

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari"

Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale
Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

***Sintesi e caratterizzazione di polimeri anfifilici per
il trasporto di materiale genetico***

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

Presentato da:
Gaia Tombari

Relatore:
Dott. Loris Giorgini

Co-relatore:
Dott. Massimo Benaglia

Prima Sessione

Anno Accademico 2012-2013

Abstract

In questo lavoro sono stati sintetizzati dei copolimeri anfifilici random per il trasporto di materiale genetico.

Si è partiti dalla sintesi di poli (glicidil metacrilato) mediante tecnica RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer), con il fine di ottenere un polimero con una distribuzione del peso molecolare ben definita.

Il trattamento del polimero con un opportuno nucleofilo fornisce un materiale con caratteristiche differenti da quelle di partenza, con l'ottenimento di un polimero solubile in acqua. Altri trattamenti di funzionalizzazione con gruppi lipofili hanno fornito un materiale (copolimero random) anfifilico in grado di autoassemblarsi in acqua con formazione di micelle. Si è dimostrato che le micelle hanno un'interazione con del materiale genetico.

I polimeri sono stati infine funzionalizzati con degli agenti fluorescenti.

Abstract

In the present work random amphiphilic copolymers were synthesized for gene delivery. Starting from the synthesis of poly(glycidyl methacrylate) by means of RAFT technique (Reversible Addition Fragmentation chain Transfer), the aim was to obtain a polymer characterized by a specific molecular weight distribution.

The treatment of polymer with appropriate nucleophilic agents yielded a material with different properties with respect to the starting ones and led to the achievement of a water-soluble polymer. Others functionalizing treatments with lipophilic groups supplied an amphiphilic material (random copolymer) able to auto assemble in water building micelles. These micelles have been shown to interact with genetic material.

The polymers was functionalized with fluorescent agents.

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	0
1.1 POLIMERIZZAZIONE RADICALICA CONTROLLATA	3
1.2 LA POLIMERIZZAZIONE RAFT	7
1.3 CARATTERISTICHE DI UN BUON AGENTE RAFT (CTA)	10
1.4 POLIMERIZZAZIONE RAFT DI MONOMERI “PIÙ-ATTIVATI” E “MENO ATTIVATI”	12
1.5 PROCESSI DI POST POLIMERIZZAZIONE	15
1.6 GENE DELIVERY SYSTEM E APPLICAZIONI DELLA TECNICA RAFT	17
2. SCOPO	21
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	25
3.1 SINTESI DELL’AGENTE RAFT	25
3.2 SINTESI DEI POLIMERI	26
3.2.1 Poli (glicidil metacrilato) (PGMA).....	26
3.3 TRATTAMENTI DI POST POLIMERIZZAZIONE	28
3.3.1 Trattamento di PGMA con morfolina	29
3.3.2 Inserimento unità idrofobiche.....	32
3.3.2.1 Trattamento con isocianati.....	32
3.3.2.2 Trattamento con colesteril cloroformiato	34
3.3.3 Inserimento di marcatori fluorescente	36
3.3.3.1 Trattamento con 2,5-diossipirrolidin-1-il-2,2’-ditiofene-5-carbossilato (T2).....	37
3.3.3.2 Trattamento con 5’’-(metiltio)-2,2’:5’,2’’tertiofene-2,5-diossipirrolidin-1-il-2,2’-ditiofene-5-carbossilato (T3).....	38
3.4 FORMAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI MICELLE.....	41
3.5 ASSOCIAZIONE POLIMERO DNA	42
4. CONCLUSIONI	45
5. PARTE SPERIMENTALE	47
5.1 SOLVENTI E REAGENTI	47
5.2 CARATTERIZZAZIONE DEI PRODOTTI SINTETIZZATI	47
5.3 SINTESI AGENTE RAFT: 2-CIANO-4-METILPENTAN-2-IL-4-ISOCIANODITIOBENZOATO (PM=288 G/MOL).....	48
5.4 SINTESI DI POLI (GLICIDIL METACRILATO) (P1)	50
5.5 REAZIONI DI POST POLIMERIZZAZIONE.....	51
5.5.1 Reazione di apertura dell’anello epossidico da parte della morfolina (PHMPMA)	51
5.5.2 Trattamento con isocianati.....	53
5.5.3 Trattamento con colesteril cloroformiato	55
5.5.4 Trattamento con fluorofori	57
6. BIBLIOGRAFIA.....	61

1. Introduzione

1.1 Polimerizzazione radicalica controllata

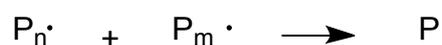
La polimerizzazione radicalica è una polimerizzazione a catena e rappresenta una delle tecniche di polimerizzazione più utilizzate per la produzione industriale di polimeri ad elevato peso molecolare. Le caratteristiche principali per cui la polimerizzazione radicalica ha acquisito l'importanza odierna sono le seguenti¹:

- La possibilità di utilizzare come monomeri un'ampia gamma di molecole, ad esempio: metacrilati, metacrilammidi, acrilonitrile, stirene, etc.;
- La tolleranza nei confronti di gruppi funzionali non protetti in monomeri e solventi quali gruppi acidi, liberi o salificati, gruppi idrossilici o gruppi amminici terziari;
- La compatibilità con la maggior parte delle condizioni di reazione (bulk, emulsione, soluzione e sospensione), solventi protici o acquosi;
- La semplicità e basso costo di realizzazione.

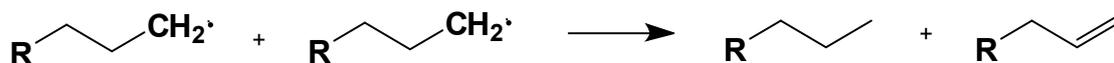
Nonostante questi vantaggi, la polimerizzazione radicalica convenzionale mostra dei limiti consistenti per quanto riguarda la possibilità di ottenere un peso molecolare prescelto, un valore contenuto di polidispersità ed il controllo della composizione dei copolimeri (generalmente avviene la formazione di catene molto ramificate).

Come in tutte le polimerizzazioni a catena ci sono tre meccanismi che governano il processo di polimerizzazione: inizio, propagazione e terminazione di catena.

Nello stadio iniziale è necessaria la presenza di un iniziatore che, degradandosi, formi un radicale in grado di addizionarsi alla specie monomerica presente nell'ambiente di reazione; segue poi la propagazione, stadio in cui la catena appena formatasi si lega con il monomero propagandosi. L'ultima fase, quella della terminazione, è il momento in cui avvengono le reazioni che portano all'interruzione della propagazione di catena, quindi il polimero in accrescimento perde la capacità di aggiungere ulteriori unità monomeriche. Le reazioni di terminazione possono essere di accoppiamento o disproporzionamento. L'accoppiamento si ha quando si incontrano i radicali di due catene in accrescimento:



Il disproporzionamento si ha quando la terminazione avviene con la formazione di una catena con un'estremità insatura ed un'altra con estremità satura:



Sono inoltre da considerare i trasferimenti di catena ovvero le reazioni che arrestano la crescita della catena, ma non sopprimono l'attività radicalica. Questi ultimi possono avvenire sia con meccanismo intermolecolare che intramolecolare.

Nella polimerizzazione radicalica la distribuzione dei pesi molecolari e, di conseguenza, gli indici di polidispersità sono determinati da fattori statistici. In particolare il valore di M_w/M_n (polidispersità) è generalmente superiore a 2 nel caso in cui la terminazione avvenga prevalentemente per disproporzionamento mentre, se la terminazione per accoppiamento è la favorita, è superiore a 1,5.

Nel tempo, la polimerizzazione radicalica convenzionale è stata affiancata da nuove tecniche in grado di supplire agli svantaggi della tecnica tradizionale. Infatti, i nuovi procedimenti garantiscono alla polimerizzazione un carattere "vivente" che minimizza la terminazione della catena in modo incontrollato; consente inoltre la sintesi di polimeri a struttura controllata.

Nella polimerizzazione radicalica convenzionale, la propensione del radicale in accrescimento ad andare incontro a reazioni di auto-terminazione, non permette che le catene siano tutte simultaneamente attive. L'attributo "vivente" si manifesta soltanto grazie alla presenza di un reagente capace di disattivare reversibilmente il radicale in accrescimento ($P_n\cdot$), facendo in modo che la maggior parte delle catene macromolecolari del prodotto finale corrispondano ad un macro-radiale nello stato dormiente legato al gruppo funzionale dalla specie in grado di reagire reversibilmente con il radicale in crescita (P_n-X) (Figura1).

La polimerizzazione prosegue se modulando correttamente le condizioni di reazione, si riesce a raggiungere un equilibrio fra catene attive e dormienti.

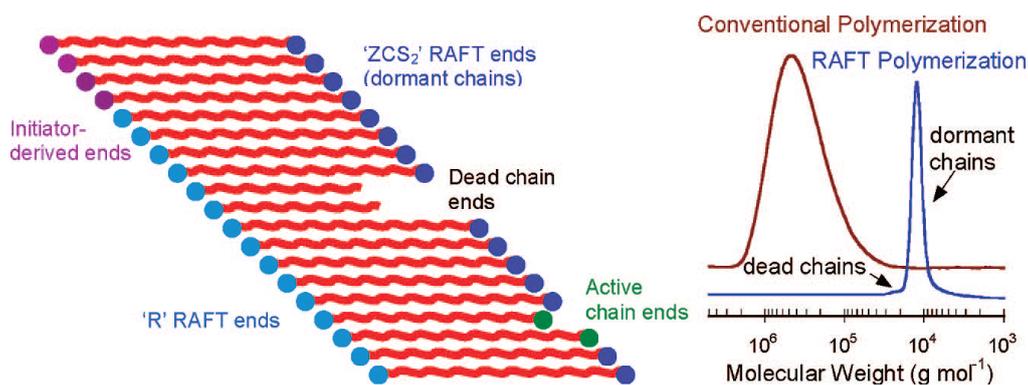


Figura 1: Composizione delle catene macromolecolari, distribuzione dei pesi molecolari in una polimerizzazione RAFT convenzionale

La velocità di terminazione diminuisce con il quadrato della concentrazione del radicale macromolecolare totale $[Pn\bullet]^2$, mentre la velocità di propagazione è direttamente proporzionale a $[Pn\bullet]$. Una strategia, per limitare al minimo le terminazioni, consiste nell'abbassare la concentrazione del radicale in accrescimento ottenendo, come effetto collaterale, l'abbassamento della velocità di polimerizzazione. È possibile ottenere un'alta percentuale di catene "viventi" e nello stesso tempo mantenere una concentrazione media di specie radicaliche in accrescimento simile o a volte superiore rispetto a quella ottenibile con la polimerizzazione radicalica classica. Questo fa sì che il numero totale delle catene viventi ($=Pn\bullet + Pn-X$) sia notevolmente maggiore rispetto a quello ottenibile in polimerizzazione convenzionale con la medesima velocità d'iniziazione e corrisponde ad un peso molecolare inferiore.

Un'altra possibilità per ottenere un'elevata velocità di polimerizzazione e un alto grado di "vita" delle catene in accrescimento, consiste nel fare uso di un processo di polimerizzazione eterogeneo in modo da isolare efficacemente singoli radicali in accrescimento.

Qualunque sia la strategia impiegata, è essenziale raggiungere rapidamente un equilibrio fra forme dormienti e forme attive propaganti in modo da assicurarsi che tutte le catene abbiano la stessa possibilità di crescere, benché in modo intermittente. Sotto queste condizioni, il peso molecolare aumenta linearmente con la conversione, si ottiene una distribuzione stretta ed il prodotto di polimerizzazione è per la maggior parte costituito da catene "dormienti" in grado di estendere la propria lunghezza in qualsiasi momento se poste in un adeguato ambiente di reazione in presenza di ulteriore monomero².

Le principali tecniche in grado di fornire carattere vivente alla polimerizzazione radicalica e quindi un conseguente controllo del peso molecolare sono: l’NMP, ATRP, DT e RAFT, le quali agiscono tramite un processo di disattivazione reversibile^{3,4}.

NMP (**N**itroxide-**M**ediated **P**olymerization) è stata per la prima volta applicata presso il CSIRO (Australian Commonwealth Scientific and Research Organization) di Melbourne agli inizi degli anni 80 ed è stata abbondantemente sfruttata per la sintesi di polimeri acrilici e stirenici^{5,6,7}, in cui la specie radicalica “dormiente” è costituita da un’alossi ammina che nelle condizioni di polimerizzazione è in equilibrio con il nitrossido radicale e la catena polimerica radicalica in accrescimento.

ATRP (**A**tomic **T**ransfer **R**adical **P**olymerization) è sicuramente più versatile e ad oggi rappresenta il metodo più utilizzato per il controllo di polimerizzazioni radicaliche^{8,9}. Il meccanismo di attivazione/disattivazione di catena è pressochè analogo a quello impiegato in NMP, ma richiede uno step intermedio di attivazione bimolecolare. In ATRP tutte le catene in accrescimento si trovano, per la stragrande maggioranza, in forma “cappata” non attiva (P_n-X , X: Br o Cl); il radicale ($P_n\cdot$), ovvero la forma attiva, è generata attraverso un processo redox reversibile dal metallo di transizione, generalmente rame complessato da un legante azotato, che si ossida, e contemporaneamente estrae con una rottura omolitica l’alogeno dalla catena polimerica. Il radicale così generato è in grado di aggiungere monomeri. Lo svantaggio di questa tecnica è rappresentato dalla presenza del metallo e di leganti complessi nel sistema di reazione.

DT (**D**egenerative **T**ransfer) prevede il trasferimento diretto del gruppo terminale dalla catena attiva a quella dormiente. Per il controllo della polimerizzazione occorre che la concentrazione dell’iniziatore sia minore rispetto a quella del trasferitore. Come trasferitori di catena si utilizzano gli alchil ioduri.

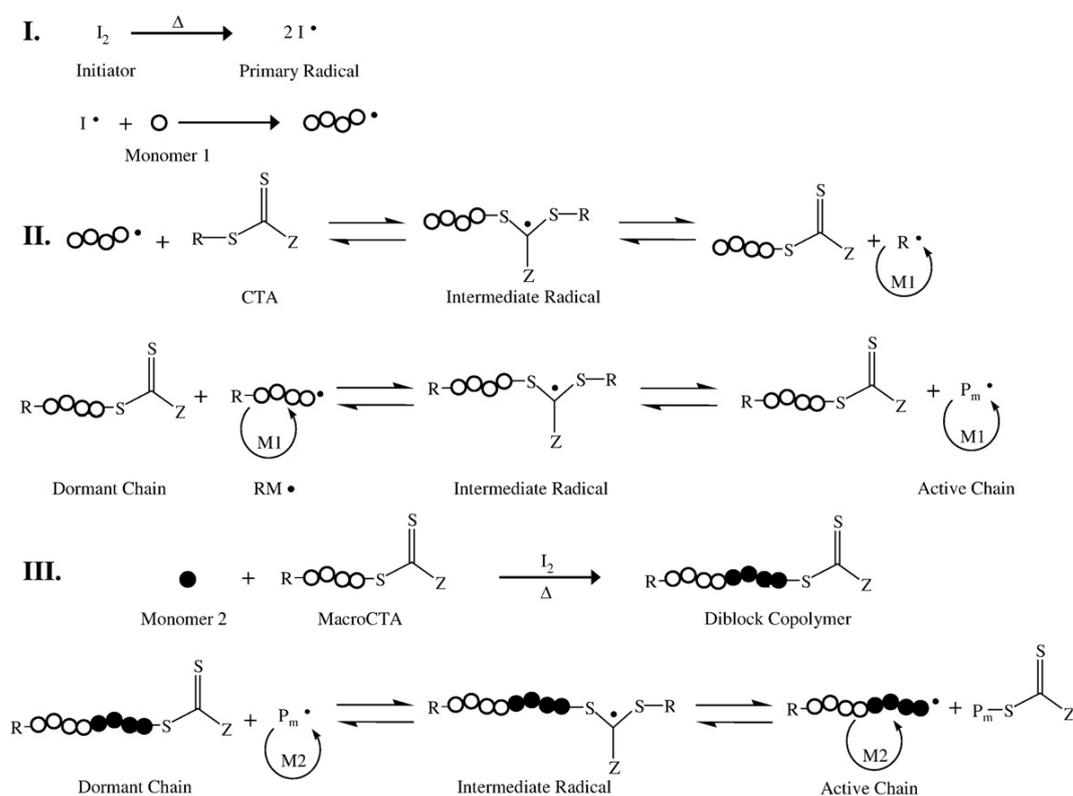
RAFT^{10,11} (**R**eversible **A**ddiction **F**ragmentation chain **T**ransfer) è probabilmente la polimerizzazione più conveniente e versatile fra le tecniche sopra indicate, poiché permette di avvicinarsi il più possibile alle condizioni di reazione utilizzate nella polimerizzazione radicalica convenzionale^{12,13,14}.

1.2 La polimerizzazione RAFT

Le prime pubblicazioni concernenti il processo RAFT risalgono al 1998 quando, presso il gruppo di ricerca guidato dal Dott. Ezio Rizzardo del CSIRO di Melbourne in Australia, fu scoperta questa nuova tecnica di polimerizzazione radicalica “vivente”^{11,12,13}.

Il processo RAFT, oltre ad essere un metodo di polimerizzazione molto robusto, è un processo che non comporta l'utilizzo di metalli pesanti, quindi permette di ottenere materiali utilizzabili anche per applicazioni biomedicali.¹⁵

Il meccanismo della polimerizzazione RAFT, com'è stato proposto originariamente è rappresentato nello Schema 1.



Schema 1: Meccanismo polimerizzazione RAFT

Il processo RAFT prevede la presenza di una specie molecolare che funziona da agente di trasferimento di catena (Chain Transfer Agent: CTA). Un agente RAFT è caratterizzato dalla presenza di una funzionalità ditiocarbonilica che presenta un'elevata reattività nei confronti delle specie radicaliche. L'attacco al carbonio tiocarbonilico comporta la formazione di un radicale intermedio abbastanza stabile che è in grado di

scindersi per dare luogo ad un ditio derivato polimerico e liberando una specie radicalica $R\bullet$ capace di iniziare la propagazione di una nuova catena $RM\bullet$ (Schema 1, step II)^{11,12}. Il gruppo R dell'agente RAFT, deve riuscire a frammentarsi in modo efficace (buon gruppo uscente) dall'addotto radicalico intermedio, riuscendo così a riiniziare la polimerizzazione; questo meccanismo consente alla maggior parte delle catene di essere iniziate da $R\bullet$ e, solo una minima parte, dall'iniziatore. Una volta che tutti i gruppi $R\bullet$ hanno generato una catena polimerica, viene raggiunto un equilibrio fra le specie radicaliche polimeriche in accrescimento e le specie "dormienti" (macroRAFT). Il radicale intermedio potrà a questo punto scindersi in entrambe le direzioni fornendo a tutte le catene polimeriche, la medesima possibilità di crescere; si ottiene così una distribuzione uniforme dei pesi molecolari e di conseguenza gli indici di polidispersità saranno prossimi a uno. Se la polimerizzazione viene fermata a bassi valori di conversione, la possibilità che avvengano reazioni di terminazione irreversibili diminuisce, conservando così le catene macromolecolari RAFT-terminate. La preservazione delle catene viventi, alla quali ci si riferisce con il termine macroRAFT, permette di isolare il polimero e in seguito estenderlo attraverso l'aggiunta di un secondo monomero (Schema 1, step III)^{11,12,16}. La natura "vivente" del processo RAFT permette la polimerizzare di innumerevoli monomeri vinilici, ed un'ampia libreria di copolimeri a blocchi funzionalizzati senza la necessità di aggiungere stadi di protezione, deprotezione o della messa a punto di specifiche condizioni di reazione.

Essendo una polimerizzazione radicalica, l'avvio del processo richiede l'intervento di una specie iniziatrice (Schema 1, step I); nella polimerizzazione RAFT, il rapporto fra $[CTA]/[I]$ (RAFT/iniziatore) è usualmente maggiore di uno, in modo da assicurarsi che in soluzione il numero di molecole dell'agente RAFT sia maggiore rispetto ai radicali liberi. La concentrazione dei radicali liberi presenti nel sistema è stabilita dalla velocità di decomposizione dell'iniziatore, mentre il numero di catene è determinato dalla quantità di agente di trasferimento. Nel processo si instaura così un equilibrio reversibile, che consente ad un elevato numero di agenti RAFT di essere attivati da pochi frammenti dell'iniziatore poiché al processo di trasferimento derivante dall'interazione di ogni specie radicalica con l'agente RAFT corrisponde una nuova specie iniziatrice ($R\bullet$). A un aumento della concentrazione di agente RAFT corrisponde la formazione di polimeri a peso molecolare minore ma caratterizzati da una polidispersità ancor più bassa, inoltre la velocità di conversione diminuisce poiché diminuisce la concentrazione istantanea di radicali in crescita; al contrario, l'aumento di

concentrazione dell'iniziatore, cioè il diminuire del rapporto $[CTA]/[I]$, porta ad una velocità di conversione maggiore ma ad un peggiore controllo sul peso molecolare. La velocità di conversione cresce a causa dell'aumento della concentrazione istantanea di radicali in crescita, così come aumenta la possibilità che avvengano reazioni di terminazione irreversibili prima che i radicali partecipino allo step di addizione-frammentazione. Questa perdita di controllo è dovuta ad una presenza significativa di reazioni di terminazione: infatti una più alta concentrazione di iniziatore dà luogo ad una maggiore concentrazione di catene radicaliche in crescita e quindi ad una maggiore probabilità di reazioni di terminazione.

Nella tecnica RAFT la concentrazione dell'agente di trasferimento deve quindi essere molto maggiore di quella dell'iniziatore per assicurare un buon controllo sul peso molecolare; in questo modo la concentrazione dell'iniziatore ha effetto soprattutto sulla cinetica della polimerizzazione e solo secondariamente sul peso molecolare del prodotto ottenuto.

Nel processo RAFT il fattore determinante il peso molecolare è il rapporto tra la concentrazione di monomero e quella dell'agente RAFT ($[M]/[CTA]$). Quindi si può calcolare il peso molecolare del polimero finale tramite la seguente equazione:

$$M_{n,teorico} = \frac{[M]_0 \cdot PM_{monomero} \cdot conv}{[CTA]_0} + PM_{CTA}$$

Dove $[M]_0$ rappresenta la concentrazione iniziale di monomero, $PM_{monomero}$ è il peso molecolare del monomero, $conv$ la conversione, $[CTA]_0$ la concentrazione iniziale di agente RAFT e PM_{CTA} il peso molecolare dell'agente RAFT^{12,16}.

Questa equazione rende evidente la relazione lineare che esiste fra la conversione e il peso molecolare; quindi è possibile ottenere un prescelto peso molecolare arrestando la polimerizzazione a definiti tempi di reazione. Questo controllo consente la sintesi di omopolimeri o copolimeri a blocchi aventi dimensioni predeterminate. Inoltre la polimerizzazione RAFT può essere utilizzata per la sintesi di copolimeri multi-block, a stella, graft, statistici, alternati e a gradiente (Figura 2)^{12,16,17,18}.

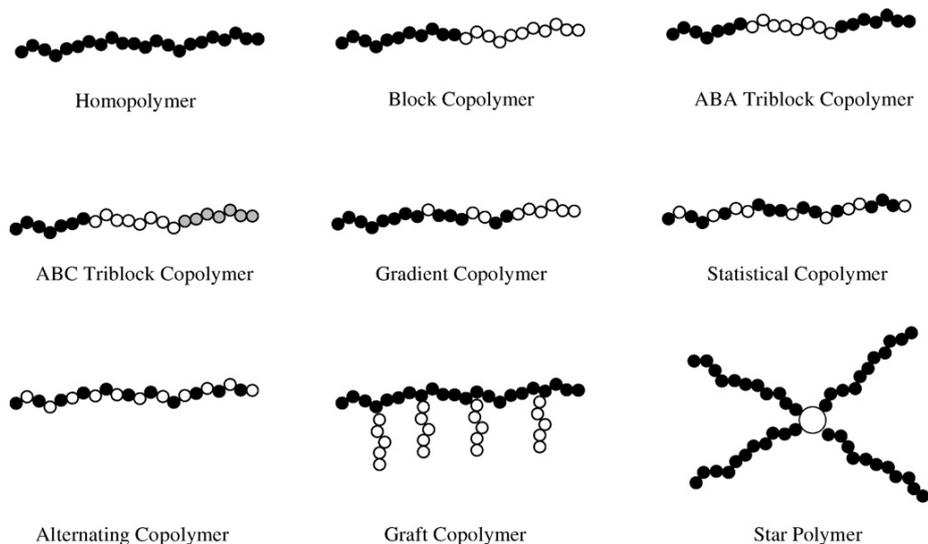
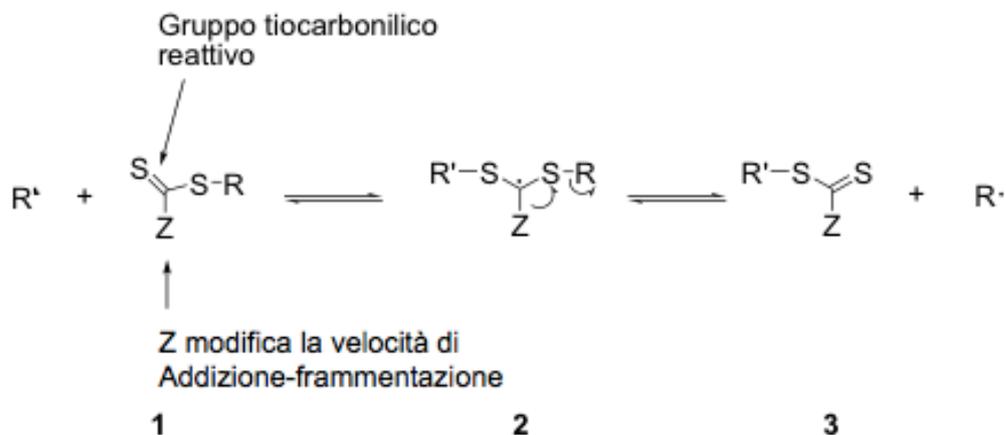


Figura 2: Copolimeri ottenibili con la tecnica RAFT

1.3 Caratteristiche di un buon Agente RAFT (CTA)



Schema 2: Meccanismo addizione-frammentazione

Un buon agente RAFT di struttura generale **1**, è caratterizzato da:

- Un legame doppio C=S reattivo nei confronti di un'addizione radicalica;
- Un sostituito *Z* capace di attivare (o disattivare) l'addizione radicalica al doppio legame C=S, e procurare adeguata stabilità al radicale intermedio **2**;

- Dalla buona efficienza di R come gruppo uscente capace di allontanarsi per scissione omolitica del legame S-R, dando il radicale R• capace di riiniziare efficacemente la polimerizzazione.

È quindi richiesta al radicale R• una buona stabilità generata da fattori sterici, termodinamici e polari, ed allo stesso tempo una buona reattività nei confronti del monomero. Nel caso in cui lo stadio determinante la velocità, cioè la scissione del radicale intermedio **2** o la re-iniziazione della polimerizzazione da parte di R• sono lente rispetto alla propagazione, la polimerizzazione stessa risulterà più lenta rispetto alla polimerizzazione convenzionale.

In base al gruppo Z prescelto, la reattività dell'agente RAFT e dell'addotto radicalico da cui deriva si registrano notevoli variazioni. Se si sceglie un agente RAFT con un sostituente Z alifatico o tioalchilico non si notano effetti rilevanti sull'efficienza dell'agente RAFT stesso, mentre, con sostituenti che hanno la capacità di coniugare con il doppio legame C=S, il cambiamento della reattività del gruppo tiocarbonilico è considerevole. Il fenile ad esempio, stabilizza considerevolmente il radicale intermedio poiché è in grado di delocalizzare la carica sull'anello aromatico. Se invece il gruppo Z è un atomo con un doppietto elettronico (O o N) facilmente delocalizzabile verso il gruppo tiocarbonilico, l'attività di quest'ultimo nei confronti dell'attacco radicalico diminuisce seriamente e viene destabilizzato il radicale intermedio, infatti si ha uno scarso coefficiente di trasferimento con xantati e ditiocarbammati.

Al fine della scelta di un agente RAFT efficiente in specifiche condizioni di reazione, e per il controllo delle polimerizzazioni di determinati monomeri è necessario fare un'accurata scelta dei sostituenti R e Z. S Una guida grafica alla scelta dell'agente RAFT più idoneo è rappresentata in Figura 3^{12,14}.

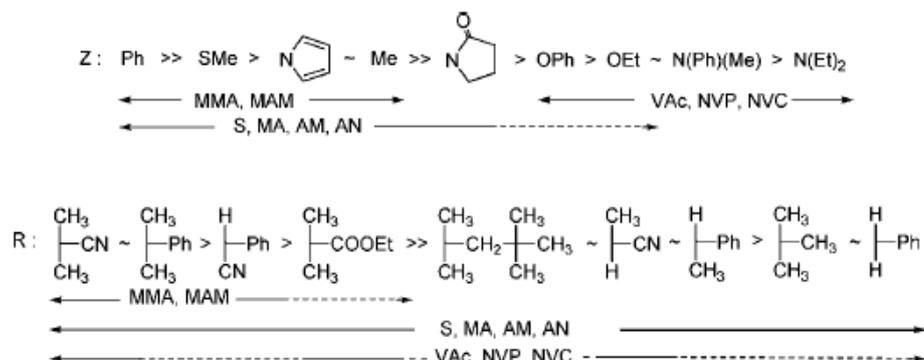


Figura 3: Guida alla scelta dell'agente RAFT per la polimerizzazione di diversi monomeri: Influenza dei gruppi R e Z

I monomeri adatti al processo RAFT vengono generalmente suddivisi in due categorie:

- a) **Monomeri “più-attivati” (“more-activated”)**: includono monomeri vinilici aromatici (stirene e vinilpiridina), metacrilici (MMA, metacrilammide, etc), e acrilici (MA, acido acrilico, acrilamide, acrilonitrile etc.);
- b) **Monomeri “meno attivati” (less-activated)**: vinil esteri (vinil acetato) e vinil ammidi (N-vinilpirrolidone, N-vinilcarbazolo)

1.4 Polimerizzazione RAFT di monomeri “più-attivati” e “meno attivati”

La classe dei “più attivati” si suddivide in due sottocategorie: monomeri che generano radicali terziari (olefine 1,1-disostituite) e monomeri che generano radicali secondari (olefine monosostituite). Per comprendere al meglio fenomeni come ritardo o inibizione di polimerizzazione riscontrabili nel processo RAFT sarebbe bene considerare distintamente monomeri con elevata velocità di propagazione (acrilati e acrilammidi), da monomeri aventi bassa velocità di accrescimento (vinilici aromatici e metacrilici).

Gli agenti RAFT più utilizzati per la polimerizzazione dei monomeri “più-attivati” sono i ditiobenzoiati e altri ditiioesteri aromatici (Z =arile, **16** e **17**, Figura 4)^{12,13}; anche i tritio carbonati (Z =S-alchile), ditiocarbammati aromatici (Z =pirrolo) e ditiioesteri (Z =alchile o alchilarile: meno sensibili all'idrolisi e decomposizione indotta da acidi di Lewis^{19,20}) assicurano un buon controllo del processo.

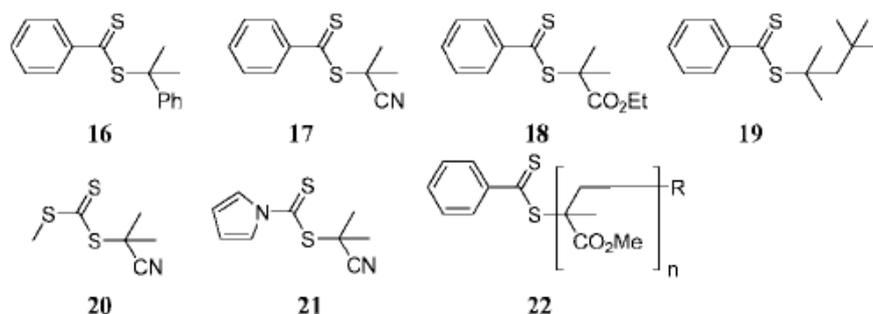


Figura 4: Alcuni ditiioesteri utilizzati come agenti RAFT

La scelta del gruppo R dell'agente RAFT adatto ai metacrilati è di fondamentale importanza²¹.

In agenti RAFT efficaci, R è rappresentato da un ciano alchile terziario (**17**, Figura 4) o da un cumile (**16**, Figura 4); mentre, composti aventi R=alchile terziario (**19**, Figura 4) non offrono nessun controllo. In entrambi i casi, durante la polimerizzazione si osserva un periodo di inibizione attribuibile alla lenta reiniziazione da parte del radicale R•.

La presenza di gruppi elettron-attrattori migliora l'efficienza dei ditio benzoati come agenti RAFT nella polimerizzazione del MMA, in quanto rendono il gruppo tiocarbonilico maggiormente elettrofilo e quindi aumenta la velocità di addizione al doppio legame C=S. In queste condizioni fin dai primi stadi di polimerizzazione è possibile ottenere prodotti con indici di polidispersità bassi^{12,22}. I ditiobenzoiati, in particolare il cumil ditiobenzoiato^{23,24}, possono ritardare severamente la polimerizzazione in special modo se vengono impiegati ad alte concentrazioni per l'ottenimento di polimeri a basso peso molecolare. Il fenomeno è particolarmente evidente nel caso dei monomeri acrilati e acrilammidi quindi per la loro polimerizzazione è consigliato usare agenti RAFT come ditioesteri alifatici o tritiocarbonati che limitano al minimo il ritardo^{2,21,24-27}.

In Figura 5 è possibile osservare come la velocità di polimerizzazione non sia dipendente da R e come sia fortemente ritardata in presenza di ditiobenzoiati rispetto alla totale assenza dell'agente RAFT.

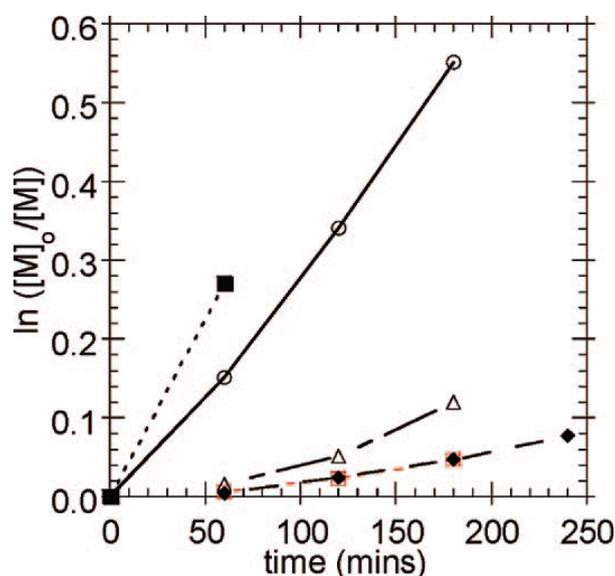


Figura 5: Velocità di polimerizzazione del pseudo primo ordine per il metil acrilato (4.45 M in benzene) a 60°C con c.a. 3.3×10^{-4} M di azobisisobutirronitrile in assenza (■, - - -) e presenza di 0.00306 M MeC(=S)SCH₂Ph (O, ---), di 0.0306 M MeC(=S)SCH₂Ph (Δ, - - -), 0.00366 M PhC(=S)SCH₂Ph (cerchio rosso, - - -), o 0.00366 M PhC(=S)SC(Me)₂CN (rombo, ---) (i punti corrispondenti ai dati di questi ultimi due agenti RAFT sono praticamente sovrapposti).

La polimerizzazione radicalica controllata dei monomeri “meno-attivati” è spesso problematica e complessa (vinil acetato, N-vinilpirrolidone, N-vinilcarbazolo etc.); l’ATRP e NPM sono inutilizzabili per questi monomeri.

Anche gli agenti RAFT più attivi come ditioesteri e tritio carbonati inibiscono fortemente la polimerizzazione, infatti anche impiegando lunghi tempi di reazione si ottengono scarse quantità di prodotto di polimerizzazione. Utilizzando degli agenti RAFT meno efficienti (xantati e ditiocarbammati) è possibile ottenere un buon controllo del peso molecolare e polidispersità su Vinil acetati, N-vinilpirrolidone (NVP) e N-vinilcarbazolo (NVC)²⁸ poiché la delocalizzazione del doppietto elettronico dell’ossigeno o dell’azoto verso il gruppo tiocarbonilico destabilizza il radicale intermedio facilitando l’equilibrio con le specie radicaliche.

1.5 Processi di post polimerizzazione

L'uso di monomeri che contengono dei gruppi funzionali aggiuntivi, che rimangono inerti nel processo di polimerizzazione, è un'ottima strategia che consente di ottenere innumerevoli prodotti finali a partire da un unico monomero. I gruppi reattivi secondari permettono trasformazioni posteriori al processo di polimerizzazione. Questo consente, in linea di principio, di utilizzare un unico polimero reattivo per ottenere una grande varietà di materiali differenti con le proprietà chimiche acquisite nelle trasformazioni post polimerizzazione¹⁵.

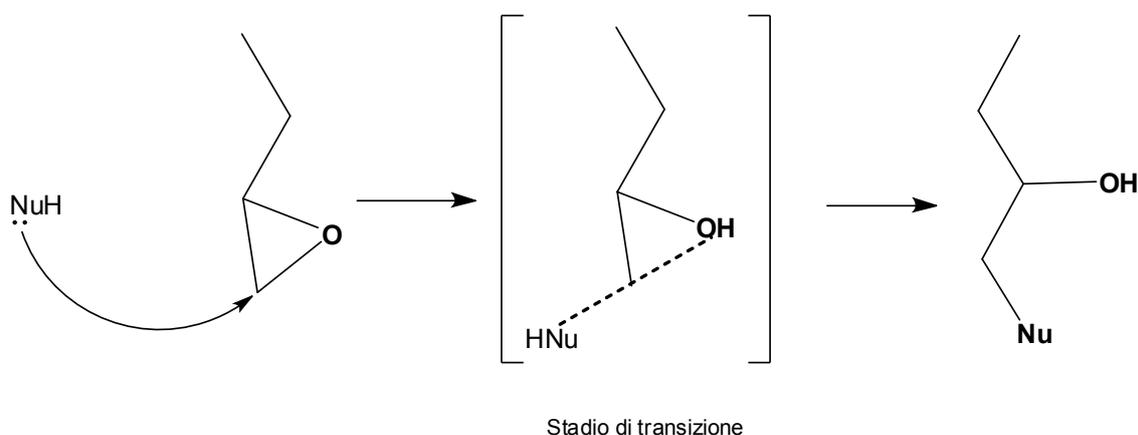
Uno dei monomeri più importanti per un processo sintetico di questo genere è il glicidil metacrilato.

Al fine di ottenere copolimeri anfifilici, dotati quindi sia di una parte idrofila che di una idrofoba, a partire dal poli (glicidil metacrilato) sono state valutate possibili reazioni di post polimerizzazione necessarie alla formazione di entrambi i blocchi.

Sono noti processi di post polimerizzazione per formare copolimeri anfifilici a base di glicidil metacrilato e un altro monomero, trattati in ambiente acido, in modo da promuovere l'apertura dell'anello epossidico del glicidile e portare alla formazione di due gruppi ossidrilici²⁹.

I legami a idrogeno che i gruppi ossidrilici e i gruppi nucleofili introdotti sono in grado di dare in ambiente acquoso forniscono al blocco derivante dal glicidil metacrilico le caratteristiche di idrofilicità volute.

L'attacco nucleofilo avviene sul carbonio meno sostituito (primario) dell'anello epossidico con formazione di un gruppo ossidrilico (schema 3).



Schema 3: Meccanismo generale di attacco nucleofilo sul carbonio primario dell'anello epossidico.

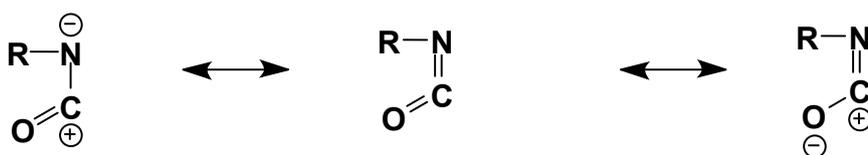
Questo processo ha un meccanismo di reazione di tipo SN_2 in cui la formazione del legame nucleofilo/carbonio avviene contemporaneamente all'apertura dell'anello. Si forma infatti, uno stadio di transizione in cui questa porzione di molecola diventa planare, il nucleofilo attacca dalla parte opposta rispetto all'ossigeno epossidico che agisce come gruppo uscente andando poi a formare un gruppo ossidrilico OH sul carbonio vicinale (secondario).

Sebbene un ossigeno etero sia un cattivo gruppo uscente, in una reazione di tipo SN_2 , la tensione dell'anello a tre termini fa sì che gli epossidi siano dotati di una buona reattività.

Questi vengono infatti scissi sia in ambiente acido (sono sufficienti soluzioni diluite acide a temperatura ambiente) sia in ambiente basico a temperature elevate.

Nel caso di attacco nucleofilo, la debole elettrofilicità del carbonio primario, conferitagli dalla maggiore elettronegatività dell'ossigeno a cui è legato, rende necessario l'utilizzo di nucleofili abbastanza forti.

La presenza di un gruppo ossidrilico nell'unità ripetente conferisce al polimero le potenzialità reattive degli alcoli. Le macromolecole possono poi essere rese idrofobe mediante, per esempio, addizione al gruppo idrossilico di isocianati a catena alifatica. Il carbonio delisocianato possiede infatti una parziale carica positiva, che lo rende suscettibile di attacco nucleofilo (schema 4).



Schema 4: Polarizzazione isocianati

L'ossidrilico attacca quindi il carbonio dell'isocianato generando un legame uretanico caratterizzato dal nuovo gruppo carbammato; la velocità di reazione sarà maggiore se si utilizza un isocianato aromatico piuttosto che uno alifatico in quanto quest'ultimi sono meno reattivi.

Gli isocianati sono utilizzati industrialmente per la produzione di poliuretani.

1.6 Gene Delivery System e applicazioni della tecnica RAFT

L'obiettivo della terapia genica è quello di introdurre materiale genetico all'interno di una cellula specifica (trasfezione) al fine di replicare geni mancanti che sono causa di malattie. Offre quindi nuove possibilità di trattamento per numerose patologie, sia ereditarie, che acquisite, che le procedure convenzionali non sono in grado di curare efficacemente. È ritenuta perciò la terapia del futuro e negli ultimi anni è oggetto d'intenso studio e sviluppo per un suo possibile impiego su larga scala in ambito clinico. La trasfezione di geni può essere utilizzata inoltre per l'espressione di proteine biologicamente attive. Non di secondaria importanza risulta, oltre il campo terapeutico, quello delle vaccinazioni.

I Gene Delivery Systems sono i vettori che trasportano e rilasciano materiale genetico all'interno delle cellule bersaglio, proteggendolo dalla degradazione ed assicurandone la trascrizione.

Tra i potenziali carrier per il gene delivery sono stati considerati i liposomi e i polielettroliti cationici come alternative interessanti ai vettori virali disattivati che si preferirebbe abbandonare per ragioni di sicurezza biologica, nonostante i loro recenti miglioramenti. Un polimero cationico come il PEI presenta la capacità di complessare DNA o RNA (portatori di cariche negative), con la formazione di aggregati interpolielettrolitici. Questa complessazione dei geni di tipo elettrostatico fornisce la protezione necessaria contro la degradazione enzimatica ed assicura la compattezza adeguata per l'ingresso all'interno della cellula bersaglio.

Il processo RAFT apre nuove strade grazie alla possibilità di realizzare un vettore disegnato appositamente e polimerizzato a partire da cationi polari o monomeri cationizzabili. Sono un esempio, gli omopolimeri di poli(dimetilamminoetil metacrilato), PDMAEMA, che hanno fornito ottimi risultati nel trasporto di materiale genetico, pur presentando un'altissima citotossicità³⁰.

Altri polimeri sono stati modificati con derivati amminici per formare blocchi cationici. È possibile rendere positivi, in un ampio range di pH, polimeri che contengono ammine primarie, secondarie o terziarie. Gli studi effettuati su polimeri cationici hanno mostrato un'efficace complessazione del plasmide DNA e una buona protezione nei riguardi delle DNAasi. Prove in vitro hanno però evidenziato un grado di complessazione troppo forte che impedisce al DNA di essere liberato una volta dentro la cellula.

Copolimeri a blocchi, composti da un gruppo neutro ed uno cationico, possiedono la

capacità di assemblarsi in nano particelle di varia forma in accordo con la natura chimica del copolimero e il mezzo disperdente in cui è posto. Le nano strutture di questo genere più comuni sono le micelle (Figura 6)³¹.

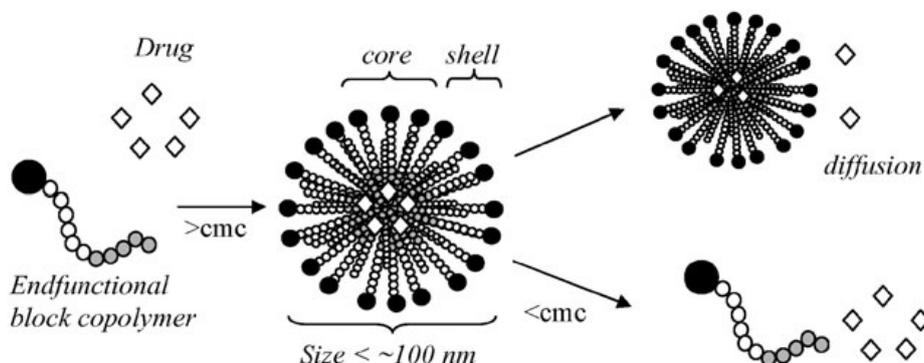


Figura 6: Auto aggregazione in micelle di copolimeri a blocchi funzionalizzati

Il nucleo interno delle micelle è costituito dal blocco idrofobico, mentre il guscio da quello idrofilo che, oltre a favorire una buona solubilità del carriers in ambiente fisiologico, ne ritarda la velocità di riconoscimento da parte del sistema reticoloendoteliale (RES). La scelta di impiegare micelle come carriers deriva anche da altri due fattori: le loro dimensioni ridotte per l'ingresso per endocitosi nella cellula e la possibilità di avere gusci altamente funzionalizzati grazie ai gruppi terminali delle macromolecole che ne costituiscono gli unimeri.

La possibilità di usufruire delle estremità della catena per creare un sistema di localizzazione, ad esempio facendole reagire con agenti fluorescenti di notevole utilità ai fini della comprensione dei meccanismi che si instaurano fra la parte polimerica e l'ambiente biologico.

Le micelle si formano quando il polimero di partenza viene disperso in opportuni solventi, a quel punto gli unimeri sono in grado di auto organizzarsi con un procedimento simile a quello dei tensioattivi a basso peso molecolare.

Al contrario delle molecole anfifiliche a basso peso molecolare la sintesi di micelle polimeriche non è così semplice e la struttura risultante dalla loro auto aggregazione può essere severamente influenzata dalle metodologie di polimerizzazione adottate³¹. Le micelle e la loro stabilità sono influenzate da una serie di altri parametri come la concentrazione micellare critica (CMC) e la temperatura micellare critica (CMT): esse disgregano in unimeri sotto certi valori di concentrazione ed al di sopra di determinate temperature. CMT e CMC variano radicalmente in funzione delle tipologie e proprietà dei copolimeri che costituiscono gli unimeri; in generale la CMC diminuisce

all'aumentare del peso molecolare globale ed in particolare del blocco idrofobico che ne costituisce il guscio^{31,32}. L'auto aggregazione in micelle è regolata essenzialmente da processi termodinamici ed una volta che la struttura è formata le forti interazioni fra i blocchi costituenti il nucleo, ostacola la disgregazione in unimeri³³. La stabilità cinetica che impedisce la disgregazione in unimeri al di sotto della CMC aumenta con l'impiego di copolimeri il cui blocco idrofobico possiede un alta temperatura di transizione vetrosa.

Le dimensioni e struttura delle micelle sono direttamente correlate al polimero che le costituisce (Figura 7).



Figura 7: Micella a “stella”(sinistra) e a “spazzola”(destra)

Come rappresentato in Figura 7, le micelle denominate “a stella” possiedono una corona decisamente più estesa del nucleo, mentre negli aggregati “a spazzola” quest'ultimo è decisamente dominante. Questo a causa della maggior estensione o meno del blocco idrofobico. Unitamente alle dimensioni, la struttura dell'unimero influenza altri parametri caratteristici delle micelle quali raggio idrodinamico (R_h), il raggio di girazione (R_g) e quindi il rapporto R_g/R_h che fornisce informazioni riguardo alla forma delle micelle.

2. Scopo

Il lavoro sperimentale per la preparazione di questa tesi di Laurea svolto presso il gruppo di ricerca ISOF-CNR di Bologna, ha avuto come scopo principale la sintesi di polimeri random anfifilici tramite processi di post polimerizzazione del poli(glicidil metacrilato) per l'ottenimento di micelle da essere utilizzate come sistema trasportare di materiale genetico.

A tal fine si è scelto di polimerizzare il glicidil metacrilato tramite un opportuno agente RAFT (**R**eversible **A**ddiction **F**ragmentation chain **T**ransfer), tecnica di polimerizzazione nella quale il gruppo di ricerca è da anni specializzato¹¹⁻¹⁶. L'omopolimero di poli (glicidil metacrilato) ottenuto con questa tecnica ha pesi molecolari predefiniti e un indice di polidispersità molto basso. Il polimero così ottenuto è stato trattato con un agente nucleofilo che permette l'apertura dell'anello glicidilico con la formazione di gruppi ossidrilici OH che, assieme al nucleofilo (ammina) ormai legato al polimero, conferiscono idrofilicità al blocco. Si è scelta come ammina la morfolina, che è risultata in studi precedenti, il miglior nucleofilo per la buona reattività e l'ottima selettività di reazione sul carbonio meno stericamente impedito (Figura 8).

Il gruppo terminale piridil disolfuro è stato introdotto per proteggere il tiolo derivante dall'amminolisi del ditiocarbonile (gruppo RAFT).

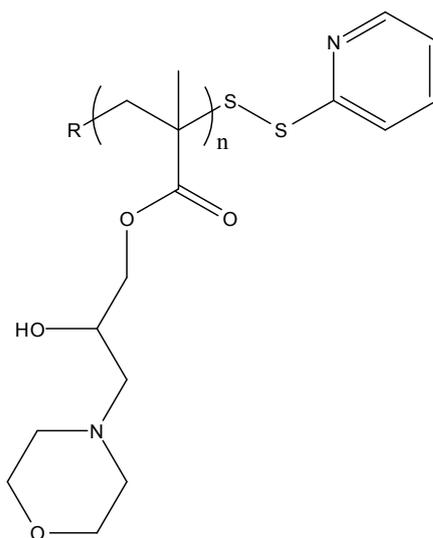


Figura 8: PHMPMA Poli (2-idrossi-3-morfolinopropil metacrilato)

Una catena polimerica anfifilica è caratterizzata dalla contemporanea presenza di gruppi

idrofilici e gruppi idrofobici. Il poli (2-idrossi-3-morfolinopropil metacrilato) è un polimero a caratteristiche idrofiliche, per ottenere un comportamento anfifilico, e quindi delle micelle, sono stati introdotti gruppi funzionali idrofobici con successivi trattamenti di post funzionalizzazione sull'OH libero. A tal scopo sono stati utilizzati vari isocianati contenenti catene alifatiche di diversa lunghezza e del colesteril cloroformiato. I polimeri finali presentano la struttura generale mostrata in Figura 9.

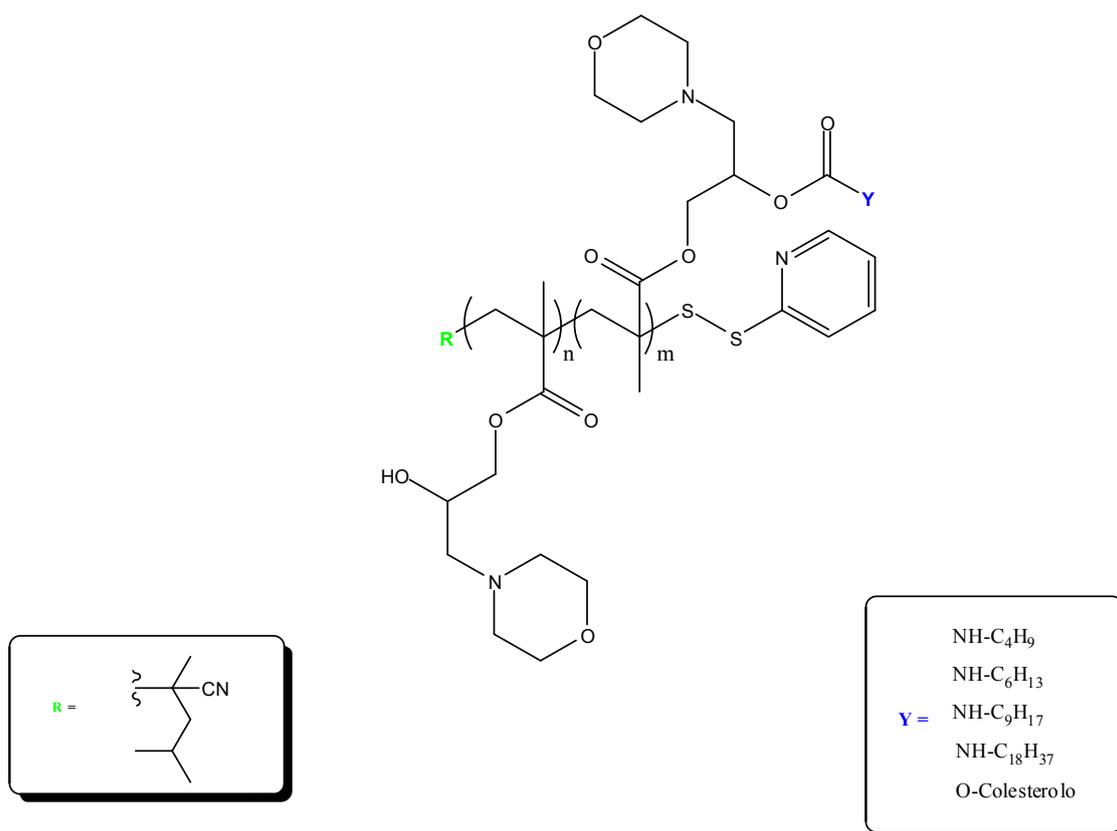


Figura 9: Struttura generale dei polimeri sintetizzati

È stata studiata la capacità di questi polimeri di autoassemblarsi per formare micelle; che si formano in maniera spontanea aggiungendo acqua deionizzata, nelle quantità opportune e sotto agitazione, alla soluzione del copolimero disciolto in THF.

Le micelle polimeriche così ottenute e purificate tramite dialisi sono state poste in contatto in presenza di PBS con del materiale genetico costituito da DNA in doppia elica. Il grado di associazione tra polimero e DNA è stato valutato in funzione del rapporto tra azoto contenuto nel polimero e fosforo contenuto nel DNA. È stato verificato che quando il rapporto fra polimero e DNA è di 3:1 la loro associazione

risulta stabile.

Queste micelle sono state pensate e potrebbero essere utilizzate come nano carriers per il trasporto all'interno della cellula di materiale genetico; le micelle vengono inglobate all'interno della cellula per endocitosi ed in seguito a disgregazione, rilasciano il contenuto.

Infine, per verificare l'ingresso delle micelle all'interno delle cellule può essere molto utile la loro visualizzazione mediante tecniche di fotoluminescenza. Si è quindi deciso di marcare i polimeri sintetizzati con nuovi agenti fluorescenti a base tiofenica messi a disposizione da un altro gruppo di ricerca dell'ISOF.

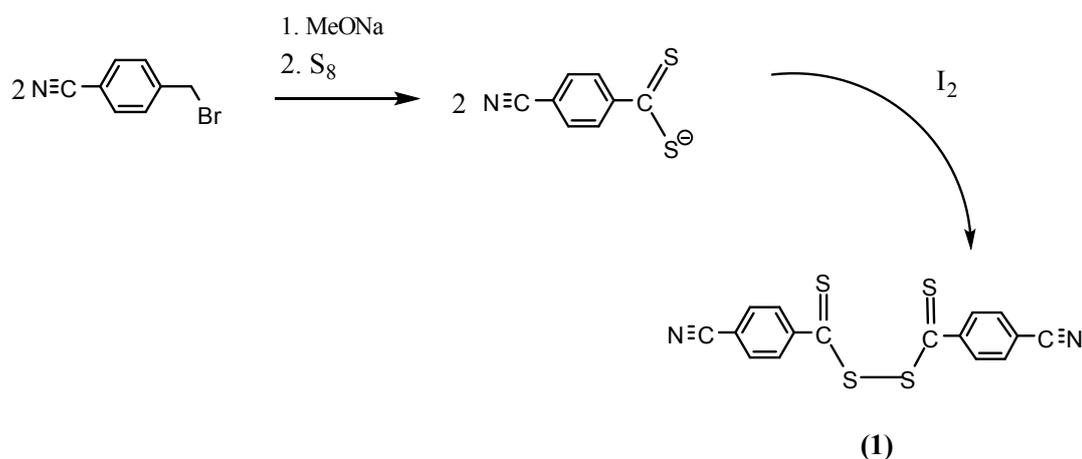
Per questo è stata messo a punto un metodo per sostituire il gruppo protettivo piridinico con il fluoroforo.

3. Risultati e discussione

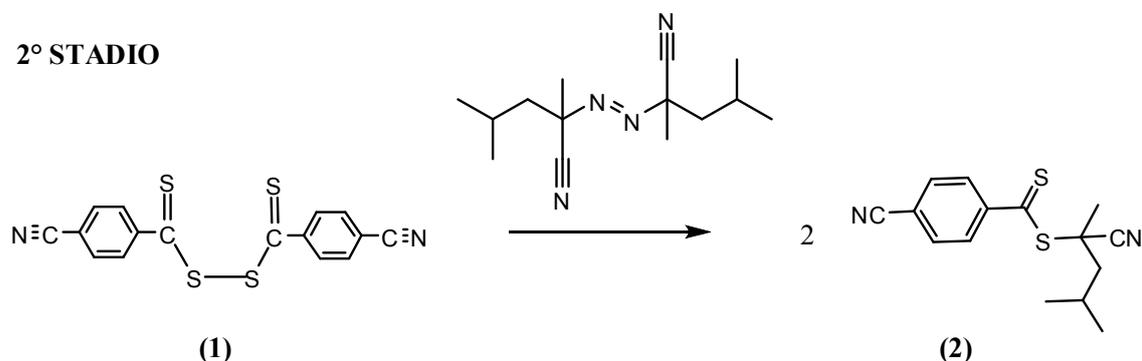
3.1 Sintesi dell'agente RAFT

L'agente RAFT utilizzato: il 2-ciano-4-metilpentan-2-il-4-isocianoditiobenzoato è stato ottenuto in due stadi distinti come mostrato nello Schema 5.

1° STADIO



2° STADIO



Schema 5: Sintesi dell'agente RAFT

Questo agente RAFT è stato scelto per poter controllare al meglio la polimerizzazione del glicidil metacrilato; occorre favorire la formazione di un radicale terziario con stabilità paragonabile a quello metacrilico, il quale deve essere in grado di reiniziare la polimerizzazione.

L' α -bromo-*p*-toluenitrile è stato scelto come reagente di partenza poichè un sostituente elettron-accettore sul fenile aumenta il controllo della polimerizzazione negli stadi iniziali²².

Nel primo stadio il sodio metossido estrae un idrogeno dal CH_2 fenilico, dando luogo ad una specie instabile che facilita l'uscita dell'anione bromuro e la formazione del

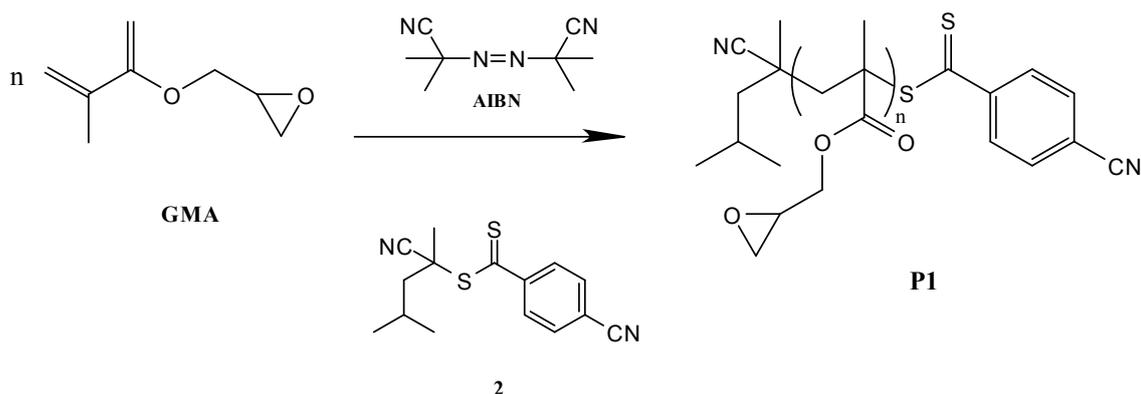
carbene. In presenza di zolfo che agisce da ossidante si forma il ditiocarbonato che viene a sua volta ossidato dallo iodio portando al disolfuro. Il disolfuro purificato è stato ottenuto con resa del 75%.

Nel secondo stadio, il 2-ciano-4-metilpentan-2-il-4-isocianoditiobenzoato è stato ottenuto, facendo reagire il disolfuro (**1**) con l'azocomposto 2,2'-azobis(2,4-dimetilpentanitrile) con una resa del 42%.

Le caratterizzazioni ¹H-NMR degli agenti RAFT e dei rispettivi intermedi di reazione sono in accordo con le strutture previste.

3.2 Sintesi dei polimeri

3.2.1 Poli (glicidil metacrilato) (PGMA)



Schema 6: Sintesi di PGMA

Il poli (glicidil metacrilato) (Schema 6) è stato ottenuto mediante RAFT, utilizzando 2-ciano-4-metilpentan-2-il-4-isocianoditiobenzoato (**2**) come agente RAFT e l'azobisisobutirronitrile (AIBN) come iniziatore termico (70°C) di polimerizzazione radicalica: il rapporto molare fra le specie reattive è stato il seguente:

$$\text{monomero/RAFT/iniziatore}=625/1/0,05$$

La miscela di reazione è stata sottoposta a 4 cicli di congelamento in azoto liquido ed aspirazione sottovuoto a 10⁻⁴ mbar in maniera tale da rimuovere l'ossigeno che interagendo con le specie radicaliche in crescita potrebbe dare origine a terminazioni e trasferimenti di catena indesiderati.

La polimerizzazione è stata condotta alla temperatura di 70°C per tempi variabili (Tabella1).

I polimeri, purificati per precipitazione in etere etilico e recuperati per filtrazione, hanno consistenza di polvere di colorazione rosa, per la presenza della funzionalità ditiocarbonilica terminale ad un'estremità delle catene polimeriche. I polimeri sono, a questo punto, sotto forma di macroRAFT, ovvero una catena dormiente in grado di riattivarsi se posta nelle opportune condizioni.

In Tabella 1 sono riportate le loro caratteristiche principali dei polimeri sintetizzati.

Tabella 1: Dati salienti riguardanti le polimerizzazioni di GMA

Polimero ottenuto	Tempo di reazione (h)	g ottenuti	\overline{M}_n Teorico ^{a)} (g/mol)	\overline{M}_n GPC ^{b)} (g/mol)	Conversione %	PD ^{c)}
P1-1	3	1,60	19474	16770	22	1,06
P1-2	4	1,58	24763	20070	28	1,06
P1-3	5	0,63	30128	24300	34	1,05

a)
$$\overline{M}_{Teorico} = \frac{[monomero]}{[RAFT]} \cdot Conversione \cdot PM_{monomero}$$

b) \overline{M}_n GPC rappresenta il peso molecolare medio numerale delle catene

c) indice di polidispersità calcolato come rapporto $\overline{M}_w/\overline{M}_n$

Tutti i polimeri sintetizzati sono stati analizzati mediante GPC (Gel Permeation Chromatography) per identificare il peso molecolare medio e l'indice (PD).

I polimeri ottenuti presentavano un basso indice di polidispersità (tendente a 1) e il peso molecolare medio incrementa con il tempo di polimerizzazione in accordo con il carattere vivente della polimerizzazione RAFT (Figura 10).

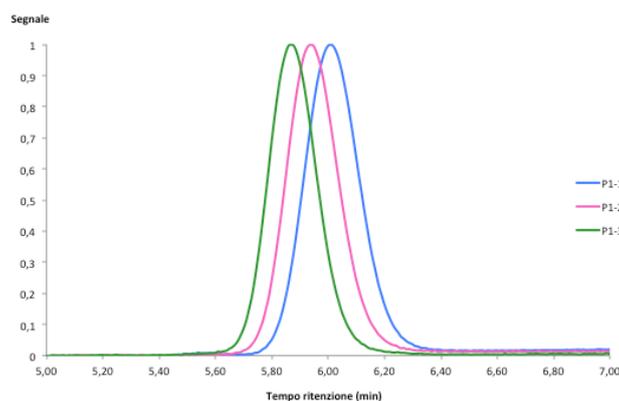


Figura 10: Cromatogramma GPC dei polimeri sintetizzati.

3.3 Trattamenti di post polimerizzazione

Un polimero in grado di auto assemblarsi in micelle, se posto in mezzo acquoso, richiede una struttura composta da una parte idrofila e da una parte idrofoba. Il PGMA permette di utilizzare la reattività dell'anello epossidico all'attacco nucleofilo per introdurre funzionalità aggiuntive che dotano il polimero finale di caratteristiche completamente differenti da quelle di partenza.

I trattamenti di post polimerizzazione eseguiti sono stati di tre tipologie:

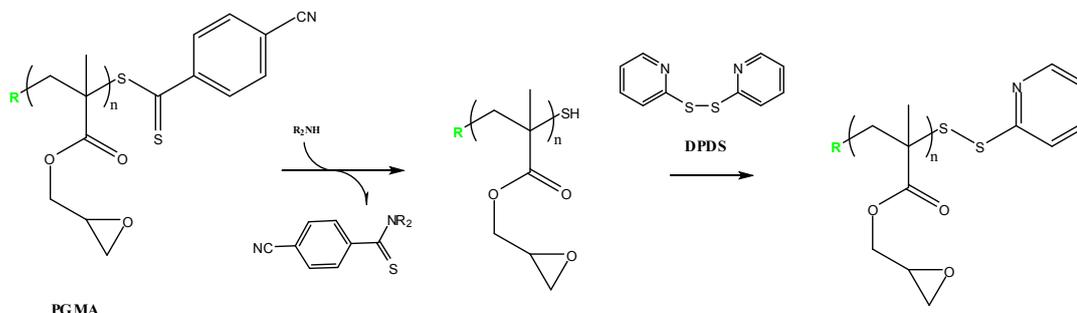
- Ottenimento di materiale idrofilico
- Inserimento di uniche idrofobiche
- Inserimento di marcatori fluorescenti

L'omopolimero PGMA ha subito inizialmente un attacco nucleofilo che comporta l'apertura dell'anello epossidico da parte della morfolina; la morfolina e il gruppo ossidrilico compiono un'azione concertata rendendo idrofilo il polimero. In seguito è stata sfruttata la reattività residua del gruppo ossidrilico per la successiva reazione con alcuni isocianati e con il colesteril cloroformiato, per l'ottenimento di opportune unità idrofobiche necessarie alla formazione delle micelle in ambiente acquoso. Infine sono stati preparati polimeri con gruppi terminali fluorescenti.

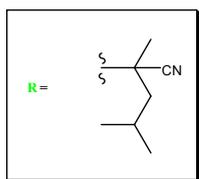
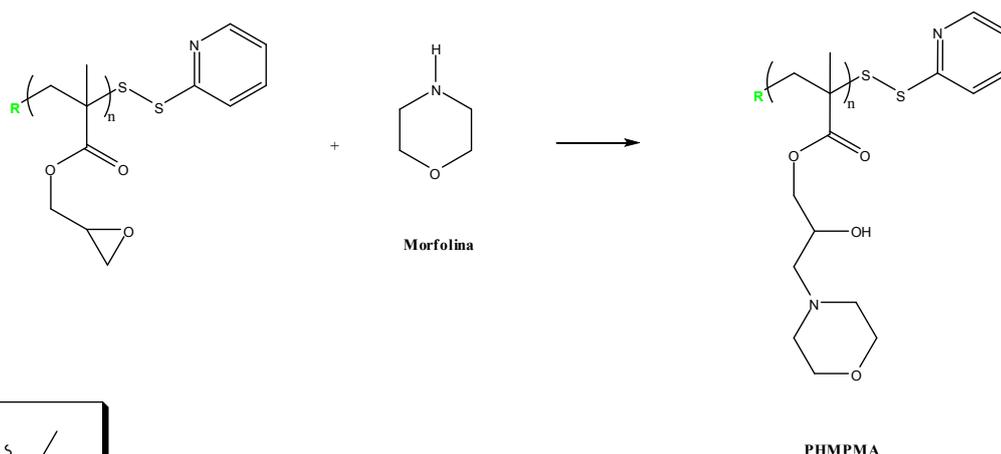
3.3.1 Trattamento di PGMA con morfolina

In studi precedenti, presso il gruppo di ricerca ISOF-CNR, è stata messa a punto una procedura efficace per l'apertura dell'anello epossidico del glicidile per l'attacco nucleofilo da parte della morfolina.

1° STADIO



2° STADIO



Schema 10: Apertura anelli epossidici del PGMA

Si è scelto di utilizzare come PGMA di partenza il P1-1.

La reazione di apertura dell'anello epossidico avviene secondo un meccanismo di sostituzione nucleofila bimolecolare (SN₂), permettendo il contemporaneo legame tra il nucleofilo e il suo carbonio meno sostituito e la formazione di un gruppo idrossilico sull'altro carbonio.

La morfolina garantisce una buona reattività ed un'ottima selettività, inoltre porta alla rimozione del gruppo RAFT tramite amminolisi con formazione di un tiolo.

Il tiolo essendo una specie reattiva sia nei confronti dei gruppi glicidilici, in quanto nucleofilo, sia per possibile ossidazione da parte dell'ossigeno atmosferico, con la formazione di un dimero disolfuro, deve essere protetto. Per questo nel primo stadio della funzionalizzazione è stato protetto mediante DPDS (Schema 10).

La reazione di protezione è pressoché immediata a temperatura ambiente, infatti si è osservato che, durante la reazione, il colore della soluzione passa velocemente da rosa a giallo intenso ad indicare che la fuoriuscita della funzionalità ditiocarbonilica.

L'attacco nucleofilo all'anello epossidico per poter avvenire necessita di condizioni più robuste rispetto alla reazione di protezione, infatti è stato necessario incrementare la temperatura a 80°C. Questa condizione di reazione permette però l'utilizzo della stessa ammina in entrambi gli step reattivi con una notevole semplificazione del processo operativo. Per ottenere la totale apertura degli anelli in un tempo di 2 ore è necessario utilizzare un eccesso di morfolina di 10 volte.

La struttura chimica del poli 2-idrossi-3-morfolinopropil metacrilato è mostrata nello Schema 10.

In Tabella 2 si riportano i dati salienti relativi al PHMPMA così ottenuto.

Tabella 2: Dati salienti riguardanti il PHMPMA

Polimero ottenuto	Tempo di reazione (h)	g ottenuti	\bar{M}_n Teorico ^{a)} (g/mol)	\bar{M}_n GPC (g/mol)	PD
PHMPMA	2	1,40	27048	23418	1,20

$$a) \bar{M}_{nPHMPMA} = \left(\frac{\bar{M}_{nP1-1}}{PM_{GMA}} \right) \times (PM_{GMA} + PM_{Morfolina})$$

Il polimero presenta un incremento del peso medio molecolare numerale e mantiene una bassa polidispersità (Figura 11).

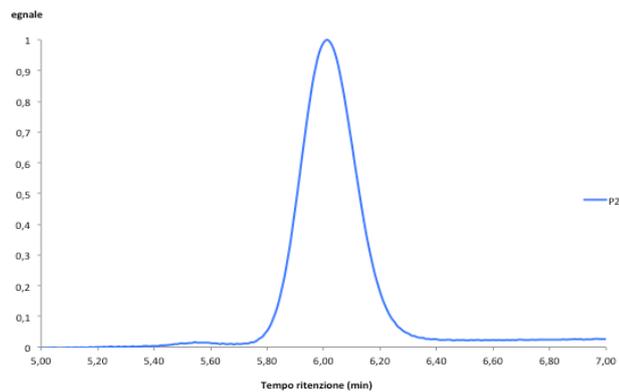


Figura 11: Cromatogramma GPC del PHMPMA

L'apertura quantitativa degli anelli epossidici è stata verificata tramite l'analisi ^1H -NMR (Figura 12).

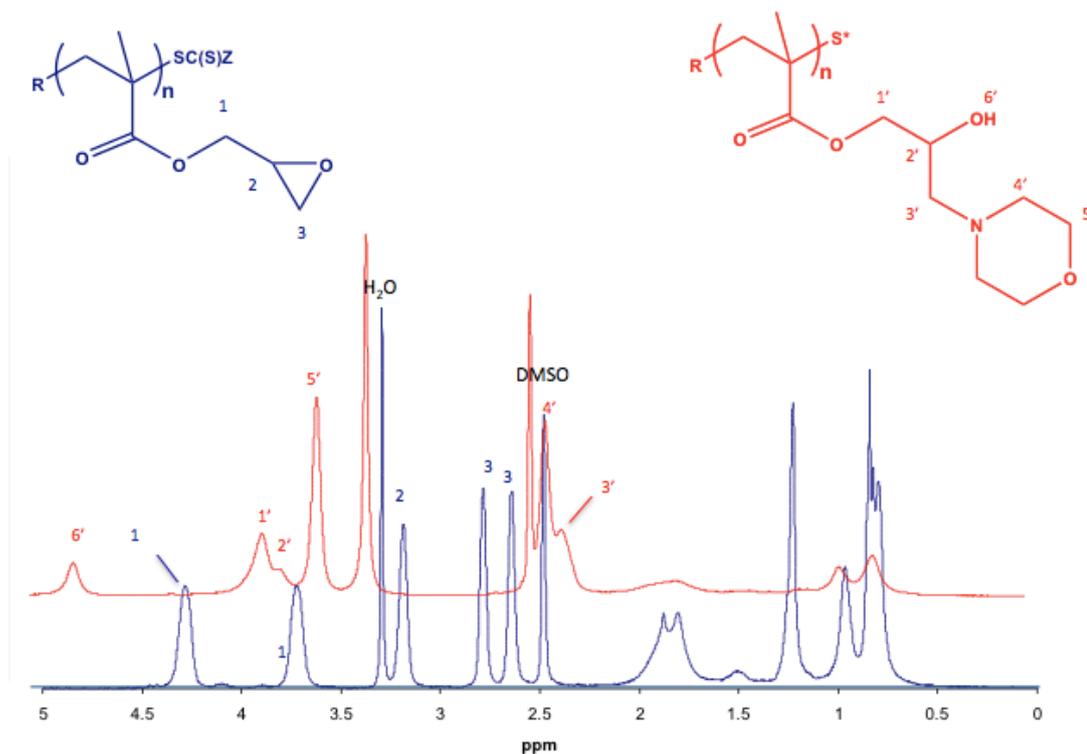


Figura 12: Spettri ^1H -NMR del PGMA e del PHMPMA a confronto

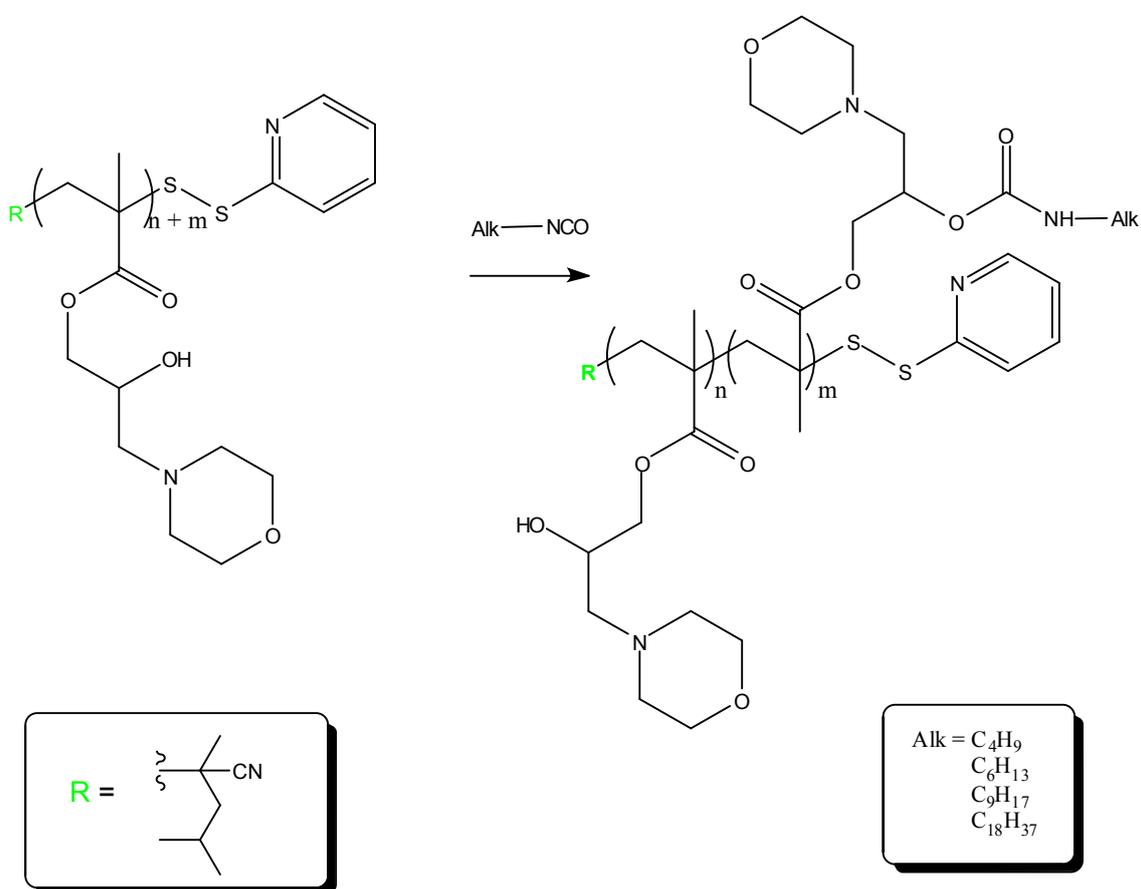
3.3.2 Inserimento unità idrofobiche

3.3.2.1 Trattamento con isocianati

Il trattamento con la morfolina ha permesso di ottenere un polimero completamente solubile in acqua. Per ottenere l'autoassemblaggio in micelle, è indispensabile inserire delle funzionalità con caratteristiche idrofobiche.

A tale scopo sono stati utilizzati alcuni isocianati alifatici per la loro reattività con i gruppi ossidrilici presenti in catena.

Il meccanismo di reazione, attacco nucleofilo del OH, è lo stesso per tutti gli isocianati trattati, di seguito è rappresentato uno schema generale (Schema 11).



Schema 11: Trattamento PHMPMA con isocianati alifatici

Gli isocianati sono il butilisocianato, l'esilisocianato, l'ottilisocianato e il decaottilisocianato.

In Tabella 3 sono riportati i dati salienti relativi alle sintesi dei polimeri cos' funzionalizzati.

Tabella 3: Dati relativi al PHMPMA trattato con i vari isocianati.

Isocianato utilizzato	Tempo di reazione (min)	g ottenuti (mg)	\overline{Mn} calcolato^{a)} (g/mol)	Conversione %
Butilisocianato-1	22	23	31514	38
Butilisocianato-2	15	91,5	29930	25
Esilisocianato	22	16	30488	23
Ottilisocianato	22	31	31245	23
Decaottilisocianato	22	10	29500	7

$$\text{a) } Mn \text{ calcolato} = Mn_{PHMPMA} + \left\{ \left[\left(\frac{Mn_{(P1-1)}}{PM_{(GMA)}} \right) \times Conv \right] \times PM_{isocianato} \right\}$$

Mn_{PHMPMA} utilizzato: calcolato con la formula riportata nel paragrafo 3.3.1= 27048(g/mol)

Inizialmente sono state eseguite numerose prove sia con riscaldamento convenzionale che con quello a microonde effettuando un ampio screening su solventi e rapporti molari tra i reagenti utilizzando il butilisocianato.

Le condizioni di reazione scelte al termine dello screening sono state: un rapporto molare fra le unità ossidriliche e il butilisocianato di 1 a 10; dimetilformammide come solvente e riscaldamento in forno a microonde.

Nel trattamento con le microonde, la scelta del solvente è dovuta ricadere necessariamente su un solvente in grado di assorbire efficacemente l'energia indispensabile per ottenere un riscaldamento rapido; inoltre, considerando che gli isocianati sono molto reattivi alla presenza di acqua e subiscono idrolisi, è stato necessario operare con solvente anidro e in atmosfera inerte.

I polimeri ottenuti sono stati purificati mediante precipitazione in etere etilico.

È stato osservato che la conversione diminuisce all'aumentare della lunghezza della catena alifatica dell'isocianato. Questo fenomeno è probabilmente dovuto all'aumento di ingombro sterico delle lunghe catene (fino a C18).

Le conversioni sono state calcolate dall'analisi NMR al protone, integrando i segnali dei CH (2), NH (1) e CH₂-Alk (4), relativi alla nuova funzionalità uretanica inserita in catena laterale rispetto agli altri segnali NMR (Figura 13, per il butilisocianato)

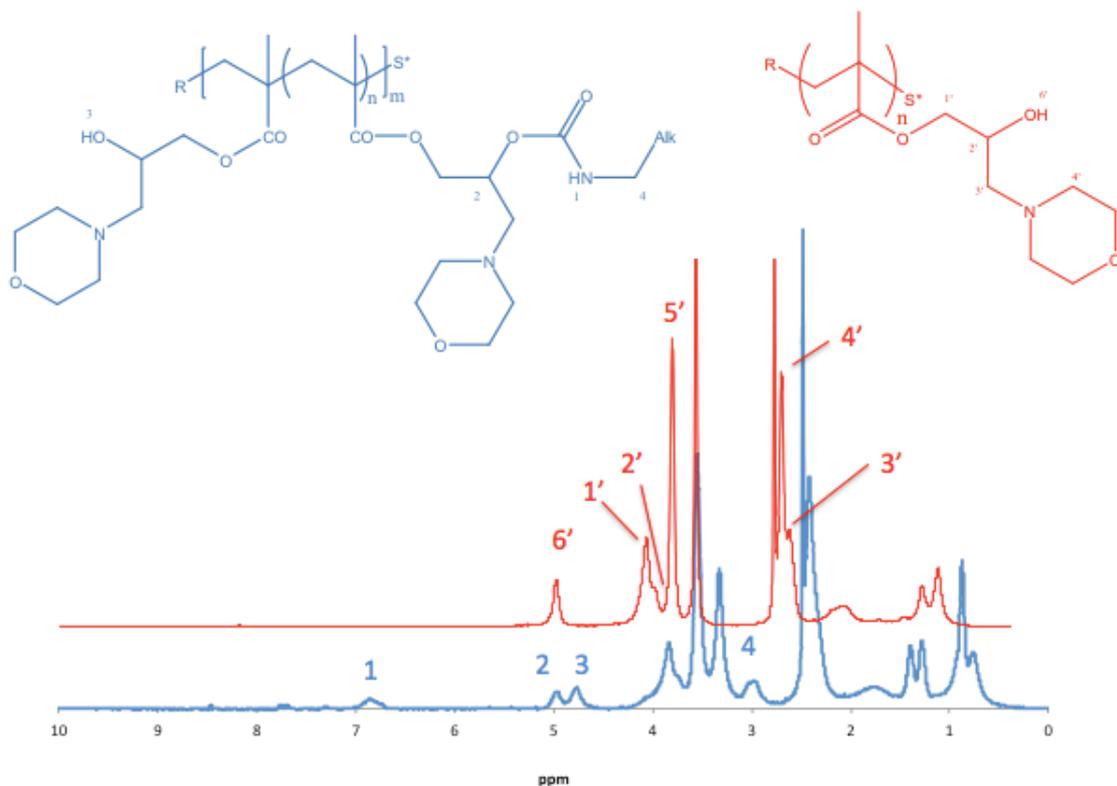
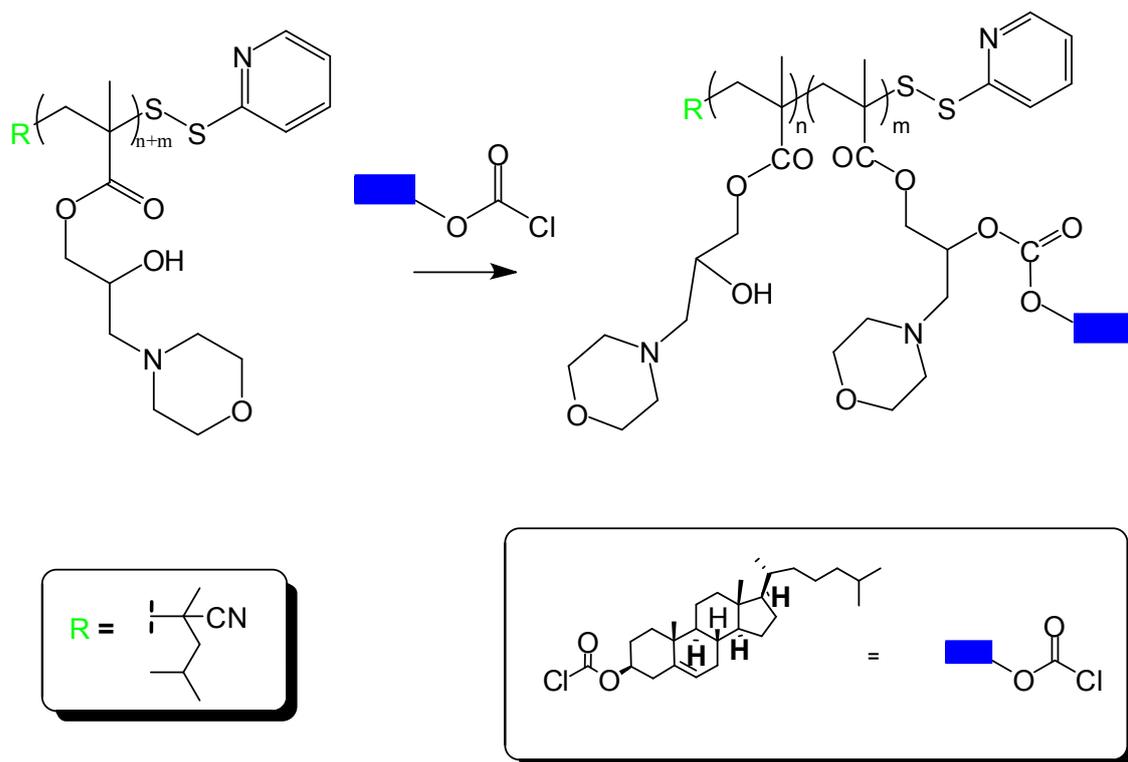


Figura 13: Spettri del PHMPMA e del PHMPMA trattato con butilisocianato

Non è stato possibile ottenere dati attendibili dalle analisi GPC in quanto i segnali registrati si mostravano molto allargati.

3.3.2.2 Trattamento con colesteril cloroformiato

La funzionalizzazione del PHMPMA con colesteril cloroformiato (Schema 12) oltre a donare carattere lipofilo alle unità strutturali potrebbe permettere una miglior efficacia della micella. Infatti essendo un composto endogeno si presuppone che possa illudere il suo riconoscimento da parte del sistema reticoloendoteliale.



Schema 12: Trattamento PHMPMA con colesteril cloroformiato

La reattività del cloroformiato è molto più alta rispetto agli isocianati alifatici per questo sono state utilizzate quantità di colesteril cloroformiato in difetto rispetto alle unità ossidriliche; inoltre l'alta reattività del colesteril cloroformiato rende non indispensabile l'utilizzo delle microonde.

Il colesteril cloroformiato reagisce completamente (completa scomparsa del reagente) e quindi in base alla percentuale del reattivo utilizzato si può calcolare il peso molecolare del polimero ottenuto (Tabella 4).

Sono quindi state effettuate tre procedure sintetiche: Col-1 con riscaldamento a microonde e Col-2 e Col-3 mediante riscaldamento convenzionale a 60°C, variando la percentuale di colesteril cloroformiato in alimentazione e quindi nel polimero finale.

Tabella 4: Dati relativi al PHMPMA trattato con il colesterilcloroformiato.

Prodotti	Tempo di reazione	g ottenuti (mg)	\overline{M}_n calcolato (g/mol)	% di funzionalizzazione
Col-1	22 min	16	42770	30
Col-2	12 ore	24,5	32440	10
Col-3	12 ore	21	29050	5

Le analisi NMR dei polimeri ottenuti confermano le strutture previste. L'ingresso del colesteril cloroformiato in catena è supportato anche dall'evidenza che le proprietà di solubilità del polimero variano notevolmente dopo la reazione.

3.3.3 Inserimento di marcatori fluorescente

Per l'ottenimento di catene polimeriche terminate con marcatori fluorescenti, fra i numerosi prodotti sintetizzati nei laboratori ISOF-CNR sono stati scelti due composti a base tiofenica mostrati in Figura 14.

Il 2,5-diossipirrolidin-1-il-2,2'-ditiofene-5-carbossilato (**T2**) e il 5''-(metiltio)-2,2':5',2''tertiofene-2,5-diossipirrolidin-1-il-2,2'-ditiofene-5-carbossilato (**T3**).

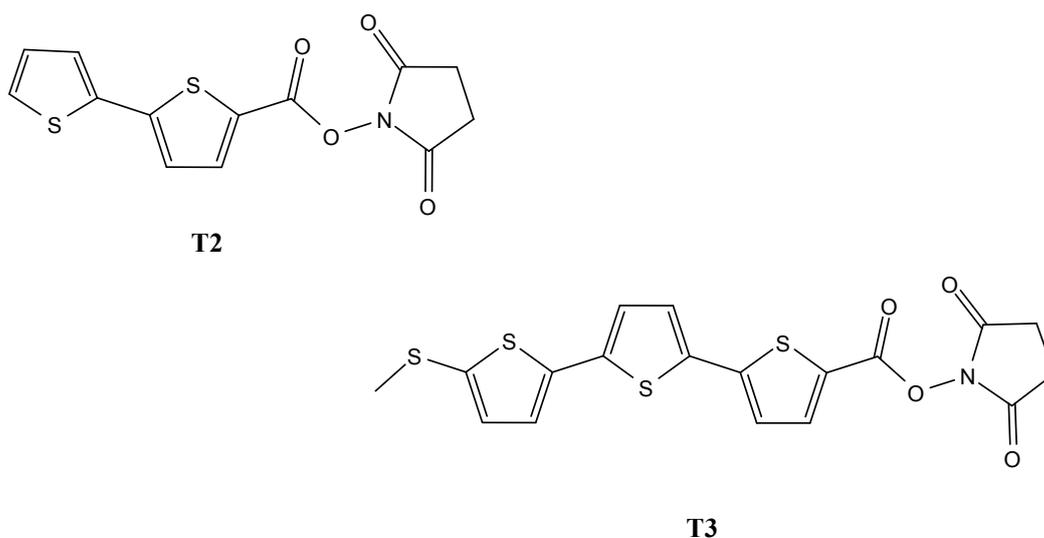
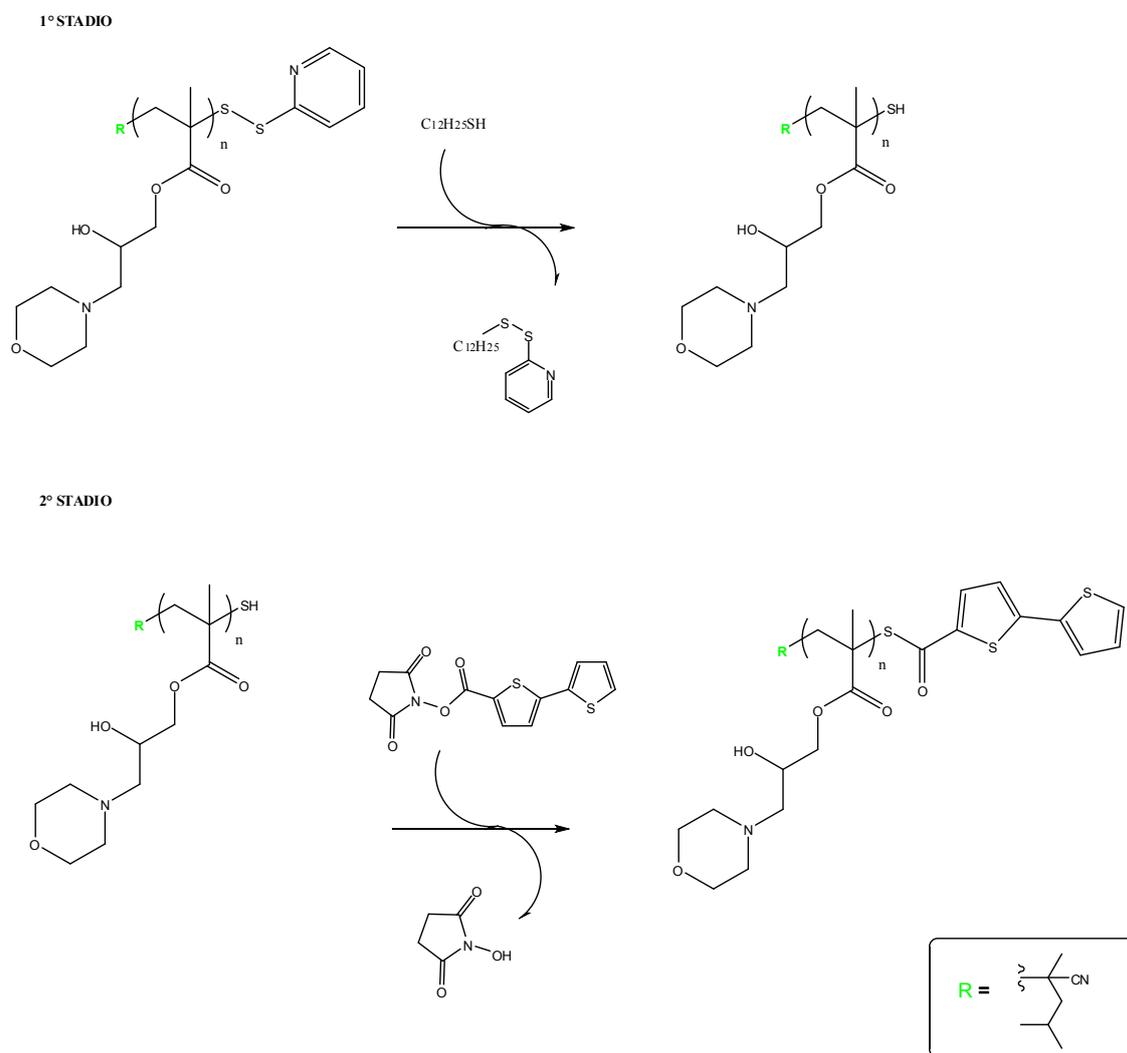


Figura 14: T2 e T3

3.3.3.1 Trattamento con 2,5-diossipirrolidin-1-il-2,2'-ditiofene-5-carbossilato (T2)



Schema 13: Trattamento PHMPMA con fluoroforo T2

La reazione, eseguita sul PHMPMA, è in due stadi (Schema 13). Il primo prevede l'utilizzo di dodecantiolo in eccesso il quale legandosi al gruppo piridinico, lascia il tiolo (SH) libero di reagire con il fluoroforo aggiunto nel secondo step di riscaldamento in microonde.

Il secondo step prevede l'attacco dell'anione mercaptano all'estere attivato del fluoroforo tiofenico, per questo è necessario l'utilizzo di una base inorganica per favorirlo (anche se il polimero è lievemente basico per la presenza di morfolina).

Dopo numerosi tentavi è stato osservato che il migliore rapporto molare tra i reagenti è:

$$\text{polimero/dodecantiolo/base/fluoroforo} = 1/4/1/6$$

Il polimero ottenuto è stato recuperato mediante una precipitazione.

In Figura 15 sono riportati gli spettri di assorbimento e fluorescenza del polimero ottenuto.

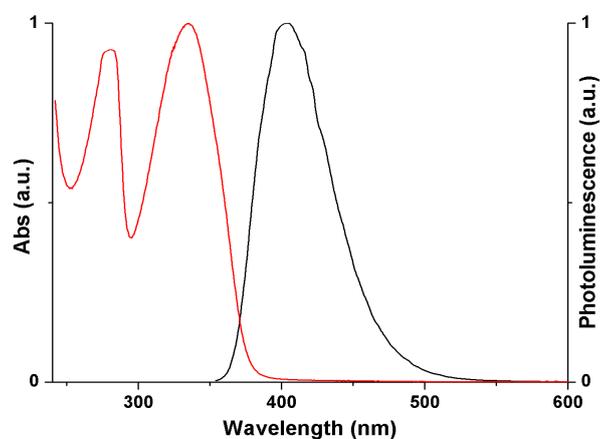


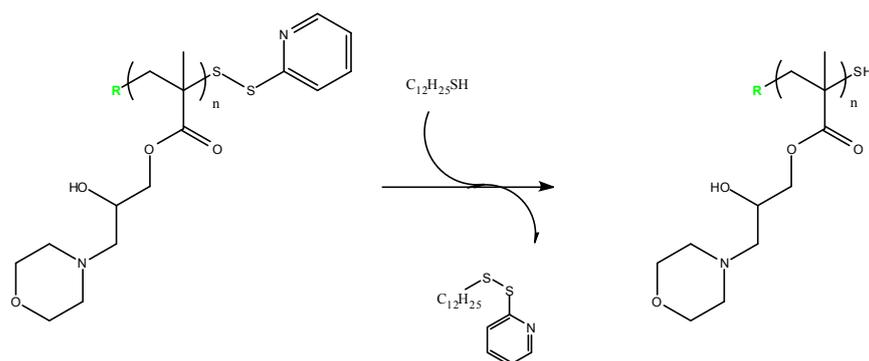
Figura 15: Spettro di fluorescenza e di assorbimento del polimero trattato con il T2

3.3.3.2 Trattamento con 5''-(metiltio)-2,2':5',2''tertiofene-2,5-diossipirrolidin-1-il-2,2'-ditiofene-5-carbossilato (T3)

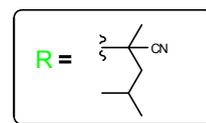
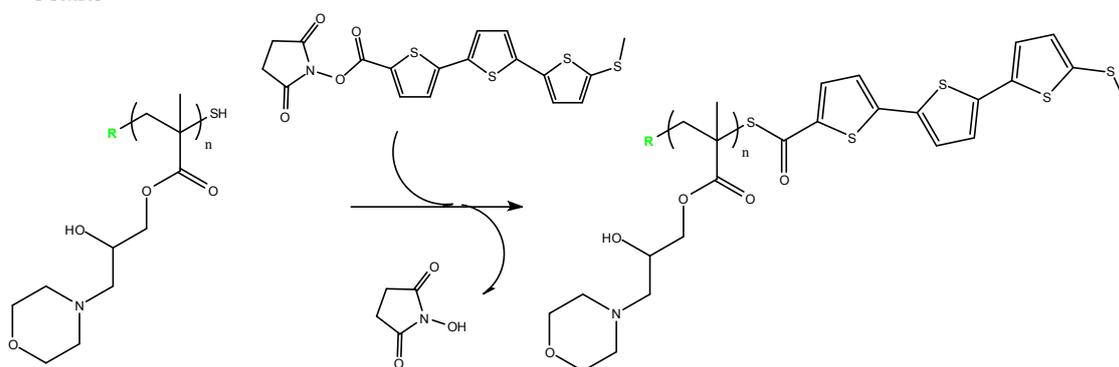
È stata utilizzata la medesima procedura sintetica in due stadi utilizzata per T2 (Schema 14) con questi rapporti molari:

$$\text{polimero/dodecantiolo/base/fluoroforo} = 1/5,5/1,5/8$$

1° STADIO



2° STADIO



Schema 14: Trattamento PHMPMA con fluoroforo T3

L'avanzamento della funzionalizzazione è stato monitorato mediante GPC con rivelatore UV (fermando la reazione a tempi definiti). La Figura 16 mostra i cromatogrammi ottenuti dopo 13,26,39,52 minuti.

Il segnale a 4,5 minuti è attribuibile al fluoroforo legato alla catena polimerica, mentre quelli tra 7 e 9 minuti sono relativi al fluoroforo non reagito e ai sottoprodotti di reazione (che dopo precipitazione del polimero scompaiono).

L'altezza del segnale relativo al fluoroforo legato al polimero aumenta all'aumentare del tempo di reazione.

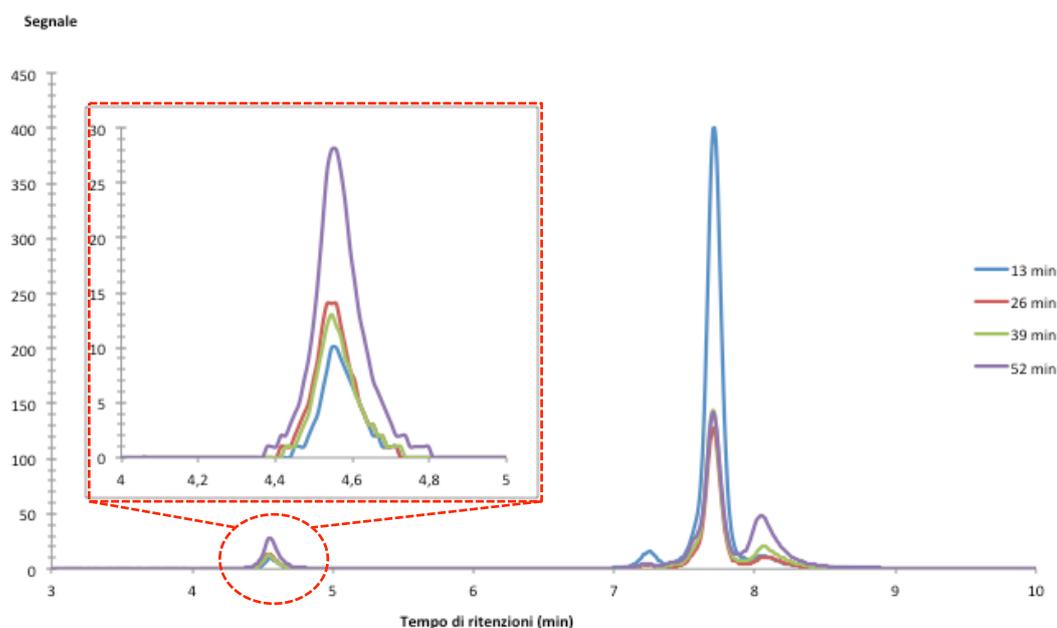


Figura 16: Cromatogrammi GPC delle aliquote prelevate a diversi tempi dalla reazione con il T3

Ipotizzato che i coefficienti di estinzione molare non varino significativamente fra il fluoroforo libero e la stessa specie legata al polimero è stato possibile calcolare dall'integrazione dell'area del segnale a 4,5 minuti rispetto ai segnali totali la percentuale molare di fluoroforo realmente legato al polimero. Questo calcolo indica che dopo 13 minuti la percentuale di funzionalizzazione è del 15%, mentre dopo 52 minuti è del 77%.

In Figura 17 sono riportati gli spettri di assorbimento e di emissione del polimero finale ottenuto funzionalizzato al 77% in moli.

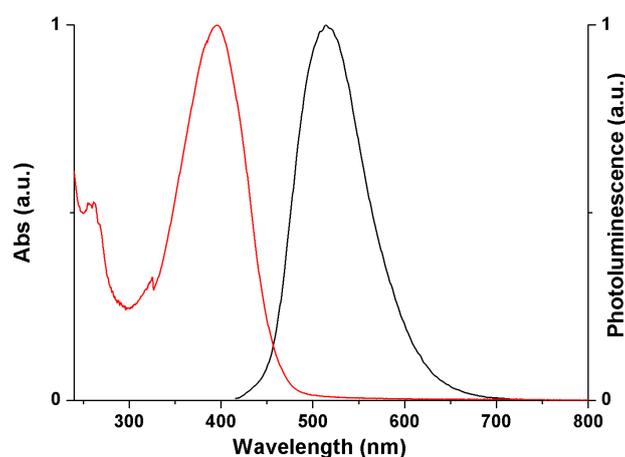


Figura 17: Spettro di fluorescenza e di assorbimento del polimero trattato con il T3

3.4 Formazione e caratterizzazione di micelle

Allo scopo di ottenere micelle caratterizzate da una distribuzione delle dimensioni omogenea tutti i copolimeri random sintetizzati sono stati micellati e caratterizzati mediante DLS. La procedura utilizzata prevede di solubilizzare circa 6 mg di polimero in una minima quantità di THF (1 ml), e successivamente aggiungere sotto agitazione acqua milliQ (5 ml) con uno sgocciolatore in quantità tale da rendere il THF trascurabile; con l'aggiunta dell'acqua la soluzione assume un aspetto opalescente dovuto alla formazione di una sospensione micellare.

Le micelle così ottenute vengono dializzate in acqua utilizzando una membrana di dialisi (Medicell Int. Cut-off 12000-14000 Da) al fine di eliminare il THF ed eventuali altri residui.

Le micelle ottenute sono state analizzate tramite DLS per misurarne le dimensioni (D_h =diametro idrodinamico medio) e l'omogeneità. In Tabella 5 sono riportati i principali risultati ottenuti.

Tabella 5: analisi DLS delle micelle dei copolimeri random sintetizzati

PHMPMA+Sostituente	Diametro idrodinamico medio (nm)
PHMPMA+Butilisocianato-1	216
PHMPMA+Butilisocianato-2	448
PHMPMA+Esilisocianato	580
PHMPMA+Ottilisocianato	48
PHMPMA+Decaottilisocianato	83
PHMPMA+Colesterilcloroformiato 30%	20
PHMPMA+Colesterilcloroformiato 10%	159
PHMPMA+Colesterilcloroformiato 5%	334

3.5 Associazione polimero DNA

Gli short interfering RNA (siRNA) sono degli RNA a doppio filamento costituiti da una serie breve di nucleotidi (circa 20 basi), con due nucleotidi sporgenti ad ognuna delle due estremità 3'; sono coinvolti nel meccanismo di silenziamento dei geni. Tramite gli siRNA è possibile introdurre nelle cellule un RNA interference esogeno. Lo studio di nuovi carrier per siRNA è di grande interesse.

Allo scopo di investigare la capacità delle micelle preparate di trasportare materiale genetico ed in particolare siRNA sono state effettuate diverse prove utilizzando catene di DNA di 20 basi complementari a doppia elica per mimare il comportamento dell'siRNA (short interfering RNA).

Per queste prime prove si è preferito utilizzare DNA perché è meno sensibile dell'RNA alla degradazione.

La soluzione con le micelle e l'altra con il DNA in presenza di un tampone di PBS sono state mescolate e filtrate su filtri ad esclusione molecolare da 100kDa. Le soluzioni filtrate sono state analizzate tramite UV-VIS (Figura 18). Se il DNA interagisce stabilmente con le micelle rimarrà nel filtrato e l'eluato presenterà assorbanza nulla.

È stato osservato che la maggioranza dei polimeri interagisce ottimamente con il DNA mentre la funzionalizzazione con il butilisocianato non lo fissa completamente.

L'associazione si è mostrata stabile quando il rapporto fra gli azoti del polimero e i fosfori del DNA si trovavano in rapporto 3:1.

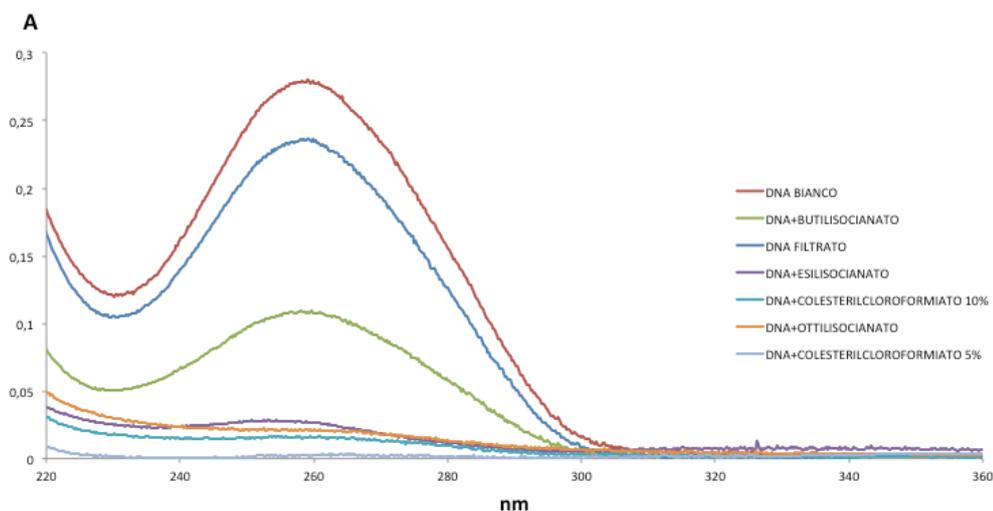


Figura 18: Spettro UV-VIS delle soluzioni di DNA e polimero analizzate

È stata calcolata la percentuale di DNA trattenuto non dal polimero, i dati sono riportati in Tabella 6.

Tabella 6: percentuali DNA trattenuto dai polimeri micellati

PHMPMA+sostituente	% DNA non trattenuto
PHMPMA+Butilisocianato-2	46,24%
PHMPMA+Esilisocianato	11,73%
PHMPMA+Ottilisocianato	9,13%
PHMPMA+Colesterilcloroformiato 10%	8,96%
PHMPMA+Colesterilcloroformiato 5%	1,34%

4. Conclusioni

- Si è dimostrato che la tecnica RAFT permette la sintesi di polimeri di controllato peso molecolare, basso indice di polidispersità e un'ottima riproducibilità di risultati. Inoltre consente il mantenimento della funzionalità RAFT per il reinizio della reazione di polimerizzazione in un secondo momento per l'eventuale sintesi di copolimeri a blocchi.
- Si è dimostrato che il PGMA reagendo con la morfolina come nucleofilo, porta ad una reazione esaustiva, veloce ed efficiente con l'ottenimento di un omopolimer
- o completamente solubile in acqua, grazie all'alto grado di idratazione che i gruppi ossidrilici e morfolinici garantiscono. Questa strada sintetica porta a superare lo svantaggio della RAFT che necessita di ottimizzare le condizioni sintetiche che includono la scelta dell'agente RAFT ed il solvente da utilizzare per ogni monomero.
- Il gruppo ossidrilico generato dall'apertura degli epossidi può essere sfruttato per l'addizione di ulteriori molecole con differenti caratteristiche chimico-fisiche. Utilizzando questa procedura è possibile, non solo sintetizzare una libreria di polimeri differenti partendo da un singolo omopolimero di partenza e diversi agenti nucleofili, ma anche ottenere materiali altrimenti irrealizzabili. Questo ha permesso di ottenere copolimeri random con caratteristiche sia idrofiliche che idrofobiche che in ambiente acquoso si autoassemblano in micelle.
- Le micelle ottenute sono state caratterizzate mediante tecnica DLS (Dynamic Light Scattering) e si è visto che la dimensione media del diametro idrodinamico varia tra i 20 e i 580 nm.
- La micelle sono state pensate per il trasporto di materiale genetico all'interno della cellula, in una associazione che dovrebbe passare inosservata al sistema immunitario. Prima di procedere con test biologici in vitro è stato necessario

investigare se il polimero fosse in grado di interagire con il DNA. Le prove effettuate hanno dimostrato che i polimeri sintetizzati sono in grado di associarsi con il materiale genetico.

- Il trattamento chimico con due agenti fluorescenti a base tiofenica ha permesso di ottenere polimeri che possono essere individuati mediante tecniche di fotoluminescenza. La reazione condotta sul fluoroforo T3 ha dimostrato che all'aumentare del tempo di reazione corrisponde un aumento della percentuale di funzionalizzazione del polimero.

5. Parte sperimentale

5.1 Solventi e reagenti

Il toluene è stato anidrificato mediante setacci molecolari.

L' α,α' -azobisisobutirronitrile (**AIBN**) è stato cristallizzato da etanolo assoluto.

Il glicidil metacrilato è stato purificato dagli agenti stabilizzanti per filtrazione su letto di allumina. Gli altri solventi e reagenti (Aldrich) sono stati usati tal quali.

5.2 Caratterizzazione dei prodotti sintetizzati

Gli spettri NMR sono stati acquisiti con uno spettrometro Varian Mercury 400. I chemical shifts sono espressi in ppm dal tetrametilsilano (TMS) usato come riferimento interno. Gli spettri ^1H -NMR dei polimeri sono stati registrati usando i seguenti parametri sperimentali: pulse width (45°); 5ms, delay; 30s, numero transienti 32 o 64.

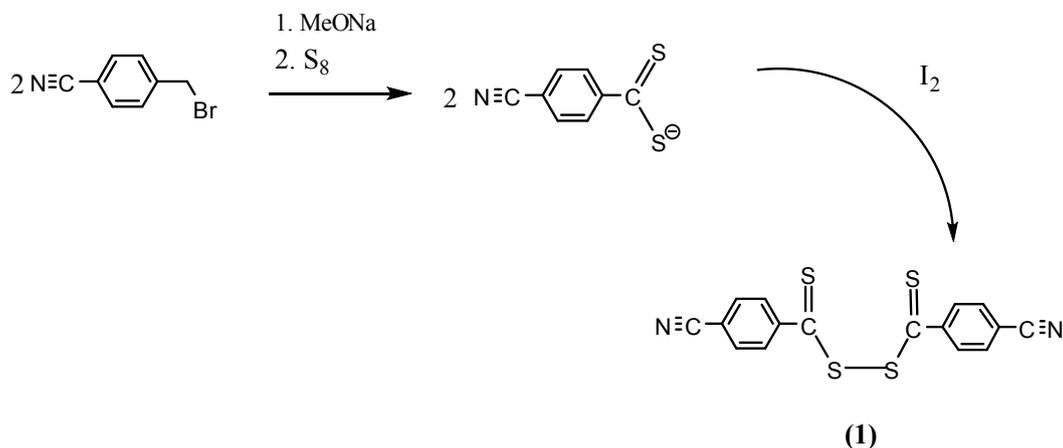
Il peso molecolare numerale dei polimeri (M_n) e il loro indice di polidispersità (M_w/M_n) sono determinati in soluzioni di THF (5 mg di polimero in 1,5 ml di THF) utilizzando toluene (7 μl) come standard interno tramite GPC usando un MSI Concept PU III, equipaggiato con rilevatore a indice di rifrazione Shodex RI-71 e una colonna Resipore Polymer Laboratories $300 \times 7,5$ mm, 0,3 μm , 200-400000 Da.

Le analisi delle micelle sia in acqua che in metanolo con tecnica DLS sono state effettuate utilizzando un Malvern Zetasizer 3000HS ad una temperatura di 25°C (se non altrimenti specificato).

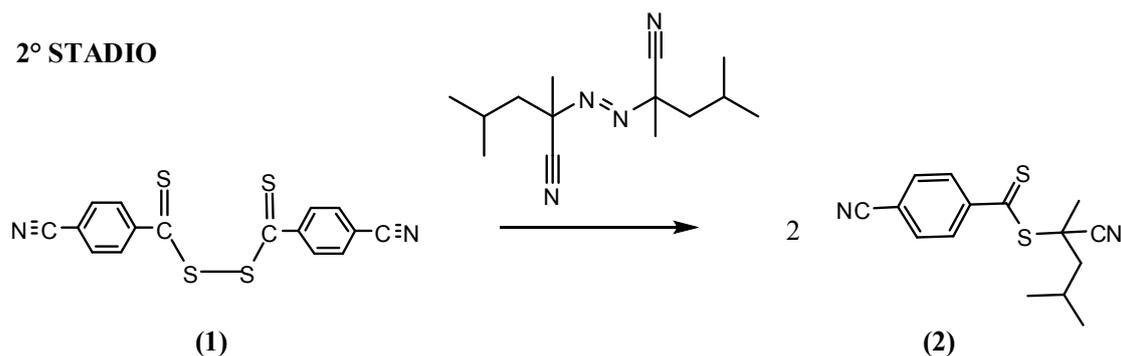
5.3 Sintesi agente RAFT: 2-ciano-4-metilpentan-2-il-4-isocianoditiobenzoato (PM=288 g/mol)

La reazione viene condotta in due stadi.

1° STADIO



2° STADIO



-Primo stadio

In un imbuto gocciolatore si sciolgono 0,46 g di Na metallico in 4,57 mL di CH_3OH anidro. In un pallone a due colli da 100mL munito di agitatore magnetico, in atmosfera di azoto, si introducono 0,64 g di zolfo e 1,96 g di α -bromo-p-toluenitrile e si sciolgono in 50 mL di CH_3OH anidro. Dopo la completa solubilizzazione inizia l'aggiunta, a goccia a goccia, della soluzione di sodio metossido nel pallone sottostante. Si osserva un cambiamento di colore della soluzione da giallo chiaro a marrone. La reazione è continuata per 3 ore.

Si elimina il CH_3OH al rotavapor e il residuo solido marrone viene ripreso con una soluzione diluita di bicarbonato di sodio, si effettuano dei lavaggi con 100 mL di etere etilico, quindi si aggiunge goccia a goccia una soluzione di I_2 (0,4M), circa 10 mmol, fino alla precipitazione di un solido marrone, a questo punto si aggiunge del CH_2Cl_2 . La

soluzione diventa così di un colore viola intenso. Si elimina l'eccesso di iodio con qualche cristallo di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ e si estrae con etere etilico, infine si anidrifica con NaHSO_4 . Resa (**1**) 75%.

-Secondo stadio

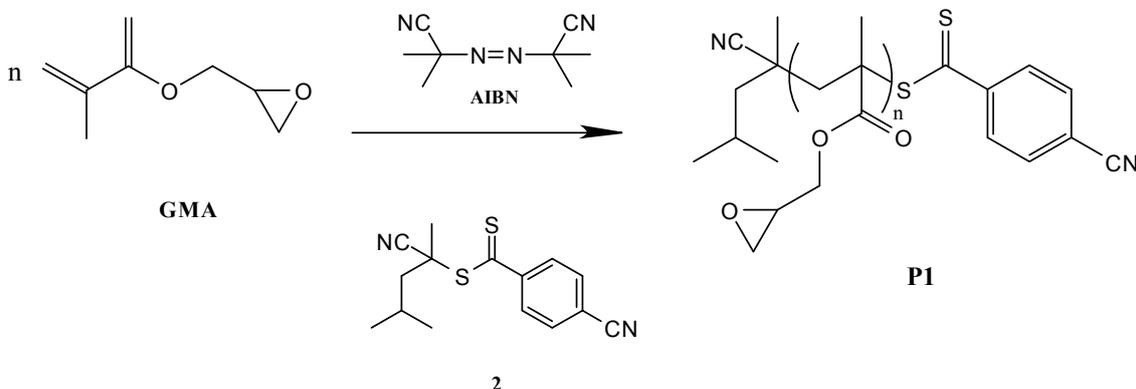
In un pallone a due colli da 250 mL, munito di agitatore magnetico e in atmosfera di N_2 , si pongono 0,6 g del disolfuro preparato nel primo step e 0,55 g di 2,2'-azobis(2,4-dimetilpentanitrile) e si sciolgono in 150 mL di etilacetato. Si fa riflussare per 20 ore controllando la reazione mediante TLC. Si elimina il solvente e si purifica il prodotto tramite una colonna cromatografica (miscela eluente: 50% esano, 45% CH_2Cl_2 , 0,5% EtOAc).

Il prodotto si presenta come un solido deliquescente dal colore rosso intenso. Resa (**1a**) 42%

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : [1.08 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H); 1.12 (d, $J = 6.8$ Hz 3H) ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1.88 (dd, $^1J = 14.2$ Hz, $^2J = 5.8$ Hz, 1H); 2.21 (dd, $^1J = 14.2$ Hz, $^2J = 6.6$ Hz, 1H) (CH_2); 2.07 (m, 1H, CH_2CHMe_2); 1.96 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)\text{CN}$); 7.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, *o*-ArH); 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, *m*-ArH).

5.4 Sintesi di Poli (glicidil metacrilato) (P1)

L'omopolimero di glicidil metacrilato è stato sintetizzato mediante tecnica RAFT utilizzando come iniziatore azobisisobutirronitrile (AIBN) e 2-ciano-4-metilpentan-2-il-4-isocianoditiobenzoato come agente RAFT. La reazione è stata condotta in toluene.



In un matraccio da 25mL si introducono:

- 0,063 g di RAFT (**1a**) (MW = 288 g/mol; $2,2 \cdot 10^{-4}$ mol)
- 0,018 g di AIBN (MW = 164 g/mol; $1,1 \cdot 10^{-5}$ mol)
- 18,75 mL di glicidil metacrilato GMA ($\rho = 1,042$ g/mL; MW = 141,15 g/mol; 0,14 mol)
- toluene anidro a portare a volume.

Si prelevano quattro aliquote: P1-1 10 mL, P1-2 8 mL e P1-3 7 mL e si introducono in quattro ampolline da polimerizzazione.

monomero/RAFT/iniziatore=625/1/0,05

La procedura standard di polimerizzazione è la seguente: le ampolle di polimerizzazione, una volta caricate delle opportune quantità di reagenti, vengono collegate ad una pompa ad alto vuoto ($9 \cdot 10$ bar) e vengono deossigenate subendo 4 cicli congelamento-vuoto-congelamento; dopo di che vengono chiuse ermeticamente e depositate all'interno di opportuni bagni termostatati (di acqua o olio diatermico). Nel nostro caso il bagno è di acqua a 70°C e le ampolline verranno prelevate dopo 3h (P1-1), 4h (P1-2), 5h (P1-3).

I polimeri ottenuti vengono precipitati in etere etilico e posti sotto vuoto per una notte.

I polimeri finali, dopo essere stati essiccati sottovuoto, sono stati caratterizzati mediante cromatografia a permeazione su gel (GPC) e spettroscopia $^1\text{H-NMR}$.

P1-1: Grammi ottenuti 1,60 g; Conv 22%; $M_n=16770$ g/mol; PD=1,06

P1-2: Grammi ottenuti 1,58 g; Conv 28%; $M_n=20070$ g/mol; PD=1,06

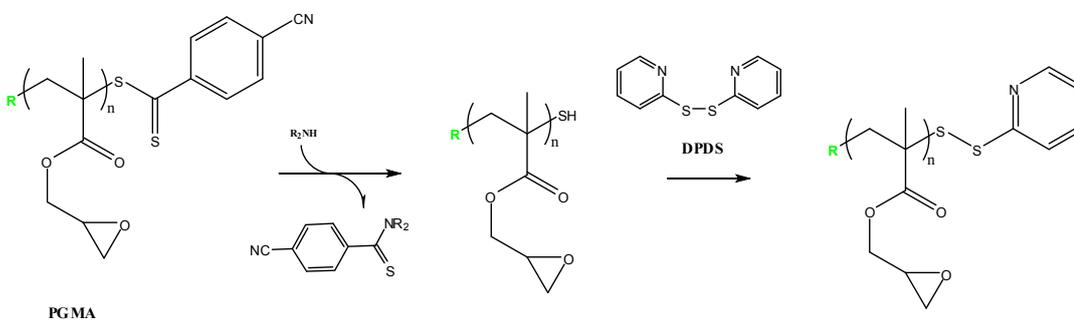
P1-3: Grammi ottenuti 1,17 g; Conv 34%; $M_n=24300$ g/mol; PD=1,05

5.5 Reazioni di post polimerizzazione

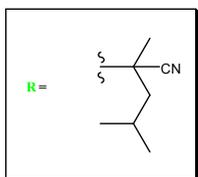
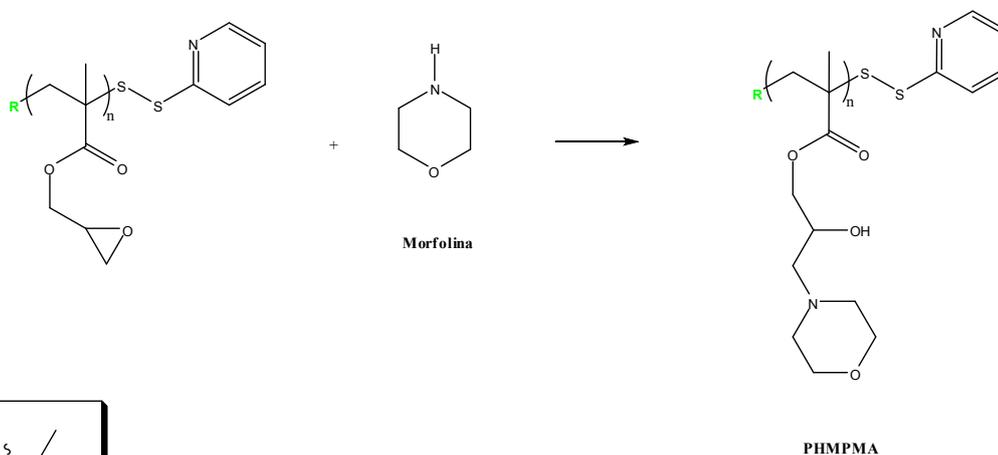
5.5.1 Reazione di apertura dell'anello epossidico da parte della morfolina (PHMPMA)

La reazione avviene sempre tramite riscaldamento convenzionale.

1° STADIO



2° STADIO



Si introducono in un pallone da 50mL munito di agitatore magnetico:

- 1 g di PGMA (**P1-3**) ($M_n=16770$ g/mol; PD = 1.06; $5,9 \cdot 10^{-5}$ mol)
- 25 mL di metilpirrolidone
- 0,04 g di dipiridildisolfuro (DPDS) (MW = 220,32 g/mol; $1,8 \cdot 10^{-4}$ mol)

- 6,15 mL di morfolina (MW= 87,12 g/mol; ρ = 0,996 g/mol; 0,07 mol).

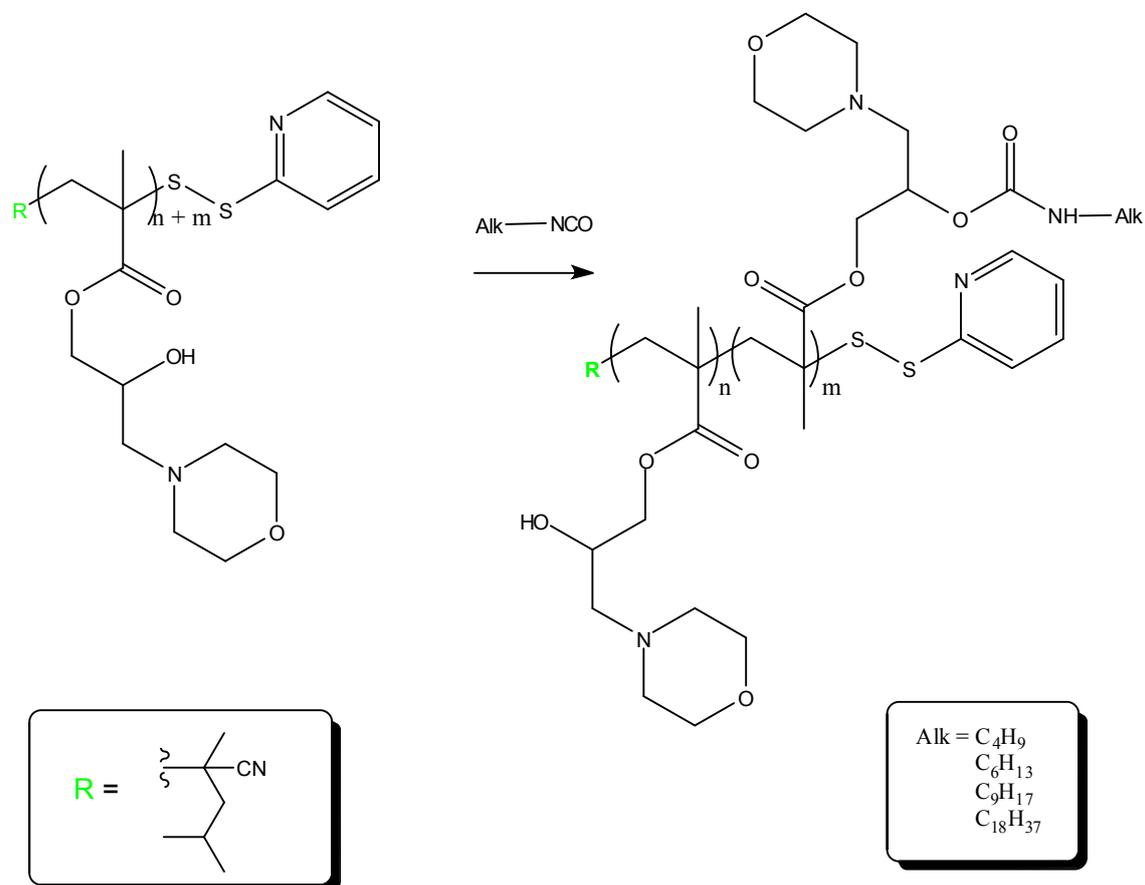
PGMA/DPDS/Morfolina=1/3/10(→ Rispetto agli anelli epossidici)

Con l'aggiunta della morfolina la soluzione passa da rosa-fucsia a giallo acceso. Si aspettano 30 minuti e poi si immerge il palloncino in un bagno d'olio, alla temperatura di 80°C, nel quale lo si lascia per 2 ore. Al termine delle 2 ore si tira a secco, con una pompa ad alto vuoto, si ridiscioglie il polimero in poco cloroformio e si precipita in 150mL di etere etilico. Si lascia asciugare il polimero in un essiccatore per una notte. Al termine il polimero PHMPMA (poli (2-idrossi-3-morfolinopropil metacrilato)) presenta un aspetto polverulento dal colore bianco-giallo.

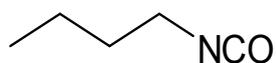
Il polimero ha un Mn di 27054 g/mol (118 unità ripetitive a catena * 229,27 g/mol peso nuova unità ripetitiva).

5.5.2 Trattamento con isocianati

Sono state condotte prove di funzionalizzazione di PHMPMA ($M_n = 27054$ g/mol) con diversi isocianati.



-Butilisocianato C_5H_9NO (MW = 99,13 g/mol; $\rho = 0,88$ g/mL)



Reazione Butilisocianato-1

Reagenti e solvente: 40 mg di PHMPMA ($1,74 \cdot 10^{-4}$ mol), 196 μ L di C_5H_9NO ($1,74 \cdot 10^{-3}$ mol) (rapporto polimero:isocianato 1:10) in 2 mL di DMF anidra.

Condizioni: la reazione avviene tramite riscaldamento a microonde con la seguente rampa:

Tempo (min)	Potenza (W)	Temperatura ($^{\circ}C$)
2	1000	120
20	500	120

Conv = 38%; Mn = 31514 g/mol; grammi ottenuti: 23 mg

Reazione Butilisocianato-2

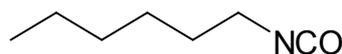
Reagenti e solvente: 100 mg di PHMPMA ($4,36 \cdot 10^{-4}$ mol), 500 μ L di C₅H₉NO ($4,43 \cdot 10^{-3}$ mol) (rapporto polimero:isocianato 1:10) in 2 mL di DMF anidra.

Condizioni: la reazione avviene tramite riscaldamento a microonde con la seguente rampa:

Tempo (min)	Potenza (W)	Temperatura (°C)
2	1000	120
13	500	120

Conv = 25%; Mn = 29930 g/mol; grammi ottenuti: 91,5 mg

-Esilisocianato C₇H₁₃NO (MW = 127,18 g/mol; $\rho = 0,873$ g/mL)



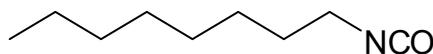
Reazione Esilisocianato

Reagenti e solvente: 20 mg di PHMPMA ($8,72 \cdot 10^{-5}$ mol), 127 μ L di C₇H₁₃NO ($8,72 \cdot 10^{-4}$ mol) (rapporto polimero:isocianato 1:10) in 2 mL di DMF anidra.

Condizioni: la reazione avviene tramite riscaldamento a microonde con la stessa rampa della reazione Butilisocianato-1.

Conv = 23%; Mn = 30488 g/mol; Grammi ottenuti: 16 mg.

-Ottilisocianato C₉H₁₇NO (MW = 155,24 g/mol; $\rho = 0,88$ g/mL)



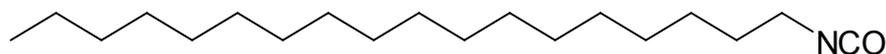
Reazione Ottilisocianato

Reagenti e solvente: 40 mg di PHMPMA ($1,74 \cdot 10^{-4}$ mol), 308 μ L di C₉H₁₇NO ($1,74 \cdot 10^{-3}$ mol) (rapporto polimero:isocianato 1:10) in 2 mL di DMF anidra.

Condizioni: la reazione avviene tramite riscaldamento a microonde con la stessa rampa della reazione Butilisocianato-1.

Conv = 23%; Mn = 31245 g/mol; grammi ottenuti: 31 mg.

-Decaottilisocianato C₁₉H₃₇NO (MW = 295,90 g/mol; $\rho = 0,847$ g/mL)



Reazione Decaottilisocianato

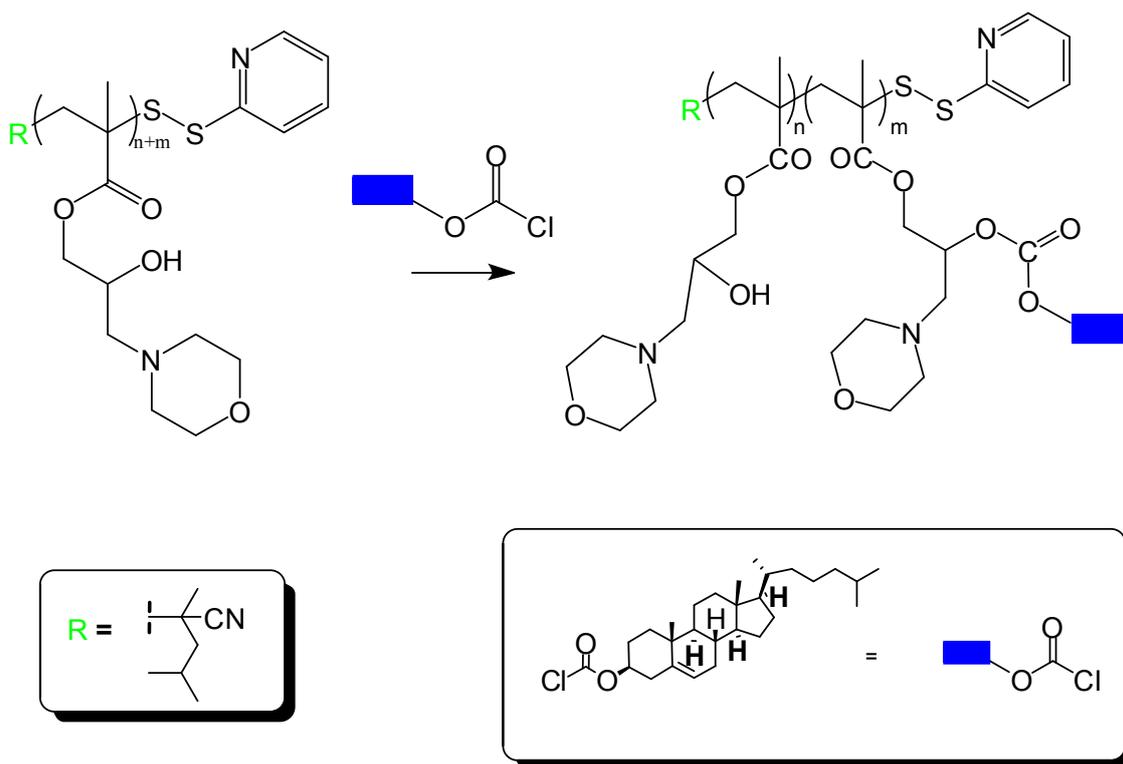
Reagenti e solvente: 50 mg di PHMPMA ($2,18 \cdot 10^{-4}$ mol), 760 μ L di $C_{19}H_{37}NO$ ($2,18 \cdot 10^{-3}$ mol) (rapporto polimero:isocianato 1:10) in 1,4 mL di CH_3Cl e 0,6 mL di DMF anidra.

Condizioni: la reazione avviene tramite riscaldamento a microonde con la stessa rampa della reazione Butilisocianato-1.

Conv 7%; $M_n = 29500$ g/mol; grammi ottenuti: 10 mg.

5.5.3 Trattamento con colesteril cloroformiato

(MW = 449,11 g/mol)



Reazione Col-1

Reagenti e solvente: 20 mg di PHMPMA ($8,72 \cdot 10^{-5}$ mol), 0,392 g di colesterilcloroformiato ($8,72 \cdot 10^{-4}$ mol) (rapporto polimero:colesterilcloroformiato 1:10) in 2 mL di DMF anidra. Dopo il microonde si aggiunge trietilammina 0,121 mL ($8,72 \cdot 10^{-4}$ mol).

Condizioni: la reazione avviene tramite riscaldamento a microonde con la stessa rampa della reazione Butilisocianato-1.

Conv = 30%; Mn = 42770 g/mol; grammi ottenuti: 16 mg.

Reazione Col-2

Reagenti e solvente: 40 mg di PHMPMA ($1,74 \cdot 10^{-4}$ mol), 7,8 mg di colesterilcloroformiato ($1,74 \cdot 10^{-5}$ mol) (rapporto polimero:colesterilcloroformiato 1:0,1) in 3 mL di CHCl_3 anidro. Al termine della reazione si scioglie in etere etilico e si aggiungono 0,10 mL di trietilammina (in eccesso).

Condizioni: la reazione avviene tramite riscaldamento convenzionale a $T = 60^\circ\text{C}$ per tutta la notte.

Conv = 10%; Mn = 32440 g/mol; grammi ottenuti: 24,5 mg.

Reazione Col-3

Reagenti e solvente: 40 mg di PHMPMA ($1,74 \cdot 10^{-4}$ mol), 4 mg di colesterilcloroformiato ($8,72 \cdot 10^{-6}$ mol) (rapporto polimero: colesterilcloroformiato 1:0,05) in 3 mL di CHCl_3 anidro.

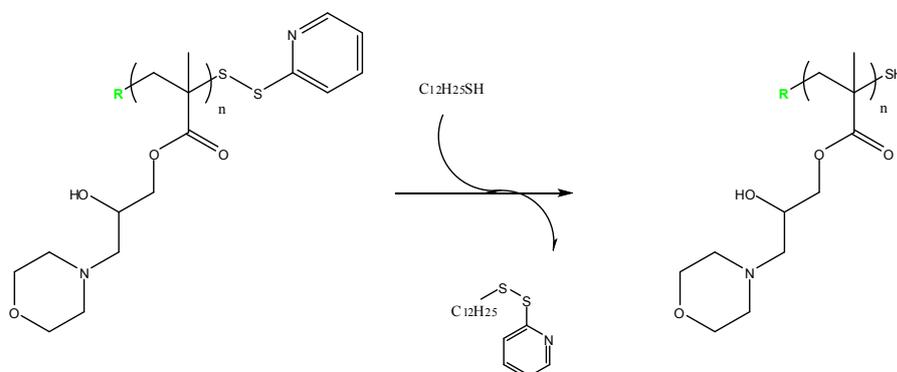
Condizioni: la reazione avviene tramite riscaldamento convenzionale a $T = 60^\circ\text{C}$ per tutta la notte.

Conv = 5%; Mn = 29050 g/mol; grammi ottenuti: 21 mg.

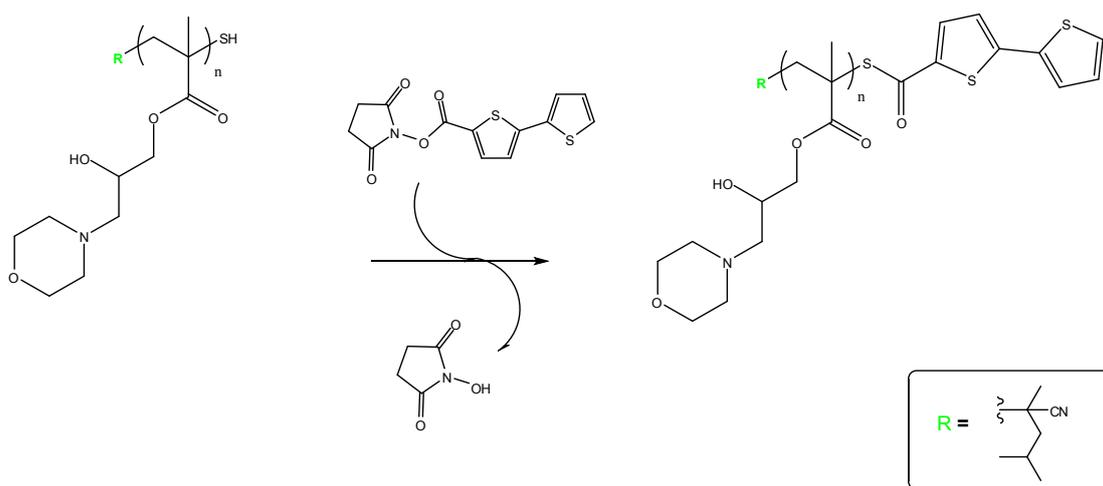
5.5.4 Trattamento con fluorofori

T2 = 2,5-diossipirrolidin-1-il-2,2'-ditiofene-5-carbossilato (MW = 307 g/mol)

1° STADIO



2° STADIO



Per queste reazioni si utilizza:

- dodecantiolo ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SH}$): MW = 202,40 g/mol; $\rho = 0,845$ g/mL

Reazione T2

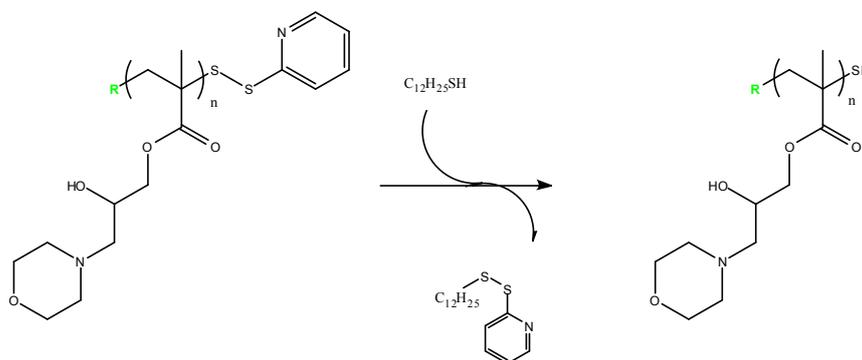
Reagenti e solvente: 5 mg di PHMPMA ($4,2 \cdot 10^{-7}$ mol), 1 equivalente di Na_2CO_3 ($4,2 \cdot 10^{-7}$ mol) 0,4 μL di dodecantiolo ($1,70 \cdot 10^{-6}$ mol), in 2 mL di DMF e 1 mL di H_2O . Dopo il primo step di riscaldamento si aggiungono 0,77 mg di T2 ($2,53 \cdot 10^{-6}$ mol) (rapporto polimero:dodecantiolo:base:fluoroforo 1:4:1:6).

Condizioni: la reazione avviene tramite riscaldamento a microonde in due step. Per entrambi gli step si è utilizzata la seguente rampa:

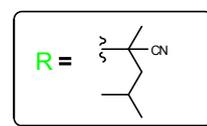
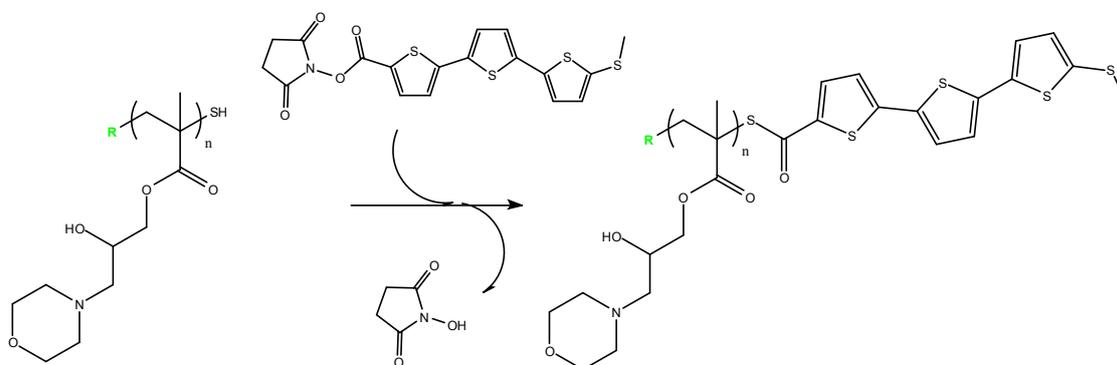
Tempo (min)	Potenza (W)	Temperatura (°C)
3	250	80
10	250	80

T3 = 5''-(metiltio)-2,2':5'.2''tertiofene-2,5-diossipirrolidin-1-il-2,2'-ditiofene-5-carbossilato (MW = 436 g/mol)

1° STADIO



2° STADIO



Reazione T3

Reagenti e solvente: 0,1g di PHMPMA ($8,4 \cdot 10^{-6}$ mol), 1,5 equivalenti di Na_2CO_3 , 11 μL di dodecantiolo ($4,62 \cdot 10^{-5}$ mol), in 2 mL di DMF e 1 mL di H_2O . Dopo il primo step di riscaldamento si aggiungono 29 mg di T3 ($6,72 \cdot 10^{-5}$ mol) (rapporto polimero:dodecantiolo:base:fluoroforo 1:5,5:1,5:8).

Condizioni: la reazione avviene tramite riscaldamento a microonde. È stata utilizzata la

rampa seguente:

Tempo (min)	Potenza (W)	Temperatura (°C)
3	250	80
10	250	80

Il procedimento di riscaldamento è stato ripetuto per quattro volte utilizzando sempre la stessa miscela di reazione. Dopo ogni step è stata prelevata un'aliquota che è stata analizzata mediante analisi GPC.

6. Bibliografia

1. Moad, G.; Solomon, D. H. *The Chemistry of Radical Polymerization*, 2nd ed.; Elsevier: Oxford, U.K., 2006; pp 1-9.
2. Moad, G.; Chiefari, J.; Krstina, J.; Postma, A.; Mayadunne, R. T. A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living free radical polymerization with reversible addition fragmentation chain transfer (the life of RAFT). *Polym. Int.* 2000, 49, 993–1001.
3. Moad, G.; Solomon, D. H. *The Chemistry of Radical Polymerization*, 2nd ed.; Elsevier: Oxford, U.K., 2006; pp 451-585.
4. Braunecker, W. A.; Matyjaszewski, K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 93–146.
5. Hawker, C. J.; Bosman, A. W.; Harth, E. New polymer synthesis by nitroxide mediated living radical polymerizations. *Chem. Rev.* 2001, 101, 3661–3688.
6. Studer, A.; Schulte, T. Nitroxide-mediated radical processes. *Chem. Rec.* 2005, 5, 27–35.
7. Nesvadba, P. N-Alkoxyamines: Synthesis, properties, and applications in polymer chemistry, organic synthesis, and materials science. *Chimia* 2006, 60, 832–840.
8. Kamigaito, M.; Ando, T.; Sawamoto, M. Metal-catalyzed living radical polymerization. *Chem. Rev.* 2001, 101, 3689–3745.
9. Matyjaszewski, K.; Xia, J. Atom transfer radical polymerization. *Chem. Rev.* 2001, 101, 2921–2990.
10. Le, T. P.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Polymerization with living characteristics. WO9801478, 1998 (Chem. Abstr. 1998, 128, 115390f).
11. Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living freeradical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfers: The RAFT process. *Macromolecules* 1998, 31, 5559–5562.
12. Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living radical polymerization by the RAFT process. *Aust. J. Chem.* 2005, 58, 379–410.
13. Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living radical polymerization by the RAFT process A first update. *Aust. J. Chem.* 2006, 59, 669–692.
14. Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Radical addition fragmentation chemistry in polymer synthesis. *Polymer* 2008, 49, 1079–1131.

15. Benaglia, M.; Alberti, A.; Giorgini, L.; Magnoni, F.; Tozzi, S. Poly(glycidyl methacrylate): a highly versatile polymeric building block for post-polymerization modifications. *Polym. Chem.* 2013, 4, 124.
16. A.B. Lowe, C.L. McCormick, Reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) radical polymerization and the synthesis of water-soluble (co)polymers under homogeneous conditions in organic and aqueous media, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 283–351.
17. S. Perrier, P. Takolpuckdee, Macromolecular design via reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT)/xanthates (MADIX) polymerization, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 43 (2005) 5347–5393.
18. K. Matyjaszewski, *Advances in Controlled/Living Radical Polymerization*, American Chemical Society: Washington, D.C., vol. 854, 2003.
19. Rizzardo, E.; Chen, M.; Chong, B.; Moad, G.; Skidmore, M.; Thang, S. H. RAFT polymerization: Adding to the picture. *Macromol. Symp.* 2007, 248, 104–116.
20. Chong, Y. K.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Skidmore, M. A.; Thang, S. H. RAFT polymerization of methyl methacrylate in the presence of Lewis acids: An approach to stereocontrolled living radical polymerization. *Macromolecules* 2007, 40, 9262–9271.
21. Chong, Y. K.; Krstina, J.; Le, T. P. T.; Moad, G.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Thiocarbonylthio compounds [S:C(Ph)S-R] in free radical polymerization with reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT polymerization). Role of the free-radical leaving group (R). *Macromolecules* 2003, 36, 2256–2272.
22. Benaglia, M.; Rizzardo, E.; Alberti, A.; Guerra, M. Searching for more effective agents and conditions for RAFT polymerization of MMA: Influence of dithioester substituents, solvent and temperature. *Macromolecules* 2005, 38, 3129–3140.
23. Buback, M.; Vana, P. Mechanism of dithiobenzoate-mediated RAFT polymerization: A missing reaction step. *Macromol. Rapid Commun.* 2006, 27, 1299–1305.
24. Moad, G.; Chiefari, J.; Moad, C. L.; Postma, A.; Mayadunne, R. T. A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Initiating free radical polymerization. *Macromol. Symp.* 2002, 182, 65–80.

25. Perrier, S.; Barner-Kowollik, C.; Quinn, J. F.; Vana, P.; Davis, T. P. Origin of inhibition effects in the reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of methyl acrylate. *Macromolecules* 2002, 35, 8300–8306.
26. Quinn, J. F.; Rizzardo, E.; Davis, T. P. Ambient temperature reversible addition fragmentation chain transfer polymerisation. *Chem. Commun.* 2001, 1044–1045.
27. McLeary, J. B.; McKenzie, J. M.; Tonge, M. P.; Sanderson, R. D.; Klumperman, B. Initialisation in RAFT-mediated polymerisation of methyl acrylate. *Chem. Comm* 2004, 1950–1951.
28. Rizzardo, E.; Chiefari, J.; Mayadunne, R. T. A.; Moad, G.; Thang, S. H. Synthesis of defined polymers by reversible addition fragmentation chain transfer. *ACS Symp. Ser.* 2000, 768, 278–296.
29. Chakravarthy S. Guidipati; Maureen B.H. Tan; Hazrat Hussain; Chaobin He; Ye Liu. Synthesis of Poly(glycidyl methacrylate)-block-Poly(pentafluorostyrene) by RAFT: Precursor to Novel Amphiphilic Poly(glyceryl methacrylate)-block-Poly(pentafluorostyrene).
30. Songrui Y.; Jianxin C.; Ruijiao D.; Yue S.; Bing J.; Yongfeng Z.; Xinyuan Z.; Deyue Y. Enhanced gene transfection efficiency of PDMAEMA by incorporating hydrophobic hyperbranched polymer cores: effect of degree of branching. *Polym. Chem.* 2012,
31. J.-F. Gohy, *Adv. Polym. Sci.*, 2005, 190, 65.
32. G. S. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, Y. Sakurai and K. Kataoka, *Langmuir*, 1993, 9, 945.
33. Blanazs A.; Armes P. S.; Ryan J. A. Self assembled block copolymer aggregates: from micelles to vesicles and their biological applications. *Macromol. Rapid Commun.*, 2009, 30, 267-277