

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 nanosistemi
biocompatibili per drug delivery nel
trattamento dell'Alzheimer

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Elisabetta Campodoni

RELATORE

Chiar.mo Prof. Mauro Comes Franchini

CORRELATORE

Dott.ssa Erica Locatelli

Sessione I

Anno Accademico 2013-2014

INDICE

1. Introduzione

1.1. Nanotecnologia e nanomedicina

1.1.1. Drug delivery

1.1.2. Target attivi e passivi

1.1.3. Modi di somministrazione

1.2. Nanoneuromedicina

1.3. Alzheimer's disease

1.3.1. Liraglutide

1.3.2. Magnesio

1.3.3. Nanoparticelle di Ferro

1.4. Sistemi nanostrutturati per drug delivery

1.4.1. Nanoparticelle polimeriche

1.4.2. Polimeri di partenza

1.4.3. Modi di formazione delle nanoparticelle

2. Obiettivi della ricerca

3. Discussione dei risultati

3.1. Sintesi

3.1.1. Sintesi dei leganti organici

3.1.1.1. Sintesi del legante etil-12-(idrossammino)-12-ossododecanoato

3.1.1.2. Sintesi del legante N-(3,4-diidrossifenetil)dodecanammide

3.1.2. Sintesi di copolimeri

3.1.2.1. Sintesi del polimero PLGA-b-PEG-NH₂

3.1.2.2. Sintesi del polimero PLGA-b-PEG-COOH

3.1.3. Sintesi delle nanoparticelle metalliche

3.1.3.1. Sintesi delle nanoparticelle di magnesio (MgNPs)

3.1.3.2. Sintesi delle nanoparticelle di magnetiti (Fe₃O₄NPs)

3.2. Nanosistemi per drug delivery

3.2.1. Sistemi contenenti liraglutide

- 3.2.1.1. *Incapsulamento di liraglutide in micelle polimeriche: water-oil-water*
- 3.2.1.2. *Formazione di lir@PNPs_WGA tramite reazione di coniugazione*
- 3.2.2. Sistemi contenenti magnesio
 - 3.2.2.1. *Reazione di scambio di legante: formazione di nanoparticelle di magnesio lipofiliche*
 - 3.2.2.2. *Incapsulamento di MgNPs-2 in micelle polimeriche: oil-in-water*
- 3.2.3. Sistemi contenenti magnetiti
 - 3.2.3.1. *Incapsulamento di magnetite in micelle polimeriche: water-oil-water*
 - 3.2.3.2. *Reazione di scambio legante: formazione di magnetiti lipofiliche*
 - 3.2.3.3. *Incapsulamento di magnetiti lipofiliche in micelle polimeriche: oil-in-water*
 - 3.2.3.4. *Incapsulamento di liraglutide e magnetiti lipofiliche in micelle polimeriche: water-oil-water*

4. Studi biologici

5. Conclusioni

6. Parte sperimentale

6.1. Note generali

6.2. Sintesi di leganti

6.2.1. Sintesi del legante etil-12-(idrossammino)-12-ossododecanoato

6.2.1.1. *Sintesi di etil-12-idrossidodecanoato*

6.2.1.2. *Sintesi dell'acido 12-etossi-12-ossododecanoico*

6.2.1.3. *Sintesi di etil-12-(idrossammino)-12-ossododecanoato*

6.2.2. Sintesi del legante N-(3,4-diidrossifenetil)dodecanammide

6.3. Sintesi di copolimeri

6.3.1. Sintesi del polimero PLGA-b-PEG-COOH

6.3.1.1. *Sintesi del PLGA-NHS*

6.3.1.2. *Sintesi del polimero PLGA-b-PEG-COOH*

6.3.2. Sintesi del polimero PLGA-b-PEG-NH₂

6.4. Sintesi di nanoparticelle metalliche

6.4.1. Sintesi di nanoparticelle di magnesio (MgNPs)

6.4.2. Sintesi di nanoparticelle di magnetiti ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$)

6.5. Nanosistemi per drug delivery

6.5.1. Sistemi contenenti liraglutide

6.5.1.1. *Incapsulamento di liraglutide in micelle polimeriche: water-oil-water*

6.5.1.2. *Formazione di lir@PNPs_WGA tramite reazione di coniugazione*

6.5.2. Sistemi contenenti magnesio

6.5.2.1. *Reazione di scambio di legante: formazione di nanoparticelle di magnesio lipofiliche*

6.5.2.2. *Incapsulamento di MgNPs-2 in micelle polimeriche: oil-in-water*

6.5.3. Sistemi contenenti magnetiti

6.5.3.1. *Incapsulamento di magnetiti lipofiliche in micelle polimeriche: water-oil-water*

7. Ringraziamenti

8. Schede di sicurezza

9. Bibliografia

ABSTRACT

Le nanoparticelle polimeriche offrono grandi vantaggi nella nanomedicina in quanto fungono da carrier per il *drug delivery* e possono essere molto utili per le malattie ancor oggi difficili da trattare quali le neurodegenerative come l'Alzheimer.

In questo progetto di tesi sono stati creati nanocarrier polimerici utilizzando come polimero un copolimero a blocchi anfifilico noto come PLGA-*b*-PEG: con varie tecniche si sono ottenute micelle polimeriche nelle quali sono stati intrappolati come principi attivi sia un farmaco, il liraglutide, sia nanoparticelle di magnesio; il primo può ridurre le placche β -amiloidee, tipiche cause dell'Alzheimer, mentre le seconde possono aumentare la plasticità sinaptica anch'essa legata all'Alzheimer. Inoltre è stato sintetizzato e intrappolato anche un promettente agente diagnostico, ovvero nanoparticelle di ferro, utile per aumentare la sensibilità di tecniche di imaging quali MRI e per la rivelazione precoce di malattie. Tutti i sistemi sono stati caratterizzati con tecniche specifiche per valutare i parametri chiave quali dimensione, polidispersità, carica superficiale e concentrazione dei componenti e successivamente sono state utilizzate per studi biologici effettuati da collaboratori esterni.

Tutto questo ha come obiettivo futuro la creazione di un carrier teranostico che racchiuderà al suo interno l'agente terapeutico e l'agente diagnostico per combinare i due effetti principali in un unico carrier.

ABSTRACT

Polymeric nanoparticles offer great advantages in Nanomedicine since they act as a carrier for drug delivery purpose, thus they result very useful for untreatable diseases such the neurodegenerative ones, like Alzheimer's disease.

In this project polymeric nanocarriers constituted of an amphiphilic block co-polymer, known as PLGA-b-PEG, were created: by using various techniques polymeric micelles, which contain a drug, lyraglutide, or magnesium nanoparticles, were obtained; the first one aims to reduce β -amyloid plaques, typical causes of Alzheimer's disease, while the second ones to increase the synaptic plasticity also related to Alzheimer's disease. Moreover iron nanoparticles were also synthesized and entrapped since they are a promising diagnostic agent, useful for increasing the sensitivity of common imaging techniques such as MRI, thus for early detection of diseases. All systems were characterized with specific techniques in order to evaluate the key parameters such as size, polydispersity, surface charge and concentration of the components. These micelles were later used for biological studies carried out by external consultants.

The future objective of this research would be the creation of a theranostic carrier that encloses both the therapeutic agent and the diagnostic agent for combining the two main effects in a single carrier.

1. Introduzione

1.1 Nanotecnologia e nanomedicina

Le nanotecnologie rappresentano negli ultimi anni un settore di punta della ricerca scientifica grazie agli svariati campi in cui possono essere impegnate. La National Nanotechnology Initiative (NNI) nel 2000 le ha definite così: *“Nanotecnologia è lo studio e il controllo della materia alle dimensioni comprese tra 1 e 100 nm, dimensioni alle quali avvengono fenomeni che sono in grado di conferire ai materiali proprietà fisiche, chimiche e biologiche uniche e completamente diverse da quelle della materia di base”*.¹ Nella vita quotidiana sono già presenti moltissimi prodotti con almeno un componente di dimensioni nanometriche, come per esempio vernici, cosmetici, hard disk, farmaci.²

La ricerca sulle nanotecnologie è in continuo sviluppo in quanto moltissimi campi sfruttano la variazione delle proprietà dei materiali comuni quando divengono nanoparticellari come ad esempio l'elevatissimo rapporto area superficiale/volume da cui deriva una prevalenza dei fenomeni interfacciali; tutto ciò porta a proprietà fisiche, chimiche, elettriche, magnetiche ed ottiche diverse e uniche da materiale a materiale. L'elevata reattività e i loro comportamenti le rendono disponibili a moltissime applicazioni, in particolare nel campo della nanomedicina.³



Figura 1: la scala delle cose. Adattata da www.nano.gov

Ed è proprio la nanomedicina, ovvero l'applicazione dei vantaggi e delle scoperte delle nanotecnologie in ambito medico, uno dei campi più promettenti della nanotecnologia. In questo settore negli ultimi decenni sono già stati sviluppati con

successo biosensori, nanomateriali per applicazioni biomediche ed in generale nanomateriali simultaneamente utili in entrambi i campi principali della nanomedicina: il campo diagnostico e il campo terapeutico.¹

In particolare, in campo diagnostico si studia l'utilizzo di nanosistemi per la diagnosi precoce e per l'identificazione della predisposizione a determinate malattie grazie, ad esempio, a sistemi fluorescenti o a sistemi magnetici che sfruttano poi tecniche di imaging, quali la Risonanza Magnetica per Immagini (MRI). In campo terapeutico invece, si studia l'utilizzo di nanostrutture capaci di intrappolare, proteggere e trasportare farmaci comuni all'interno del corpo potendo avere, in questa maniera, ottimi risultati terapeutici con sistemi non invasivi e privi di effetti collaterali applicabili per esempio nella cura di tumori maligni.²

Ma il campo più innovativo, e forse più sorprendente della nanomedicina, è quello della cosiddetta teranostica (fusione del termine terapeutica e diagnostica) nel quale si cerca di sintetizzare sistemi nanostrutturati che possano accogliere al loro interno contemporaneamente farmaci a scopo terapeutico e nanoparticelle a scopo diagnostico andando così ad ottenere un unico sistema in grado di soddisfare i due più importanti aspetti della medicina classica.

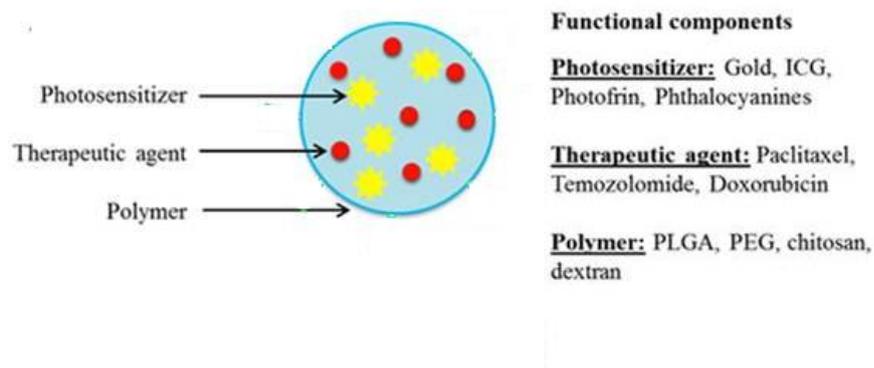


Figura 2: schematica rappresentazione di una nanoparticella a scopo teranostico. Adattata da J. U. Menon et al; *Theranostic*; 2013; 3; 3; 152-166.

Un esempio di sistema teranostico è stato sviluppato da MAG Nanotechnologies AG, un'azienda tedesca che sviluppa principalmente sistemi contro il cancro, e che utilizza, nanoparticelle di ferro ricoperte da uno zucchero e le inietta in un

corpo affetto da cancro, queste vengono inglobate molto più velocemente e maggiormente dalle cellule tumorali rispetto a quelle sane e, applicando un campo magnetico esterno, queste aumentano la loro temperatura oltre 70 °C e bruciano distruggendo le cellule tumorali.⁴

In ambito medico e farmaceutico le nanoparticelle polimeriche si stanno sempre più affermando come sistemi capaci di intrappolare farmaci e altri agenti per poi rilasciarli in corpo. Esse sono definite come particelle solide colloidali con dimensioni comprese tra 1 e 1000 nm che possono essere usate terapeuticamente come trasportatori di farmaci e nelle quali il principio attivo può essere dissolto, intrappolato o incapsulato.⁵

Per la loro dimensione e per la loro idrofilicità le nanoparticelle polimeriche possono essere trasportate col flusso sanguigno, penetrare negli organi attraverso i capillari e raggiungere i tessuti dove poi sono assorbite dalle cellule.⁶

1.1.1. Drug delivery

Il termine drug delivery descrive il trasporto del farmaco selettivamente sul sito di interesse ad opera di un sistema nanostrutturato o meno, che ha come obiettivo il trasporto controllato al sito d'azione ad una velocità ottimale e nel modo più efficiente possibile. Questo non solo aumenta l'efficacia terapeutica, ma permette anche una riduzione della dose totale del farmaco con conseguente riduzione degli effetti collaterali.

Per ottenere un buon dispositivo di drug delivery bisogna controllare ed ottimizzare il caricamento ed il rilascio del farmaco; il primo si ottiene per incorporamento all'interno della nanoparticella o per legame covalente o per legame elettrostatico o ancora per adsorbimento sulla superficie di un dato principio farmaceutico; mentre il rilascio in corpo, che in genere è piuttosto rapido, avviene invece per desorbimento dalla superficie o diffusione attraverso le nanoparticelle o erosione della matrice, o entrambi diffusione ed erosione.³

I sistemi di drug delivery possono essere vari: i più utilizzati sono quelli mostrati in figura 3 e si differenziano o per il metodo di formazione o per i componenti presenti; essi si classificano come:

- A) Polimero coniugato al farmaco;
- B) Nanoparticella polimerica;
- C) Nanoparticella solida lipidica;
- D) Dendrimerico;
- E) Liposoma;
- F) Micella;
- G) Nanoparticella d'oro;
- H) Nanotubo di carbonio.

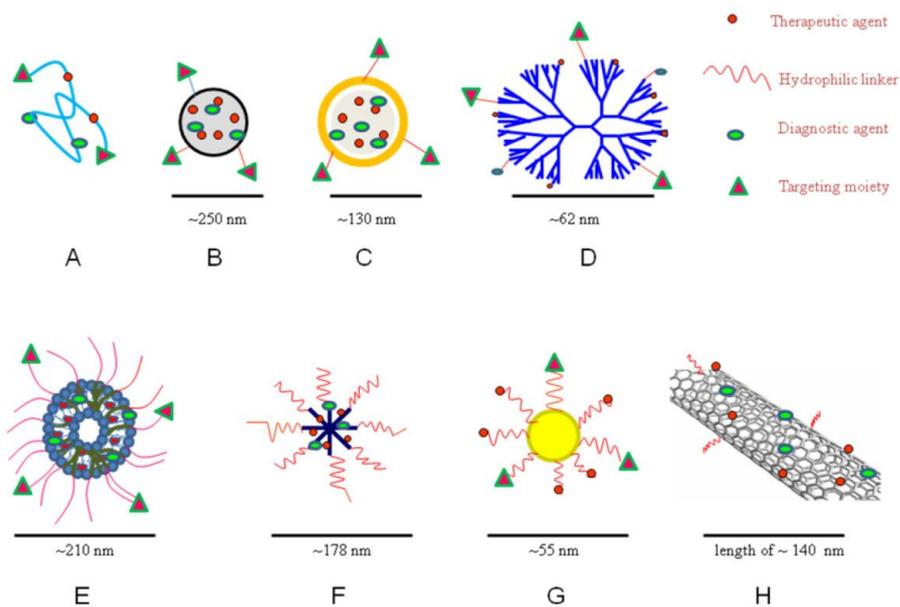


Figura 3: vari esempi di nanosistemi per il drug delivery. Da M.S.Muthu et al; *Theranostic*; 2014; 4; 6; 660-677.

1.1.2. Target attivo e passivo

È importante valutare, una volta somministrate le nanoparticelle, la biodistribuzione di esse nel corpo, ovvero organi e tessuti nei quali queste vengono a trovarsi dopo un dato tempo di attesa. La biodistribuzione può essere diversa se si lascia la nanoparticella tal quale (target passivo) o se la si funzionalizza sulla superficie con un agente di target (target attivo).

Il target passivo viene anche chiamato effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (*Enhanced permeability and retention, EPR*): esso sfrutta la

tendenza naturale delle particelle ad accumularsi in alcune parti del corpo, in particolare nei tumori o nei tessuti infiammati che possiedono ipervascolarizzazione e scarso drenaggio linfatico. L'effetto EPR, infatti, si basa su due fattori: il primo sfrutta il fatto che l'endotelio attorno ai vasi sanguigni nel tumore è spesso molto discontinuo e permette così il passaggio di grandi particolati, mentre il secondo fattore si basa sul fatto che nei tumori non esiste il drenaggio linfatico che normalmente rimuoverebbe questi particolati i quali dunque, come effetto globale, possono accumularsi e rimanere nei tessuti malati per un tempo maggiore rispetto a quelli sani. Affinchè l'effetto EPR si manifesti, però, le nanoparticelle devono rimanere abbastanza a lungo nella circolazione sanguigna da raggiungere il tumore senza essere rimosse prima dai macrofagi, poiché riconosciute come agenti estranei dal sistema immunitario. Bisogna quindi inibire il fenomeno dell'opsonizzazione ossia il riconoscimento da parte dell'organismo e in particolare dal sistema reticoloendoteliale (RES) del corpo estraneo; esso avviene tramite la ricopertura di questo corpo estraneo per opera di componenti specifici del sangue, quali le opsonine, con successiva eliminazione da parte dei macrofagi. Per evitare l'opsonizzazione molti studi hanno dimostrato che è possibile ricoprire i nanosistemi con il polietilenglicole (PEG) ad una concentrazione almeno dello 0,1%, ma in ogni caso il target passivo rimane poco efficace proprio a causa della sua non specificità verso i tessuti malati.^{3,4}

Il target attivo, invece, offre la possibilità di far legare le nanoparticelle solo a siti specifici delle cellule malate; in questo modo si massimizza la concentrazione di farmaco sul sito d'interesse e si riduce la distribuzione di esso in altre parti del corpo e, di conseguenza, gli effetti collaterali.⁴

Per ottenere un target attivo è possibile operare in vari modi come per esempio alterare la carica superficiale delle nanoparticelle oppure incorporare nanoparticelle magnetiche nella matrice polimerica e 'spostarle' nel corpo grazie all'utilizzo di un campo magnetico esterno, una soluzione tecnologica questa che ha già avuto un certo impatto in campo medico.

Ma la tecnica più utilizzata per il target attivo è quella di legare sulla superficie della nanoparticella un agente che interagisce con recettori

specifici o che viene riconosciuto dai tumori stessi: questi agenti possono essere peptidi, proteine, oligonucleotidi, anticorpi monoclonali.³

Per legare questi leganti sulla superficie si possono utilizzare svariate tecnologie: quella più promettente è la possibilità di legare covalentemente e non elettrostaticamente questi agenti alla matrice polimerica sfruttando gruppi funzionali superficiali e reazioni classiche della chimica organica. La più comune è la reazione di coupling tra un acido carbossilico e un'ammina, gruppi in genere abbondanti su proteine e peptidi.

Per quest'ultima tecnica si utilizza (1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide (EDC), che è un ottimo reagente di coupling per questa reazione perché lavora molto bene in acqua (solvente tipico in cui sono disperse le nanoparticelle) e che può essere usato insieme alla sulfo-N-idrossisuccinimide (sulfo-NHS), per aumentare l'efficienza di coupling.⁴

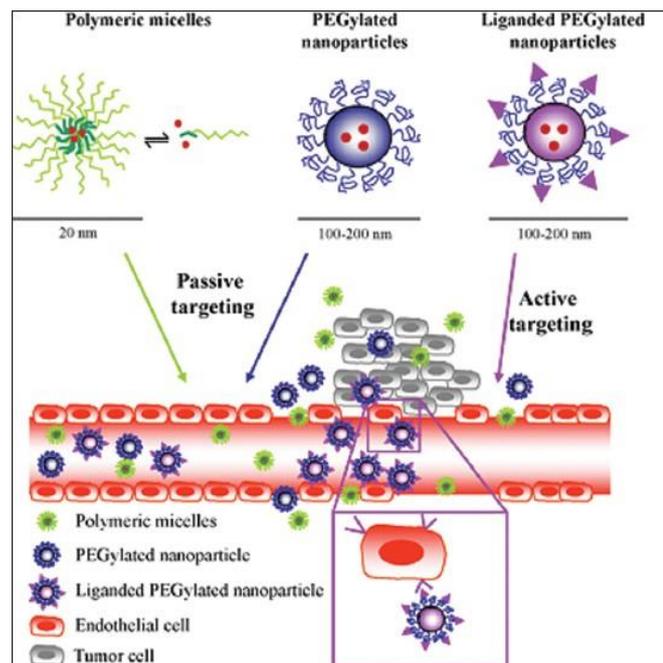


Figura 4: target attivo e target passivo a confronto. Da N.M.Dand et al; *Chronicles of Young Scientists*; 2013; 4; 2; 94-101.

1.1.3. Modi di somministrazione

La somministrazione è il processo per il quale un farmaco raggiunge il sito d'azione; in base alla via di somministrazione si può avere un effetto topico, se l'applicazione avviene sulla parte interessata o in prossimità della zona da trattare, oppure un effetto sistemico che prevede che il farmaco entri nel sistema circolatorio e sia poi distribuito nel sito d'azione che può essere anche lontano dal sito di somministrazione.

Tra le varie modalità di somministrazione la più comune è l'iniezione intravenosa, con la quale le nanoparticelle sono immesse direttamente nella circolazione sanguigna; purtroppo con questa tecnica, la maggior parte delle nanoparticelle (60-90%) viene cattura dal fegato, principale organo del RES; al contrario l'iniezione intramuscolare o sottocutanea ha un effetto topico, in quanto le nanoparticelle rimangono nel sito di iniezione e meno dell'1% va in circolo nel corpo.

Con la somministrazione orale la più alta concentrazione di nanoparticelle dopo poco tempo si trova nel fegato, nei reni, nei muscoli e nel midollo osseo, ma le proprietà di superficie e le dimensioni giocano un ruolo fondamentale nello schema di assorbimento da parte dell'intestino tenue.

Tra i vari modi di somministrazione quello intranasale sta avendo grande interesse soprattutto per malattie del cervello, organo dove si trova la barriera emato-encefalica (BEE) che rappresenta un ostacolo molto difficile da superare per le nanoparticelle e in generale per tutti i tipi di farmaci.⁷

La barriera emato-encefalica si trova tra cervello e circolazione sanguigna ed ha la funzione di proteggere tutto il sistema nervoso da agenti esterni patogeni. Essa ha origine dal basso numero di pori di membrana, dalle giunzioni strette tra le cellule endoteliali dei capillari vicine tra loro e dalla presenza di trasportatori che rimuovono qualsiasi farmaco entri nelle cellule endoteliali; tra queste ci sono soprattutto gli astrociti, uno dei vari tipi di cellule presenti nel sistema nervoso centrale (CNS) che costituiscono la glia.⁸

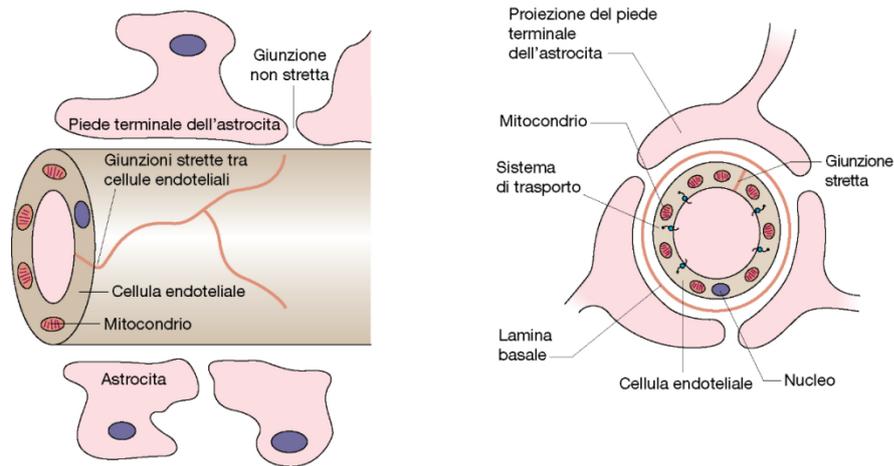


Figura 5: rappresentazione della barriera emato-encefalica; Da www.elsevier.it

La via di somministrazione intranasale è così studiata poiché si è osservato che si verificano due effetti contemporaneamente: da una parte si ha un accesso diretto dal naso al cervello tramite il sistema olfattorio, dall'altra si ha un trasporto delle nanoparticelle al cervello attraverso la BEE dopo essere entrate nel circolo sanguigno, ma il primo effetto è molto più elevato rispetto al secondo.⁵

Inoltre l'incorporazione di farmaci in nanoparticelle permette la loro protezione dalla degradazione ad opera delle ciglia nelle cavità nasali e il trasporto di essi attraverso le barriere della mucosa.

Per ottimizzare ancora di più il passaggio delle nanoparticelle al cervello alcuni ricercatori hanno recentemente scoperto che è possibile funzionalizzare le nanoparticelle con una lectina come la Wheat germ agglutinin (WGA): essa è una proteina che riconosce specificamente una molecola di zucchero e quindi, è capace di legare la componente glicosilata delle mucose olfattive. La WGA in particolare si lega al N-acetil-D-glucosammina e all'acido sialico, entrambi presenti in grosse concentrazioni nella cavità nasale, permettendo un forte aumento di ancoraggio delle nanoparticelle alla mucosa nasale e, di conseguenza, un aumento dell'assorbimento di farmaco nel cervello. I risultati ottenuti da questi ricercatori sono di seguito riassunti:

- La WGA legata covalentemente alle nanoparticelle rimane ancorata anche una volta *in vivo* sulla superficie delle stesse grazie alla

formazione di un legante tioestereo stabile tra il residuo cisteinico della WGA e il residuo carbossilico del PLGA-*b*-PEG-COOH, legame che non è soggetto alla rottura *in vivo* al contrario di un ponte disolfuro.

- Dopo amministrazione intranasale della WGA non è stata osservata nessuna modifica nella morfologia o nella struttura delle ciglia nasali; ciò suggerisce la biocompatibilità di questa molecola nell'organismo e in particolare nella mucosa nasale.
- Grazie all'incorporazione di 6-coumarin nelle nanoparticelle si è osservato che la concentrazione nel sangue di questa molecola risulta 1,4 volte maggiore rispetto alle nanoparticelle non modificate con WGA e la concentrazione nel cervello risulta ben 2 volte maggiore.

Tutto ciò permette di evidenziare come la WGA legandosi al N-acetil-D-glucosamina permette un tempo di permanenza maggiore delle nanoparticelle sulla mucosa e, di conseguenza, una maggior concentrazione assorbita nel sangue e nel cervello.

Come si può osservare la via intranasale offre molti vantaggi rispetto alle altre ed è per questo che molti gruppi di ricerca studiano e analizzano principalmente questa via.⁹

1.2. Nanoneuromedicina

La nanoneuromedicina racchiude le attività di ricerca basate sullo studio delle malattie del sistema nervoso centrale (CNS), sia per arrestare la malattia sia per aumentare le funzioni del CNS. Essa comprende molti campi diversi di studio che promuovono lo sviluppo di nanoformulazioni ma anche agenti di targeting specifici per le cellule e per i siti dei neuroni lesionati o il passaggio attraverso la barriera emato-encefalica.⁶

La presenza di materiali terapeutici o farmaci, però, condiziona l'ambiente del CNS in quanto possono dare tossicità o danneggiare il sistema stesso. Per prevenire o trattare ciò la nanotecnologia ha permesso di ridurre la tossicità, di migliorare il targeting per i tumori e di alleviare le malattie neurodegenerative impedendo la morte cellulare, monitorando tutto questo in tempo reale.¹⁰

Sono stati studiati molti sistemi per drug o gene delivery come sensori, nanoparticelle o nanosfere, ma pochi di questi sono stati sviluppati a pieno e testati clinicamente con l'obiettivo di prevenire l'aggregazione di composti insolubili, indurre la riparazione neuronale, migliorare la diagnostica o migliorare il trasporto attraverso la barriera emato-encefalica.

In questo campo della nanomedicina si valuta soprattutto la formulazione di farmaci che migliori sia la farmacocinetica, che studia quantitativamente l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione dei farmaci, sia la farmacodinamica, che studia gli effetti biochimici e fisiologici dei farmaci sull'organismo e il loro meccanismo d'azione; inoltre si cerca di migliorare la permanenza nel sistema e la riduzione degli effetti collaterali per aumentare l'efficacia del farmaco.⁷

Poter utilizzare la nanotecnologia nella neuroscienza dà alcuni vantaggi perché permette di agire sulle cellule neuronali a livello molecolare; infatti, la possibilità di utilizzare farmaci, nanoparticelle, neurotrasmettitori e piccole molecole per lo sviluppo neuronale permette di creare dispositivi idonei e specifici per molte applicazioni.¹¹

Il campo della nanoneuroscienza racchiude sia discipline diagnostiche sia terapeutiche; nel primo caso si utilizzano come tecniche la tomografia ad emissione di positroni (PET), che produce bio-immagini grazie all'iniezione di un radioisotopo con un tempo di vita molto breve e l'MRI che permette una rapida valutazione grazie all'utilizzo di agenti di contrasto che devono possedere caratteristiche magnetiche; ad esempio le nanoparticelle di ferro, possono rappresentare agenti di contrasto alternativi e migliori dei classici in commercio poiché oltre alla caratteristica di imaging possono anche veicolare un terapeutico al cervello per attrazione magnetica.

Tra le varie malattie del CNS, in particolare si stanno studiando molto le malattie neurodegenerative, che comprendono Alzheimer (AD), che tratteremo nel capitolo seguente, Parkinson (PD), Sclerosi amiotrofica laterale (ALS), Sclerosi multipla (MS).⁷

1.3. Alzheimer's disease

I malati di AD sviluppano deficit cognitivi che comprendono l'alterazione della memoria, disorientamento e cambi di personalità. Tutto ciò diminuisce la qualità della vita del paziente; in particolare la forma più comune di Alzheimer è quella in tarda età che viene chiamata Late Onset Alzheimer's Disease (LOAD). Le cause dell'Alzheimer non sono ancora del tutto chiare e soprattutto sono più di una, ma ciò che si osserva in tutti i pazienti a livello microscopico è la presenza di depositi anormali di proteine tra cui le placche neuronali senili (SNPs), aggregati insolubili di β -amiloidi, e i grovigli neurofibrillari (NFTs).¹²

I β -amiloidi, di per sé, sono solubili, ma la loro accumulazione porta ad oligomeri tossici che, a cascata, provocano una serie di effetti come la disfunzione sinaptica che causa la perdita delle funzioni cognitive.¹³

Gli aggregati derivano dalla rottura ad opera dell'enzima secretasi, dell'*Amyloid Precursor Protein* (APP) una proteina transmembrana costituita da 770 amminoacidi nota proprio per essere il precursore dei β -amiloidi. L'APP subisce due processi di rottura ben differenti grazie a due tipi diversi di enzimi secretasi: il primo porta alla formazione di un prodotto solubile e non tossico (α -amiloidi), il secondo porta ad un prodotto tossico e non solubile (β -amiloidi).

I β -amiloidi a loro volta, si trovano in due forme che si differenziano per il numero di amminoacidi che li compongono: $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$; la seconda specie ha maggior tendenza ad aggregare ed infatti nei malati di AD il rapporto $A\beta_{40}:A\beta_{42}$ tende ad aumentare. La conseguenza è una serie di effetti neurotossici che portano alla disfunzione sinaptica e alla morte neuronale.¹¹

Nei malati di Alzheimer si osserva inoltre anche una perdita della cosiddetta plasticità sinaptica. La plasticità sinaptica è la capacità del sistema nervoso di modificare l'intensità delle relazioni interneuronali, tramite sinapsi, instaurandone nuove e eliminandone altre. È stato sperimentalmente osservato che l'aumento di memoria e apprendimento è direttamente proporzionale al potenziamento della plasticità sinaptica.¹⁴

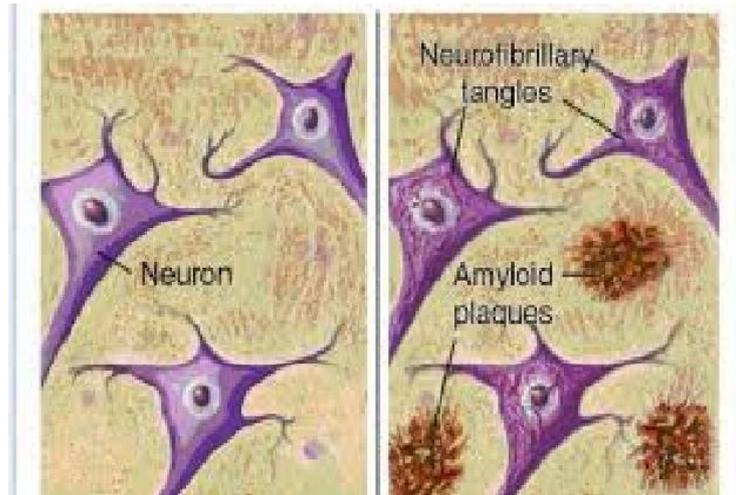


Figura 6: placche neuronali senili e grovigli neurofibrillari. Da www.theadplan.com

Le malattie neurodegenerative e in particolare l'Alzheimer sono ancora in fase di studio: ad esempio si stanno investigando le cause scatenanti la malattia e, quello che si è per ora osservato, è che ci sono più fattori che influiscono nello sviluppo della malattia; per questo motivo molti gruppi di ricerca stanno lavorando su diversi fronti per uno scopo comune.

In particolare quello che si cerca di fare è diminuire la formazione dei β -amiloidi, che portano alle placche senili, e contemporaneamente aumentare la rimozione di essi,¹¹ ad esempio utilizzando nanostrutture con affinità per i β -amiloidi, che permettono la cattura di essi, il loro trasporto fino al sangue e il reindirizzamento verso i macrofagi per la loro distruzione.¹²

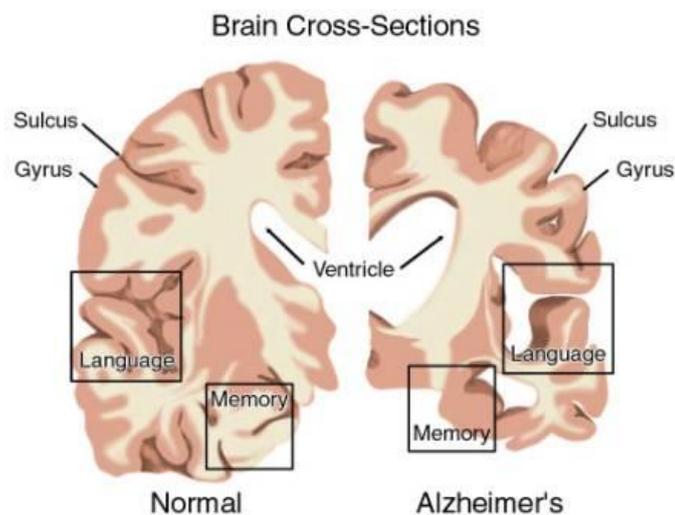


Figura 7: confronto tra un cervello sano ed uno con l'Alzheimer. Da www.codacons.it

1.3.1. Liraglutide

Una delle scoperte più importanti degli ultimi decenni è stata, però, la correlazione tra insorgenza di AD e livelli di insulina nel sangue, cosa che ha spinto molti gruppi di ricerca ad investigare questo aspetto; in particolare, alcuni centri di ricerca si sono soffermati su un farmaco già usato contro il diabete mellitico di tipo II, ovvero il liraglutide. Il liraglutide è un glucagone, ormone peptidico che permette il controllo dei livelli di glucosio nel sangue, di tipo peptide-1, (GLP-1) a lunga azione sviluppato per il trattamento del diabete di tipo 2; questo farmaco è stato approvato dall'EMA (Agenzia europea per i medicinali) il 3 luglio 2009 e dalla FDA (Food and Drug Administration) il 25 gennaio 2010.¹⁵ Gli analoghi del GLP-1 rappresentano una nuova classe di farmaci contro il diabete che mimano gli effetti dei due ormoni secretati da alcune cellule nello stomaco che sono il GLP-1 e il GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide). Le funzioni principali di questi farmaci sono stimolare la secrezione di insulina, sopprimere la produzione epatica di glucosio e rallentare lo svuotamento gastrico. Al momento solo due farmaci sono stati approvati, il liraglutide e l'exenatide; il primo è migliore in quanto si somministra una sola volta al giorno, evita l'aumento di peso ed è molto simile al GLP-1 umano come si può notare in fig.8.¹⁶

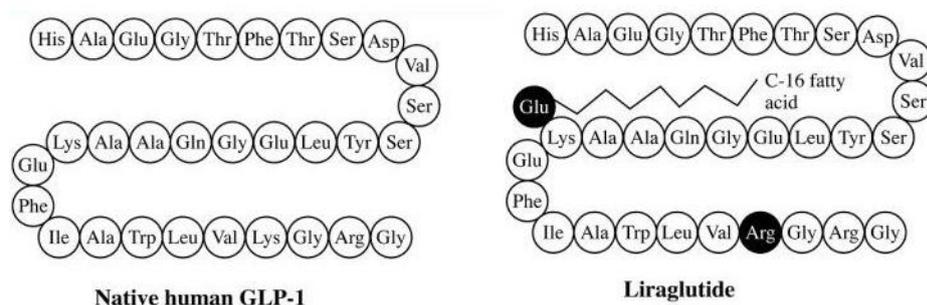


Figura 8: confronto tra GLP-1 umano e liraglutide. Adattato da S. R. Drab; Incretin-Based Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: Current Status and Future Prospects; Pharmacotherapy; 2010; 30(6); 609-624.

Sono due le differenze con il GLP-1 umano: l'aggiunta di un acido grasso a 16 atomi di carbonio (acido palmitico) legato per mezzo di un residuo

glutammato alla lisina in posizione 26, e la sostituzione di una lisina con un'arginina in posizione 34. Grazie a queste uniche due differenze il liraglutide ha un'omologia con il GLP-1 umano del 97% e questo permette di trovare una percentuale minore di anticorpi anti GLP-1 nell'uomo dopo una somministrazione di farmaco. La presenza di acido palmitico è fondamentale per aumentare il tempo di emivita che è pari a 13 ore, in quanto permette di legarsi in maniera reversibile all'albumina fornendo, quindi, maggior stabilità e resistenza alla degradazione; tutto ciò permette la mono-somministrazione giornaliera. Infine questo farmaco permette una perdita di peso rispetto agli altri farmaci per il diabete, grazie al rallentamento dello svuotamento gastrico che diminuisce l'introito di cibo.¹⁷ Gli analoghi del GLP-1, però, hanno anche molti altri effetti fisiologici, tra i quali effetti neuroprotettivi e anti-infiammatori. Negli studi preclinici di malattie neurodegenerative si è osservato che questi composti attraversano la barriera emato-encefalica e mostrano effetti neuroprotettivi e, in particolare, che il liraglutide mostra questi effetti nel sistema nervoso centrale riducendo le placche β -amiloidee prevenendo la morte sinaptica e la perdita di memoria.¹⁷

Gruppi di ricerca hanno iniziato ad osservare il comportamento di questo farmaco poiché *Leibson* dimostrò che l'85% di pazienti che soffrivano di diabete mellitico di tipo 2 soffriva anche di Alzheimer.¹⁸ Inoltre un altro studio *in vitro* sull'incubazione dei tessuti cerebrali malati di Alzheimer ha dimostrato che i tessuti trattati con insulina portano ad una minor attivazione del cosiddetto sistema del secondo messaggero: esso consiste in piccole molecole organiche o ioni inorganici che si formano in seguito a stimolazione e sono capaci di controllare moltissimi processi cellulari, come ad esempio, il processo di apoptosi che porta alla morte programmata della cellula neuronale. Questa riduzione del sistema del secondo messaggero a seguito della somministrazione di insulina si osserva in maniera molto pronunciata e anche in caso di pazienti non diabetici.¹⁹ Avendo quindi osservato la correlazione tra diabete e Alzheimer e l'importanza dell'insulina come potente neuroprotettore, alcuni gruppi di ricerca come quello di *Craft e Reger* testarono l'efficacia dell'insulina mediante applicazione nasale e conclusero che essa migliora l'attenzione e la

memoria; e, molto importante, effettuarono anche studi clinici di fase II. In questo caso lo studio clinico ha mostrato che l'applicazione nasale di insulina migliora la cognizione nei pazienti nella prima fase di Alzheimer.^{20,21}

Nel cervello i recettori di GLP-1 sono espressi nei neuroni piramidali dell'ippocampo e della neocorteccia e dunque gli analoghi, come il liraglutide, possono proteggere la plasticità sinaptica dagli effetti dei β -amiloidi potendo anche attraversare la barriera emato-encefalica. Inoltre sono stati anche dimostrati gli effetti anti-infiammatori dei GLP-1 grazie a iniezioni intraperitoneali che mostravano la riduzione delle microglie attivate: esse sono cellule della glia che si occupano della difesa immunitaria attiva del sistema nervoso centrale, analizzando questo in cerca di neuroni danneggiati e agenti infettivi che distruggono grazie alla fagocitosi ma che possono portare ad un danneggiamento eccessivo del CNS se iper-attivate. In particolare il liraglutide ha molte funzioni, previene la perdita di memoria e protegge la plasticità sinaptica nell'ippocampo, poiché riduce le placche senili e la quantità totale di β -amiloidi e quindi riduce l'infiammazione, ripara le cellule e normalizza la proliferazione delle cellule progenitrici dei neuroni e la neurogenesi. Tutto quello appena detto dimostra come gli analoghi del GLP-1 e, in particolare, il liraglutide grazie a moltissimi effetti protettivi possono essere utilizzati come trattamenti per l'Alzheimer.²²

1.3.2. Magnesio

Il magnesio ionico è lo ione più abbondante nel corpo e svolge moltissime funzioni; in particolare nel cervello la sua azione è quella di modulare il recettore N-Metil-D-Aspartato (NMDAr) e controllare la sua apertura. NMDAr è un recettore postsinaptico dell'acido glutammico, è classificato come ionotropico, ossia funziona esso stesso da canale ionico dopo legame col rispettivo legante, e lascia fluire Na^+ e Ca^{2+} all'interno del neurone e K^+ all'esterno. Questo recettore presenta vari siti di legame con vari composti: in particolare il Mg^{2+} si lega nei siti per gli antagonisti modificandone la struttura. Quello che si osserva è il blocco del recettore NMDA con conseguente aumento di NMDA per sovraespressione e conseguente

aumento della plasticità: NMDA viene sopraregolato poiché l'aumento di Mg ionico porta ad un aumento dei recettori NMDA con l'apertura bloccata quindi, per controbilanciare ciò, la cellula aumenta il numero di recettori di NMDA sinaptici.²³

Il gruppo di ricerca formato da *Inna Slutsky del Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia della Facoltà di Medicina dell'Università di Tel Aviv e da Nashat Abumaria del centro di Apprendimento e Memoria della Scuola di Medicina all'Università di Tsinghua in Cina* ha eseguito dei test utilizzando il magnesio-L-treonato (MgT) somministrato alla dose di 50 mg/Kg/giorno per dimostrare che un conseguente aumento di magnesio nel cervello del 7% aumenta sia la facilitazione sinaptica a corto termine sia il potenziamento di essa a lungo termine e, inoltre, migliora le funzioni della memoria e dell'apprendimento. Si è scelto il MgT giacché è, tra vari composti di magnesio, quello con elevata efficacia di trasporto dal tratto digestivo al sangue e infine nel sistema nervoso centrale. Per valutare l'aumento di magnesio si è analizzato il fluido cerebrospinale (CSF) prima e dopo il trattamento e si è osservato un aumento del 7%. Inoltre, test *in vivo* sui topi modello malati di AD hanno mostrato che il trattamento con MgT può portare ad un aumento della memoria spaziale nei topi giovani o adulti; l'unica differenza è che i topi giovani mantengono buoni risultati anche alla fine del trattamento con MgT mentre i topi adulti perdono il miglioramento ottenuto dopo 12 giorni dall'interruzione del trattamento. Inoltre il trattamento con MgT aumenta il livello di NMDA nelle sinapsi e si osserva una maggior attivazione ed espressione della plasticità sinaptica.¹³

Un altro gruppo di ricerca del *Dipartimento di Chirurgia Generale, dell'Università di Binzhou in Cina* ha osservato l'influenza del magnesio sulle cellule della microglia. Le cellule della microglia sono un tipo di cellule della glia che si occupano della difesa immunitaria attiva del sistema nervoso centrale; queste analizzano il CNS in cerca di neuroni danneggiati e agenti infettivi che distruggono grazie alla fagocitosi; oltre a ciò, le microglie attivate possono promuovere il rilascio di sostanze citotossiche e infiammatorie quali le interleuchine 1 β , l'ossido nitrico, il fattore di necrosi tumorale (TNF- α). Le microglie vengono attivate dai liposaccaridi (LPS),

componenti esterni delle membrane di molti batteri; di conseguenza lo studio effettuato è quello di utilizzare il magnesio solfato, avente proprietà antiinfiammatorie, come inibitore dei liposaccaridi per bloccare il rilascio di sostanze citotossiche. Nei test eseguiti è stato valutato il rilascio delle sostanze tossiche quali NO, PGE₂, TNF α , IL-1 β al variare della concentrazione di magnesio e per tutte le sostanze citotossiche si è osservata una diminuzione del rilascio per concentrazioni di magnesio pari a 5 mM e 10 mM. Questi effetti sembrano dovuti all'inibizione del canale calcio di tipo L poiché questi effetti inibitori sono invertiti in presenza del BAY-K8644, un attivatore del canale calcio di tipo L. In conclusione, gli effetti antiinfiammatori del MgSO₄ sono raggiunti, almeno in parte, dall'inibizione del canale di calcio di tipo L; ciò suggerisce che il MgSO₄ potrebbe essere sviluppato come agente terapeutico per il trattamento di malattie neuroinfiammatorie che sono caratterizzate da un'eccessiva attivazione della microglia.²⁴

1.3.3. Nanoparticelle di Ferro

Le nanoparticelle di ossido di ferro sono molto utilizzate per applicazioni in campo medico grazie alla loro scarsa tossicità, all'alta magnetizzazione di saturazione e l'alta suscettibilità magnetica; queste possono essere realizzate con varie morfologie quali sfere, cilindri, tubi, cavi. In particolare, le magnetiti (Fe₃O₄), hanno caratteristiche molto interessanti in quanto formate da cationi di ferro(II) e ferro(III); queste assumono soprattutto la forma cubica e sono ferromagnetiche per temperature sotto i 581 °C. Queste nanoparticelle assumono dimensioni di pochi nanometri e si dispongono in grappoli; la loro caratteristica fondamentale è la possibilità di utilizzarle per l'imaging con la tecnica MRI anche nei primi stadi della malattia aumentando, così, la sensibilità delle comuni diagnosi.²⁵ Le nanoparticelle possono essere usate tal quali, oppure coperte con leganti particolari per modificarne le proprietà. Ci sono moltissime vie di sintesi delle magnetiti, quasi tutte ad alte temperature, come la decomposizione termica, la co-precipitazione, la sintesi idrotermica e la pirolisi laser,²⁶ ma c'è anche un metodo molto semplice di coprecipitazione a temperatura

ambiente dei sali di ferro cloruro adiuvati dalla presenza di un ambiente estremamente basico; questa sintesi oltre ad essere estremamente semplice permette anche di utilizzare solamente i sali di ferro senza altri additivi evitando la contaminazione con sostanze poi tossiche per l'organismo.²⁷ L'unica accortezza di questa sintesi è l'ambiente inerte, in quanto in presenza di aria le magnetiti si ossidano a maghemiti e ciò viene dimostrato dal viraggio di colore da nero a rosso e dalla diminuzione delle proprietà magnetiche, che si possono osservare semplicemente ponendo la soluzione su un magnete e osservando la precipitazione del campione.

1.4. Sistemi nanostrutturati per drug delivery

1.4.1. Nanoparticelle polimeriche

Negli ultimi anni le nanoparticelle polimeriche sono diventate parte attiva della ricerca in campo biomedicale, in quanto svolgono, grazie alle loro dimensioni, la funzione di carrier per veicolare il farmaco nel sito d'azione, cosa che non solo aumenta l'efficacia terapeutica ma permette di ridurre la dose totale del farmaco somministrata e, quindi, gli effetti collaterali. Per le loro dimensioni sono permesse iniezioni intravenose e intrarteriali perché possono attraversare anche i capillari più piccoli con diametri sotto i 3-8 μm . In particolare, le nanoparticelle polimeriche, principalmente ottenute da poliesteri, poliammidi e poliuretani, presentano un'elevata biodegradabilità e biocompatibilità che le rende adatte per il drug delivery. Queste possono intrappolare al loro interno il farmaco e rilasciarlo nel tempo, permettendo ad esso di raggiungere meglio il sito d'azione, inoltre possono adsorbire o legare sulla superficie piccole molecole che fungono da target attivo per permettere la maggior selettività verso i siti d'azione del farmaco.

Le caratteristiche fondamentali che devono avere le nanoparticelle polimeriche sono delle buone dimensioni, valutate grazie al Dynamic Light Scattering (DLS), e una buona polidispersità (PDI), ovvero essere omogenee nella dimensione. È importante valutare anche la carica superficiale o

Potenziale Zeta: infatti, tutte le nanoparticelle disperse in acqua presentano una carica superficiale causata da fenomeni di ionizzazione o assorbimento di specie cariche; il potenziale zeta risulta essere la forza principale delle interazioni tra le nanoparticelle e può determinare la loro aggregazione quando i valori sono prossimi allo zero. Ecco perchè sono stabili le nanoparticelle con elevata carica superficiale, in positivo o in negativo (minori di -30 mV o maggiori di +30 mV), perché rimangono lontane l'una dalle altre respingendosi abbastanza per eliminare la possibilità di aggregazione e/o flocculazione.

I nanosistemi polimerici di drug delivery possono essere diversi a seconda della forma, composizione e dimensione: tra i più importanti ci sono le nanoparticelle, le micelle, i dendrimeri, le nanoparticelle solide lipidiche e i liposomi.

Le nanoparticelle polimeriche, molto simili alle micelle polimeriche, si formano principalmente per nanoprecipitazione: essa avviene quando una fase lipofila incontra una fase idrofila e il polimero si dispone con parte idrofila verso l'esterno e quella lipofila verso l'interno; è vero però che la struttura che si ottiene, a differenza delle micelle, è molto meno ordinata ma è per questo che il polimero non necessariamente deve essere anfifilico: esistono infatti anche nanoparticelle di solo polimero lipofilo.

Le micelle polimeriche invece sono necessariamente formate da polimeri anfifilici, ossia dotati di una porzione lipofila ed una idrofila; in questo modo quando vengono a contatto con l'acqua queste due porzioni si ordinano in modo da formare un sistema sferico stabile con il blocco idrofilico rivolto verso la soluzione esterna e quello lipofilo rivolto verso l'interno dove rimarrà intrappolato un eventuale farmaco lipofilo; questo sistema può essere creato anche con una parte idrofila centrale ed esterna e uno strato intermedio lipofilo, tramite la cosiddetta tecnica di water-oil-water.²⁸

Le nanoparticelle solide lipidiche sono una valida alternativa alle nanoparticelle polimeriche in quanto anche loro hanno un 'core' lipofilo che intrappola il farmaco ma sono fatte da lipidi biocompatibili come i trigliceridi che sono solidi a temperatura ambiente. I metodi di preparazione usati sono l'omogeneizzazione a freddo e a caldo. Grazie alle loro piccole

dimensioni e alla loro superficie lipofilica queste entrano nel sangue molto facilmente e riescono a superare la barriera ematoencefalica. Il vantaggio di queste nanoparticelle, oltre a essere biocompatibili in quanto derivanti da composti naturali, è che il 'core' solido permette un rilascio più lento e più controllato del farmaco all'interno.²⁹

I liposomi sono formati da fosfolipidi anfifilici e che si dispongono in una struttura a doppio strato simile alla membrana cellulare ed è proprio questa la caratteristica più vantaggiosa di questi sistemi: avendo una struttura simile alla membrana cellulare possono essere assorbiti per fusione sulla membrana e rilasciare il loro contenuto all'interno lentamente. Le dimensioni dei liposomi generalmente sono inferiori ai 100 nm e hanno un'alta capacità di caricare il farmaco.³⁰

I dendrimeri sono composti sintetici formati da un polimero sferico altamente ramificato, che può essere sintetizzato partendo dal centro fino all'esterno (sintesi divergente) o viceversa (sintesi convergente); la sintesi divergente avviene per aggiunta ripetitiva di unità ramificate ad un core e la struttura finale assume un perfetto schema sferico tridimensionale dalle dimensioni tra 10 e 100 nm.²⁷

1.4.2. Polimeri di partenza

I polimeri per essere utilizzati in applicazioni biomediche devono soddisfare alcune caratteristiche:

- Un'adatta cinetica di biodegradabilità
- Dichiarati biocompatibili dalla Food and Drug Administration (FDA)
- Un buon profilo tossicologico
- Un efficace caricamento del farmaco
- Struttura ben caratterizzata

I polimeri più utilizzati sono poliammidi, poliesteri, poliuretani e, in particolare, per questo progetto di tesi, l'acido(poli-lattico-co-glicolico) (PLGA) e il polietilenglicole (PEG).

Il PLGA è un copolimero sintetico ottenuto dall'apertura dell'anello e dalla copolimerizzazione di due dimeri ciclici, acido glicolico e acido lattico tramite un legame estereo. Il rapporto tra questi due polimeri nel copolimero finale ne modifica la biodegradabilità e si è osservato che il rapporto 50:50 è quello più velocemente idrolizzabile; la degradazione avviene tramite idrolisi del legame estereo e il numero di acidi carbossilici formati catalizza la biodegradazione stessa.

Il polimero è stato approvato dalla FDA ma a volte necessita di stabilizzanti, per la sintesi delle nanoparticelle, non sempre biocompatibili e inoltre una volta formate le nanoparticelle queste vengono riconosciute dal RES molto velocemente e vengono rimosse dal sangue riducendo il tempo di residenza delle nanoparticelle.³¹

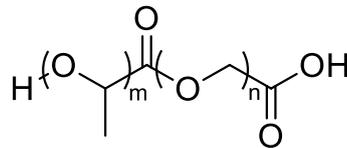


Figura 9: struttura dell'acido(poli-lattico-co-glicolico)

Il PEG è sintetizzato dalla polimerizzazione del monomero etilenglicole ed usato come agente coprente delle nanoparticelle in quanto sopprime il fenomeno di opsonizzazione e permette un maggior tempo di residenza nel sangue delle nanoparticelle; questo processo viene chiamato peghilazione della nanoparticella, ossia creare attorno alla nanoparticella un campo idrofilico adatto all'ambiente acquoso in cui è immersa la nanoparticella minimizzando così l'opsonizzazione. Il legame può essere di tipo covalente e può avvenire ad esempio tramite reazione diretta tra un terminale amminico ed uno carbossilico.

Il PEG non è biodegradabile, ma è biocompatibile e non si accumula nei tessuti soprattutto se usato a basso peso molecolare. Grazie alla sua

idrofilicità può stabilizzare le nanoparticelle nel mezzo acquoso e aumentare la solubilità; un altro vantaggio è quello di aumentare la permeabilità e l'effetto EPR.³²

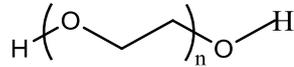


Figura 10: struttura del polietilenglicole

Vista l'importanza di entrambi i polimeri, PLGA e PEG, si sono sintetizzati copolimeri a blocchi di PLGA-*b*-PEG poiché essi associano le caratteristiche di entrambi i polimeri, ossia la biodegradabilità e la biocompatibilità, e ne aggiungono altre come ad esempio l'anfifilicità dovuta ad una parte idrofobica (PLGA) ed una idrofilica (PEG): ciò permette al copolimero di auto-assemblarsi creando delle micelle dove il PLGA forma il 'core' interno lipofilo e il PEG forma lo 'shell' esterno idrofilico, cosa che rende questo copolimero ideale per il drug delivery. La caratteristica di questo copolimero è la formazione del legame covalente tra il terminale carbossilico del PLGA e il terminale amminico del PEG in fase di sintesi, prima della nanoprecipitazione; questo conferisce maggior stabilità del polimero ed evita, poi, dopo la formazione delle nanoparticelle, la perdita del gruppo idrofilico PEG.³³

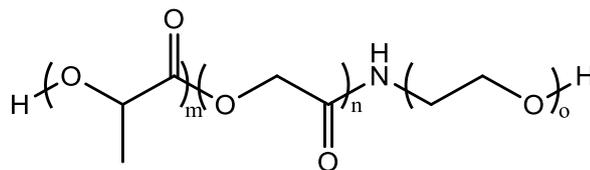


Figura 11: struttura del PLGA-*b*-PEG

1.4.3. Metodi di formazione delle nanoparticelle

I metodi di formazione delle nanoparticelle sono assai numerosi: quelli utilizzati in questo progetto, che prevedono l'utilizzo sempre di un polimero anfifilico, sono la cosiddetta oil-water, water-oil-water e nanoprecipitazione.

La tecnica della nanoprecipitazione è il metodo più utilizzato per formare nanoparticelle a partire da molti polimeri anfifilici e non anfifilici; con essa si ottiene una sospensione colloidale con proprietà riproducibili e controllabili. La caratteristica principale di questa tecnica è il fatto che il solvente in cui viene sciolto il polimero è miscibile con l'acqua come ad esempio acetone, tetraidrofurano (THF), dimetilformammide (DMF); insieme al polimero si può aggiungere nel solvente tutto ciò che si vuole intrappolare nel 'core' lipofilico. La miscela lipofilica mediante un meccanismo formato da due pompe peristaltiche o due siringhe temporizzatrici viene messa in contatto con una soluzione acquosa sotto forte agitazione: in questa maniera avviene subito la nucleazione delle nanoparticelle che si blocca non appena esse raggiungono la stabilità. Il solvente è poi rimosso per evaporazione e in questo modo si ottiene il 'core' interno lipofilico contenente l'eventuale farmaco mentre le catene di PEG rimangono orientate nelle fase acquosa. Con questa tecnica si ottengono buoni diametri (50-250 nm) e buoni PDI.³⁴

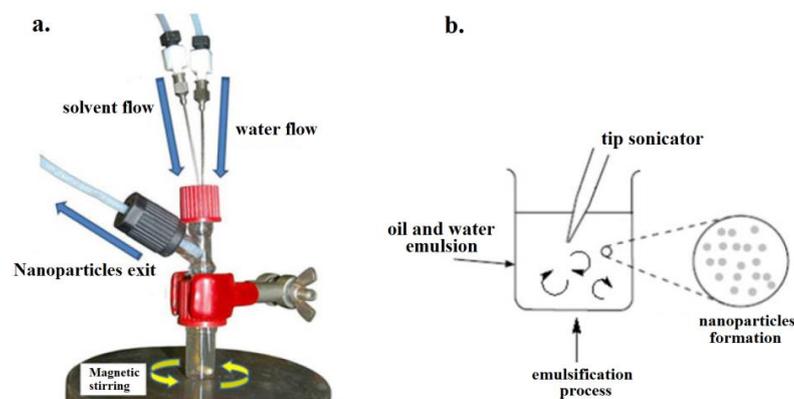


Figura 12: rappresentazione della tecnica di nanoprecipitazione (a) e oil-water o water-oil-water (b).

La tecnica oil-water è valida solo per polimeri anfifilici e consente la formazione di micelle molto ordinate con le catene idrofiliche rivolte verso l'acqua. Il polimero è sciolto in un solvente immiscibile con l'acqua come cloroformio o diclorometano e, grazie alla sonicazione, la fase oil viene dispersa in quella acquosa: si formano così nanogocce di solvente con il polimero dissolto e la parte lipofilica orientata verso la nanogoccia mentre

quella idrofilica verso l'esterno; il solvente viene poi rimosso per evaporazione e quello che si ottiene sono micelle con un buon diametro pari a 100-500 nm e un buon PDI.³⁵

La tecnica water-oil-water è un metodo per formare micellepolimeriche solubili in acqua con un 'core' interno idrofilico. Il farmaco viene dissolto nella fase acquosa chiamata water-1 (w1) e viene aggiunta una quantità maggiore in solvente, fase oil (o), con il polimero disciolto ed eventualmente ciò che è lipofilico come ad esempio una molecola per imaging o nanoparticelle metalliche; la soluzione viene poi sonicata e in questo caso le code idrofobiche sono rivolte verso l'esterno in quanto l'ambiente è principalmente solvente. In seguito, una grande quantità di acqua, fase water-2 (w2), viene aggiunta alla soluzione e una seconda sonicazione porta ad un ambiente principalmente acquoso dove il blocco idrofilico è rivolto verso il 'core' ma anche verso l'esterno e il blocco lipofilico è rivolto verso lo strato centrale della nanoparticella in maniera simile alle membrane cellulari. La seconda fase acquosa però deve essere ricca in surfattante, tipici sono sodio colato e PVA, in quanto la stabilità, durante il processo, non è ottimale: di conseguenza dopo aver evaporato il solvente bisogna lavare molto bene la soluzione per eliminare il surfattante.⁵

2. Obiettivi della ricerca

Obiettivo della ricerca sarà la sintesi e la caratterizzazione di micelle polimeriche contenenti vari agenti terapeutici o diagnostici, quali nanoparticelle metalliche o peptidi, per applicazioni nel campo del *drug delivery* e della lotta contro l'Alzheimer. La ricerca si svolgerà parallelamente su due sistemi diversi, che saranno poi sperimentati in collaborazione con due centri di ricerca esterni all'Università di Bologna.

In particolare, saranno dapprima sintetizzati e caratterizzati copolimeri biocompatibili e biodegradabili a carattere anfifilico, che possano essere adatti alla formazione di micelle. Per il primo dei due sistemi sarà prevista la sintesi di nanoparticelle di magnesio, che saranno successivamente ricoperte da un legante lipofilico ed incapsulate all'interno di micelle polimeriche mediante la tecnica della oil-in-water. Obiettivo di questa prima fase sarà di verificare la possibilità di eseguire tale sintesi e intrappolamento per ottenere sistemi stabili, completamente caratterizzabili con tecniche classiche per la determinazione delle dimensioni di tutti i componenti, della composizione finale, delle concentrazioni degli agenti attivi, ed infine utilizzabili per test biologici.

Parallelamente sarà creato un secondo nanosistema polimerico dove il liraglutide, un farmaco recentemente sperimentato per la cura dell'Alzheimer, verrà incapsulato all'interno delle stesse micelle polimeriche descritte per il primo sistema, che successivamente verranno funzionalizzate sulla superficie esterna con una glicoproteina (wheat german agglutinin, WGA) che si lega molto bene agli zuccheri presenti nella mucosa nasale e che servirà per aumentare l'efficacia di questo sistema nei futuri test *in vivo*. Anche in questo caso, l'obiettivo sarà di sintetizzare con successo e caratterizzare completamente il sistema per riuscire ad ottenere una buona stabilità ed una buona concentrazione di liraglutide, mantenendo delle dimensioni ideali per i test successivi e una buona omogeneità del campione.

Un altro punto della ricerca che si cercherà di iniziare in questo progetto, ma che sarà continuato in maniera più approfondita negli studi futuri riguarderà la sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle di ossidi di ferro (magnetiti) e la loro modificazione superficiale con un opportuno legante organico, che sarà sintetizzato appositamente per stabilizzare tali nanoparticelle e renderle solubili in solventi organici. Lo scopo finale di tale sintesi sarà di integrare al sistema contenente il liraglutide anche nanoparticelle di

Obiettivi della ricerca

magnetiti lipofile grazie alla tecnica della water-oil-water per ottenere proprietà diagnostiche oltre che terapeutiche; più precisamente in questo progetto si studierà solo la parte relativa alla sintesi e alla caratterizzazione delle nanoparticelle di magnetiti e l'eventuale possibilità di incapsulamento in micelle polimeriche, mentre la successiva parte di sperimentazione biologica sarà effettuata in seguito, quando si saranno ottenuti dei sistemi abbastanza stabili, riproducibili e completamente caratterizzati.

Obiettivo di lungo termine della ricerca, in collaborazione con il centro di ricerca *Istituto Clinico Humanitas Irccs* (Rozzano, Milano) e con il gruppo universitario coordinato dal Professor Christian Holscher (Lancaster, UK), sarà quello di sperimentare *in vivo* tali nanosistemi per valutare l'*uptake* di magnesio e liraglutide all'interno del cervello dopo superamento della barriera emato-encefalica utilizzando l'innovativa via della somministrazione intranasale.

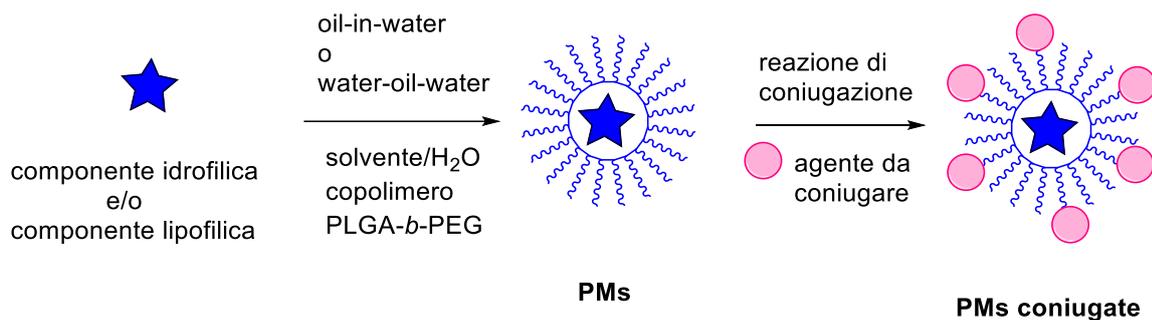


Figura 13: piano d'azione per la sintesi di varie micelle polimeriche

3. Discussione dei risultati

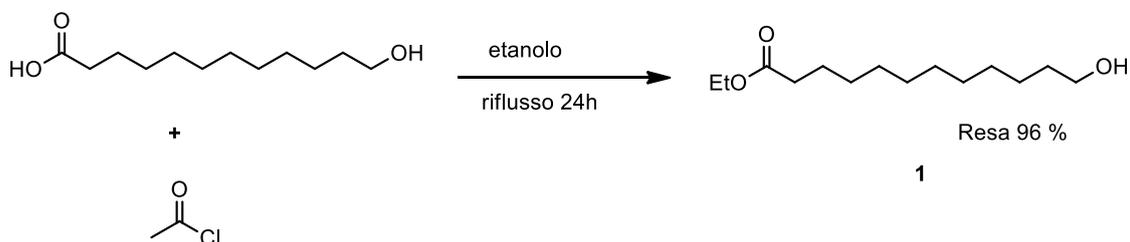
3.1. Sintesi

3.1.1. Sintesi dei leganti organici

3.1.1.1. Sintesi del legante etil-12-(idrossammino)-12-ossododecanoato

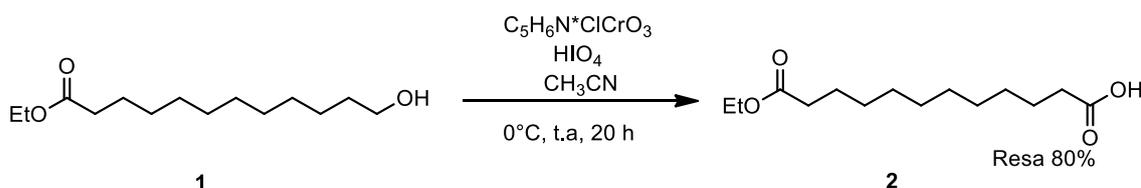
Il legante etil-12-(idrossammino)-12-ossododecanoato è un legante ideale per rendere le nanoparticelle di magnesio lipofile ed è stato sviluppato dal gruppo di ricerca dove ho svolto la mia tesi per la ricopertura di metalli nanostrutturati; il gruppo terminale idrossamico infatti, si lega facilmente sulla superficie del metallo mentre la catena alifatica terminante con l'estere etilico rende la nanoparticella solubile in solvente organico e, in particolare, in diclorometano.³⁶

La reazione (**schema 1**) inizia con la dissoluzione dell'acido 12-idrossidodecanoico in etanolo e l'aggiunta dell'acetil cloruro: la reazione va a riflusso per 24h e si ottiene come prodotto l'etil-12-idrossidodecanoato con una resa del 96%.



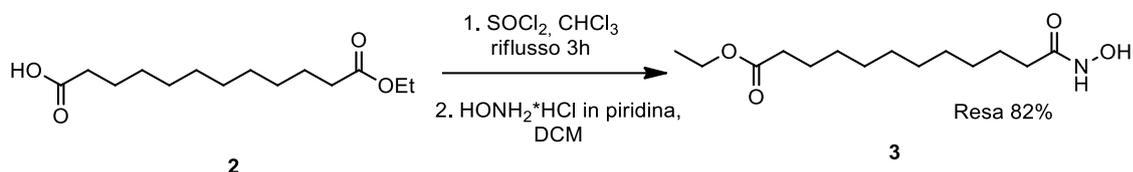
Schema 1: sintesi dell'estere etilico 1

Successivamente (**schema 2**) l'intermedio di reazione viene sciolto in acetonitrile a cui si aggiunge acido periodico e piridinio clorocromato. Dopo purificazione si ottiene l'acido 12 etossi-12-ossododecanoico con una resa dell'80%.



Schema 2: sintesi dell'acido 2

Infine l'ultimo step di reazione (**schema 3**) che prevede la formazione del prodotto idrossamico si compone di due fasi; nella prima fase all'acido 12-etossi-12-ossododecanoico, sciolto in cloroformio, si aggiunge il tionil cloruro e la reazione procede a refluxo per 3 h. Questa prima fase porta alla formazione del cloruro acilico che viene senza purificazioni isolato e in seguito sciolto in diclorometano; a questa miscela di reazione viene aggiunta l'idrossilammina cloridrato (reagente commerciale) in piridina e questa seconda fase di reazione procede a temperatura ambiente per 12 h. Al termine della reazione la miscela di reazione viene lavata con acqua e anidrificata con solfato di sodio anidro. Si ottiene il legante voluto **3**, senza purificazione come solido giallo pallido con una resa del 82%.



Schema 3: sintesi del legante 3

3.1.1.2. Sintesi del legante N-(3,4-diidrossifenetil)dodecanammide

Il legante N-(3,4-diidrossifenetil)dodecanammide è il legante ideale per rendere invece le magnetiti (Fe₃O₄) lipofile in quanto il gruppo terminale contenente un catecolo chela molto bene il ferro, mentre l'altro gruppo terminale è una lunga catena alifatica ideale per rendere le nanoparticelle lipofile, in particolare solubili in etanolo e diclorometano.

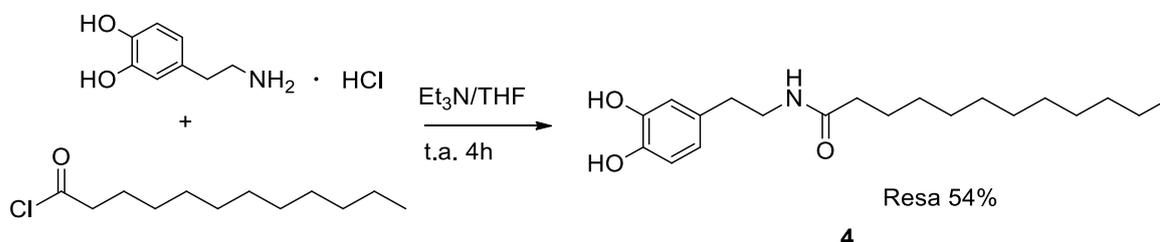
La sintesi di questo legante è una sintesi molto semplice ideata anche in questo caso dal gruppo di ricerca in cui ho lavorato e prevede la reazione tra la dopamina cloridrato e il lauril cloruro (entrambi prodotti commerciali) con formazione di un legame ammidico grazie all'attacco nucleofilo dell'azoto della dopamina sul carbonile del lauril cloruro.

La reazione (**schema 4**) inizia con la dissoluzione in tetraidrofurano anidro (THF) della dopamina cloridrato e della trietilammina come base non nucleofila; in seguito il lauril cloruro viene addizionato molto lentamente, sgocciolando la soluzione tramite imbuto sgocciolatore onde evitare il possibile attacco degli -OH fenolici sul carbonile. Al termine dell'aggiunta di lauril cloruro la reazione procede per un'ora e in seguito sono

Discussione dei risultati

effettuate le operazioni di lavaggio con acqua e anidificazione con magnesio solfato anidro.

Al termine della reazione si isola il legante **4**, un solido bianco con una resa del 54% senza bisogno di ulteriori purificazioni.



Schema 4: Sintesi del legante 4

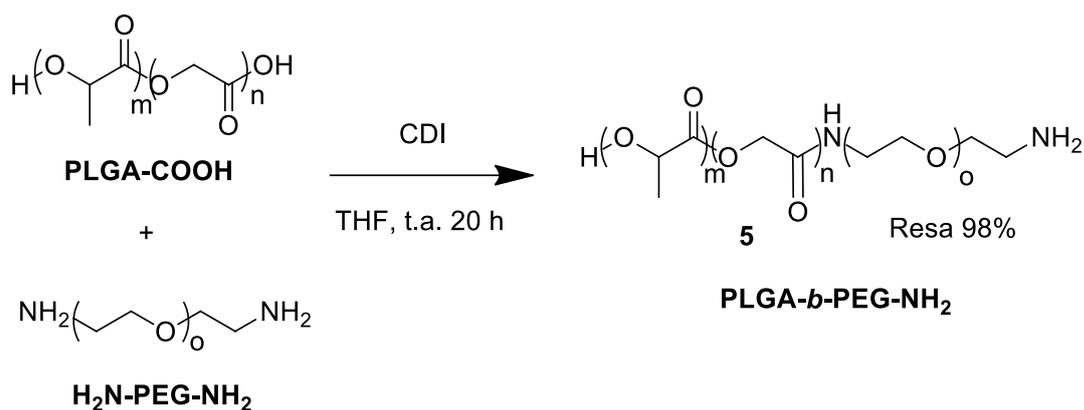
3.1.2. Sintesi dei copolimeri

3.1.2.1. Sintesi del polimero PLGA-*b*-PEG-NH₂

La reazione di sintesi del copolimero PLGA-*b*-PEG-NH₂ prevede un solo passaggio di reazione dove il PLGA-COOH (disponibile commercialmente, PM=7000 dalton) viene disciolto sotto flusso di azoto in tetraidrofurano anidro (THF), insieme al carbonildiimidazolo (CDI) e lasciato in agitazione per un paio d'ore; successivamente viene aggiunto il NH₂-PEG-NH₂ (reagente commerciale, PM= 3000 dalton) disciolto in THF e in largo eccesso per evitare la reazione su entrambi i gruppi amminici terminali; la reazione viene lasciata reagire tutta la notte in agitazione. Il giorno seguente la reazione viene interrotta e, dopo purificazione per precipitazione in dietiletere si ottiene il copolimero desiderato (**5**) con una resa del 98% (**schema 5**).

Al termine della reazione si forma un legame ammidico tra il gruppo carbossilico del PLGA e il gruppo amminico del PEG formando così un copolimero a blocchi.

Il prodotto ottenuto è caratterizzato mediante ¹H-NMR e ¹³C-NMR per verificare l'avvenuta reazione e la purezza del polimero ottenuto.

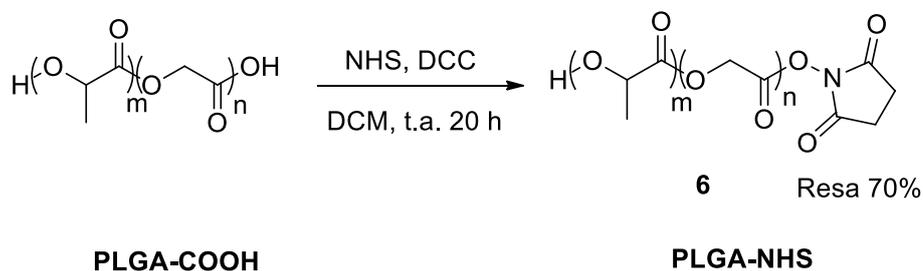


Schema 5: Sintesi del PLGA-b-PEG-NH₂

3.1.2.2. Sintesi del polimero PLGA-b-PEG-COOH

La reazione di sintesi del copolimero PLGA-b-PEG-COOH prevede invece due passaggi: il primo vede l'attivazione del gruppo carbossilico del PLGA-COOH con carbodiimidi, mentre il secondo sfrutta la formazione del legame ammidico tra il PLGA e il PEG.³⁷

Il PLGA-COOH è disciolto in diclorometano anidro (DCM) sotto flusso di azoto e successivamente vengono introdotti i reagenti N-idrossisuccinimide (NHS) e dicicloesilcarbodiimmide (DCC). La reazione è lasciata in agitazione per tutta la notte e al termine di essa, dopo purificazione per precipitazione in dietilere, si ottiene il polimero PLGA-NHS (**6**) con una resa finale del 70% (**schema 6**).

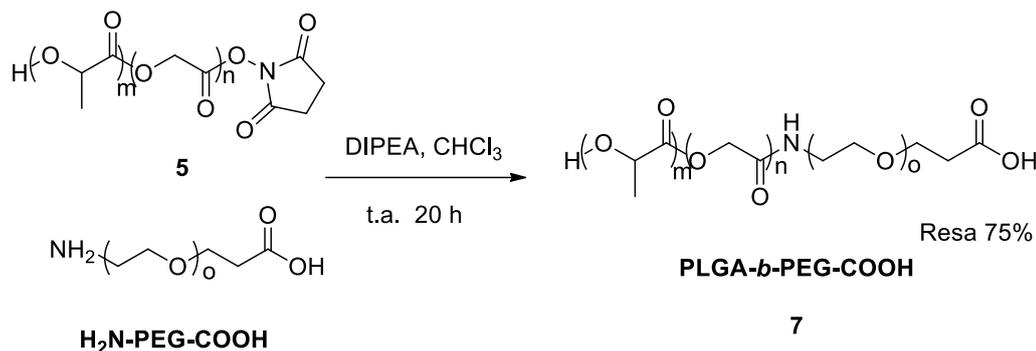


Schema 6: Sintesi del PLGA-NHS

Nel secondo passaggio (**schema 7**) si ottiene la formazione del legame ammidico dovuto all'attacco nucleofilo sul gruppo carbonilico attivato del PLGA-NHS da parte del gruppo

amminico del H₂N-PEG-COOH (reagente commerciale, PM= 3000 dalton). La reazione è effettuata sotto flusso di azoto sciogliendo il polimero **6** in cloroformio e aggiungendo successivamente il H₂N-PEG-COOH e la N,N-diisopropiletilammina (DIPEA); la reazione prosegue per tutta la notte e, dopo purificazione, si ottiene il copolimero a blocchi PLGA-*b*-PEG-COOH (**7**) con una resa del 75%.

Anche in questo caso, il prodotto ottenuto è stato caratterizzato mediante ¹H-NMR e ¹³C-NMR per verificare la buona riuscita della reazione e la purezza del polimero ottenuto.



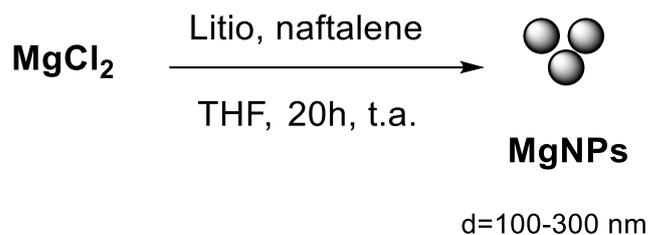
*Schema 7: Sintesi del PLGA-*b*-PEG-COOH*

3.1.3. Sintesi delle nanoparticelle metalliche

3.1.3.1. Sintesi di nanoparticelle di magnesio (MgNPs)

La sintesi delle nanoparticelle di magnesio è stata effettuata modificando una procedura nota in letteratura e già sperimentata dal gruppo di ricerca nel quale ho svolto il progetto, che prevede la riduzione del magnesio ionico ad opera di litio e naftalene.³⁸

La reazione (**schema 8**) è condotta per tutto il tempo sotto azoto: il magnesio cloruro è disperso in tetraidrofurano anidro (THF) e in seguito sono aggiunti il naftalene ed il litio metallico. La reazione prosegue per 20 ore, ma si osserva dopo una decina di minuti un viraggio di colore della soluzione dal bianco al nero, colore tipico del complesso litio-naftalene, segno che la reazione di riduzione ha avuto inizio.



Schema 8: Sintesi delle nanoparticelle di Magnesio

Nella miscela di reazione non è presente un vero e proprio legante in grado di circondare e dunque stabilizzare la superficie delle nanoparticelle, di conseguenza ciò che si ottiene sono nanoparticelle di magnesio non coperte sulla superficie, anche dette “nude”; è per questo motivo che l’ambiente deve essere estremamente inerte non solo durante la reazione, ma anche durante le procedure di lavaggio e precipitazione, altrimenti le nanoparticelle di Mg(0) si riossidano facilmente a Mg(II) in presenza di ossigeno. Trascorse le 24 ore le nanoparticelle ottenute vengono precipitate per centrifugazione e lavate più volte con THF anidro al fine di rimuovere tutto il litio e il naftalene rimasto.

Le dimensioni delle nanoparticelle di magnesio non sono state analizzate mediante *Dynamic Light Scattering* (DLS) in quanto estremamente instabili all’aria cosa che renderebbe la misura effettuata non veritiera.

Per valutare le dimensioni delle nanoparticelle è stato invece deciso di utilizzare il microscopio a trasmissione elettronica (TEM) come mostra la **figura 14**: come si può osservare sono presenti nanoparticelle di diverse dimensioni, alcune abbastanza piccole intorno ai 100 nm e altre più grandi intorno a 200-300 nm, di forma esagonale. Bisogna, però sempre considerare l’instabilità del campione all’aria, quindi questo è un buon risultato.

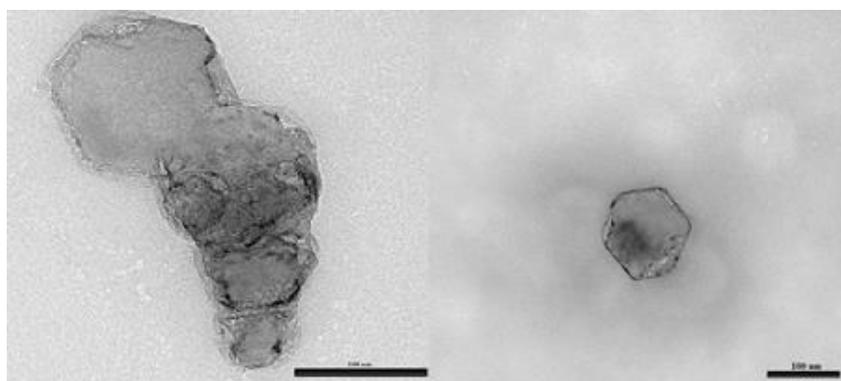


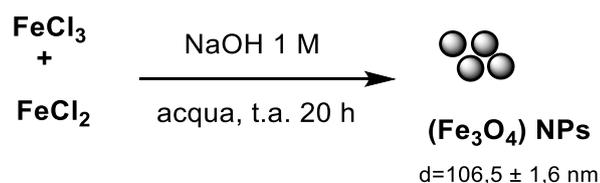
Figura 14: Immagini TEM delle nanoparticelle di magnesio; in entrambe le figure la barra di scala misura 100 nm

3.1.3.2. Sintesi delle magnetiti (Fe_3O_4)

La sintesi delle magnetiti si compone di un unico passaggio nel quale avviene la co-precipitazione di ioni di Fe(III) e Fe(II) in preciso rapporto 2:1 in una soluzione molto basica ed in ambiente inerte.²⁴

La sintesi (**schema 9**) avviene in acqua sotto flusso d'azoto e in agitazione per 20 h e quello che si ottiene sono nanoparticelle di Fe_3O_4 idrofiliche non ricoperte da alcun legante che possono essere utilizzate tal quali, o dopo un successivo scambio di legante affinché assumano caratteristiche diverse, come ad esempio la lipofilicità.

La purificazione delle magnetiti avviene tramite precipitazione magnetica. Il campione è posto su un magnete utilizzando una beuta a fondo largo per avere una maggior superficie di precipitazione ed è lavato più volte con acqua; questa operazione deve essere effettuata velocemente per evitare che le magnetiti si ossidino; una volta purificate esse devono essere subito intrappolate.



Schema 9: Sintesi delle nanoparticelle di ossido di ferro

Le analisi della dimensione delle magnetiti sono effettuate tramite DLS: come mostra il grafico in **figura 15**, il diametro idrodinamico è pari a $106,5 \pm 1,6$ nm con un indice di polidispersità (PDI) pari a $0,198 \pm 0,014$ ed un potenziale Zeta di $-35,2$ mV. Se analizziamo in maniera più dettagliata il diametro osservando le percentuali in volume, notiamo che la percentuale del campione che ha il diametro corrispondente al primo picco a $81,2$ nm è pari all'88,4%, mentre la percentuale corrispondente al secondo picco a 4825 nm è pari all'11,6%; la presenza di aggregati è infatti possibile e, se le percentuali rimangono basse come in questo caso, non crea problemi al campione.

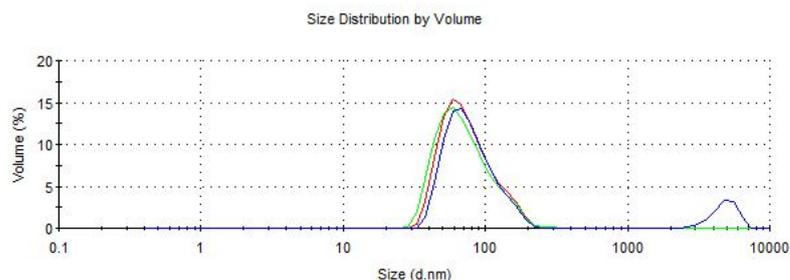


Figura 15: grafico che mostra il diametro idrodinamico delle magnetiti tramite DLS.

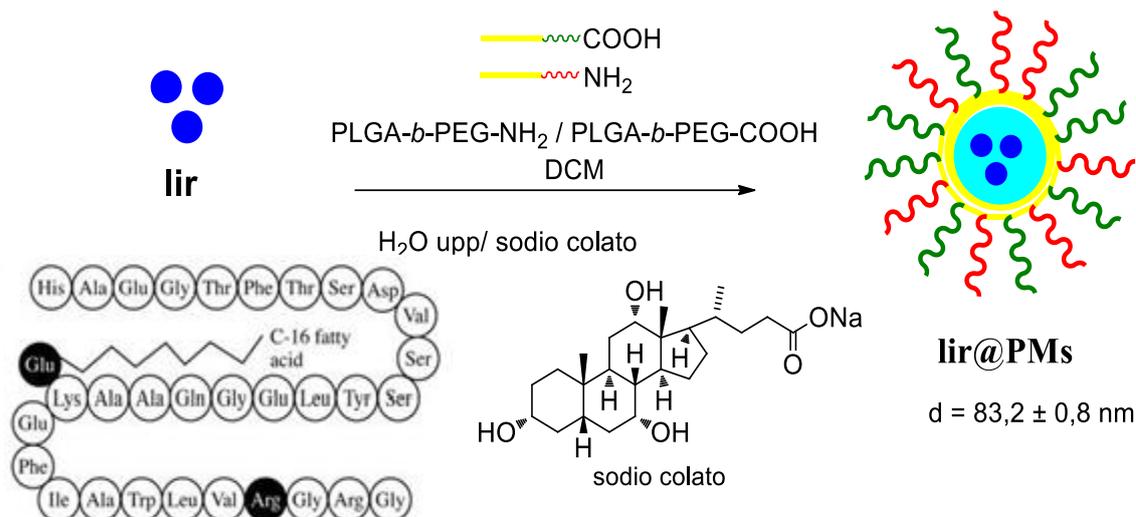
3.2. Nanosistemi per drug delivery

3.2.1. Sistemi contenenti il liraglutide

3.2.1.1. *Incapsulamento di liraglutide in micelle polimeriche: water-oil-water*

Per incapsulare il liraglutide all'interno di micelle polimeriche è necessario utilizzare la tecnica water-oil-water poiché esso è un farmaco idrofilico. La tecnica si basa sullo stesso principio della oil-in-water con la differenza che prima della sonicazione del sistema bifasico organico/acquoso con rapporti molto elevati di acqua rispetto all'organico si va ad aggiungere precedentemente una sonicazione tra una piccola fase acquosa e l'organico con rapporti molto elevati di organico rispetto all'acquoso.⁵ Ponendo nella prima fase acquosa il farmaco idrofilico, nel nostro caso il liraglutide, è possibile incapsularlo all'interno delle micelle. Questa tecnica è molto più sensibile della oil-in-water e il rischio di aggregazione delle nanoparticelle è molto elevato; per ovviare a ciò si utilizzano alcune accortezze particolari quali rapporti di concentrazione e tempi di sonicazione precisi, sonicazioni in bagno di ghiaccio e infine l'utilizzo come seconda fase acquosa di una soluzione contenente un surfattante per aumentare la stabilità delle nanoparticelle durante il processo.

La sintesi delle micelle (**schema 10**) avviene ponendo il farmaco disciolto nella prima fase acquosa a contatto con una miscela 50:50 dei due copolimeri (PLGA-*b*-PEG-COOH e PLGA-*b*-PEG-NH₂) sciolti in abbondante DCM e emulsionando la miscela bifasica con il sonicatore a punta in un bagno di ghiaccio; al termine di questo passaggio si crea una miscela lattiginosa costituita in larga parte da diclorometano; a questa si aggiunge una grande quantità di soluzione acquosa contenente il surfattante (sodio colato) e si effettua la seconda sonicazione sempre in bagno di ghiaccio. Al termine della formazione delle micelle la soluzione è posta in agitazione finché da lattiginosa non ritorna trasparente a causa della lenta evaporazione del solvente. La concentrazione avviene tramite centrifugazione su membrane con un cut-off di 100 kDa, corrispondente a circa 7 nm: in questo modo tutte le particelle più piccole di 7 nm, come il polimero non micellizzato e l'acqua, attraversano le membrane e si separano dalle micelle polimeriche.



Schema 10: Sintesi di micelle polimeriche contenenti liraglutide

Per valutare le dimensioni di questo sistema è stato utilizzato il DLS che ha mostrato un diametro idrodinamico pari a $83,2 \pm 0,8 \text{ nm}$ con un PDI pari a $0,176 \pm 0,002$ come mostra la **figura 16**; inoltre, il potenziale Zeta è pari a $-25,7 \text{ mV}$.

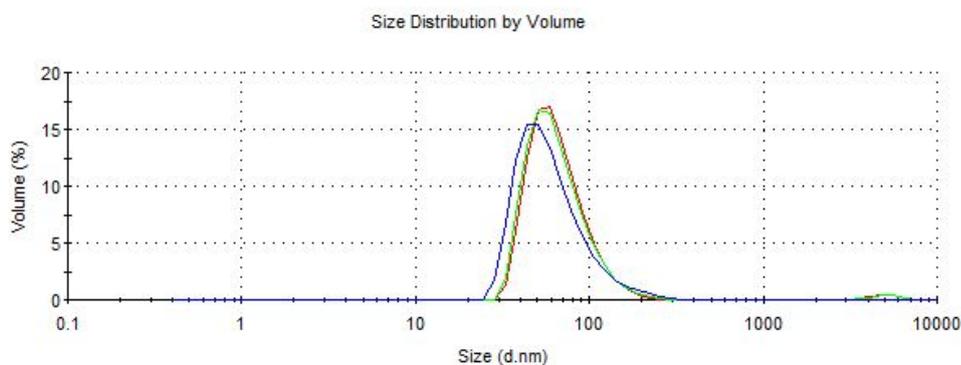


Figura 16: Grafico che mostra il diametro idrodinamico del Lir@PMs tramite DLS

Per determinare la concentrazione di liraglutide è stato utilizzato il test di Bradford, un test specifico per le proteine che, grazie all'utilizzo di un reagente particolare chiamato reattivo di Bradford permette la misurazione spettrofotometrica della concentrazione di proteine.

Per l'analisi si è iniziato con la creazione di una retta di taratura (**figura 17**) e dopo si è determinata l'assorbanza del campione specifico.

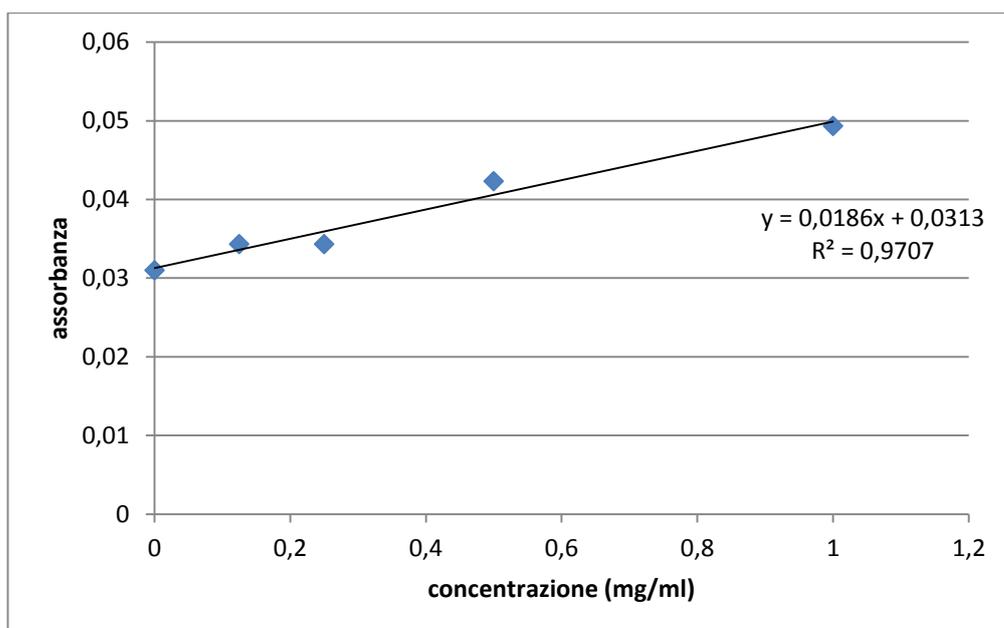


Figura 17: retta di taratura per la determinazione della concentrazione di liraglutide

Poiché le micelle polimeriche influenzano la misura all'UV-vis, mentre il polimero non micellizzato no, si è deciso di operare la misura sulle acque madri conservate durante la concentrazione e il lavaggio del campione: il risultato sulle acque di scarto è stato pari a 0,33 mg/ml di liraglutide; dato che inizialmente la concentrazione utilizzata era 0,8 mg/ml significa che il campione contiene, a parità di volume, 0,47 mg/mL di liraglutide che corrispondono a 120 μ M.

È stata eseguita, anche, un'analisi di termogravimetria che permette di valutare la concentrazione totale di micelle polimeriche comprese di agenti interni ed esterni che viene effettuata ponendo in stufa una quantità nota di soluzione del campione e pesando il secco che rimane dopo evaporazione dell'acqua; questa analisi, benchè semplice, è estremamente importante per i futuri studi biologici, in quanto è nota la concentrazione massima di micelle polimeriche che è possibile somministrare *in vivo* per non avere effetti collaterali; in questo specifico caso la concentrazione totale di micelle polimeriche è pari a 6,7 mg/mL.

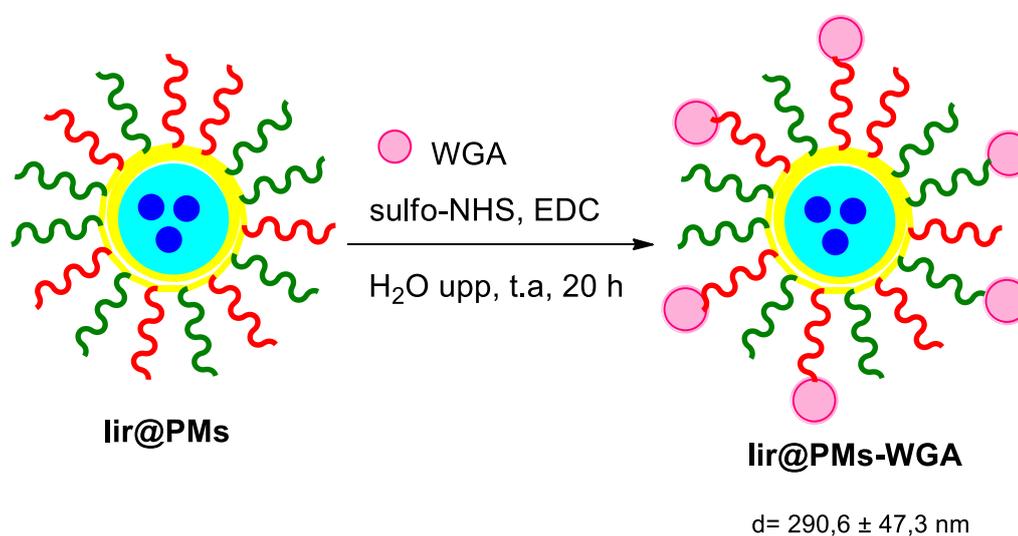
3.2.1.2. Formazione di Lir@PMs WGA tramite reazione di coniugazione

La parte idrofilica del copolimero costituita da PEG-COOH e PEG-NH₂ non ha solo la caratteristica di creare un polimero anfifilico necessario per formare le micelle, ma ha

anche la caratteristica di lasciare liberi sulla superficie esterna della micella i gruppi funzionali terminali amminici e carbossilici: questi possono essere utilizzati per successive reazioni con molecole adatte al target attivo, come in questo caso la WGA, proteina in grado di legarsi alla mucosa nasale. Il gruppo terminale libero sulla WGA per la coniugazione è il gruppo amminico dell'amminoacido lisina, di conseguenza si è deciso di utilizzare una miscela di copolimeri PLGA-*b*-PEG-NH₂ e PLGA-*b*-PEG-COOH per avere sulla superficie gruppi carbossilici con i quali essi possano reagire. La reazione di coniugazione (**schema 11**) avviene tramite *EDC chemistry*: si utilizzano come reagenti sulfo-N-idrossisuccinimide (sulfo-NHS) e (1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide idrocloruro (EDC), buoni reagenti per il *coupling* in ambiente acquoso che attivano il gruppo carbossilico favorendo il successivo attacco nucleofilo della WGA.³⁹

Nello specifico, le micelle polimeriche contenenti liraglutide sono diluite con acqua e poi sono addizionate sulfo-NHS e EDC; dopo aver atteso 15 minuti viene aggiunta la WGA e la reazione viene lasciata per 20 h a temperatura ambiente sotto agitazione.

In seguito si eseguono le operazioni di concentrazione e lavaggio in centrifuga come in precedenza e si caratterizza il prodotto ottenuto.



Schema 11: Coniugazione della WGA sulle micelle polimeriche

La misura del diametro idrodinamico di queste micelle tramite analisi al DLS (**figura 18**) ha mostrato un accrescimento delle micelle poiché la WGA che circonda la superficie delle micelle è una proteina abbastanza grande in quanto pesa 36 kDa; tuttavia il

diametro rimane in un range accettabile; infatti le micelle mostrano un diametro pari a $290,6 \pm 47,3$ nm con un PDI pari a $0,433 \pm 0,012$ ed un potenziale Zeta pari a $-17,7$ mV.

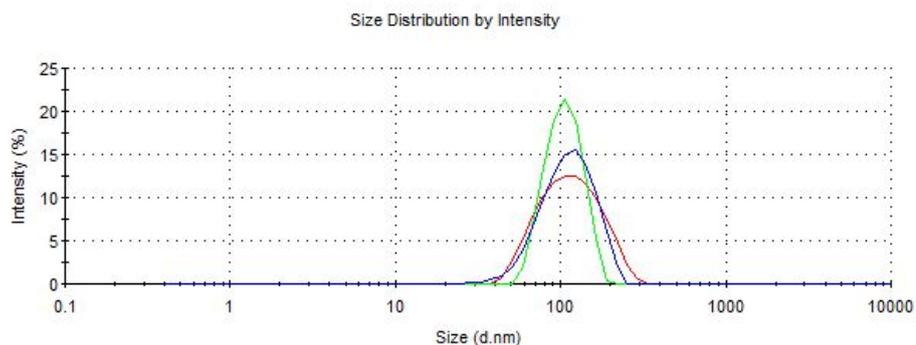


Figura 18: Grafico che mostra il diametro idrodinamico del Lir@PMs-WGA tramite DLS

La determinazione della WGA risulta molto complessa in quanto il test di Bradford risente sia delle interferenze dovute al liraglutide che alla micella polimerica dunque non è stata effettuata in questa prima parte del progetto. La prova che la WGA è presente è data dall'aumento del diametro idrodinamico. Infine, è stata determinata la concentrazione totale di micelle polimeriche che ha mostrato un valore pari a $3,0$ mg/ml.

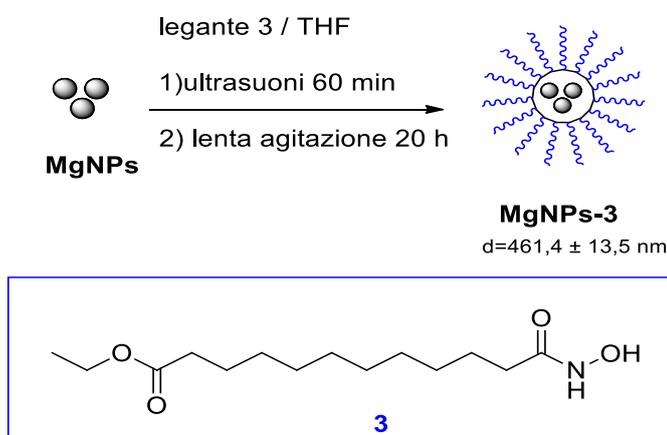
3.2.2. Sistemi contenenti MgNPs

3.2.2.1. Reazione di scambio di legante: formazione di nanoparticelle di magnesio lipofiliche

Le MgNPs sono ricoperte con il legante **3** sintetizzato in precedenza, sia per rendere le nanoparticelle più stabili, data la loro reattività all'aria sia per renderle maggiormente solubili (lipofiliche) nel solvente che verrà utilizzato per la formazione di micelle polimeriche.

Il legante, come descritto in precedenza, è costituito da una catena lunga alifatica che permette la formazione di un mono-strato ordinato di molecole di legante sulla superficie metallica grazie a legami a idrogeno e interazioni deboli tra le varie catene; inoltre presenta ad una estremità un gruppo estereo, molto solubile in solvente organico, e all'altra estremità un gruppo idrossamico che si lega al metallo per interazione elettrostatica con l'ossigeno. È importante notare, però, che sebbene il legante conferisca

maggior stabilità, le nanoparticelle sono ancora facilmente ossidabili all'aria quindi è ancora necessario lavorare in ambiente inerte (Argon) e procedere velocemente con l'incapsulamento in micelle. La reazione di scambio di legante (**schema 12**) avviene in tetraidrofurano; le nanoparticelle di magnesio sono sciolte in THF e in seguito si aggiunge il legante, sciolto anch'esso in un piccolo volume di THF; la soluzione viene posta agli ultrasuoni per 60 minuti e poi sotto lenta agitazione per 20 h. Trascorso tale tempo le nanoparticelle ora ricoperte di legante (MgNPs-3) sono precipitate per centrifugazione, lavate con THF e ridisperse in diclorometano.



Schema 12: Scambio di legante su MgNPs

Le prime analisi di dimensione delle nanoparticelle di magnesio tramite DLS vengono effettuate dopo lo scambio legante, in quanto prima di ciò le nanoparticelle sono talmente instabili che non si riesce ad effettuare la misura. Il grafico riportato in **figura 19** mostra un diametro pari a $461,4 \pm 13,5$ nm con un PDI pari a $0,401 \pm 0,052$. I dati sono buoni e, soprattutto riproducibili, se si considera l'instabilità del campione all'aria durante l'analisi.

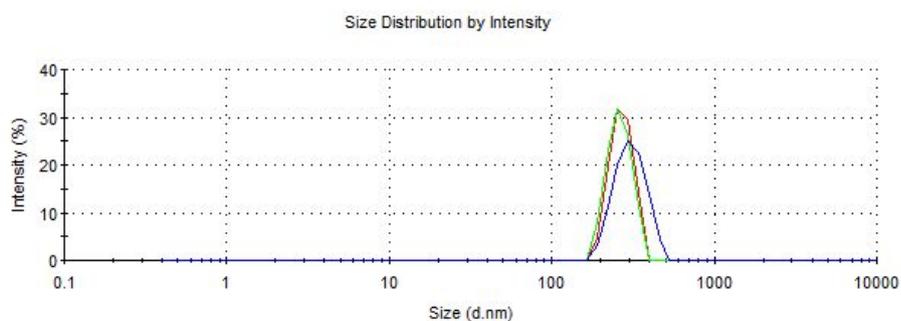


Figura 19: grafico che mostra il diametro idrodinamico del MgNPs-3 tramite DLS

Per confermare la presenza del legante **3** sulla superficie della nanoparticella di magnesio sono state effettuate analisi agli infrarossi (IR) e analisi di termogravimetria (TGA).

L'analisi IR (**figura 20**) è stata eseguita su tre campioni: nanoparticelle di magnesio con il legante **3** sulla superficie, solo nanoparticelle di magnesio, solo legante **3**. Come si osserva dall'immagine si può confermare che il legante è presente sulla superficie delle nanoparticelle di magnesio in quanto si ritrovano alcuni dei picchi fondamentali di entrambi i componenti.

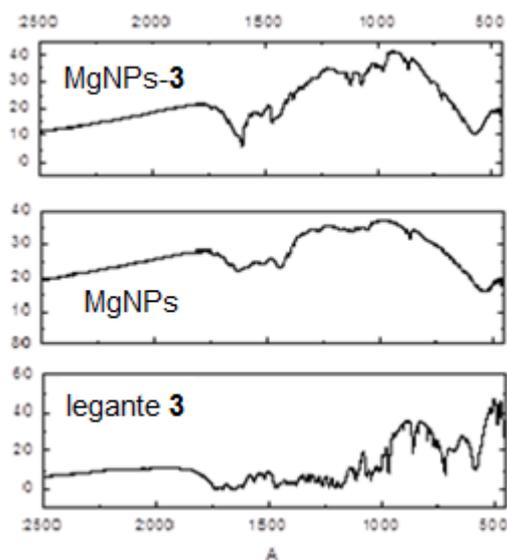


Figura 20: analisi IR che confrontano MgNPs-3, MgNPs, legante 3

Grazie alla TGA (**figura 21**), oltre ad avere la conferma della presenza del legante **3**, si può anche quantificare la percentuale di legante presente: quello che si osserva è che il legante **3** sulla superficie delle nanoparticelle di magnesio rappresenta circa il 26% rispetto al peso totale del campione.

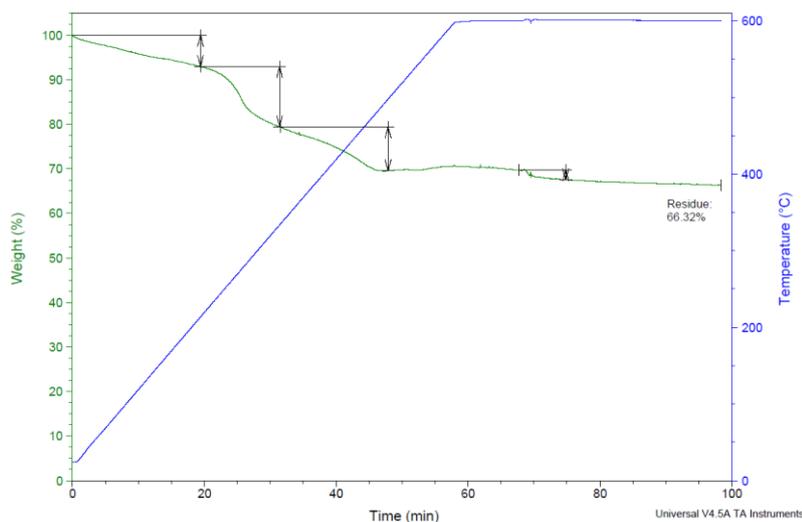
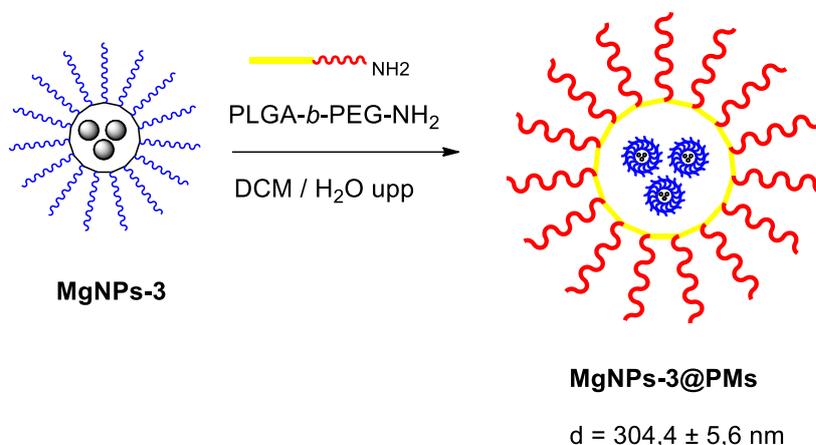


Figura 21: grafico dell'analisi di TGA di MgNPs-3: t.a-600 °C sotto azoto poi da 600 °C costante in aria

3.2.2.2. *Incapsulamento di MgNPs-3 in micelle polimeriche: oil-in-water*

La formazione di micelle tramite oil-in-water avviene grazie ad un sonicatore a punta che, immerso nella soluzione, crea gocce di solvente attorno alle quali si dispone la parte idrofobica del polimero (PLGA) mentre la parte idrofila (PEG) si dispone con le code tutte distese nell'ambiente esterno acquoso, esponendo sulla superficie della micella i gruppi funzionali caratteristici del copolimero.⁵ Grazie a questa tecnica è inoltre possibile inserire un farmaco o delle nanoparticelle, purchè lipofili, come in questo caso quelle di magnesio, all'interno della micella per creare un sistema di drug delivery che permetta il rilascio controllato una volta in corpo.

Per ottenere le micelle con questa tecnica (**schema 13**) si scioglie il copolimero (PLGA-*b*-PEG-NH₂) in diclorometano anidro e questa soluzione è addizionata alle MgNPs-3, sotto Ar per mantenere la stabilità del magnesio: questa soluzione viene posta nel bagno ad ultrasuoni per pochi minuti per permettere la perfetta dissoluzione del copolimero e del magnesio nel solvente. A questa soluzione si aggiunge lentamente la fase acquosa costituita da acqua ultrapura e infine si emulsiona la soluzione bifasica tramite il sonicatore a punta (input 600 W): quando la miscela è perfettamente emulsionata in tempi variabili nell'ordine di qualche minuto, si ottiene una soluzione lattiginosa che tornerà limpida dopo evaporazione del diclorometano al rotavapor. In questo modo il magnesio è stato intrappolato all'interno delle micelle polimeriche e, dopo concentrazione e purificazione tramite centrifugazione come descritto in precedenza.



Schema 13: Sintesi di micelle polimeriche contenenti magnesio lipofilico

Discussione dei risultati

L'analisi al DLS, come mostra il grafico in **figura 22**, rivela un diametro pari a $304,4 \pm 5,6$ nm con un PDI pari a $0,230 \pm 0,009$ e un potenziale Zeta di $-16,9$ mV. Il diametro delle nanoparticelle è buono, soprattutto per il nostro obiettivo finale, ovvero la somministrazione intranasale, dove non è necessario che le dimensioni siano troppo piccole, mentre è più importante che il PDI sia relativamente basso perché dimostra che il campione è omogeneo.

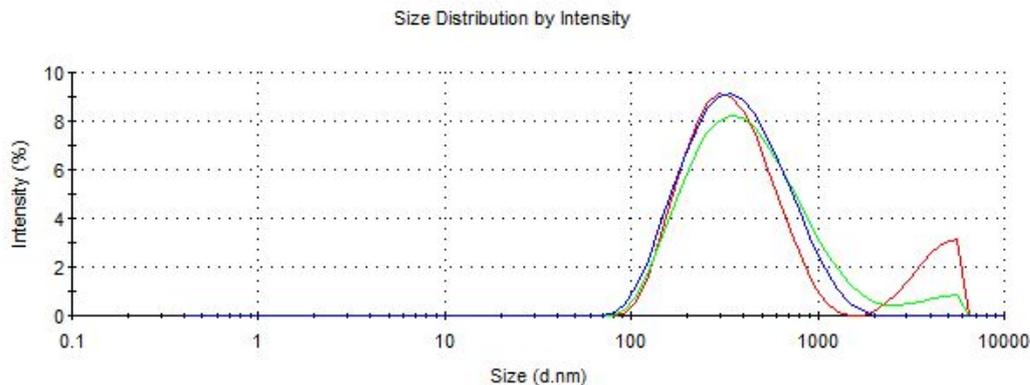


Figura 22: grafico che mostra il diametro idrodinamico di MgNPs-3@PMs tramite DLS

Un'altra analisi per valutare le dimensioni e la morfologia del campione è il TEM (**figura 23**) che mostra un buon incapsulamento del magnesio all'interno delle micelle ed un buon diametro.

Inoltre, una volta che il magnesio è incapsulato all'interno delle micelle polimeriche, acquista stabilità all'aria e i campioni si possono conservare per poter effettuare le analisi necessarie alla caratterizzazione ed eventuali test *in vitro* e *in vivo*.

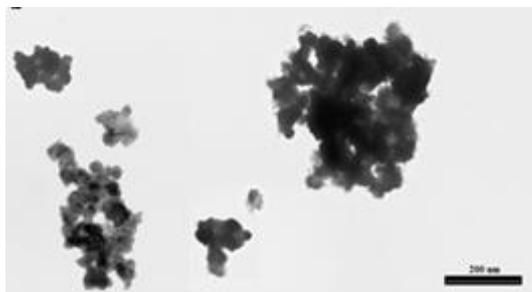


Figura 23: immagini TEM delle nanoparticelle di MgNPs-3@PMs; in entrambe le figure la barra di scala misura 200 nm

È stata successivamente effettuata l'analisi della concentrazione totale di micelle polimeriche che ha mostrato un valore pari a 3,3 mg/mL.

Successivamente è stata valutata la concentrazione di magnesio all'interno delle micelle polimeriche tramite Spettroscopia di Assorbimento Atomico (*Atomic Absorption Spectrometry*, AAS); inizialmente è stata effettuata la retta di taratura grazie all'utilizzo di 4 standard rispettivamente a concentrazione di 0,2 ppm, 0,4 ppm, 0,8 ppm e 1,0 ppm (**figura 24**); successivamente si è proceduto con la determinazione dell'assorbanza del campione precedentemente diluito 50 volte.

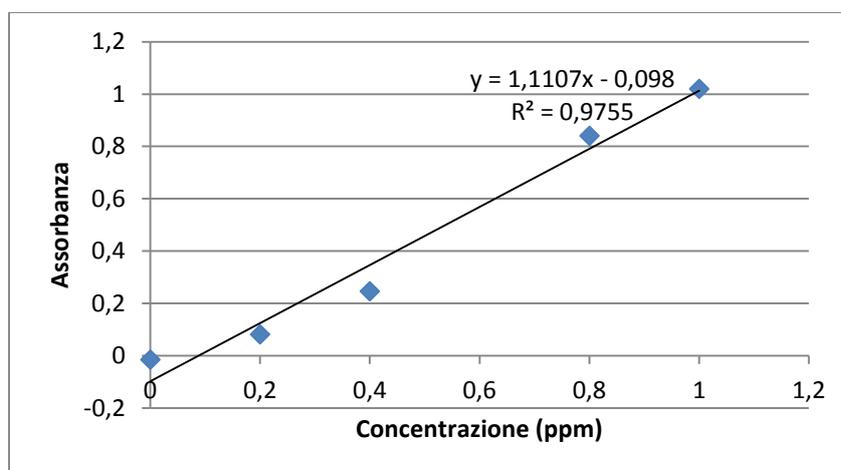


Figura 24: Retta di taratura per la determinazione della concentrazione di magnesio

Il campione ha un'assorbanza di 1,23 che indica una concentrazione in magnesio pari a 59,8 ppm, corrispondente a 2,5 mM considerando già il fattore di diluizione.

È stata sperimentata, in seguito, anche la stabilità del campione in soluzioni diverse dall'acqua ultrapura, in quanto per i test *in vivo* si preferisce utilizzare un ambiente salino simile a quello fisiologico del nostro organismo. È vero, però, che cambiare il solvente alle nanoparticelle potrebbe destabilizzarle, in particolare se si aumentano le specie cariche in soluzione; di conseguenza si è provato a diluire il campione sia con una soluzione salina di NaCl 0.9% (w/v) sia con un tampone fosfato salino allo 0.1% (PBS) ed è stata eseguita un'analisi al DLS. Si è potuto osservare che nel campione in soluzione salina si sono formati grossi aggregati di dimensione micrometrica, mentre nella soluzione tampone il diametro è diventato circa 320 nm, con una differenza di poche decine di nanometri dall'originale, che mostra come il campione sia stabile in tampone; di conseguenza si è deciso che il tampone fosfato salino fosse il giusto compromesso tra un test *in vivo* più sicuro ed un campione più stabile.

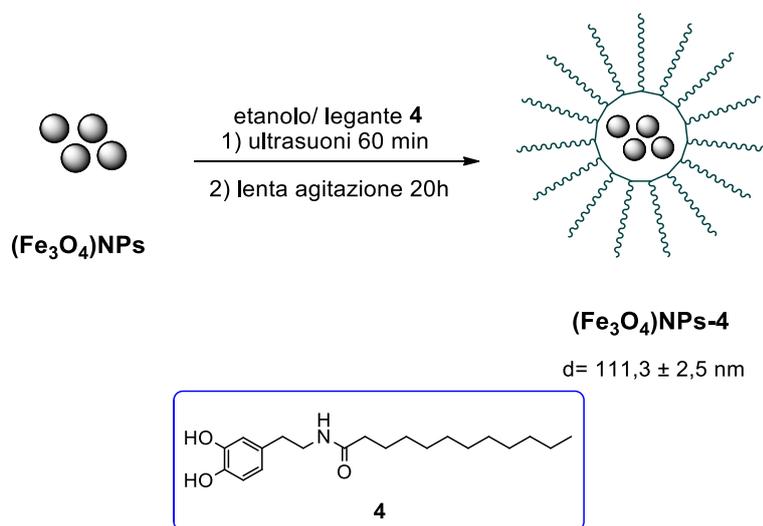
3.2.3. Sistemi contenenti le magnetiti

3.2.3.1. Reazione di scambio di legante: formazione di magnetiti lipofiliche

La reazione di sintesi delle nanoparticelle di magnetiti utilizzata in questo progetto porta alla formazione di magnetiti idrofiliche, ma può essere molto utile averle anche lipofiliche in quanto è possibile utilizzare svariate tecniche di formazione di micelle, quali nanoprecipitazione e oil-in-water, per il loro intrappolamento; inoltre la presenza di un legante sulla superficie conferisce loro una maggiore stabilità.

La reazione (**schema 14**) di scambio di legante per la quale, in questo caso, si utilizza un legante sintetizzato dal gruppo di ricerca (legante **4**), avviene sciogliendo le magnetiti in etanolo, solvente in cui risultano ridispersibili dopo la sintesi, e aggiungendo il legante anch'esso sciolto in etanolo: in seguito viene posta la soluzione dapprima agli ultrasuoni per 60 minuti e poi in lenta agitazione utilizzando il vortex per 20 h, favorendo così il contatto tra la superficie delle magnetiti e il legante in modo tale che il legante si disponga in maniera ordinata attorno alle magnetiti e conferisca loro la solubilità in solvente organico.

Il prodotto ottenuto è lavato con etanolo mediante precipitazione su magnete e caratterizzato.



Schema 14: Scambio di legante su $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{NPs}$

Dopo lo scambio di legante è stata eseguita un'analisi al DLS in etanolo (**figura 25**) e si è osservato un diametro idrodinamico pari a $111,3 \pm 2,5 \text{ nm}$ con un PDI pari a $0,173 \pm 0,005$.

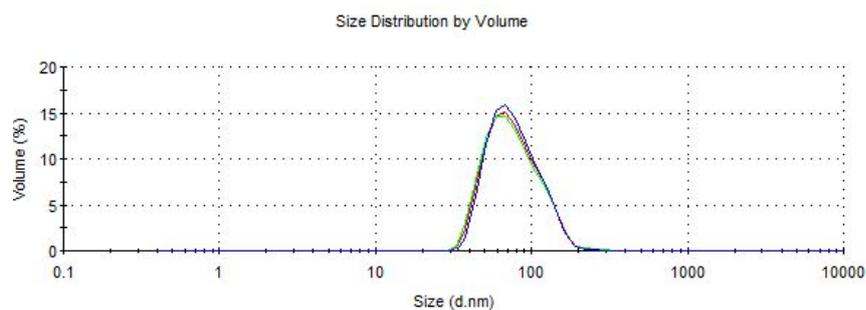
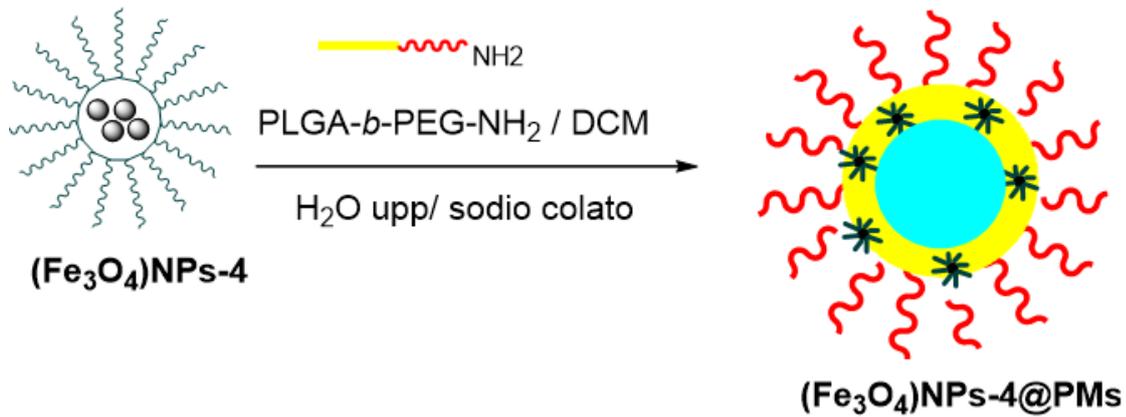


Figura 25: Grafico che mostra il diametro idrodinamico di $(Fe_3O_4)NPs-4$ tramite DLS

3.2.3.2 Incapsulamento di magnetiti lipofile in micelle polimeriche: water-oil-water

È stato preparato in questo progetto un carrier polimerico per scopi diagnostici, grazie all'intrappolamento di magnetiti all'interno di micelle polimeriche; l'obiettivo finale di questo lavoro, è infatti combinare gli effetti diagnostici delle magnetiti con gli effetti terapeutici di un farmaco, come in questo caso il liraglutide o le nanoparticelle di magnesio, per creare un carrier teranostico; in questo caso le magnetiti si trovano in forma lipofila, ossia solubili in un mezzo diverso da quello del liraglutide: in questo modo non competono né interferiscono con quest'ultimo.

Per creare questo carrier diagnostico si utilizza la tecnica della water-oil-water (**schema 15**); la prima fase acquosa è costituita da acqua ultrapura; a questa viene aggiunto il copolimero (PLGA-*b*-PEG-NH₂) sciolto in DCM e si effettua la prima sonicazione in bagno di ghiaccio; a questo punto la miscela ottenuta è lattiginosa e prevalentemente organica, di conseguenza è possibile aggiungere le magnetiti ricoperte con il legante **4** e sciolte in un piccolo volume di solvente: si aggiunge poi la seconda fase acquosa con il surfattante creando un sistema bifasico che viene sonicato una seconda volta in bagno di ghiaccio. La soluzione lattiginosa ottenuta è messa sotto lenta agitazione per 16 ore finché la soluzione non ritorna limpida; la fase di concentrazione e lavaggio viene effettuata in filtri per centrifuga come in precedenza e il prodotto ottenuto viene caratterizzato. La scelta di inserire le magnetiti lipofile dopo la prima sonicazione è stata presa dopo varie prove effettuate in entrambi i modi e quello che si è constatato è che l'inserimento delle magnetiti prima della sonicazione porta alla presenza di aggregati più grossi nel campione, fatto dovuto probabilmente al duplice stress che le magnetiti si trovano ad affrontare.



Schema 15: Sintesi di una micella polimerica contenente magnetiti lipofiliche

Il diametro è stato valutato mediante DLS (**figura 26**) che ha mostrato un valore pari a $212,0 \pm 3,2$ nm con un PDI pari a $0,178 \pm 0,006$ ed un potenziale Zeta pari a $-16,9$ mV.

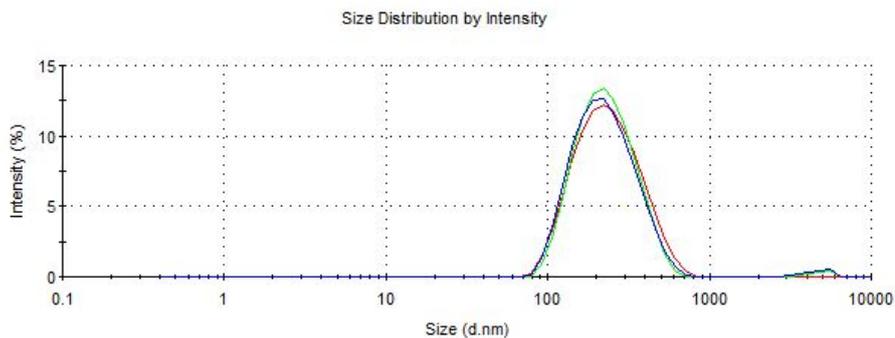


Figura 26: Grafico che mostra il diametro idrodinamico di $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{NPs-4@PMs}$ tramite DLS

Il diametro e la morfologia di questo carrier sono stati valutati anche mediante analisi TEM (**figura 27**); ovviamente non si riesce ad apprezzare la presenza di magnetiti nello strato intermedio poiché le micelle sono sfere tridimensionali, mentre le immagini ottenute con questa tecnica sono bidimensionali.

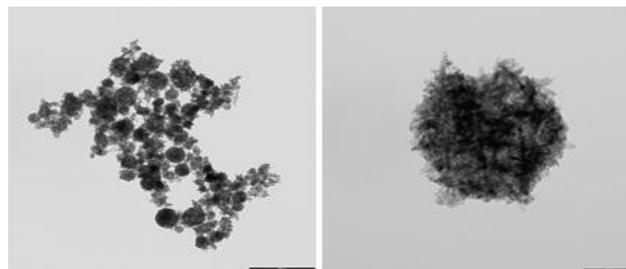


Figura 27: immagini TEM delle micelle contenenti le magnetiti lipofiliche; per l'immagine a sinistra la barra di scala è di 1000 nm mentre per l'immagine a destra è di 100 nm.

Discussione dei risultati

La concentrazione di magnetiti è stata determinata mediante Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AAS) grazie alla costruzione di una retta di taratura (**figura 28**) e in seguito all'analisi del campione precedentemente diluito 625 volte.

Il campione mostra una concentrazione pari a 4623,9 ppm che corrispondono a 82,8 mM.

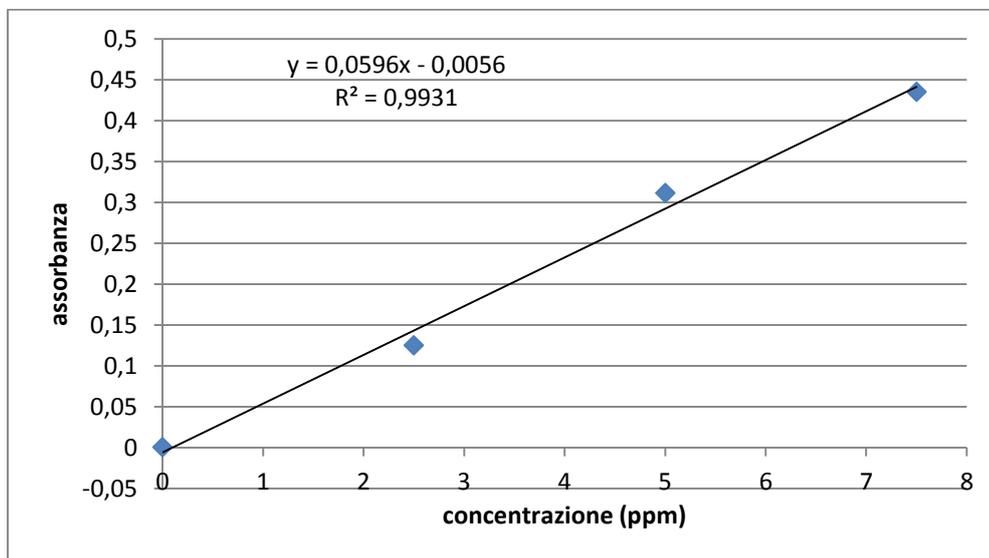


Figura 28: retta di taratura per la determinazione della concentrazione di magnetiti lipofiliche

La concentrazione totale di micelle polimeriche mostra un valore pari a 27,576 mg/ml.

Questo carrier sarà oggetto di maggiori investigazioni in futuro, quali la valutazione della stabilità nel tempo, ma gli studi per ora compiuti hanno mostrato come questa tecnica sia la migliore per la creazione di un vero e proprio sistema teranostico. La possibilità infatti di sfruttare non solo la prima fase acquosa, ma anche la fase lipofilica, per l'introduzione di farmaci, nanoparticelle o agenti attivi apre infatti le porte a numerose possibilità, quali ad esempio la sintesi di un nanosistema altamente complesso, contenente due o più agenti attivi.

4. Studi biologici

In collaborazione con il centro di ricerca *Humanitas Irccs* (Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico) che si trova a Rozzano (Milano) e con il centro universitario gestito dal Professor Christian Holscher (Lancaster, UK) è stato possibile sperimentare l'efficacia dei sistemi di drug delivery sviluppati in questo lavoro di tesi.

In particolare i collaboratori del centro universitario di Lancaster hanno eseguito studi *in vivo* per osservare l'uptake di liraglutide nel cervello dopo applicazione intranasale dei sistemi preparati e descritti in precedenza.

Per tale analisi sono stati preparati i seguenti campioni:

- Campione 1: micelle polimeriche prive del liraglutide all'interno (PMs, colore blu)
- Campione 2: micelle polimeriche prive di liraglutide all'interno e coniugate sulla superficie con WGA (PMs_WGA, colore rosso)
- Campione 3: micelle polimeriche contenenti liraglutide all'interno (lir@PMs, colore verde)
- Campione 4: micelle polimeriche contenenti liraglutide all'interno e coniugate sulla superficie con WGA (lir@PMs_WGA, colore viola)
- Campione 5: soluzione contenente liraglutide non incapsulato (colore arancione)

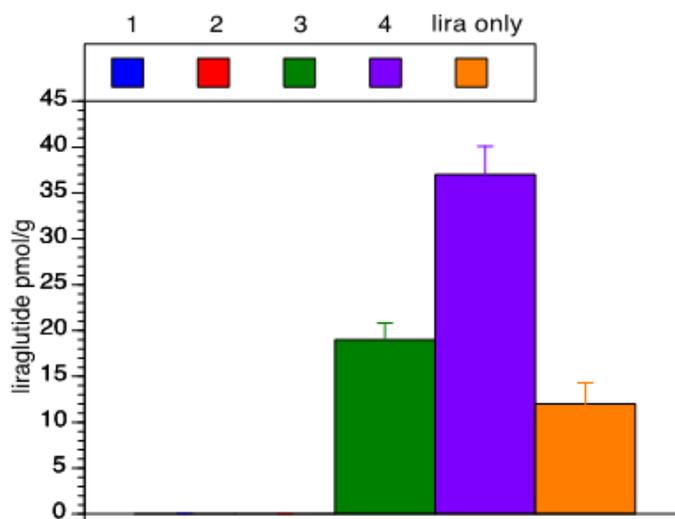


Figura 29: livelli di liraglutide nel cervello dopo applicazione intranasale dei seguenti campioni: 1)PMs; 2)PMs_WGA; 3)lir@PMs; 4)lir@PMs_WGA; 5)lira.

Dal grafico in **figura 29** si può osservare immediatamente l'ottimo risultato di uptake ottenuto grazie all'utilizzo dei nanocarrier preparati. In particolare i primi due campioni analizzati, anche detti 'controlli', mostrano un ingresso di liraglutide nel cervello pari a zero in quanto questo non è presente nelle micelle polimeriche: questi campioni servono per confermare che non vi sono interferenze nel metodo di analisi. Nel nanosistema contenente il liraglutide all'interno (campione 3, lir@PMs) si osserva un valore di 20 pmol/g di liraglutide entrato nel cervello, un buon risultato che migliora notevolmente quando sulla superficie delle micelle è presente l'agente per aumentare l'adesione, ovvero la WGA, che innalza il livello di liraglutide a circa 40 pmol/g (campione 4 lir@PMs_WGA): questo valore è doppio rispetto alle micelle senza WGA. Inoltre è stato testato anche un campione contenente solo liraglutide (campione 5, lir) non incapsulato in micelle polimeriche che porta ad un livello di liraglutide pari a 10 pmol/g, valore molto più basso rispetto a quelli precedenti che mostra, quindi, l'efficacia e l'importanza del sistema di drug delivery.

Inoltre per valutare l'efficacia della somministrazione intranasale rispetto a quella tradizionale è stato testato un campione di liraglutide somministrato per via intraperitoneale: quello che si è osservato è che la via intranasale migliora di un fattore 100 l'uptake di liraglutide rispetto a quella intraperitoneale; questo conferma le teorie per le quali la via intranasale permette di attraversare più efficacemente la barriera emato-encefalica. (Campione non mostrato nel grafico)

Nel futuro sarà sperimentato anche un nuovo carrier diagnostico contenente magnetiti, che sarà preparato proprio sfruttando la possibilità di inserire magnetiti lipofile nella fase oil. Tale approccio permetterà non solo di valutare l'uptake cerebrale, ma anche di effettuare un test di MRI e dunque di visualizzare la distribuzione delle nanoparticelle nel cervello.

Parallelamente sono stati eseguiti test simili presso il centro di ricerca Humanitas, utilizzando i sistemi di drug delivery contenenti il magnesio; anche in questo caso si è valutato l'uptake del magnesio *in vivo* nel cervello ma anche nel fegato, usato come organo di riferimento, sia dopo somministrazione intranasale sia dopo somministrazione intraperitoneale. La quantità di Mg è stata determinata tramite Spettrometria di emissione su plasma (ICP).

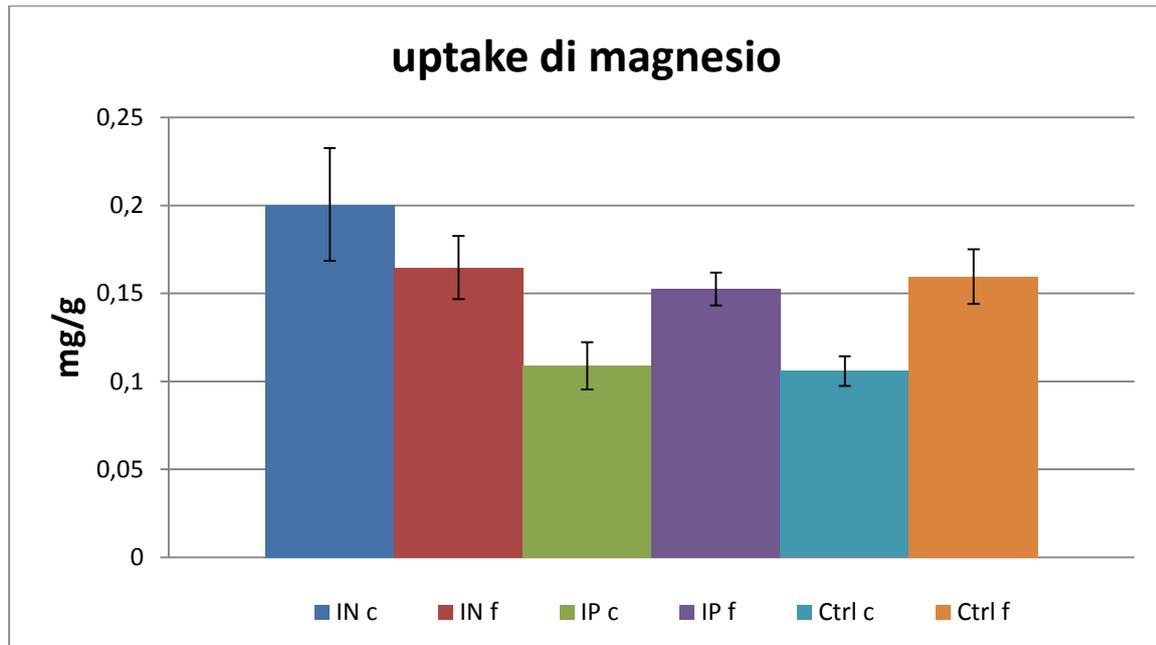


Figura 30: livelli di magnesio dopo applicazione intranasale(IN) e intraperitoneale (IP) del seguente campione: MgNPs@PMs. I dati sono dotati di intervallo di deviazione standard. Ctrl si riferisce ai dati di controllo su animali non trattati.

Come si può osservare dal grafico soprastante (**figura 30**) anche in questo test i risultati sono molto buoni; nei primi quattro campioni è stata iniettata la stessa soluzione di micelle polimeriche contenenti nanoparticelle di magnesio descritte nel capitolo precedente, mentre nei due controlli è stata iniettata semplicemente dell'acqua. Quello che si può osservare è che non solo la via intranasale è quella che porta ad un aumento di magnesio nel cervello, ma la via intranasale è l'unica che permette di avere concentrazioni di magnesio superiori nel cervello rispetto al fegato.

Inoltre nel grafico sottostante (**figura 31**) è stato calcolato l'aumento in percentuale di magnesio rispetto alla dose somministrata sia per via intranasale sia per via intraperitoneale: il dato è assai significativo poichè mostra l'aumento del 10,3% di magnesio dopo somministrazione intranasale nel cervello rispetto al controllo.

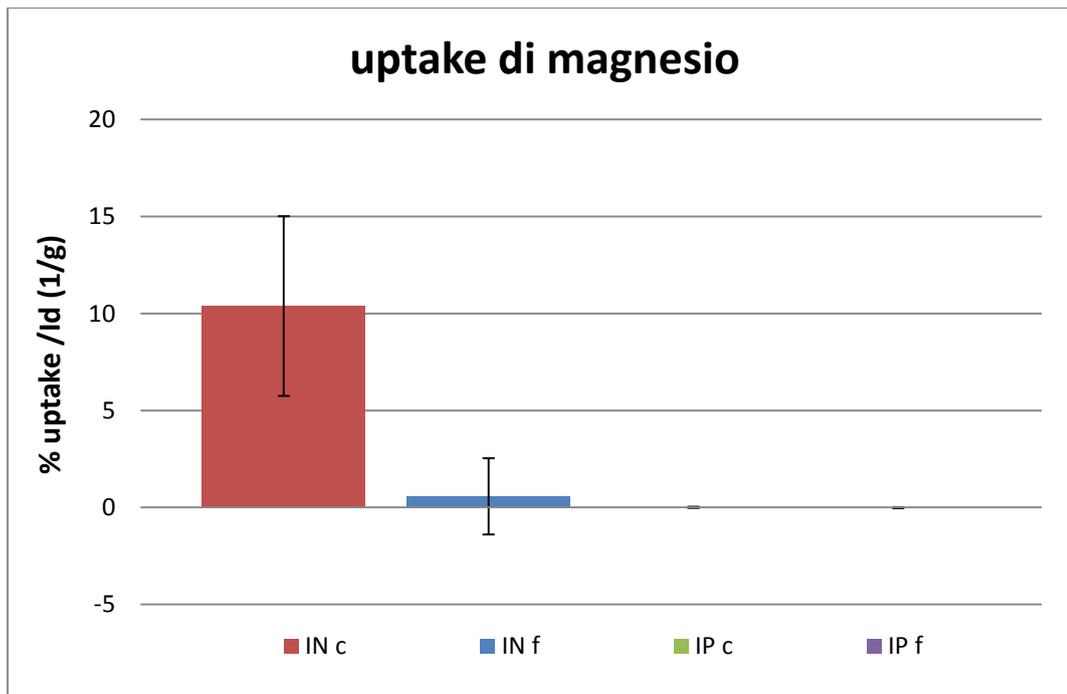


Figura 31: Aumento percentuale del magnesio rispetto al controllo dopo somministrazione di MgNPs@PMs. I dati sono dotati di intervallo di deviazione standard.

5. Conclusioni e studi futuri

In questo progetto di tesi si è perseguito l'obiettivo di sintetizzare una serie dei sistemi polimerici di drug delivery, efficaci nel trasporto dei farmaci attivi per il trattamento dell'Alzheimer.

Sono stati sviluppati vari carrier diversi sia nella struttura sia nel componente all'interno di esso; nella prima parte si sono formate micelle miste contenenti PLGA-*b*-PEG-NH₂ e PLGA-*b*-PEG-COOH per avere entrambi i gruppi funzionali terminali sulla superficie esterna, e dentro queste micelle è stato incapsulato il liraglutide, un farmaco già usato per il diabete mellitico e che si pensa sia valido anche per il trattamento dell'Alzheimer; inoltre sulla superficie di queste micelle è stata legata covalentemente, mediante reazione di coniugazione, la WGA, un agente di adesione che si lega con alcuni zuccheri presenti nella mucosa nasale e orale.

In una seconda parte del progetto sono state sintetizzate nanoparticelle di magnesio che successivamente sono state ricoperte con un opportuno legante organico e intrappolate in micelle polimeriche formate dal copolimero a blocchi PLGA-*b*-PEG-NH₂: questo polimero ha permesso la creazione di sistemi 'core-shell' ossia dotati di un nucleo lipofilo ed un guscio idrofilo, grazie alla sua caratteristica di polimero anfifilo.

Infine sono state sintetizzate nanoparticelle di magnetiti idrofiliche e successivamente funzionalizzate con un legante lipofilo; quest'ultime sono state intrappolate, per la prima volta tramite tecnica water-oil-water, all'interno di micelle polimeriche formate da PLGA-*b*-PEG-NH₂.

Le micelle formate sono state caratterizzate con molte analisi per valutare tutte quelle caratteristiche necessarie per la loro applicazione in studi biologici, quali la stabilità, la dimensione e la carica superficiale, le varie concentrazioni di farmaco, componente attivo, polimero, agente di target e agente di imaging.

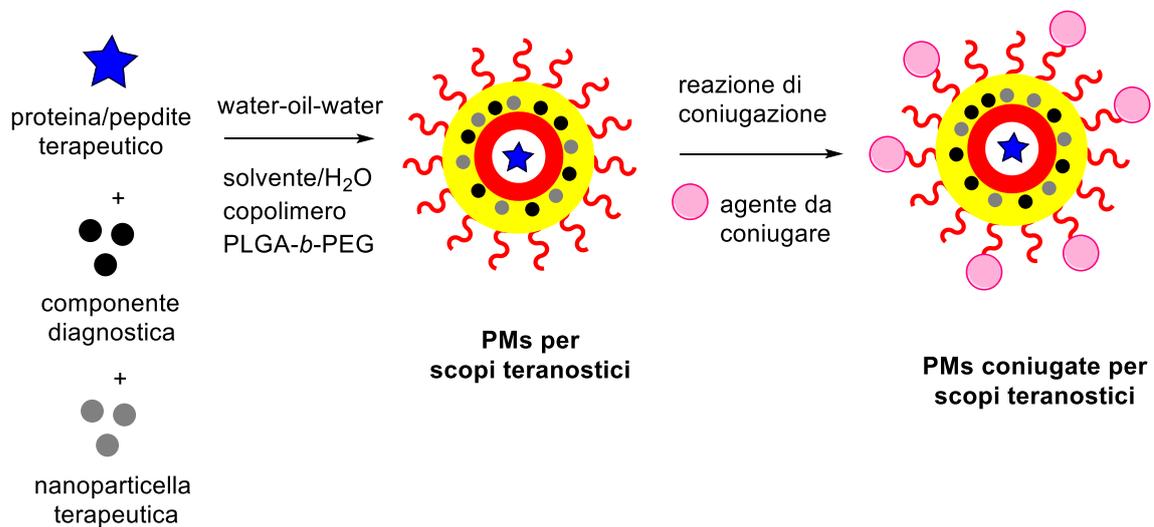
Infine i sistemi di drug delivery sono stati testati o sono in fase di test *in vivo* per valutare l'uptake cerebrale; nei sistemi per ora sperimentati ossia quelli contenenti il liraglutide e il magnesio, si è osservato che:

Conclusione e studi futuri

- Intrappolare il farmaco in sistemi di drug delivery aumenta notevolmente l'uptake di questo nel cervello;
- La coniugazione sulla superficie esterna delle micelle della WGA raddoppia la concentrazione di farmaco trovata nel cervello;
- Somministrare un farmaco per via intranasale aumenta notevolmente l'uptake di farmaco nel cervello rispetto alla via intraperitoneale, fatto giustificato dalla possibilità per il farmaco di by-passare la barriera emato-encefalica per via olfattoria.

Si può quindi concludere che i sistemi di drug delivery sono sistemi molto validi per veicolare i farmaci e che la via di somministrazione intranasale è interessante e deve essere ancora studiata per migliorare ancora di più l'uptake cerebrale dei farmaci.

Gli studi futuri sicuramente vedranno la creazione e caratterizzazione di un carrier teranostico (**schema 16**) contenente sia liraglutide nella fase acquosa interna e magnetiti lipofile e/o nanoparticelle di magnesio nella fase oil intermedia; questa tipologia di carrier è molto promettente perché può avere molteplici effetti terapeutici e diagnostici; inoltre su questo carrier si proverà a coniugare la WGA, dato l'ottimo risultato che ha ottenuto in queste prime sperimentazioni.



Schema 16: rappresentazione di un possibile carrier teranostico

6. Parte sperimentale

6.1 Note generali

Tutti i reattivi sono stati acquistati 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 acquistato dalla Lakeshore Biomaterials (Birmingham, AL, USA). Il polietilen glicole terminante alle estremità con una funzionalità amminica e una carbossilica (NH₂-PEG-COOH, MW~3 kDa) e quello terminante alle due estremità con una funzionalità amminica (NH₂-PEG-NH₂, MW~3 kDa) è stato acquistato 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 MΩ/cm. Il THF è stato distillato da sodio/benzofenone prima di ogni utilizzo e conservato sotto Ar. Il CH₂Cl₂ ed il CHCl₃ 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 (N₂ o Ar) seccato per passaggio successivo attraverso CaCl₂ e silica gel con indicatore. Le reazioni sono state controllate tramite TLC su fogli di gel di silice (Bakerflex IB2-F), mentre le colonne cromatografiche sono state effettuate con Merck silica gel 60 (70-230 mesh). Per la sintesi delle micelle polimeriche è stato utilizzato il sonicatore ad alta potenza Sonics, Vibra Cell, 750 W equipaggiato con punta in titanio. Per la decantazione magnetica delle magnemiti è stato utilizzato un supermagnete 50x50x30 mm in NdFeB, magnetizzazione N52. I punti di fusione sono stati determinati con un apparato Büchi SMP-20. Gli spettri ¹H NMR e ¹³C NMR sono stati registrati a 300, 400, 600 MHz per ¹H e 75.46, 100.6 e 150.92 MHz per ¹³C. Tutti gli spettri IR sono stati ottenuti con lo strumento Perkin Elmer FT-IR Spectrometer Spectrum 2000 in pasticca di KBr. 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

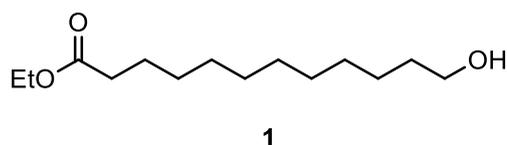
Parte sperimentale

nano-S operante con raggio laser a 532 nm. Le misurazioni del potenziale Zeta sono state condotte in una cella apposita (DTS1060C-Clear disposable zeta cells) a 25 °C. Uno strumento SpectraAA 100 Varian è stato usato per l'analisi di spettroscopia di assorbimento atomico. Le centrifugazioni sono avvenute in una centrifuga Rotofix 32 A, Hettich Zentrifugen.

6.2. Sintesi dei leganti organici

6.2.1. Sintesi del legante etil-12-(idrossammino)-12-ossododecanoato

6.2.1.1. Sintesi di etil-12-idrossidodecanoato



In un pallone a due colli dotato di refrigerante sotto agitazione e flusso di azoto, si aggiunge l'acido idrossidodecanoico (5.0 g, 23.2 mmol), etanolo (20 mL) e acetil cloruro (0.09 mL, 1.62 mmol); la miscela va a riflusso per 24 h. Al termine si concentra la soluzione al rotavapor sotto alto vuoto e il prodotto grezzo è purificato tramite colonna cromatografica su gel di silice utilizzando come eluente una miscela etere di petrolio/etil acetato 5/4. Il prodotto finale (5.45 g) si presenta come un olio giallo pallido con una resa del 96%.

Dati spettroscopici:

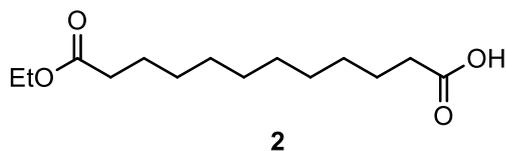
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.05-1.25 (m, 17H), 1.40-1.60 (m, 4H), 2.17 (t, J=7.2 Hz, 2H), 2.34 (s, 1H), 3.49 (t, J=6.8 Hz, 2H), 4.01 (q, J=7.2 Hz, 2H) ppm;

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ= 14.0, 24.7, 25.6, 28.9, 29.0, 29.2, 29.2, 29.3, 29.4, 32.6, 34.2, 59.98, 62.6, 173.8 ppm;

IR (cm⁻¹): 3423, 2928, 2855, 1737;

MS: 245 (M+1)⁺.

6.2.1.2. Sintesi dell'acido 12-etossi-12-ossododecanoico



In un pallone ad un collo dotato di setto perforabile, sotto flusso di azoto e agitazione, si aggiunge all'acetonitrile (80 mL) l'acido periodico (5.13 g, 22.5 mmol) e, dopo 15 minuti, si porta la temperatura a 0 °C. Successivamente si sgocciola all'interno della miscela di reazione una soluzione di etil 12- idrossidodecanoato (2.5 g, 10.2 mmol) e di piridinio clorocromato (PCC; 44 mg, 0.20 mmol) in acetonitrile (20 mL). La reazione procede a temperatura ambiente per 20 h; e al termine si aggiunge etil acetato (100 mL) per interrompere la reazione. La reazione è lavata con una soluzione 1:1 acqua distillata/soluzione satura di NaCl (2 x 50 mL), con una soluzione satura di sodio idrogenosolfito (NaHSO₃; 2 x 25 mL) e di nuovo con una soluzione satura di NaCl (2 x 50 mL). La fase organica è anidrificata con solfato di sodio anidro e filtrata sotto vuoto. Infine, si evapora il solvente e, il prodotto viene essiccato sotto alto vuoto ottenendo 2.45 g di solido bianco. Il prodotto viene, infine, purificato tramite colonna cromatografica su gel di silice utilizzando come eluente una miscela di etil acetato/ etere di petrolio 3/1. Il prodotto pulito ottenuto è un solido bianco (2.1 g) con una resa pari a 80%.

Dati spettroscopici:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 1.26 (m, 15H), 1.61 (m, 4H), 2.28 (t, J=7.6 Hz, 2H), 2.35 (t, J=7.4 Hz, 2H), 4.12 (q, J=7.1 Hz, 2H) ppm;

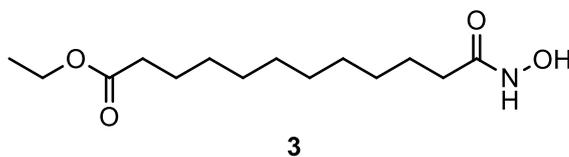
¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ= 14.5, 26, 26.5, 30.1-30.5, 34.9, 35.0, 61.3, 175.4, 177.5 ppm;

IR (cm⁻¹): 2916, 2850, 1739, 1714, 1473, 1432;

MS: 259 (M+1)⁺.

Parte sperimentale

6.2.1.3. Sintesi di etil-12-(idrossammino)-12-ossododecanoato



In un pallone ad un collo, dotato di refrigerante, sotto agitazione e flusso di azoto, si scioglie l'acido 12-etossi-12-ossododecanoico (1.5 g, 5.8 mmol) in cloroformio (20 mL). Successivamente si sgocciola il tionile cloruro (0.64 mL, 8.8 mmol) e la reazione procede per 3 ore sotto riflusso. Si raffredda la miscela a temperatura ambiente e si elimina il solvente sotto vuoto. Si scioglie il prodotto ottenuto in diclorometano (20 mL) e a questo si aggiunge, a temperatura ambiente e in agitazione, una soluzione di idrossalammina cloridrata (0.61 g, 8.8 mmol) in piridina (10 mL), la reazione procede per 12 ore sotto le stesse condizioni. Tutti i solventi sono rimossi al rotavapor e il prodotto rimasto è solubilizzato in etil acetato (50 mL) e lavato con acqua distillata (3 x 20 mL). La fase organica si anidrificata con solfato di sodio anidro e si filtra sotto vuoto. Il solvente è evaporato e il prodotto è essiccato sotto alto vuoto ottenendo un solido giallo pallido (1.3 g, resa=82%).

Dati spettroscopici:

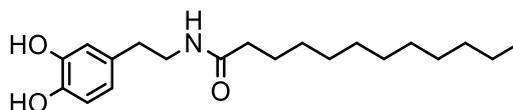
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 1.27 (m, 15H), 1.60 (m, 4H), 2.08 (t, J=7.4 Hz, 2H), 2.30 (t, J=7.2 Hz, 2H), 4.11 (q, J=7.1 Hz, 2H) ppm;

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃OD): δ = 14.5, 25.9, 26.5, 30.0-30.4, 33.1, 35.0, 61.3, 173.4, 175.4 ppm;

IR (cm⁻¹): 3421, 2922, 2848, 1735, 1636, 1469, 1421;

MS: 274 (M+1)⁺.

6.2.2. Sintesi del legante N-(3,4-diidrossifenetil)dodecanammide



4

In un pallone da 250 mL, sotto agitazione e flusso di azoto, si introduce la dopamina idrocloruro (2.50 g, 13.15 mmol), la trietilammina (4.5 mL, 32.50 mmol) e il tetraidrofurano anidro (THF, 70 mL). Successivamente si aggiunge lentamente tramite un imbuto sgocciolatore (tempo di aggiunta = 4 ore) una soluzione di lauril cloruro (3.12 mL, 13.15 mmol) in THF (100 mL); al termine dell'aggiunta, la reazione procede per un'ora. Si rimuove il solvente al rotavapor e si riprende il prodotto con etil acetato (30 mL) poi si lava con acqua (3x30mL). La fase organica si anidrifca con magnesio solfato anidro, e successivamente si filtra e si evapora al rotavapor. Infine, si ricristallizza il prodotto ottenuto con una miscela di etere di petrolio/etilacetato 7:3 (70 mL) e, dopo un giorno di riposo, si recupera il solido per filtrazione, si lava con la stessa miscela utilizzata per la cristallizzazione raffreddata in un bagno di ghiaccio e si tira a secco con la pompa ad alto vuoto. Il prodotto ottenuto (2.38 g, resa=54%) si trova in forma di solido bianco.

Dati spettroscopici:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ= 0.82 (m, 1H), 1.18 (m, 8H), 1.45 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 2.63 (m, 1H), 3.42 (m, 1H), 5.65 (bs, 1H), 6.48 (m, 1H), 6.75 (m, 2H) ppm;

¹³C-NMR (100.6 MHz, CD₃Cl₃): δ= 14.10, 22.67, 24.80, 25.74, 29.18, 29.28, 29.32, 29.45, 29.59, 31.89, 34.85, 36.80, 40.97, 115.23, 115.46, 120.39, 130.41, 143.21, 144.41, 174.70.

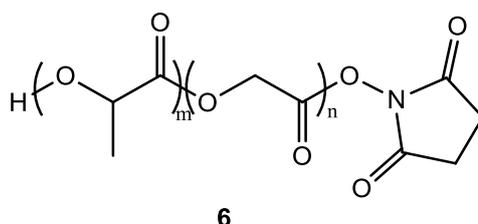
IR (cm⁻¹): 3475, 3351, 2917, 1631, 1446, 1373, 1189.

ESI: 358.25 (M+23).

6.3. Sintesi di copolimeri

6.3.1. Sintesi del PLGA-b-PEG-COOH

6.3.1.1. Sintesi di PLGA-NHS

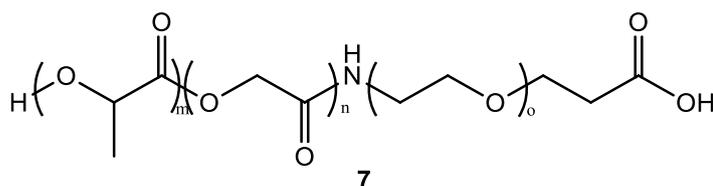


In un pallone da 50 mL, sotto agitazione magnetica e flusso di azoto, si scioglie l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA-COOH) (1 g, 0.143 mmol) in diclorometano anidrificato su allumina basica (DCM, 10 mL) e si addiziona, poi, la N-idrossisuccinimide (NHS) (66 mg, 0.56 mmol). Con un bagno di ghiaccio si porta la temperatura a 0 °C poi si aggiunge la dicicloesilcarbodiimmide (DCC) (127 mg, 0.66 mmol). Si lascia andare la reazione per 20 h a temperatura ambiente poi si filtra su celite e si lava abbondantemente con diclorometano che viene parzialmente eliminato al rotavapor. Si precipita il prodotto per aggiunta di etere etilico freddo (30 mL) e lo si separa per decantazione. Si lava più volte con etere etilico freddo. Si ottiene un solido bianco (700 mg, resa = 70%) che si secca bene dapprima al rotavapor poi alla pompa ad alto vuoto.

Dati spettroscopici:

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ= 5.29-5.12 (m, (OCH(CH₃)C(O))_m), 4.92-4.62 (m, (OCH₂C(O))_n), 2.85 (s, (ON(C(O)CH₂)₂), 1.61-1.52 (m, (OCH(CH₃)C(O))_m) ppm.

6.3.1.2. Sintesi di PLGA-*b*-PEG-COOH

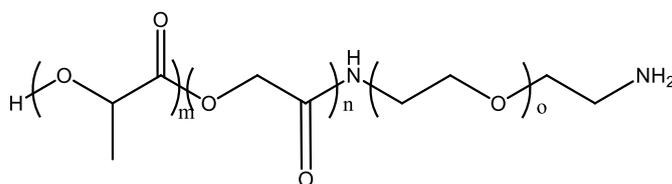


In un pallone da 50 mL, sotto agitazione magnetica e flusso di azoto, si scioglie il PLGA-NHS (700 mg, 0.100 mmol) in cloroformio anidrificato su allumina basica (CHCl₃, 10 mL) e ad esso si aggiungono H₂N-PEG-COOH (300 mg, 0.100 mmol) e *N,N*-diisopropiletilammina (DIPEA) (0.06 mL, 0.3 mmol). Si lascia andare la reazione a temperatura ambiente per 20 h poi si precipita il copolimero con etere etilico freddo (30 mL). Il solido viene poi decantato, lavato sempre con etere etilico (4x10 mL) e con acqua fredda (10 mL) per rimuovere l'H₂N-PEG-COOH non reagito; infine si secca il prodotto mediante la pompa ad alto vuoto. Si conserva il prodotto ottenuto (525 mg, resa = 75%), sotto forma di un solido bianco, in congelatore a -20°C e lo si utilizza senza ulteriori purificazioni.

Dati spettroscopici:

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ= 5.28-5.10 (m, (OCH(CH₃)C(O))_m), 4.92-4.70 (m, (OCH₂C(O))_n), 3.64 (s, (CH₂CH₂O)_o), 1.62-1.50 (d, (OCH(CH₃)C(O))_m) ppm.

6.3.2. Sintesi del PLGA-b-PEG-NH₂



5

In un pallone da 100 mL, sotto agitazione magnetica e flusso di azoto, si scioglie l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA-COOH) (1 g, 0.143 mmol) in tetraidrofurano anidro (THF, 20 mL) e, dopo completa dissoluzione del polimero, si aggiunge il carbonildiimidazolo (CDI, 23.19 mg, 0.143 mmol); la reazione procede per due ore a temperatura ambiente. Successivamente si scioglie il diammino polietilenglicole (H₂N-PEG-NH₂, 430 mg, 0.143 mmol) disciolto in THF (15 mL) e si aggiunge alla soluzione lentamente; la reazione procede per 20 ore a temperatura ambiente; si elimina parzialmente il solvente tramite rotavapor e si precipita il copolimero grazie ad una soluzione fredda di metanolo:etere etilico 5:50 e successivamente si lava con la stessa soluzione per 5-6 volte. Si ottiene un solido bianco (980 mg, resa = 98%) che viene conservato in congelatore a -20°C e utilizzato senza ulteriori purificazioni.

Dati spettroscopici:

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ= 5.28-5.10 (m, (OCH(CH₃)C(O))_m), 4.92-4.70 (m, (OCH₂C(O))_n), 3.64 (s, (CH₂CH₂O)_o), 1.62-1.50 (d, (OCH(CH₃)C(O))_m) ppm.

6.4. Sintesi di nanoparticelle metalliche

6.4.1. Sintesi di nanoparticelle di magnesio (MgNPs)

In uno schlenk da 50 mL, sotto agitazione e sotto flusso di azoto, si pone cloruro di magnesio (MgCl_2 , 100 mg, 1 mmol) sciolto in tetraidrofurano anidro (THF, 7 mL) e successivamente si aggiungono naftalene (300 mg, 2.35 mmol) e litio in barretta (10 mg, 1.44 mmol) precedentemente tagliato in piccoli pezzi. La reazione dopo qualche decina di minuti passa dal colore bianco a quello nero e procede poi per 20 ore. Il giorno successivo dalla soluzione contenete MgNPs si eliminano i pezzi di litio non reagiti per decantazione; poi si trasferisce la soluzione, sotto argon, in un tubo da centrifuga e si precipita a 6000 rpm per 60 minuti eliminando il surnatante, e lavando con THF anidro sempre sotto argon. Le nanoparticelle di magnesio sono ridisperse in THF anidro e devono essere utilizzate subito.

6.4.2. Sintesi di nanoparticelle di magnetiti (Fe_3O_4 NPs)

In un pallone a due colli da 100 mL, sotto agitazione e sotto flusso di azoto, si introducono una soluzione di FeCl_2 (100 mg, 0.5 mmol) e un soluzione di FeCl_3 (270.3 mg, 1 mmol) entrambe dissolte in acqua distillata (5 mL). Si addiziona poi una soluzione di NaOH 1M (40 mL) e immediatamente si osserva un viraggio di colore verso il nero. Dopo un'ora si interrompe il flusso di azoto e si lascia andare la reazione per 20 ore. Al termine della reazione si procede con la precipitazione delle magnetiti mediante precipitazione magnetica ponendo la soluzione sopra un magnete ed eliminando il surnatante. Nella stessa maniera si lavano le nanoparticelle con acqua (3x15 mL).

Dati spettroscopici:

Dynamic Light Scattering (DLS):

- Diametro idrodinamico: $106,5 \pm 1,6$ nm
- PDI: $0,198 \pm 0,014$
- Potenziale Zeta: -35,2 mV

6.5. Nanosistemi per drug delivery

6.5.1. Sistemi contenenti il liraglutide

6.5.1.1. Incapsulamento di liraglutide in micelle polimeriche mediante water-oil-water. (lir@PMs)

In un becker da 100 mL si pone il liraglutide (1 mg/mL, 1 mL) e si aggiunge una soluzione mista 50:50 di PLGA-PEG-NH₂ (50 mg, 0.005 mmol) e PLGA-PEG-COOH (50 mg, 0.005 mmol) sciolto in diclorometano anidrificato su allumina basica (DCM, 10 mL). La soluzione bifasica immersa in un bagno di ghiaccio è posta sotto la punta del sonificatore per 45 sec con un'amplificazione del 50%. Successivamente a questa soluzione si aggiunge una soluzione al 1,25% w/v di sodio colato (0.500 gr, 1.16 mmol) in acqua (40 mL). Questa soluzione bifasica immersa in un bagno di ghiaccio è posta sotto la punta del sonificatore per 3 minuti con un'amplificazione del 50%.

Per evaporare il solvente la soluzione è lasciata all'aria sotto lenta agitazione per 20 ore. Le operazioni di concentrazione avvengono mediante ultrafiltrazione per centrifuga (3000 rpm per 10 minuti per ciclo) e dopo aver concentrato il campione si lava per 3 volte con la stessa tecnica e, infine, si riduce la soluzione fino al volume desiderato (5 mL). Si conserva il campione in frigorifero.

Dati spettroscopici:

Dynamic Light Scattering (DLS):

- Diametro idrodinamico: $83,2 \pm 0,8$ nm
- PDI: $0,176 \pm 0,010$
- Potenziale Zeta: - 25,7 mV

[micelle polimeriche]: 6,7 mg/mL

Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AAS):

- *[liraglutide]:* 120 μ M

Parte sperimentale

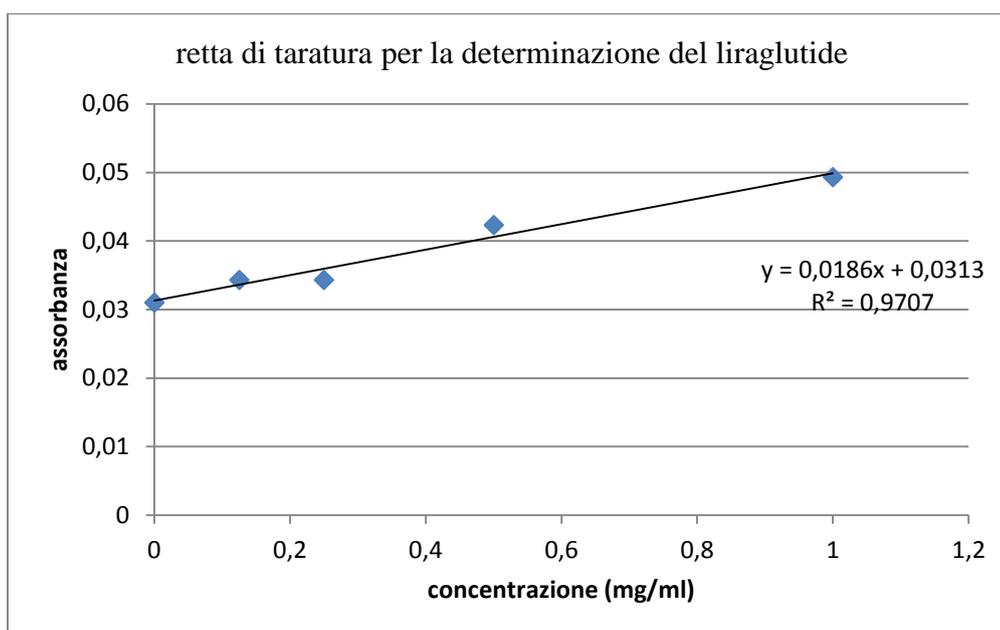


Figura 32: retta di taratura per la determinazione della concentrazione di liraglutide

Campione	Concentrazione (mg/L)	Assorbanza
Bianco	0	0,031
Standard 1	0,125	0,034
Standard 2	0,25	0,035
Standard 3	0,5	0,042
Standard 4	1,0	0,049

Tabella 1: valori di assorbanza degli standard utilizzati nella creazione del grafico

Assorbanza Acque madri	mg/mL acque madri	mg/mL campione	Concentrazione [liraglutide] (mM)
0,037	0,033	0,460	0,120

Tabella 2: valori di assorbanza del campione e corrispondente concentrazione

6.5.1.2. Coniugazione con WGA sulla superficie delle micelle polimeriche contenenti liraglutide. (lir@PMs-WGA)

Le micelle polimeriche contenenti il liraglutide (5 mL) sono diluite con acqua ultrapura (10 mL). Si aggiungono successivamente la N-idrossisulfosuccinimide (sulfo-NHS, 2,72 mg, 0,0125 mmol) e la (1-etil-3-(3-dimetilammino propil)carbodiimmide idrocloruro (EDC, 119,8 mg, 0,625 mmol); dopo il completo scioglimento dei reagenti si attende per circa 15 minuti e successivamente si aggiunge la Wheat germ agglutinin (WGA, 4 mg, 0,00011 mmol). La reazione di coniugazione procede per 20 h e successivamente si effettuano le operazioni di concentrazione e lavaggio mediante ultrafiltrazione per centrifuga (3000 rpm per 10 minuti per ciclo) e dopo aver concentrato il campione si lava per 3 volte con la stessa tecnica e, infine, si riduce la soluzione fino al volume desiderato (5 mL). Si conserva il campione in frigorifero.

Dati spettroscopici:

Dynamic Light Scattering (DLS):

- Diametro idrodinamico: $290,6 \pm 47,3$ nm
- PDI: $0,433 \pm 0,054$
- Potenziale Zeta: - 17,7 mV

[micelle polimeriche]: 3 mg/mL

[liraglutide]: 120 μ M

6.5.2. Sistemi contenenti il magnesio

6.5.2.1. Sintesi di nanoparticelle di magnesio scambiate con il legante idrossamico. (MgNPs-3)

In un tubo da centrifuga sotto Argon si sciolgono le nanoparticelle di magnesio in tetraidrofurano anidro (THF, 15 mL) e si aggiunge il legante lipofilico **3** (100 mg, 0.36 mmol) sciolto in un piccolo volume di THF anidro.

Si pone la soluzione agli ultrasuoni per 60 minuti e successivamente in lenta agitazione, mediante vortex, per 20 ore.

Al termine della reazione di scambio di legame la soluzione si precipita in centrifuga per 60 minuti a 6000 rpm e si elimina il surnatante; infine, il prodotto si lava con THF anidro (15 mL) e si ridisperde in diclorometano anidrificato su allumina basica (5 mL).

Dati spettroscopici:

Dynamic Light Scattering (DLS):

- Diametro idrodinamico: $461,4 \pm 15,6$ nm
- PDI: $0,401 \pm 0,078$

6.5.2.2. *Incapsulamento di nanoparticelle lipofile di magnesio in micelle polimeriche mediante oil-in-water. (MgNPs-3@PMs)*

Per effettuare l'incapsulamento delle nanoparticelle di magnesio all'interno delle micelle di polimero si è utilizzata la tecnica della oil-in-water: si sciolgono le nanoparticelle ricoperte dal legante idrossamico in diclorometano anidrificato su allumina basica (5 mL) insieme al polimero PLGA-*b*-PEG-NH₂ (50 mg, 0.005 mmol). Si pone questa soluzione organica in un becker e a questa si aggiunge la fase acquosa composta da acqua ultrapura (50 mL). Si pone la soluzione bifasica sotto la punta del sonificatore per circa un minuto con un'amplificazione dell'80%. Si evapora il solvente tramite rotavapor e successivamente si procede con la fase di concentrazione e lavaggio. Questa fase avviene mediante ultrafiltrazione in centrifuga (3000 rpm, 10 minuti, per ciclo) e una volta concentrata la soluzione la si lava 3 volte con acqua ultrapura; infine si porta la soluzione al volume necessario (2 mL)

La soluzione risultante è stata conservata in frigorifero.

Dati spettroscopici:

Dynamic Light Scattering (DLS):

- Diametro idrodinamico: $304,4 \pm 5,6$ nm
- PDI: $0,230 \pm 0,009$
- Potenziale Zeta: -16.9 mV

[micelle polimeriche]: 6,6 mg/mL

Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AAS):

- *[Mg]: 2,461 mM*

Parte sperimentale

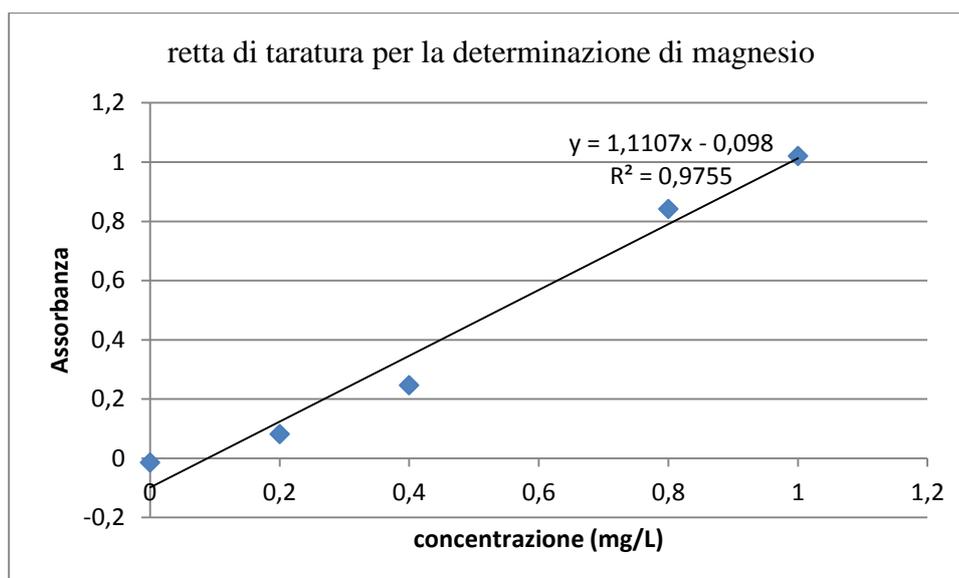


Figura 33: Retta di taratura per la determinazione della concentrazione di magnesio

Campione	Concentrazione (mg/L)	Assorbanza
Bianco	0	- 0,015
Standard 1	0,2	- 0,082
Standard 2	0,4	- 0,247
Standard 3	0,8	- 0,841
Standard 4	1,0	- 1,020

Tabella 3: valori di assorbanza degli standard utilizzati nella creazione del grafico

Assorbanza	mg/L campione diluito	Fattore di diluizione	mg/L campione originale	Concentrazione [Mg] (mM)
1,230	1,196	1/50	59,805	2,461

Tabella 4: valori di assorbanza del campione e corrispondente concentrazione

6.5.3. Sistemi contenenti magnetiti

6.5.3.1. Sintesi di magnetiti lipofiliche (Fe_3O_4 NPs-4)

In un pallone a due colli da 50 mL, si disperdono le magnetiti in etanolo (15 mL); successivamente viene addizionato il legante lipofilo **4** (120 mg, 0.36 mmol). La reazione è posta agli ultrasuoni per un'ora poi procede per 20 ore sotto lenta agitazione tramite vortex. Al termine di essa le magnetiti sono recuperate precipitando la soluzione su un magnete ed eliminando il surnatante; nella stessa maniera le nanoparticelle sono lavate con etanolo (2x10 mL).

Dati spettroscopici:

Dynamic Light Scattering (DLS):

- Diametro idrodinamico: $111,3 \pm 2,5$ nm
- PDI: $0,173 \pm 0,005$

6.5.3.2. *Incapsulamento di magnetiti lipofile in micelle polimeriche mediante water-oil-water (Fe₃O₄-4@PMs)*

In un becker da 100 mL si pone acqua ultrapura (1 mL) e, a questa, si aggiunge una soluzione di PLGA-PEG-NH₂ (50 mg, 0.01 mmol) e PLGA-PEG-COOH (50 mg, 0.01 mmol) sciolta in DCM anidrificato su allumina basica (9 mL). La soluzione bifasica immersa in un bagno di ghiaccio è posta sotto la punta del sonificatore per 45 sec con un'amplificazione del 50%. Successivamente si sgocciola la soluzione di magnetiti lipofile sciolte in 1 ml di DCM e alla soluzione ottenuta si aggiunge una soluzione al 1,25% w/v di sodio colato (0.500 gr, 1.16 mmol) in acqua (40 mL). Questa soluzione bifasica immersa in un bagno di ghiaccio è posta sotto la punta del sonificatore per 3 minuti con un'amplificazione del 50%. Per evaporare il solvente la soluzione viene lasciata sotto lenta agitazione all'aria per 20 ore. Le operazioni di concentrazione avvengono mediante ultrafiltrazione per centrifuga (3000 rpm per 10 minuti per ciclo). Dopo aver concentrato il campione si lava per 3 volte con la stessa tecnica e, infine, si riduce la soluzione fino al volume desiderato (2 mL). Il campione viene conservato in frigorifero.

Dati spettroscopici:

Dynamic Light Scattering (DLS):

- Diametro idrodinamico: 212,0 ± 3,2 nm
- PDI: 0,178 ± 0,006
- Potenziale Zeta: -16,9 mV

Prova di stabilità dopo 45 giorni (DLS) :

- Diametro idrodinamico: 210,1 ± 4,1 nm
- PDI: 0,230 ± 0,009
- Potenziale Zeta: -30,9 mV

[micelle polimeriche]: 32,2 mg/mL

Parte sperimentale

Spettroscopia di Assorbimento Atomico (AAS): 82,806 mM

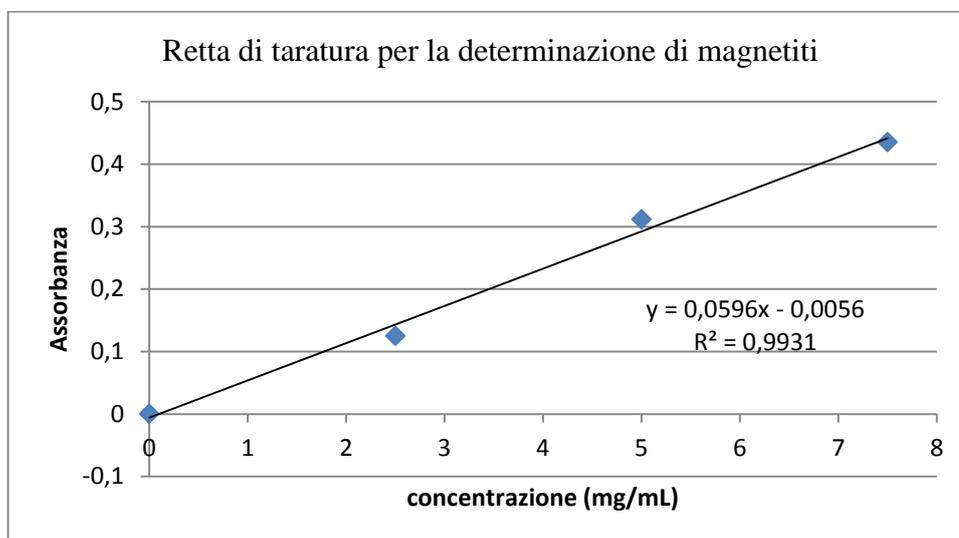


Figura 34: Retta di taratura per la determinazione della concentrazione di magnetiti

Campione	Concentrazione (mg/L)	Assorbanza
Bianco	0	0,001
Standard 1	2,5	0,125
Standard 2	5	0,311
Standard 3	7,5	0,435

Tabella 5: valori di assorbanza degli standard utilizzati nella creazione del grafico

Assorbanza	mg/L campione diluito	Fattore di diluizione	mg/L campione originale	Concentrazione (mM)
0,435	7,398	625	4623,881	82,806

Tabella 6: valori di assorbanza del campione e corrispondente concentrazione

7. Ringraziamenti

Un anno fa sono entrata in laboratorio convinta che la ricerca non fosse per me, convinta che nel mio futuro questa non fosse contemplata convinta che bisogna essere piccoli genietti per capire quel mondo tanto diverso dal mio... Un anno fa ho toppato alla grande e sono bastati pochi mesi per rendermi conto quanto sia affascinante la ricerca e quanta passione e volontà impiega chi la compie; la cura nella preparazione e l'attesa nel risultato, ma soprattutto il lavoro di squadra, il sapere che c'è sempre qualcuno con cui confrontarti e che due o più teste possono essere meglio di una. Non bisogna essere piccoli genietti, basta solo prendersi a cuore il progetto e farlo tuo, lavorare con cura e con pazienza che se il risultato non è buono oggi lo sarà sicuramente domani. Sono riuscita ad apprezzare e comprendere tutto questo grazie a tutte le persone che mi hanno accolto nel laboratorio di chimica organica e prima di tutto al professore Mauro Comes Franchini che desidero ringraziare per avermi dato la possibilità di vivere tutto ciò e che mi ha mostrato il mondo della ricerca a tutto tondo facendomi sentire parte di un team e parte della ricerca. Desidero ringraziare anche Erica Locatelli, punto di riferimento in laboratorio, capace di insegnarti ma anche di ascoltarti e pronta sempre a nuove proposte, ma non solo, compagna di lunghi e 'insidiososi' viaggi nei quali non ci siamo mai annoiate grazie ad un po' di chiacchiere, qualche film e nei giorni duri, un gelato di consolazione. Infine volevo ringraziare tutti i ragazzi del laboratorio per le giornate passate insieme e perché, ogni scusa, era buona per festeggiare insieme; e in particolare ringrazio Ilaria, Simone e Federico per aver reso tutte le mattine delle belle mattine, per tutti i momenti condivisi insieme: un buon risultato, una buona idea o anche solo un po' di speranza, ma anche una pausa caffè e sigaretta o un aperitivo.

Finito questo percorso di studi, non posso non ringraziare chi mi ha permesso per svariati motivi tutto ciò; in primis i miei genitori, che non solo mi hanno dato la possibilità di studiare, ma mi hanno sempre spronato a farlo condividendo con me i successi e facendosi una sana risata sugli insuccessi dandomi così la grinta e la voglia di migliorare e andare avanti. I miei genitori hanno fatto anche un'altra fantastica cosa mi hanno fatto crescere in una super famiglia, quindi non posso non ringraziare le mie fantastiche sorelle Alice, Maria Chiara, Francesca, e il mio super fratellino Lorenzo, per aver sopportato in tutti questi anni una sorella molto chiacchierona e sentimentale e per esserci sempre stati; ma la famiglia Campodoni non è ancora finita e meritano un ringraziamento speciale

Ringraziamenti

anche i miei cognati Stefano, Marco e Filippo per le cene in compagnia, per le partite di racchettoni e per avermi dato tre splendidi nipoti, Lucia, Mattia e Agostino, e avermi permesso di fare la Zia Betta ogni volta che mi era possibile.

Sia quasi alla fine di questa numerosa famiglia e gli ultimi ringraziamenti vanno alla mia super nonna Simo, che non si è mai tirata indietro a ogni mia pazzia e che non ha mai rifiutato una sigaretta dopo cena accompagnata da mille chiacchiere; ai miei zii, ai miei cugini e a chi non c'è più, ma è sempre stato il mio primo sostenitore e che mi è sempre vicino.

E adesso arriva la crema della crema... gli amici insostituibili, compagni di serate, chiacchiere, giochi e tante tisane, è anche grazie a loro che oggi posso festeggiare, per la compagnia in biblioteca, in treno e per avermi concesso di paccare qualche serata quando proprio ero a pezzi.

Per ultimo, ma non per importanza, un grazie speciale va al mio compagno di vita, Francesco, per avermi spronato a continuare nel percorso della magistrale, per non avermi fatto pesare la mia poca presenza in casa e per aver fatto finta di essere interessato quando gli raccontavo per ore e ore ciò che succedeva in laboratorio. Grazie perché senza di lui ce l'avrei fatta lo stesso, ma non sarebbe stato così divertente...

Il capitolo più duro da scrivere della tesi volge al termine e spero di non aver dimenticato nessuno comunque ringrazio tutte le persone che volontariamente o per sbaglio sono finite sul mio cammino perché ognuno ti lascia qualcosa e ti permette di crescere, ma soprattutto ringrazio chi, dopo avermi conosciuto, ha deciso di non uscire fuori strada, ma di accompagnarmi in questo lungo e duro cammino che è la vita...

8. Schede di sicurezza

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA

secondo il Regolamento (CE) Num. 1907/2006

Versione 5.1 Data di revisione 22.06.2014

Data di stampa 05.07.2014

SEZIONE 1: Identificazione della sostanza o della miscela e della società/impresa

1.1 Identificatori del prodotto

Nome del prodotto	:	1,1'-Carbonildiimidazolo
Codice del prodotto	:	115533
Marca	:	Aldrich
Num. REACH	:	Per questa sostanza non è disponibile un numero di registrazione in quanto la sostanza o i suoi usi sono esentati da registrazione, il tonnellaggio annuale non richiede registrazione oppure la registrazione è prevista ad una scadenza successiva.
N. CAS	:	530-62-1

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)
---------------------------	---	---

SEZIONE 2: Identificazione dei pericoli

2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Tossicità acuta, Orale (Categoria 4), H302

Corrosione cutanea (Categoria 1B), H314

Per il testo completo delle indicazioni di pericolo (H) citate in questa sezione, riferirsi alla sezione 16.

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

C Corrosivo R22, R34

Per il testo completo delle frasi R citate in questa sezione, riferirsi alla sezione 16.

2.2 Elementi dell'etichetta

Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Pittogramma



Avvertenza Pericolo

Indicazioni di pericolo

H302

H314

Nocivo se ingerito.

Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

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.
 Descrizioni supplementari del rischio nessuno(a)

2.3 Altri pericoli - nessuno(a)

SEZIONE 3: Composizione/informazioni sugli ingredienti

3.1 Sostanze

Sinonimi : CDI
 Formula : C₇H₆N₄O
 Peso Molecolare : 162,15 g/mol
 N. CAS : 530-62-1
 N. CE : 208-488-9

Componenti pericolosi secondo il Regolamento (CE) No 1272/2008

Component	Classificazione	Concentrazione
1,1'-Carbonylbis-1H-imidazole		
N. CAS 530-62-1 N. CE 208-488-9	Acute Tox. 4; Skin Corr. 1B; H302, H314	<= 100 %

Componenti pericolosi secondo la Direttiva 1999/45/CE

Component	Classificazione	Concentrazione
1,1'-Carbonylbis-1H-imidazole		
N. CAS 530-62-1 N. CE 208-488-9	C, R22 - R34	<= 100 %

Per il testo completo dei codici H e delle frasi R citati in questa sezione, vedere la sezione 16.

SEZIONE 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. 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

I più importanti sintomi ed effetti conosciuti sono descritti nella sezione 2.2 sull'etichettatura e/o nella sezione 11.

- 4.3 Indicazione dell'eventuale necessità di consultare immediatamente un medico oppure di trattamenti speciali**
nessun dato disponibile

SEZIONE 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 (NOx)

Ossidi di carbonio, ossidi di azoto (NOx)

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

SEZIONE 6: Misure in caso di rilascio accidentale

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

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

Vedere Sezione 8 per i dispositivi di protezione individuale.

6.2 Precauzioni ambientali

Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica

Ritirare e provvedere allo smaltimento senza creare polvere. 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.

SEZIONE 7: Manipolazione e immagazzinamento

7.1 Precauzioni per la manipolazione sicura

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.

Per le precauzioni vedere la sezione 2.2.

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.

Maneggiare e conservare in atmosfera inerte. Si idrolizza rapidamente.

7.3 Usi finali specifici

A parte gli usi descritti nella sezione 1.2 non sono contemplati altri usi specifici.

SEZIONE 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

Manipolare rispettando le buone pratiche di igiene industriale e di sicurezza adeguate. Lavarsi le mani prima delle pause ed alla fine della giornata lavorativa.

Protezione individuale

Protezioni per occhi/volto

Visiera e occhiali di protezione. 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.

Pieno contatto

Materiale: Gomma nitrilica

spessore minimo: 0,11 mm

Tempo di penetrazione: 480 min

Materiale testato: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Taglia M)

Contatto da spruzzo

Materiale: Gomma nitrilica

spessore minimo: 0,11 mm

Tempo di penetrazione: 480 min

Materiale testato: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Taglia M)

Fonte dei dati: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, tel. +49 (0)6659 87300, e-mail sales@kcl.de, metodo di prova: EN374

Se usato in soluzione, o misciato con altre sostanze, e in condizioni diverse da quelle menzionate nella norma EN 374, contattare il fornitore di guanti approvati dalla CE. Questa raccomandazione vale a titolo di consiglio e dev'essere valutata da un igienista industriale e da un responsabile della sicurezza al corrente della situazione specifica dell'uso previsto dai nostri clienti. Non si deve interpretare come un'approvazione di uno specifico scenario di esposizione.

Protezione fisica

Indumenti protettivi completi resistenti alle sostanze chimiche, 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 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).

Controllo dell'esposizione ambientale

Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

SEZIONE 9: Proprietà fisiche e chimiche

9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali

- | | |
|---------------------|---------------------------------------|
| a) Aspetto | Stato fisico: solido
Colore: beige |
| b) Odore | nessun dato disponibile |
| c) Soglia olfattiva | nessun dato disponibile |
| d) pH | 7,7 a 50 g/l |

Schede di sicurezza

e) Punto di fusione/punto di congelamento	Punto/intervallo di fusione: 117 - 122 °C - lit.
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	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

SEZIONE 10: Stabilità e reattività

10.1 Reattività

nessun dato disponibile

10.2 Stabilità chimica

Si può decomporre per esposizione all'aria umida o all'acqua.
Stabile nelle condizioni di stoccaggio raccomandate.

10.3 Possibilità di reazioni pericolose

nessun dato disponibile

10.4 Condizioni da evitare

Esposizione all'umidità.

10.5 Materiali incompatibili

Acidi forti, Agenti ossidanti forti, Basi forti, Ammine

10.6 Prodotti di decomposizione pericolosi

Altre prodotti di decomposizione pericolosi - nessun dato disponibile
In caso di incendio: vedere la sezione 5

SEZIONE 11: Informazioni tossicologiche

11.1 Informazioni sugli effetti tossicologici

Tossicità acuta

DL50 Orale - ratto - 1.071 mg/kg

Corrosione/irritazione cutanea

Pelle - su coniglio

Risultato: Corrosivo

Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi

Occhi - su coniglio

Risultato: Grave irritazione agli occhi

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

ulteriori informazioni

RTECS: nessun dato disponibile

SEZIONE 12: Informazioni ecologiche

12.1 Tossicità

Tossicità per i pesci CL0 - Leuciscus idus (Leucisco dorato) - 250 mg/l - 48 h

Tossicità per la daphnia e per altri invertebrati acquatici CE50 - Dafnia - 341,5 mg/l - 48 h

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

Valutazione PBT/vPvB non disponibile in quanto non richiesta o non effettuata la valutazione della sicurezza chimica.

12.6 Altri effetti avversi

nessun dato disponibile

Schede di sicurezza

potranno essere ritenute responsabili 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 sito www.sigma-aldrich.com e/o al retro della fattura o della bolla di accompagnamento.

SIGMA-ALDRICHsigma-aldrich.com**SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA**

secondo il Regolamento (CE) Num. 1907/2006

Versione 5.5 Data di revisione 19.06.2014

Data di stampa 05.07.2014

SEZIONE 1: Identificazione della sostanza o della miscela e della società/impresa**1.1 Identificatori del prodotto**

Nome del prodotto : *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride

Codice del prodotto : E6383

Marca : Sigma-Aldrich

Num. REACH : Per questa sostanza non è disponibile un numero di registrazione in quanto la sostanza o i suoi usi sono esentati da registrazione, il tonnellaggio annuale non richiede registrazione oppure la registrazione è prevista ad una scadenza successiva.

N. CAS : 25952-53-8

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 Antiveneni Niguarda Ca' Granda - Milano)

SEZIONE 2: Identificazione dei pericoli**2.1 Classificazione della sostanza o della miscela****Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008**

Irritazione cutanea (Categoria 2), H315

Lesioni oculari gravi (Categoria 1), H318

Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola (Categoria 3), H335

Per il testo completo delle indicazioni di pericolo (H) citate in questa sezione, riferirsi alla sezione 16.

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

Xi Irritante R37/38, R41

Per il testo completo delle frasi R citate in questa sezione, riferirsi alla sezione 16.

2.2 Elementi dell'etichetta**Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008**

Pittogramma



Avvertenza Pericolo

Indicazioni di pericolo
H315 Provoca irritazione cutanea.

H318	Provoca gravi lesioni oculari.
H335	Può irritare le vie respiratorie.
Consigli di prudenza	
P261	Evitare di respirare la polvere/ i fumi/ i gas/ la nebbia/ i vapori/ gli aerosol.
P280	Indossare guanti/ 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.
Descrizioni supplementari del rischio	nessuno(a)

2.3 Altri pericoli - nessuno(a)

SEZIONE 3: Composizione/informazioni sugli ingredienti

3.1 Sostanze

Sinonimi	:	EDAC EDHydrochloride N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidehydrochloride WSHydrochloride
Formula	:	C ₈ H ₁₇ N ₃ · HCl
Peso Molecolare	:	191,70 g/mol
N. CAS	:	25952-53-8
N. CE	:	247-361-2

Componenti pericolosi secondo il Regolamento (CE) No 1272/2008

Component	Classificazione	Concentrazione
1-(3-(Dimethylamino)propyl)-3-ethyl-carbodiimide hydrochloride		
N. CAS	25952-53-8	Skin Irrit. 2; Eye Dam. 1; STOT SE 3; H315, H318, H335
N. CE	247-361-2	
<= 100 %		

Componenti pericolosi secondo la Direttiva 1999/45/CE

Component	Classificazione	Concentrazione
1-(3-(Dimethylamino)propyl)-3-ethyl-carbodiimide hydrochloride		
N. CAS	25952-53-8	Xi, R37/38 - R41
N. CE	247-361-2	
<= 100 %		

Per il testo completo dei codici H e delle frasi R citati in questa sezione, vedere la sezione 16.

SEZIONE 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

Lavare con sapone e molta acqua. 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.

4.2 Principali sintomi ed effetti, sia acuti e che ritardati

I più importanti sintomi ed effetti conosciuti sono descritti nella sezione 2.2 sull'etichettatura e/o nella sezione 11.

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

nessun dato disponibile

SEZIONE 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 (NOx), 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

nessun dato disponibile

SEZIONE 6: Misure in caso di rilascio accidentale

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

Usare i dispositivi di protezione individuali. Evitare la formazione di polvere. Evitare di respirare vapori/nebbia/gas. Prevedere una ventilazione adeguata. Evacuare il personale in aree di sicurezza.

Non inalare polvere.

Vedere Sezione 8 per i dispositivi di protezione individuale.

6.2 Precauzioni ambientali

Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica

Ritirare e provvedere allo smaltimento senza creare polvere. 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.

SEZIONE 7: Manipolazione e immagazzinamento

7.1 Precauzioni per la manipolazione sicura

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.

Per le precauzioni vedere la sezione 2.2.

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: -20 °C

Sensibile all'umidità. Conservare in atmosfera inerte.

7.3 Usi finali specifici

A parte gli usi descritti nella sezione 1.2 non sono contemplati altri usi specifici.

SEZIONE 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

Manipolare rispettando le buone pratiche di igiene industriale e di sicurezza adeguate. Lavarsi le mani prima delle pause ed alla fine della giornata lavorativa.

Protezione individuale

Protezioni per occhi/volto

Visiera e occhiali di protezione. 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.

Pieno contatto

Materiale: Gomma nitrilica

spessore minimo: 0,11 mm

Tempo di penetrazione: 480 min

Materiale testato: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Taglia M)

Contatto da spruzzo

Materiale: Gomma nitrilica

spessore minimo: 0,11 mm

Tempo di penetrazione: 480 min

Materiale testato: Dermatril® (KCL 740 / Aldrich Z677272, Taglia M)

Fonte dei dati: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, tel. +49 (0)6659 87300, e-mail sales@kcl.de, metodo di prova: EN374

Se usato in soluzione, o misciato con altre sostanze, e in condizioni diverse da quelle menzionate nella norma EN 374, contattare il fornitore di guanti approvati dalla CE. Questa raccomandazione vale a titolo di consiglio e dev'essere valutata da un igienista industriale e da un responsabile della sicurezza al corrente della situazione specifica dell'uso previsto dai nostri clienti. Non si deve interpretare come un'approvazione di uno specifico scenario di esposizione.

Protezione fisica

Indumenti protettivi completi resistenti alle sostanze chimiche. 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 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).

Controllo dell'esposizione ambientale

Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

SEZIONE 9: Proprietà fisiche e chimiche

9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali

a) Aspetto	Stato fisico: cristallino Colore: bianco, biancastro
b) Odore	nessun dato disponibile
c) Soglia olfattiva	nessun dato disponibile
d) pH	nessun dato disponibile
e) Punto di fusione/punto di congelamento	Punto/intervallo di fusione: 110 - 115 °C
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	< 1,3 hPa a 20 °C
l) Densità di vapore	nessun dato disponibile
m) Densità relativa	nessun dato disponibile
n) Idrosolubilità	solubile 0,2 g/l
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

SEZIONE 10: Stabilità e reattività

10.1 Reattività

nessun dato disponibile

10.2 Stabilità chimica

Stabile nelle condizioni di stoccaggio raccomandate.

10.3 Possibilità di reazioni pericolose

nessun dato disponibile

10.4 Condizioni da evitare

nessun dato disponibile

10.5 Materiali incompatibili

Agenti ossidanti forti, Acidi forti

10.6 Prodotti di decomposizione pericolosi

Altre prodotti di decomposizione pericolosi - nessun dato disponibile
In caso di incendio: vedere la sezione 5

SEZIONE 11: Informazioni tossicologiche

11.1 Informazioni sugli effetti tossicologici

Tossicità acuta

nessun dato disponibile

DL50 intravenoso - topo - 56 mg/kg

Corrosione/irritazione cutanea

nessun dato disponibile

Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi

nessun dato disponibile

Sensibilizzazione respiratoria o cutanea

Un'esposizione ripetuta o prolungata può provocare reazioni allergiche in alcuni soggetti sensibili.

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

ulteriori informazioni

RTECS: FF2200000

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

SEZIONE 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

Valutazione PBT/vPvB non disponibile in quanto non richiesta o non effettuata la valutazione della sicurezza chimica.

Ulteriori informazioni

Diritti d'autore 2014 Sigma-Aldrich Co. LLC. 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 Sigma-Aldrich Corporation e le suo filiali non potranno essere ritenute responsabili 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 sito www.sigma-aldrich.com e/o al retro della fattura o della bolla di accompagnamento.

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA

secondo il Regolamento (CE) Num. 1907/2006

Versione 5.0 Data di revisione 24.07.2012

Data di stampa 05.07.2014

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

1.1 Identificatori del prodotto

Nome del prodotto : Clorocromato di piridinio

Codice del prodotto : 190144

Marca : Aldrich

N. CAS : 26299-14-9

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]

Solidi comburenti (Categoria 2)

Sensibilizzazione cutanea (Categoria 1)

Cancerogenicità, Inalazione (Categoria 1B)

Tossicità acuto per l'ambiente acquatico (Categoria 1)

Tossicità cronica per l'ambiente acquatico (Categoria 1)

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

Può provocare il cancro per inalazione. Può provocare l'accensione di materie combustibili. Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle. Altamente tossico per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico.

2.2 Elementi dell'etichetta

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

Pittogramma



Avvertenza

Pericolo

Indicazioni di pericolo

H272

Può aggravare un incendio; comburente.

H317

Può provocare una reazione allergica cutanea.

H350i

Può provocare il cancro se inalato.

H410

Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

Consigli di prudenza

P201

Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.

P220 Tenere/conservare lontano da indumenti/materiali combustibili.
 P273 Non disperdere nell'ambiente.
 P280 Indossare guanti.
 P308 + P313 IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
 P501 Smaltire il contenuto/ contenitore in un impianto d'eliminazione di rifiuti autorizzato.

Descrizioni supplementari del rischio nessuno(a)

Unicamente ad uso di utilizzatori professionali.

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

Simbolo/i di pericolo



Fraasi "R"

R49 Può provocare il cancro per inalazione.
 R 8 Può provocare l'accensione di materie combustibili.
 R43 Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.
 R50/53 Altamente tossico per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico.

Fraasi "S"

S53 Evitare l'esposizione - procurarsi speciali istruzioni prima dell'uso.
 S45 In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).
 S60 Questo materiale e il suo contenitore devono essere smaltiti come rifiuti pericolosi.
 S61 Non disperdere nell'ambiente. Riferirsi alle istruzioni speciali/schede informative in materia di sicurezza.

Unicamente ad uso di utilizzatori professionali.

2.3 Altri pericoli - nessuno(a)

3. COMPOSIZIONE/ INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI

3.1 Sostanze

Sinonimi : PCC
 Formula : C₅H₅N · ClCrO₃H
 Peso Molecolare : 215,56 g/mol

Component	Concentrazione
Pyridinium chlorochromate	
N. CAS	26299-14-9
N. CE	247-595-5

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

Lavare con sapone e molta acqua. Consultare un medico.

In caso di contatto con gli occhi

Come precauzione sciacquare gli occhi con acqua.

Se ingerito

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

4.2 Principali sintomi ed effetti, sia acuti e che ritardati

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

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 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 (NOx), Gas di acido cloridrico, Ossido di cromo

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

Spruzzi d'acqua possono essere usati per raffreddare contenitori chiusi.

6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE

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

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

6.2 Precauzioni ambientali

Evitare sversamenti o perdite supplementari, se questo può essere fatto senza pericolo. Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi. La discarica nell'ambiente deve essere evitata.

6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica

Spazzare e spalare. Contenere e raccogliere quanto riversato accidentalmente con un aspirapolvere protetto dalle scariche elettriche o con una spazzola bagnata e porlo in un recipiente rispettando le direttive locali (riferirsi alla sezione 13). 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. Evitare la formazione di polvere e la dispersione del prodotto nell'aria. Evitare l'esposizione - procurarsi speciali istruzioni prima dell'uso. Adottare un'adeguata ventilazione nei luoghi dove si sviluppano le polveri. Conservare lontano da fiamme e scintille - Non fumare. Tenere lontano da fonti di calore e altre cause d'incendio.

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.

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

Manipolare rispettando le buone pratiche di igiene industriale e di sicurezza adeguate. Lavarsi le mani prima delle pause ed alla fine della giornata lavorativa.

Protezione individuale

Protezioni per occhi/volto

Visiera e occhiali di protezione. 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 dall'immersione

Materiale: Gomma nitrilica

spessore minimo: 0,11 mm

Tempo di penetrazione: > 480 min

Materiale testato: Dermatril® (Aldrich Z677272, Taglia M)

Protezione dagli schizzi

Materiale: Gomma nitrilica

spessore minimo: 0,11 mm

Tempo di penetrazione: > 30 min

Materiale testato: Dermatril® (Aldrich Z677272, Taglia M)

Fonte dei dati: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, tel. +49 (0)6659 873000, e-mail sales@kcl.de, metodo di prova: EN374

Se usato in soluzione, o misciato con altre sostanze, e in condizioni diverse da quelle menzionate nella norma EN 374, contattare il fornitore di guanti approvati dalla CE. Questa raccomandazione vale a titolo di consiglio e dev'essere valutata da un Igienista Industriale al corrente della situazione specifica dell'uso previsto dai nostri clienti. Non si deve interpretare come un'approvazione di uno specifico scenario di esposizione.

Protezione fisica

Indumenti protettivi completi resistenti alle sostanze chimiche, 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 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).

9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE

9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali

- | | |
|------------|---|
| a) Aspetto | Stato fisico: cristallino, polvere
Colore: arancione |
| b) Odore | nessun dato disponibile |

Aldrich - 190144

Pagina 4 di 7

Schede di sicurezza

c) Soglia olfattiva	nessun dato disponibile
d) pH	nessun dato disponibile
e) Punto di fusione/punto di congelamento	Punto/intervallo di fusione: 205 - 208 °C - lit.
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	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	La sostanza o la miscela è classificata come ossidante con la categoria 2.

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

nessun dato disponibile

10.5 Materiali incompatibili

Alcoli, Acetone, Metanolo

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

nessun dato disponibile

Corrosione/irritazione cutanea

nessun dato disponibile

Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi

nessun dato disponibile

Sensibilizzazione respiratoria o cutanea

Può causare una reazione allergica sulla pelle.

Mutagenicità delle cellule germinali

nessun dato disponibile

Cancerogenicità

Presunto potenzialmente cancerogeno per l'uomo Può provocare il cancro se inalato.

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 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

9. Bibliografia

-
- ¹ National Nanotechnology Initiative (NNI). 2007. Website. <http://www.nano.gov/>.
- ² A. Arcangeli; S. Ferrati; M.Ferrari; Le nanotecnologie applicate alla medicina: un futuro ormai vicino. *Toscana Medica*, **2013**, 4, 6.
- ³ G. Serenelli; Nanoscienze, nanotecnologia e nanomedicina: la rivoluzione tecnologica del XXI secolo; *riflessioni.it*; **2011**; novembre.
- ⁴ K. Maier-Hauff; F. Ulrich; D. Nestler; H. Niehoff; P. Wust; B. Thiesen; H. Orawa; V. Budach; A. Jordan; Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme; *Journal of Neuro-Oncology*; **2011**; 103; 2; 317-324.
- ⁵ J. Kreuter; Nanoparticles as Drug Delivery Systems; *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*; **2004**; 7; 161-180.
- ⁶ E. Locatelli; M. C. Franchini; Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles:synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system; *Journal of Nanoparticles Research*; **2012**; 14 1-17.
- ⁷ H. Yu; K. Kim; Direct nose-to-brain transfer of a growth hormone releasing neuropeptide, hexarelin after intranasal administration to rabbits; *International Journal of Pharmaceutics*; **2009**; 378; 73-79.
- ⁸ H. E. Gendelman; R. L. Mosley; M. D. Boska; J. Mcmillan; The promise of nanoneuromedicine; *Nanomedicine*; **2014**; 9(2); 171-176.
- ⁹ X. Gao; W. Tao; W. Lu; Q. Zhang; Y. Zhang; X. Jiang; S. Fu; Lectin-conjugated PEG-PLA nanoparticles: Preparation and brain delivery after intranasal administration; *Biomaterials*; **2006**; 27; 3482-3490.
- ¹⁰ E.B. Rutledge; the Central Nervous System: Can we rebuild it? Can we make it better than before?; *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology, and Medicine*; **2014**; website; <http://www.nanomedjournal.com/>.
- ¹¹ G. A. Silva; Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges; *Nature*; **2006**; 7; 65-74.
- ¹² T. Silva; J. Teixeira; F. Remião; F. Borges; Alzheimer's Disease, Cholesterol, and Statin: The Junctions of Important Metabolic Pathways; *Angewandte Chemie*; **2013**; 52; 1110-1121.
- ¹³ Q. Song; M. Huang; L. Yao; X. Wang; X. Gu; J. Chen; J. Chen; J. Huang; Q. Hu; T. Kang; Z. Rong; H. Qi; G. Zheng; H. Chen; X. Gao; Lipoprotein-Based Nanoparticles Rescue the Memory Loss of Mice with Alzheimer's Disease by Accelerating the Clearance of Amyloid-Beta; *ACSnano*; **2014**; 8(3); 2345-2349.

-
- ¹⁴ I. Slutsky; N. Abumaria; L.J. Wu; C. Huang; L. Zhang; B. Li; X. Zhao; A. Govindarajan; M.G. Zhao; M. Zhuo; S. Tonegawa; G. Liu; Enhancement of Learning and Memory by Elevating Brain Magnesium; *Neuron*; **2010**; 65; 165-177.
- ¹⁵ www.fda.gov
- ¹⁶ G. Medea; Nuove terapie per il diabete mellitico tipo 2 (analoghi del GLP-1): la soddisfazione del paziente e il miglioramento della qualità della vita; *Rivista della Società Italiana di Medicina Generale*; **2011**; 5; 51-57.
- ¹⁷ V. Borzì; Liraglutide, il primo analogo del GLP-1 umano: caratteristiche peculiari e nuovi dati clinici; *Giornale di Gerontologia*; **2009**; 57; 51-56.
- ¹⁸ C. L. Leibson; W.A. Rocca; V. A. Hanson; R. Cha; E. Kokmen; P. C. O'Brien; P. J. Palumbo; Risk of Dementia among Persons with Diabetes Mellitus: A Population-based Cohort Study; *American Journal of Epidemiology*; **1997**; 145(4); 301-308.
- ¹⁹ K. Talbot; H. Y. Wang; H. Kazi; L. Y. Han; K. P. Bakshi; A. Stucky; R. L. Fuino; K. R. Kawaguchi; A. J. Samoyedny; R. S. Wilson; Z. Arvanitakis; J.A. Schneider; B.A. Wolf; D. A. Bennet; J. Q. Trojanowski; S. E. Arnold; Demostred brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline; *Journal of Clinical Investigation*; **2012**; 122(4); 1316-1338.
- ²⁰ M. A. Reger; G. S. Green; L. D. Baker; B. Cholerton; M.A. Fishel; S. R. Plymate; M. M. Cherrier; G. D. Schellenberg; W. H. Frey II; S. Craft; Intranasal Insulin Administration Dose-Dependently Modulates Verbal Memory and Plasma β -Amyloid in Memory-Impaired Older Adults; *Journal of Alzheimer's disease*; **2008**; 13(3); 323-331.
- ²¹ S. Craft; Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and omplications for treatment; *Current Alzheimer Research*; **2007**; 4(2); 147-152.
- ²² C. Holscher; Central effect of GLP-1: new opportunities for treatments of neurodegenerative disease; *Society for Endocrinology*; **2013**.
- ²³ M. L. Mayer; G. L. Westbrook; P.B. Guthrie; Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones; *Nature*; **1984**; 309; 261-263.
- ²⁴ F. Gao; B. Ding; L. Zhou; X. Gao; H. Guo; H. Xu; Magnesium sulphate provides neuroprotection in lipopolysaccharide-activate primary microglia by inhibiting NF-kB pathway; *Journal of Surgical Research*; **2013**; 184(2); 944-950.
- ²⁵ A. Lu; E. L. Salabas; F. Schöth; Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application; *Angewandte Chemie*; **2007**; 46; 1222-1244.
- ²⁶ S. Laurent; D. Ferge; M. Port; A. Roch; C. Robic; L. V. Elst; R. N. Muller; Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical, Characterizations and Biological Applications; *American Chemical Society*; 2008; 108(6); 2064-2110.

-
- ²⁷ W. Wu; Q. He; C. Jiang; Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies; *Nanoscale Research Letters*; **2008**; 3; 397-415.
- ²⁸ G. A. Hussein; W. G. Pitt; Micelles and Nanoparticles for Ultrasonic Drug and Gene Delivery; *Advanced Drug Delivery Reviews*; **2008**; 60(10); 1137-1152.
- ²⁹ M. S. Muthu; D. T. Leong; L. Mei; S. Feng; Nanotheranostic-Application and Further Development of Nanomedicine Strategies for Advanced Theranostics; *Theranostics*; **2014**; 4(6); 660-677.
- ³⁰ W. Gao; D. Vecchio; J. Li; J. Zhu; Q. Zhang; V. Fu; J. Li; S. Thamphiwatana; D. Lu; L. Zhang; Hydrogel Containing Nanoparticle-Stabilized Liposomes for Topical Antimicrobial Delivery; *ACS Nano*; **2014**; 8(3); 2900-2907.
- ³¹ R. A. Jain; The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide)(PLGA) devices; *Biomaterials*; **2000**; 21(23); 2475-2490.
- ³² D. E. Owens III; N. A. Peppas; Opsonization, biodistribution and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles; *International Journal of Pharmaceutics*; **2006**; 307(1); 93-102.
- ³³ J. Cheng; B. A. Teply; I. Sherifi; J. Sung; G. Luther; F. X. Gu; E. Levy-Nissenbaum; A. F. Randovic-Moreno; R. Langer; O. C. Farokhzad; Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery; *Biomaterials*; **2007**; 28(5); 869-876.
- ³⁴ S. Schubert; J. T. Delaney; J. U. S. Schubert; Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid); *Soft Matter*; **2011**; 7; 1581-1588.
- ³⁵ K. S. Soppimath; T. M. Aminabhavi; A. R. Kulkarni; W. E. Rudzinski; Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices; *Journal of Controlled Release*; **2001**; 70; 1-2; 1-20.
- ³⁶ M. Comes Franchini; G. Baldi; D. Bonacchi; D. Gentili; G. Giudetti; A. Lascialfari; M. Corti; P. Marmorato; J. Ponti; E. Micotti; U. Guerrini; L. Sironi; P. Gelosa; C. Ravagli; A. Ricci; Bovine serum albumin-based magnetic nanocarrier for MRI diagnosis and hyperthermic therapy: a potential theranostic approach against cancer; *Small*; **2010**; 6(3); 366-370.
- ³⁷ D. Gentili; G. Ori; M. Comes Franchini; double phase transfer of gold nanorods for surface functionalization and entrapment into PEG-based nanocarriers. *Chemical Communications*, **2009**, 5874-5876.
- ³⁸ E. Locatelli; P. Matteini; F. Sasdelli; A. Pucci; M. Chiariello; V. Molinari; R. Pini; M. Comes Franchini; Surface chemistry and entrapment of magnesium nanoparticles into polymeric micelles: a highly biocompatible tool for photothermal therapy; *Chemical Communications*, 2014, 50, 7783-7786.
- ³⁹ D. Sehgal; I. K. Vijay; A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation; *Analytical Biochemistry*; **1994**, 218(1); 87-91.