioni personali, dispositivi di protezione e procedure in caso di emergenza**

Evitare la formazione di polvere. Evitare di respirare vapori/nebbia/gas.

### **6.2 Precauzioni ambientali**

Non sono richieste particolari misure precauzionali per la salvaguardia dell'ambiente

### **6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica**

Spazzare e spalare. Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

### **6.4 Riferimenti ad altre sezioni**

Per lo smaltimento riferirsi alla sezione 13.

## **7. MANIPOLAZIONE E IMMAGAZZINAMENTO**

### **7.1 Precauzioni per la manipolazione sicura**

Adottare un'adeguata ventilazione nei luoghi dove si sviluppano le polveri.

### **7.2 Condizioni per l'immagazzinamento sicuro, comprese eventuali incompatibilità**

Immagazzinare in luogo fresco. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato.

Temperatura di stoccaggio consigliata: 2 - 8 °C

Manipolare sotto azoto, proteggere dall'umidità.

### **7.3 Usi finali specifici**

Nessun dato disponibile

## **8. CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE/PROTEZIONE INDIVIDUALE**

### **8.1 Parametri di controllo**

#### **Componenti con limiti di esposizione**

Non contiene sostanze con valore limite di esposizione professionale.

### **8.2 Controlli dell'esposizione**

#### **Controlli tecnici idonei**

Prassi generale di igiene industriale.

#### **Protezione individuale**

##### **Protezioni per occhi/volto**

Utilizzare dispositivi per la protezione oculare testati e approvati secondo i requisiti di adeguate norme tecniche come NIOSH (USA) o EN 166 (EU)

### **Protezione della pelle**

Manipolare con guanti. I guanti devono essere controllati prima di essere usati. Usare una tecnica adeguata per la rimozione dei guanti (senza toccare la superficie esterna del guanto) per evitare il contatto della pelle con questo prodotto. Smaltire i guanti contaminati dopo l'uso in accordo con la normativa vigente e le buone pratiche di laboratorio. Lavare e asciugare le mani. I guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano.

### **Protezione fisica**

Scegliere una protezione fisica secondo le sue caratteristiche, alla concentrazione, alla quantità di sostanze pericolose e al tipo di posto di lavoro., Il tipo di attrezzatura di protezione deve essere selezionato in funzione della concentrazione e la quantità di sostanza pericolosa al posto di lavoro.

### **Protezione respiratoria**

Non è richiesta la protezione delle vie respiratorie. Se se desidera la protezione dai livelli di polveri, utilizzare maschere antipolvere con filtri di tipo P1 (EN 143). Utilizzare respiratori e componenti testati e approvati dai competenti organismi di normazione, quali il NIOSH (USA) il CEN (UE).

## **9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE**

### **9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali**

a) Aspetto Stato fisico: granuli, polvere

Colore: giallo chiaro

b) Odore leggero

c) Soglia olfattiva: nessun dato disponibile

d) pH: nessun dato disponibile

e) Punto di fusione/punto di congelamento: nessun dato disponibile

f) Punto di ebollizione iniziale e intervallo di ebollizione: nessun dato disponibile

g) Punto di infiammabilità: nessun dato disponibile

h) Tasso di evaporazione: nessun dato disponibile

i) Infiammabilità (solidi, gas): nessun dato disponibile

j) Infiammabilità superiore/inferiore o limiti di esplosività: nessun dato disponibile

k) Tensione di vapore: nessun dato disponibile

l) Densità di vapore: nessun dato disponibile

- m) Densità relativa: nessun dato disponibile
- n) Idrosolubilità: solubile, idrolizza
- o) Coefficiente di ripartizione: n-ottanolo/acqua: nessun dato disponibile
- p) Temperatura di autoaccensione: nessun dato disponibile
- q) Temperatura di decomposizione: nessun dato disponibile
- r) Viscosità: nessun dato disponibile
- s) Proprietà esplosive: nessun dato disponibile
- t) Proprietà ossidanti: nessun dato disponibile

## **9.2 Altre informazioni sulla sicurezza**

Nessun dato disponibile

## **10. STABILITÀ E REATTIVITÀ**

### **10.1 Reattività**

Nessun dato disponibile

### **10.2 Stabilità chimica**

Nessun dato disponibile

### **10.3 Possibilità di reazioni pericolose**

Nessun dato disponibile

### **10.4 Condizioni da evitare**

Esposizione all'umidità.

### **10.5 Materiali incompatibili**

Acidi, Basi

### **10.6 Prodotti di decomposizione pericolosi**

Altri prodotti di decomposizione pericolosi: nessun dato disponibile

## **11. INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE**

### **11.1 Informazioni sugli effetti tossicologici**

#### **Tossicità acuta**

Nessun dato disponibile

#### **Corrosione/irritazione**

Nessun dato disponibile

#### **Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi**

Nessun dato disponibile

#### **Sensibilizzazione respiratoria o cutanea**

Nessun dato disponibile

### **Mutagenicità delle cellule germinali**

Nessun dato disponibile

### **Cancerogenicità**

IARC: nessun componente di questo prodotto presente a livelli maggiori o uguali allo 0.1% è identificato come cancerogeno conosciuto o previsto dallo IARC.

### **Tossicità riproduttiva**

Nessun dato disponibile

### **Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola**

Nessun dato disponibile

### **Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione ripetuta**

Nessun dato disponibile

### **Pericolo in caso di aspirazione**

Nessun dato disponibile

### **Potenziati conseguenze sulla salute**

**Inalazione** può essere nocivo se inalato. Può provocare irritazione delle vie respiratorie.

**Ingestione** Può essere pericoloso se ingerito.

**Pelle** può essere dannoso se assorbito attraverso la pelle Può provocare irritazione della pelle.

**Occhi** può provocare irritazione agli occhi.

### **Segni e sintomi di esposizione**

Al meglio della nostra conoscenza, le proprietà chimiche, fisiche e tossicologiche non sono state oggetto di studi approfonditi.

### **Ulteriori informazioni**

RTECS: nessun dato disponibile

## **12. INFORMAZIONI ECOLOGICHE**

### **12.1 Tossicità**

Nessun dato disponibile

### **12.2 Persistenza e degradabilità**

Nessun dato disponibile

### **12.3 Potenziale di bioaccumulo**

Nessun dato disponibile

### **12.4 Mobilità nel suolo**

Nessun dato disponibile

## **12.5 Risultati della valutazione PBT e vPvB**

Nessun dato disponibile

## **12.6 Altri effetti avversi**

Nessun dato disponibile

## **13. CONSIDERAZIONI SULLO SMALTIMENTO**

### **13.1 Metodi di trattamento dei rifiuti**

#### **Prodotto**

Conferire le soluzioni non riciclabili e le eccedenze ad una società di smaltimento rifiuti autorizzata.

#### **Contenitori contaminati**

Smaltire come prodotto inutilizzato.

## **14. INFORMAZIONI SUL TRASPORTO**

### **14.1 Numero ONU**

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

### **14.2 Nome di spedizione dell'ONU**

ADR/RID: Merci non pericolose

IMDG: Not dangerous goods

IATA: Not dangerous goods

### **14.3 Classi di pericolo connesso al trasporto**

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

### **14.4 Gruppo d'imballaggio**

ADR/RID: - IMDG: - IATA: -

### **14.5 Pericoli per l'ambiente**

ADR/RID: no IMDG Marine pollutant: no IATA: no

### **14.6 Precauzioni speciali per gli utilizzatori**

Nessun dato disponibile

## **15. INFORMAZIONI SULLA REGOLAMENTAZIONE**

Questa scheda di sicurezza rispetta le prescrizioni del Regolamento (CE) Num. 1907/2006

### **15.1 Norme e legislazione su salute, sicurezza e ambiente specifiche per la sostanza o la miscela**

Nessun dato disponibile

## **15.2 Valutazione della sicurezza chimica**

Nessun dato disponibile

## **16. ALTRE INFORMAZIONI**

### **Ulteriori informazioni**

Diritti d'autore 2011 Sigma-Aldrich. Si autorizza la stampa di un numero illimitato di copie per esclusivo uso interno. Le informazioni di cui sopra sono ritenute corrette, tuttavia non possono essere esaurienti e dovranno pertanto essere considerate puramente indicative. La società Sigma-Aldrich, non potrà essere ritenuta responsabile per qualsiasi danno derivante dall'impiego o dal contatto con il prodotto di cui sopra. Per ulteriori termini e condizioni di vendita fare riferimento al retro della fattura o della bolla di accompagnamento.

## ***6.2. Scheda di sicurezza del cloruro di tionile***

### **1. IDENTIFICAZIONE DELLA SOSTANZA O DELLA MISCELA E DELLA SOCIETÀ/ IMPRESA**

#### **1.1 Identificatori del prodotto**

Nome del prodotto: Cloruro di tionile

Codice del prodotto: 88952

Marca: Fluka

N. INDICE: 016-015-00-0

N. CAS: 7719-09-7

#### **1.2 Usi pertinenti identificati della sostanza o miscela e usi sconsigliati**

Usi identificati: Chimici di laboratorio, Produzione di sostanze chimiche

#### **1.3 Informazioni sul fornitore della scheda di dati di sicurezza**

Società: Sigma-Aldrich S.r.l.

Via Gallarate 154

I-20151 MILANO

Telefono: +39 02-3341-7310

Fax: +39 02-3801-0737

Indirizzo e-mail: eurtechserv@sial.com

#### **1.4 Numero telefonico di emergenza**

Telefono per le emergenze: +39 02-6610-1029 (Centro Antiveleni Niguarda Ca' Granda - Milano)

## **2. IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI**

### **2.1 Classificazione della sostanza o della miscela**

#### **Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 [EU-GHS/CLP]**

Tossicità acuta, Inalazione (Categoria 4)

Tossicità acuta, Orale (Categoria 4)

Corrosione cutanea (Categoria 1A)

#### **Classificazione secondo le Direttive EU 67/548/CEE o 1999/45/CE**

Reagisce violentemente con l'acqua. Provoca gravi ustioni. Nocivo per inalazione e ingestione. A contatto con l'acqua libera gas tossici.

### **2.2 Elementi dell'etichetta**

#### **Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]**

Avvertenza            Pericolo

Indicazioni di pericolo

H302                    Nocivo se ingerito.

H314                    Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

H332                    Nocivo se inalato.

Consigli di prudenza

P280                    Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P310                    Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Informazioni supplementari sui pericoli (EU)

EUH014                Reagisce violentemente con l'acqua.

EUH029                A contatto con l'acqua libera un gas tossico.

#### **Secondo la Direttiva Europea 67/548/CEE, e successive modifiche.**

Fraasi "R"

R14 Reagisce violentemente con l'acqua.

R20/22 Nocivo per inalazione e ingestione.

R29 A contatto con l'acqua libera gas tossici.

R35 Provoca gravi ustioni.

Fraasi "S"

S26 In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S36/37/39 Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S45 In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

### **2.3 Altri pericoli**

Nessuno(a)

## **3. COMPOSIZIONE/ INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI**

### **3.1 Sostanze**

Formula: Cl<sub>2</sub>OS

Peso Molecolare: 118,97 g/mol

#### **Thionyl chloride**

N. CAS: 7719-09-7

N. CE: 231-748-8

N. INDICE: 016-015-00-0

## **4. MISURE DI PRIMO SOCCORSO**

### **4.1 Descrizione delle misure di primo soccorso**

#### **Informazione generale**

Consultare un medico. Mostrare questa scheda di sicurezza al medico curante.

#### **Se inalato**

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. Se non respira, somministrare respirazione artificiale. Consultare un medico.

#### **In caso di contatto con la pelle**

Togliere immediatamente gli indumenti e le scarpe contaminate. Lavare con sapone e molta acqua. Portare subito l'infortunato in ospedale. Consultare un medico.

#### **In caso di contatto con gli occhi**

Sciacquare accuratamente ed abbondantemente con acqua per almeno 15 minuti e rivolgersi ad un medico.

#### **Se ingerito**

NON indurre il vomito. Non somministrare alcunchè a persone svenute. Sciacquare la bocca con acqua. Consultare un medico.

#### **4.2 Principali sintomi ed effetti, sia acuti e che ritardati**

#### **4.3 Indicazione dell'eventuale necessità di consultare immediatamente un medico oppure di trattamenti speciali**

Nessun dato disponibile

### **5. MISURE ANTINCENDIO**

#### **5.1 Mezzi di estinzione**

##### **Mezzi di estinzione idonei**

Utilizzare sistemi estinguenti compatibili con la situazione locale e con l'ambiente circostante. Polvere asciutta

#### **5.2 Pericoli speciali derivanti dalla sostanza o dalla miscela**

Ossidi di carbonio, Gas di acido cloridrico. La natura dei prodotti di decomposizione è sconosciuta. Ossidi di zolfo, Gas di acido cloridrico

#### **5.3 Raccomandazioni per gli addetti all'estinzione degli incendi**

Indossare in caso di incendio, se necessario, dispositivi di protezione delle vie respiratorie con apporto d'aria indipendente.

#### **5.4 Ulteriori informazioni**

L'acqua idrolizza il prodotto liberando un gas acido che, a contatto con superfici metalliche, può generare idrogeno gassoso infiammabile e/o esplosivo. Il prodotto di per sé non brucia.

### **6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE**

#### **6.1 Precauzioni personali, dispositivi di protezione e procedure in caso di emergenza**

Usare una protezione respiratoria. Evitare di respirare vapori/nebbia/gas. Prevedere una ventilazione adeguata. Evacuare il personale in aree di sicurezza.

#### **6.2 Precauzioni ambientali**

Evitare sversamenti o perdite supplementari, se questo può essere fatto senza pericolo. Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

#### **6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica**

Impregnare con materiale assorbente inerte e smaltire come rifiuto (vedere SEZ. 13). Non lavare con acqua. Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

#### **6.4 Riferimenti ad altre sezioni**

Per lo smaltimento riferirsi alla sezione 13.

## **7. MANIPOLAZIONE E IMMAGAZZINAMENTO**

### **7.1 Precauzioni per la manipolazione sicura**

Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Non inalare vapori o nebbie.

### **7.2 Condizioni per l'immagazzinamento sicuro, comprese eventuali incompatibilità**

Immagazzinare in luogo fresco. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato. Chiudere accuratamente i contenitori aperti e riporli in posizione verticale per evitare perdite. Mantenere lontano dall'acqua. Evitare assolutamente che il prodotto venga in contatto con l'acqua durante l'immagazzinaggio. Maneggiare e conservare in atmosfera inerte.

### **7.3 Usi finali specifici**

Nessun dato disponibile

## **8. CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE/PROTEZIONE INDIVIDUALE**

### **8.1 Parametri di controllo**

#### **Componenti con limiti di esposizione**

Non contiene sostanze con valore limite di esposizione professionale.

### **8.2 Controlli dell'esposizione**

#### **Controlli tecnici idonei**

Evitare il contatto con la pelle, con gli occhi e con gli indumenti. Lavarsi le mani prima delle pause e subito dopo aver maneggiato il prodotto.

#### **Protezione individuale**

##### **Protezioni per occhi/volto**

Occhiali di sicurezza ben aderenti. Visiera protettiva (minimo 20 cm). Utilizzare dispositivi per la protezione oculare testati e approvati secondo i requisiti di adeguate norme tecniche come NIOSH (USA) o EN 166 (EU)

##### **Protezione della pelle**

Manipolare con guanti. I guanti devono essere controllati prima di essere usati. Usare una tecnica adeguata per la rimozione dei guanti (senza toccare la superficie esterna del guanto) per evitare il contatto della pelle con questo prodotto. Smaltire i guanti contaminati dopo l'uso in accordo con la normativa vigente e le buone pratiche di laboratorio. Lavare e asciugare le mani. I guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano.

##### **Protezione fisica**

Indumenti protettivi completi resistenti alle sostanze chimiche, Indumenti protettivi non infiammabili, Il tipo di attrezzatura di protezione deve essere selezionato in funzione della concentrazione e la quantità di sostanza pericolosa al posto di lavoro.

### **Protezione respiratoria**

Qualora la valutazione del rischio preveda la necessità di respiratori ad aria purificata, utilizzare una maschera a pieno facciale con filtri combinati di tipo ABEK (EN 14387) come supporto alle misure tecniche. Se il respiratore costituisce il solo mezzo di protezione, utilizzare un sistema ventilato a pieno facciale. Utilizzare respiratori e componenti testati e approvati dai competenti organismi di normazione, quali il NIOSH (USA) il CEN (UE).

## **9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE**

### **9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali**

- a) Aspetto Stato fisico: liquido, limpido
- b) Odore: nessun dato disponibile
- c) Soglia olfattiva: nessun dato disponibile
- d) pH: nessun dato disponibile
- e) Punto/intervallo di fusione: -105 °C
- f) Punto di ebollizione iniziale e intervallo di ebollizione: 79 °C
- g) Punto di infiammabilità: nessun dato disponibile
- h) Tasso di evaporazione: nessun dato disponibile
- i) Infiammabilità (solidi, gas): nessun dato disponibile
- j) Infiammabilità superiore/inferiore o limiti di esplosività: nessun dato disponibile
- k) Tensione di vapore: 129 hPa a 20 °C
- l) Densità di vapore: nessun dato disponibile
- m) Densità relativa: nessun dato disponibile
- n) Idrosolubilità: nessun dato disponibile
- o) Coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua: nessun dato disponibile
- p) Temperatura di autoaccensione: nessun dato disponibile
- q) Temperatura di decomposizione: nessun dato disponibile
- r) Viscosità: nessun dato disponibile
- s) Proprietà esplosive: nessun dato disponibile
- t) Proprietà ossidanti: nessun dato disponibile

### **9.2 Altre informazioni sulla sicurezza**

Nessun dato disponibile

## **10. STABILITÀ E REATTIVITÀ**

### **10.1 Reattività**

Nessun dato disponibile

### **10.2 Stabilità chimica**

Nessun dato disponibile

### **10.3 Possibilità di reazioni pericolose**

Reagisce violentemente con l'acqua.

### **10.4 Condizioni da evitare**

Mantenere il contenitore secco. Il contatto con acqua provoca una violenta esplosione.

Esposizione all'umidità.

### **10.5 Materiali incompatibili**

Alcoli, Ammine, Metalli, Reagisce violentemente con l'acqua.

### **10.6 Prodotti di decomposizione pericolosi**

Altre prodotti di decomposizione pericolosi - nessun dato disponibile

## **11. INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE**

### **11.1 Informazioni sugli effetti tossicologici**

#### **Tossicità acuta**

CL50 Inalazione - ratto - 1 h - 500 ppm

#### **Corrosione/irritazione cutanea**

Nessun dato disponibile

#### **Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi**

Nessun dato disponibile

#### **Sensibilizzazione respiratoria o cutanea**

Nessun dato disponibile

#### **Mutagenicità delle cellule germinali**

Nessun dato disponibile

#### **Cancerogenicità**

IARC: Nessun componente di questo prodotto presente a livelli maggiori o uguali allo 0.1% è identificato come cancerogeno conosciuto o previsto dallo IARC.

#### **Tossicità riproduttiva**

Nessun dato disponibile

**Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola**

Nessun dato disponibile

**Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione ripetuta**

Nessun dato disponibile

**Pericolo in caso di aspirazione**

Nessun dato disponibile

**Potenziali conseguenze sulla salute**

**Inalazione** Può essere fatale se inalato. Il presente prodotto provoca lacerazioni del tessuto delle mucose e delle vie respiratorie alte.

**Ingestione** Nocivo per ingestione. Provoca ustioni.

**Pelle** Può essere dannoso se assorbito attraverso la pelle Provoca ustioni alla pelle.

**Occhi** Provoca ustioni agli occhi.

**Ulteriori informazioni**

RTECS: XM5150000

**12. INFORMAZIONI ECOLOGICHE****12.1 Tossicità**

Nessun dato disponibile

**12.2 Persistenza e degradabilità**

Nessun dato disponibile

**12.3 Potenziale di bioaccumulo**

Nessun dato disponibile

**12.4 Mobilità nel suolo**

Nessun dato disponibile

**12.5 Risultati della valutazione PBT e vPvB**

Nessun dato disponibile

**12.6 Altri effetti avversi**

Nessun dato disponibile

**13. CONSIDERAZIONI SULLO SMALTIMENTO****13.1 Metodi di trattamento dei rifiuti****Prodotto**

Conferire le soluzioni non riciclabili e le eccedenze ad una società di smaltimento rifiuti autorizzata.

**Contenitori contaminati**

Smaltire come prodotto inutilizzato.

## **14. INFORMAZIONI SUL TRASPORTO**

### **14.1 Numero ONU**

ADR/RID: 1836 IMDG: 1836 IATA: 1836

### **14.2 Nome di spedizione dell'ONU**

ADR/RID: CLORURO DI TIONILE

IMDG: THIONYL CHLORIDE

IATA: Thionyl chloride

Passenger Aircraft: Not permitted for transport

Cargo Aircraft: Not permitted for transport

### **14.3 Classi di pericolo connesso al trasporto**

ADR/RID: 8 IMDG: 8 IATA: 8

### **14.4 Gruppo d'imballaggio**

ADR/RID: I IMDG: I IATA: -

### **14.5 Pericoli per l'ambiente**

ADR/RID: no IMDG Marine pollutant: no IATA: no

### **14.6 Precauzioni speciali per gli utilizzatori**

nessun dato disponibile

## **15. INFORMAZIONI SULLA REGOLAMENTAZIONE**

Questa scheda di sicurezza rispetta le prescrizioni del Regolamento (CE) Num.

1907/2006

### **15.1 Norme e legislazione su salute, sicurezza e ambiente specifiche per la sostanza o la miscela**

Nessun dato disponibile

### **15.2 Valutazione della sicurezza chimica**

Nessun dato disponibile

## **16. ALTRE INFORMAZIONI**

### **Ulteriori informazioni**

Diritti d'autore 2011 Sigma-Aldrich. Si autorizza la stampa di un numero illimitato di copie per esclusivo uso interno.

Le informazioni di cui sopra sono ritenute corrette, tuttavia non possono essere esaurienti e dovranno pertanto essere considerate puramente indicative. La società Sigma-Aldrich, non potrà essere ritenuta responsabile per qualsiasi danno derivante dall'impiego o dal contatto con il prodotto di cui sopra. Per ulteriori termini e condizioni di vendita fare riferimento al retro della fattura o della bolla di accompagnamento.

### ***6.3. Scheda di sicurezza del dicicloesilcarbodiimide***

#### **1. IDENTIFICAZIONE DELLA SOSTANZA / DEL PREPARATO E DELLA SOCIETÀ/DELL'IMPRESA**

Nome del prodotto : N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide

Codice del prodotto : D3128

Marca : Sigma

Società : Sigma-Aldrich S.r.l. Via Gallarate 154 I-20151 MILANO

#### **2. IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI**

##### **Consigli di rischio per l'uomo e per l'ambiente**

Nocivo per ingestione. Tossico a contatto con la pelle. Rischio di gravi lesioni oculari.

Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.

#### **3. COMPOSIZIONE/INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI**

Sinonimi : DCC

Formula : C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>

Peso Molecolare : 206,33 g/mol

No. CAS 538-75-0 No. CE 208-704-1

#### **4. MISURE DI PRIMO SOCCORSO**

##### **Informazione generale**

Consultare un medico. Mostrare questa scheda di sicurezza al medico curante.

##### **Se inalato**

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. In caso di arresto della respirazione, procedere con la respirazione artificiale Consultare un medico.

##### **In caso di contatto con la pelle**

Lavare con sapone e molta acqua. Portare subito l'infortunato in ospedale. Consultare un medico.

#### **In caso di contatto con gli occhi**

Sciacquare accuratamente ed abbondantemente con acqua per almeno 15 minuti e rivolgersi ad un medico.

#### **Se ingerito**

Non somministrare alcunchè a persone svenute. Sciacquare la bocca con acqua. Consultare un medico.

### **5. MISURE ANTINCENDIO**

#### **Mezzi di estinzione idonei**

Utilizzare acqua nebulizzata, schiuma alcool resistente, prodotti chimici asciutti o anidride carbonica.

#### **Equipaggiamento speciale di protezione per gli addetti all'estinzione degli incendi**

Indossare in caso di incendio, se necessario, dispositivi di protezione delle vie respiratorie con apporto d'aria indipendente.

### **6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE**

#### **Precauzioni individuali**

Usare i dispositivi di protezione individuali. Evitare la formazione di polvere. Non inalare polvere. Prevedere una ventilazione adeguata. Evacuare il personale in aree di sicurezza.

#### **Precauzioni ambientali**

Evitare sversamenti o perdite supplementari, se questo può essere fatto senza pericolo. Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

#### **Metodi di pulizia**

Ritirare e provvedere allo smaltimento senza creare polvere. Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

### **7. MANIPOLAZIONE E IMMAGAZZINAMENTO**

#### **Manipolazione**

Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Evitare la formazione di polvere e la

dispersione del prodotto nell'aria. Adottare un'adeguata ventilazione nei luoghi dove si sviluppano le polveri. Normali misure di prevenzione antincendio.

### **Immagazzinamento**

Immagazzinare in luogo fresco. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato. Sensibile all'umidità.

## **8. CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE/PROTEZIONE INDIVIDUALE**

Non contiene sostanze con valore limite di esposizione professionale.

### **Protezione respiratoria**

Qualora la valutazione del rischio preveda la necessità di respiratori a ventilazione assistita, utilizzare un facciale filtrante con filtri di tipo P3 (EN 143) come supporto alle misure tecniche. Se il respiratore costituisce il solo mezzo di protezione, utilizzare un sistema ventilato a pieno facciale. Utilizzare respiratori e componenti testati e approvati dai competenti organismi di normazione, quali il NIOSH (USA) il CEN (UE).

### **Protezione delle mani**

I guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano. Manipolare con guanti.

### **Protezione degli occhi**

Occhiali di sicurezza

### **Protezione della pelle e del corpo**

Scegliere un tipo di protezione fisica in funzione dell'ammontare di concentrazione di sostanze pericolose al posto di lavoro.

### **Misure di igiene**

Evitare il contatto con la pelle, con gli occhi e con gli indumenti. Lavarsi le mani prima delle pause e subito dopo aver maneggiato il prodotto.

## **9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE**

### **Aspetto**

Forma fisica: solido

Colore: incolore

### **Dati di sicurezza**

pH: nessun dato disponibile

Punto di fusione: 34 - 35 °C

Punto di ebollizione: 122 - 124 °C a 8 hPa; 148 - 152 °C a 20 hPa

Punto di infiammabilità: 113 °C - vaso chiuso

Temperatura di accensione: nessun dato disponibile

Limite di esplosività, inferiore: nessun dato disponibile

Limite di esplosività, superiore: nessun dato disponibile

Idrosolubilità: nessun dato disponibile

## **10. STABILITÀ E REATTIVITÀ**

### **Stabilità di magazzinaggio**

Stabile nelle condizioni di stoccaggio raccomandate.

### **Materiali da evitare**

Agenti ossidanti forti

### **Prodotti di decomposizione pericolosi**

Prodotti di decomposizione pericolosi in caso d'incendio. - Ossidi di carbonio, ossidi di azoto (NO<sub>x</sub>)

## **11. INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE**

### **Tossicità acuta**

DL50 Orale - ratto - 1.499 mg/kg

CL50 Inalazione - ratto - 6 h - 159 mg/m<sup>3</sup>

Osservazioni: Organi di senso: vista: lacrimazione Sistema vascolare: dilatazione localizzata o generale di arteriole o vene Cute ed annessi: altro: capelli

DL50 Dermico - su coniglio - 79,1 mg/kg

### **Irritazione e corrosione**

Pelle - su coniglio - Gravemente corrosivo e necrotizzante i tessuti. - 4 h

### **Sensibilizzazione**

Può causare una reazione allergica sulla pelle.

### **Esposizione continua**

IARC: Nessun componente di questo prodotto presente a livelli maggiori o uguali allo 0.1% è identificato come cancerogeno conosciuto o previsto dallo IARC

### **Segni e sintomi di esposizione**

Gli effetti possono variare da una leggera irritazione a una grave distruzione dei tessuti in relazione all'intensità e alla durata dell'esposizione., Può causare cecità., I sintomi possono essere ritardati., Al meglio della nostra conoscenza, le proprietà chimiche, fisiche e tossicologiche non sono state oggetto di studi approfonditi.

### **Conseguenze potenziali sulla salute**

**Pelle** Tossico se assorbito attraverso la pelle. Può provocare irritazione della pelle.

**Occhi** Provoca grave irritazione oculare.

**Organi bersaglio** Occhi.

## **12. INFORMAZIONI ECOLOGICHE**

### **Dati sull'eliminazione (persistenza e degradabilità)**

Nessun dato disponibile

### **Effetti legati all'ecotossicità**

Nessun dato disponibile

### **Informazioni supplementari sull'ecologia**

Nessun dato disponibile

## **13. CONSIDERAZIONI SULLO SMALTIMENTO**

### **Prodotto**

Rispettare tutti i regolamenti europei, statali e locali in materia di protezione dell'ambiente. Per lo smaltimento del presente prodotto, rivolgersi a una società specializzata nello smaltimento dei rifiuti. Solubilizzare o miscelare il prodotto con un solvente combustibile, quindi bruciare in un inceneritore per prodotti chimici dotato di sistema di postcombustione e di abbattitore.

### **Contenitori contaminati**

Smaltire come prodotto inutilizzato.

## **14. INFORMAZIONI SUL TRASPORTO ADR/RID**

Numero ONU: 2811 Classe: 6.1 Gruppo d'imballaggio: II

Nome di spedizione appropriato: TOXIC SOLID, ORGANIC, N.O.S.

(Dicyclohexylcarbodiimide)

### **IMDG**

UN-Number: 2811 Class: 6.1 Packing group: II EMS-No: F-A, S-A

Proper shipping name: TOXIC SOLID, ORGANIC, N.O.S. (Dicyclohexylcarbodiimide)

Marine pollutant: No

### **IATA**

UN-Number: 2811 Class: 6.1 Packing group: II

Proper shipping name: Toxic solid, organic n.o.s. (Dicyclohexylcarbodiimide)

## **15. INFORMAZIONI SULLA REGOLAMENTAZIONE**

### **Fraasi "R"**

R22 Nocivo per ingestione.

R24 Tossico a contatto con la pelle.

R41 Rischio di gravi lesioni oculari.

R43 Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.

#### **Frase "S"**

S24 Evitare il contatto con la pelle.

S26 In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S37/39 Usare guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S45 In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

### **6.4. Scheda di sicurezza del N-idrossisuccinimide**

#### **1. IDENTIFICAZIONE DELLA SOSTANZA/ MISCELA E DELLA SOCIETÀ/DELL'IMPRESA**

Nome del prodotto : N-Idrossisuccinimide

Codice del prodotto : 130672

Marca : Aldrich

Società : Sigma-Aldrich S.r.l., Via Gallarate 154 I-20151 MILANO

Telefono : +39 02-3341-7310

Fax : +39 02-3801-0737

Telefono per le emergenze : +39 02-6610-1029 (Centro Antiveneni Niguarda Ca' Granda - Milano)

Indirizzo e-mail : eurtechserv@sial.com

#### **2. IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI**

##### **Classificazione della sostanza o della miscela**

Sostanza non pericolosa secondo il GHS. Questa sostanza non è classificata come pericolosa secondo la Direttiva 67/548/CEE.

##### **Elementi dell'etichetta**

Il prodotto non è soggetto ad etichettatura secondo le direttive CE o le corrispondenti normative nazionali.

##### **Altri pericoli**

Nessuno(a)

### **3. COMPOSIZIONE/INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI**

Sinonimi : HOSu

1-Hydroxy-2,5-pyrrolidinedione

Formula : C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>

Peso Molecolare : 115,09 g/mol

No. CAS: 6066-82-6

No. CE: 228-001-3

### **4. MISURE DI PRIMO SOCCORSO**

#### **Se inalato**

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. Se non respira, somministrare respirazione artificiale.

#### **In caso di contatto con la pelle**

Lavare con sapone e molta acqua.

#### **In caso di contatto con gli occhi**

Come precauzione sciacquare gli occhi con acqua.

#### **Se ingerito**

Non somministrare alcunchè a persone svenute. Sciacquare la bocca con acqua.

### **5. MISURE ANTINCENDIO**

#### **Mezzi di estinzione idonei**

Utilizzare acqua nebulizzata, schiuma alcool resistente, prodotti chimici asciutti o anidride carbonica.

#### **Equipaggiamento speciale di protezione per gli addetti all'estinzione degli incendi**

Indossare in caso di incendio, se necessario, dispositivi di protezione delle vie respiratorie con apporto d'aria indipendente.

### **6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE**

#### **Precauzioni individuali**

Evitare la formazione di polvere. Evitare di respirare vapori/nebbia/gas.

#### **Precauzioni ambientali**

Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

#### **Procedure e materiali per il contenimento e la raccolta a scopo di pulizia**

Spazzare e spalare. Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

## **7. MANIPOLAZIONE E IMMAGAZZINAMENTO**

### **Precauzioni per una manipolazione sicura**

Adottare un'adeguata ventilazione nei luoghi dove si sviluppano le polveri. Normali misure di prevenzione antincendio.

### **Condizioni per lo stoccaggio in condizioni di sicurezza**

Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato.

Immagazzinare in luogo fresco. Sensibile all'umidità.

## **8. CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE/PROTEZIONE INDIVIDUALE**

Non contiene sostanze con valore limite di esposizione professionale.

### **Protezione respiratoria**

Non è richiesta la protezione delle vie respiratorie. Se se desidera la protezione dai livelli di polveri, utilizzare maschere antipolvere con filtri di tipo P1 (EN 143). Utilizzare respiratori e componenti testati e approvati dai competenti organismi di normazione, quali il NIOSH (USA) il CEN (UE).

### **Protezione delle mani**

Manipolare con guanti. I guanti devono essere controllati prima di essere usati. Usare una tecnica adeguata per la rimozione dei guanti (senza toccare la superficie esterna del guanto) per evitare il contatto della pelle con questo prodotto Smaltire i guanti contaminati dopo l'uso in accordo con la normativa vigente e le buone pratiche di laboratorio. Lavare e asciugare le mani. I guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano.

### **Protezione degli occhi**

Utilizzare dispositivi per la protezione oculare testati e approvati secondo i requisiti di adeguate norme tecniche come NIOSH (USA) o EN 166 (EU)

### **Protezione della pelle e del corpo**

Scegliere una protezione fisica secondo le sue caratteristiche, alla concentrazione, alla quantità di sostanze pericolose e al tipo di posto di lavoro., Il tipo di attrezzatura di protezione deve essere selezionato in funzione della concentrazione e la quantità di sostanza pericolosa al posto di lavoro.

### **Misure di igiene**

Prassi generale di igiene industriale.

## **9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE**

### **Aspetto**

Forma fisica solido

Colore bianco

### **Dati di sicurezza**

pH: nessun dato disponibile

Punto di fusione: 95 - 98 °C

Punto di ebollizione: nessun dato disponibile

Punto di infiammabilità: nessun dato disponibile

Temperatura di accensione: nessun dato disponibile

Limite di esplosività, inferiore: nessun dato disponibile

Limite di esplosività, superiore: nessun dato disponibile

Idrosolubilità: nessun dato disponibile

## **10. STABILITÀ E REATTIVITÀ**

### **Stabilità chimica**

Stabile nelle condizioni di stoccaggio raccomandate.

### **Condizioni da evitare**

Esposizione all'umidità.

### **Materiali da evitare**

Agenti ossidanti forti, Cloruri acidi, Anidridi di acido, Basi forti

### **Prodotti di decomposizione pericolosi**

Prodotti di decomposizione pericolosi in caso d'incendio. - Ossidi di carbonio, ossidi di azoto (NO<sub>x</sub>)

## **11. INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE**

### **Tossicità acuta**

Nessun dato disponibile

### **Corrosione/irritazione cutanea**

Nessun dato disponibile

### **Lesioni oculari gravi/irritazione oculare**

Nessun dato disponibile

### **Sensibilizzazione respiratoria o della pelle**

Nessun dato disponibile

### **Mutagenicità sulle cellule germinali**

Nessun dato disponibile

### **Cancerogenicità**

IARC: Nessun componente di questo prodotto presente a livelli maggiori o uguali allo 0.1% è identificato come cancerogeno conosciuto o previsto dallo IARC.

### **Tossicità per la riproduzione**

Nessun dato disponibile

### **Tossicità specifica per organi bersaglio -esposizione singola**

Nessun dato disponibile

### **Tossicità specifica per organi bersaglio -esposizione ripetuta**

Nessun dato disponibile

### **Pericolo in caso di aspirazione**

Nessun dato disponibile

### **Potenziati conseguenze sulla salute**

**Inalazione** Può essere nocivo se inalato. Può provocare irritazione delle vie respiratorie.

**Ingestione** Può essere pericoloso se ingerito.

**Pelle** Può essere dannoso se assorbito attraverso la pelle Può provocare irritazione della pelle.

**Occhi** Può provocare irritazione agli occhi.

### **Segni e sintomi di esposizione**

Al meglio della nostra conoscenza, le proprietà chimiche, fisiche e tossicologiche non sono state oggetto di studi approfonditi.

### **Ulteriori informazioni**

RTECS: nessun dato disponibile

## **12. INFORMAZIONI ECOLOGICHE**

### **Tossicità**

Nessun dato disponibile

### **Persistenza e degradabilità**

Nessun dato disponibile

### **Potenziale di bioaccumulo**

Nessun dato disponibile

### **Mobilità nel suolo**

Nessun dato disponibile

**Valutazione PBT e vPvB**

Nessun dato disponibile

**Altri effetti nocivi**

Nessun dato disponibile

**13. CONSIDERAZIONI SULLO SMALTIMENTO****Prodotto**

Conferire le soluzioni non riciclabili e le eccedenze ad una società di smaltimento rifiuti autorizzata.

**Contenitori contaminati**

Smaltire come prodotto inutilizzato.

**14. INFORMAZIONI SUL TRASPORTO****ADR/RID**

Merci non pericolose

**IMDG**

Not dangerous goods

**IATA**

Not dangerous goods

**15. INFORMAZIONI SULLA REGOLAMENTAZIONE**

Questa scheda di sicurezza rispetta le prescrizioni del Regolamento (CE) Num. 1907/2006

**16. ALTRE INFORMAZIONI****Ulteriori informazioni**

Diritti d'autore 2010 Sigma-Aldrich. Si autorizza la stampa di un numero illimitato di copie per esclusivo uso interno. Le informazioni di cui sopra sono ritenute corrette, tuttavia non possono essere esaurienti e dovranno pertanto essere considerate puramente indicative. La società Sigma-Aldrich, non potrà essere ritenuta responsabile per qualsiasi danno derivante dall'impiego o dal contatto con il prodotto di cui sopra. Per ulteriori termini e condizioni di vendita fare riferimento al retro della fattura o della bolla di accompagnamento.