

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

Micelle polimeriche «Core-Shell» rivestite di  
polidopamina

Tesi di laurea sperimentale

**CANDIDATO**

Giovanni Raimondo

**RELATORE**

**Chiar.mo Prof. Loris Giorgini**

**CORRELATORE**

**Dott. Massimo Benaglia**

# INDICE

CAPITOLO	PAGINA
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1 I polimeri e la polimerizzazione radicalica	1
1.2 La polimerizzazione RAFT	4
1.3 L'agente RAFT	7
1.4 Monomeri nella polimerizzazione RAFT	8
1.5 Sintesi di copolimeri a blocchi mediante tecnica RAFT	9
1.6 Reazioni di post-polimerizzazione	10
1.7 Micelle polimeriche	12
1.8 Stabilizzazione delle micelle con Polidopamina	14
<b>2. SCOPO</b>	<b>18</b>
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>19</b>
3.1 Sintesi dei copolimeri	19
3.1.1 Sintesi dell'omopolimero poli(glicidil metacrilato) PGMA	19
3.1.2 Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PBMA	23
3.1.3 Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA	26
3.2 Trattamenti di post-polimerizzazione	29
3.2.1 Reazione di funzionalizzazione con la morfolina del PGMA-b-PBMA e ottenimento di PHMPMA-b-PBMA	30
3.2.2 Reazione di funzionalizzazione con la morfolina del PGMA-b-PMMA e ottenimento di PHMPMA-b-PMMA	34
3.3 Formazione, caratterizzazione e stabilizzazione delle micelle polimeriche	38
3.3.1 Formazione delle micelle con PHMPMA-b-PBMA	38
3.3.2 Stabilizzazione delle micelle di PHMPMA-b-PBMA con polidopamina	40
3.3.3 Formazione delle micelle con PHMPMA-b-PMMA	48
3.3.4 Stabilizzazione delle micelle di PHMPMA-b-PMMA con polidopamina	49

3.4 <i>Caratterizzazione termica</i>	52
3.4.1 Analisi DSC	52
3.4.2 Analisi TGA	56
<b>4. CONCLUSIONI</b>	<b>60</b>
<b>5. PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>62</b>
5.1 Solventi e reagenti	62
5.2 Misure di caratterizzazione	62
5.3 Sintesi del poli (glicidil metacrilato)	64
5.4 Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PBMA	65
5.5 Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA	66
5.6 Reazione di funzionalizzazione con la morfolina e ottenimento di PHMPMA-b-PBMA	67
5.7 Reazione di funzionalizzazione con la morfolina e ottenimento di PHMPMA-b-PMMA	69
5.8 Formazione delle micelle polimeriche	71
5.9 <i>Stabilizzazione delle micelle con polidopamina</i>	72
5.9.1 Concentrazione di dopamina 0,01 M	72
5.9.2 Concentrazione di dopamina 0,006 M	72
5.9.3 Concentrazione di dopamina variabile	72
5.10 Stabilizzazione con polidopamina di micelle contenenti il Nile-red	73
5.11 Polimerizzazione della dopamina a polidopamina	73
5.12 <i>Tecniche di analisi</i>	74
5.12.1 Dynamic Light Scattering (DLS)	74
5.12.2 Cromatografia a permeazione di gel (GPC)	75
5.12.3 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	76
5.12.4 Analisi termogravimetrica (TGA)	76
5.12.5 Sfera integratrice	77
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>78</b>

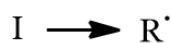
# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 I polimeri e la polimerizzazione radicalica

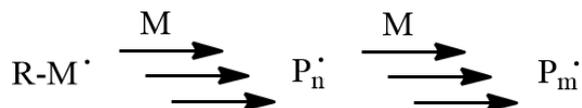
“*Plastics. There is a great future in plastics. Think about it*”. Questa frase, risalente al film “Il laureato” del 1967, probabilmente racchiude in sé il senso della ricerca degli ultimi 50 anni; da allora la tecnologia ha fatto passi da gigante ed ha permesso di sviluppare innovazioni e “plastiche” sempre più sorprendenti per soddisfare le necessità degli esseri umani. Al giorno d’oggi infatti è possibile produrre polimeri a memoria di forma, materiali compositi, polimeri resistenti al fuoco e ancora componenti polimerici in grado di rispondere agli stimoli esterni quali segnali elettrici, termici, meccanici e di pH [1]. Tutto ciò è stato reso possibile grazie alla ricerca per sviluppare vari metodi di sintesi che nel corso degli anni sono stati perfezionati in modo tale da garantire prodotti con caratteristiche migliori.

Dal punto di vista industriale uno dei processi di sintesi polimerica maggiormente utilizzati è la *polimerizzazione radicalica*, in cui la specie responsabile dell’accrescimento della catena macromolecolare è proprio un radicale (Figura 1).

Fase di inizio



Fase di propagazione



Fase di terminazione

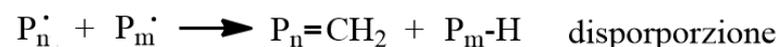


Figura 1: Schema di una polimerizzazione radicalica classica.

Essa possiede numerosi vantaggi che la pongono fra le prime vie di sintesi:

- possibilità di polimerizzare un’ampia varietà di monomeri, fra cui (met)acrilati, (met)acrilammidi, acrilonitrile, stireni, dieni e monomeri vinilici;
- tolleranza di funzionalità non protette nei monomeri o nel solvente, come gruppi OH, COOH, NR<sub>2</sub> e SO<sub>3</sub>H;



Le tecniche più utilizzate da questo punto di vista sono tre: l'ATRP, la NMP e la RAFT [3]. Nella tecnica *ATRP* (Atom Transfer Radical Polymerization), scoperta da Wang & Matyjaszewski e Sawamoto nel 1995, il meccanismo prevede la rottura omolitica reversibile di un legame carbonio-alogeno (come Cl o Br) tramite una reazione redox tra una specie dormiente  $P_n-X$  e un complesso di un metallo di transizione (ad esempio il rame con la 2,2'-bipiridina): in questo modo si instaura un veloce e dinamico equilibrio tra una bassa concentrazione di radicali in crescita e una grande quantità di catene dormienti che non sono più in grado di propagare [4,5]. Al momento è la tecnica più utilizzata grazie al controllo sulla distribuzione dei pesi molecolari, alla facilità di esecuzione e all'uso di catalizzatori poco costosi; questi ultimi rappresentano però uno svantaggio in quanto possono essere presenti come impurezze nel prodotto finale.

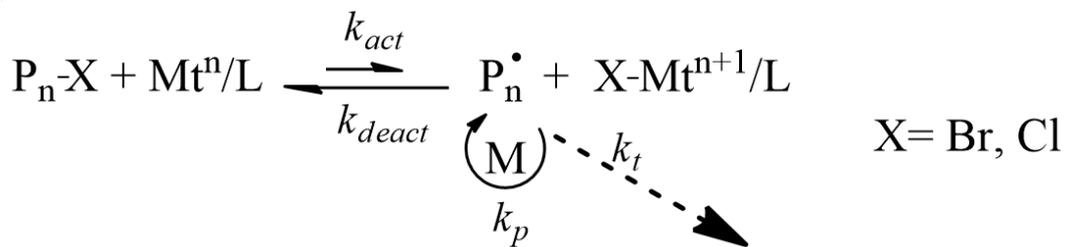


Figura 4: Meccanismo della polimerizzazione ATRP.

La *NMP* [6] (Nitroxide-Mediated Polymerization), sviluppata per la prima volta in Australia al CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation*) negli anni '80 [2], si basa sulla cattura reversibile delle catene propaganti da parte di radicali nitrossidi che porta alla formazione di catene dormienti (alcossiammine); uno dei radicali più utilizzati a base di azoto è il 2,2,6,6-tetrametilpiperidinilossi (TEMPO) (Figura 5).

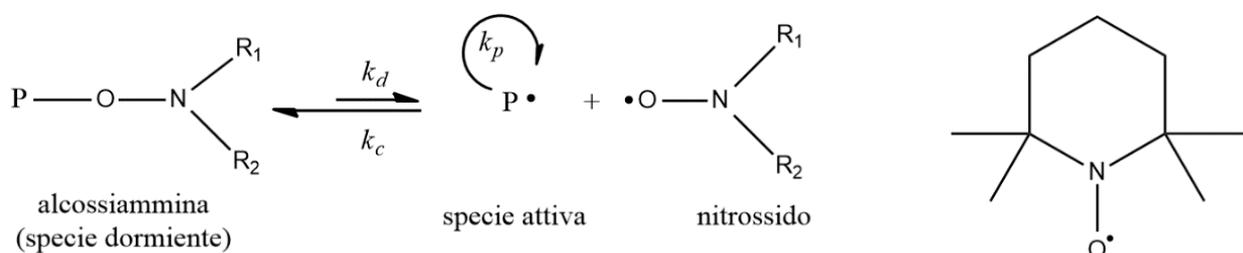


Figura 5: Meccanismo della polimerizzazione NMP; a fianco, struttura del TEMPO.

Quando l'equilibrio è spostato verso sinistra, la concentrazione delle specie attive allo stato stazionario è bassa e di conseguenza viene ridotta la probabilità di terminazione irreversibile.

Questo sistema permette di polimerizzare un ampio range di monomeri (tipicamente stireni e derivati), è libero da metalli e non richiede purificazioni; il costo e la disponibilità del nitrossido e/o dell'alcolossiammina rimane tutt'ora un problema.

## 1.2 La polimerizzazione RAFT

La tecnica RAFT (Reversible Addition Fragmentation chain Transfer), introdotta per la prima volta nel 1998 dal dottor Ezio Rizzardo e il suo team [7] prevede una disattivazione reversibile basata su un meccanismo di trasferimento di catena il quale implica uno scambio di funzionalità tra i radicali ancora attivi e le specie dormienti [1] (chiamate macroRAFT):

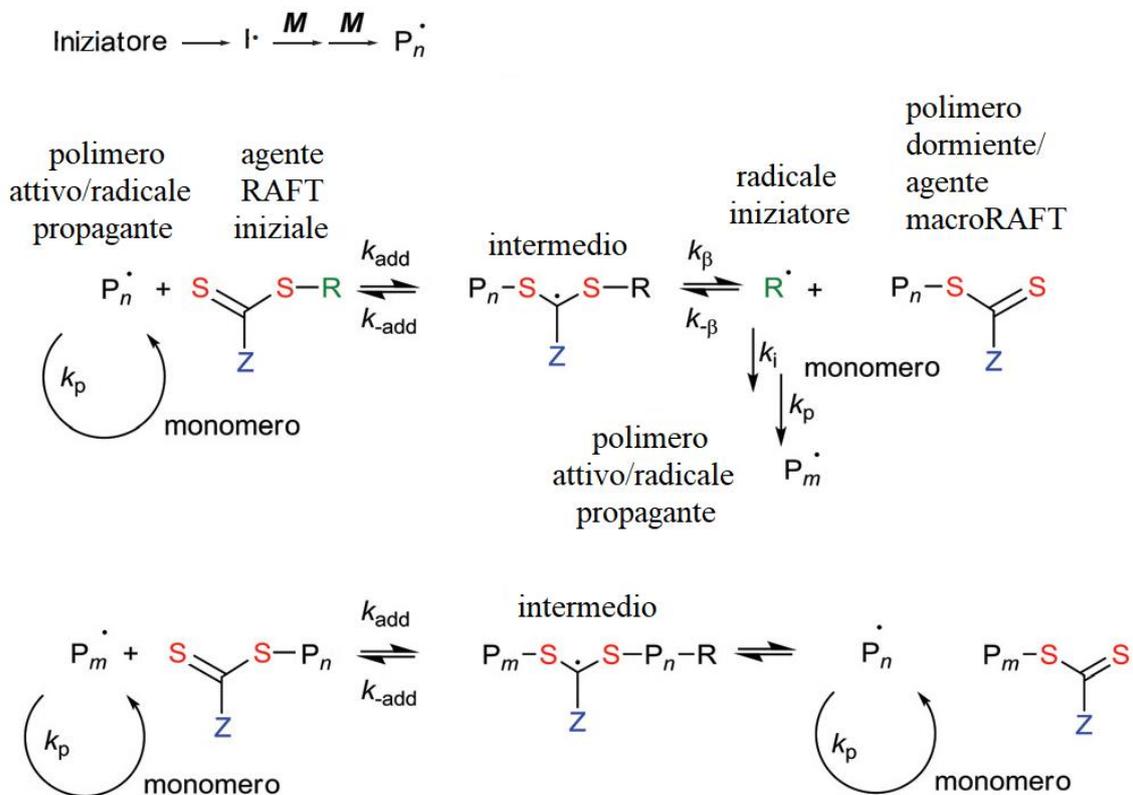


Figura 6: Meccanismo della polimerizzazione RAFT.

Il primo stadio è quello di una polimerizzazione radicalica classica in cui l'iniziatore si decompone per formare dei radicali, i quali attaccano il monomero per dare delle catene con peso molecolare via via crescente ( $\text{P}_n^\bullet$ ); in seguito il radicale propagante attacca il composto tiocarbonilico ( $\text{RSC}(\text{Z})=\text{S}$ ) dando vita ad un radicale intermedio che si scinde formando un composto polimerico tiocarbonilico ( $\text{P}_n\text{S}(\text{Z})\text{C}=\text{S}$ ) e un nuovo radicale ( $\text{R}^\bullet$ ). La reazione di quest'ultimo con altro monomero genera una nuova catena polimerica attiva ( $\text{P}_m^\bullet$ ). Il rapido

instaurarsi dell'equilibrio fra le specie attive ( $P_n^\bullet$  e  $P_m^\bullet$ ) e quelle dormienti (macroRAFT) garantisce la stessa probabilità di crescita per tutte le catene, il che permette di ottenere polimeri con una polidispersità molto stretta. Una volta terminata la polimerizzazione (perché è finito il monomero o perché questo viene allontanato dall'ambiente di reazione) la maggior parte delle catene conserva la funzione tiocarbonilto dell'agente RAFT e possono essere isolate come prodotto stabile. Le caratteristiche principali della polimerizzazione RAFT sono le seguenti:

- il processo può essere svolto semplicemente aggiungendo una giusta quantità dell'agente RAFT appropriato mantenendo inalterate le condizioni di reazione (monomero, iniziatore, solvente e temperatura);
- tutte le catene crescono finché è presente il monomero;
- i valori di polidispersità che di solito si ottengono sono  $< 1,2$ ;
- è possibile ottenere polimeri con architetture complesse (a stella, iper-ramificati, a blocchi ecc..).



Figura 7: Struttura dei copolimeri ottenibili con la RAFT.

Ciononostante una limitazione della RAFT consiste nel fatto che le condizioni di reazione (vale a dire la scelta del solvente, il tipo di agente RAFT e la procedura) devono essere ottimizzate per ogni monomero. Come tutte le polimerizzazioni radicaliche, anche la RAFT necessita di un iniziatore ovvero di una sostanza in grado di fornire radicali (solitamente uno dei più comuni è il 2-2'-azobisisobutirronitrile, *AIBN*). La concentrazione di iniziatore deve essere scelta con attenzione al fine di ottenere un bilancio adeguato tra velocità di polimerizzazione e reazioni di terminazione per accoppiamento fra radicali, cercando di minimizzare questo secondo aspetto in quanto porterebbe a delle catene inattive. I fattori da considerare per attuare questa scelta sono molteplici:

- basta una piccola quantità di iniziatore per attivare un gran numero di agenti RAFT a causa dell'instaurarsi dell'equilibrio che porta alla formazione di altri radicali;

- maggiore è la quantità di iniziatore, maggiore è la presenza di radicali; questo comporta un aumento della velocità di propagazione ma anche della cinetica di terminazione, portando a delle catene polimeriche non più attive; in questo modo diventa difficile avere un controllo sul peso molecolare e sulla polidispersità;
- utilizzando una concentrazione di RAFT elevata si diminuisce la presenza di radicali; così facendo la velocità della reazione si abbassa ma al tempo stesso si minimizzano le reazioni di terminazione, in modo tale da avere un maggiore controllo sulla reazione.

Per i motivi sopra elencati tendenzialmente vengono utilizzati rapporti RAFT/iniziatore elevati ( $\gg 1$ ) anche perché la quantità di iniziatore non influenza la lunghezza delle catene. Esiste infatti una formula utile a predire il peso molecolare di un polimero ottenuto tramite la tecnica RAFT in cui compaiono solo le concentrazioni di monomero e dell'agente RAFT:

$$Mn(calc) \approx \frac{[M]_0 - [M]_t}{[CTA]} \cdot m_t + m_{CTA}$$

dove  $[M]_0 - [M]_t$  è il monomero consumato ( $= [M]_0 \cdot conv$ ),  $[CTA]$  è la concentrazione di RAFT,  $m_{CTA}$  è il suo peso molecolare e  $m_t$  è il peso molecolare del monomero.

### 1.3 L'agente RAFT

Un agente RAFT può essere schematizzato così:

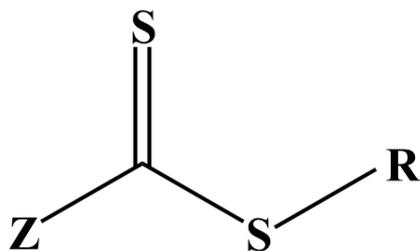


Figura 8: Struttura di un generico agente RAFT.

Le sue caratteristiche dipendono fortemente dal radicale uscente  $R\cdot$  e dal sostituente Z che può essere scelto per attivare o disattivare il doppio legame C=S e modificare la stabilità dell'intermedio radicale. In genere la scelta viene effettuata tenendo conto di alcuni aspetti fondamentali:

- l'agente RAFT iniziale e il macroRAFT devono possedere un doppio legame C=S reattivo per favorire l'attacco da parte della catena propagante  $P_n\cdot$  o  $P_m\cdot$  ( $k_{add}$  elevata);
- gli intermedi radicalici devono frammentarsi rapidamente ( $k_{\beta}$  elevata, legame S-R debole);
- il radicale  $R\cdot$  deve essere in grado di re-iniziare la polimerizzazione.

La velocità di addizione al doppio legame è fortemente influenzata dal sostituente Z. Questa velocità è alta quando Z è un arile, alchile o S-alchile, tutti gruppi capaci di delocalizzare l'elettrone spaiato, mentre è più bassa quando Z è un -OR o un N,N-dialchile; in questo caso la coppia di elettroni solitaria dell'ossigeno o dell'azoto interagisce con il doppio legame, portando a delle forme di risonanza in cui lo zolfo, essendo ricco di elettroni, rende meno attivo il legame C=S per un attacco da parte della specie propagante (Figura 9).

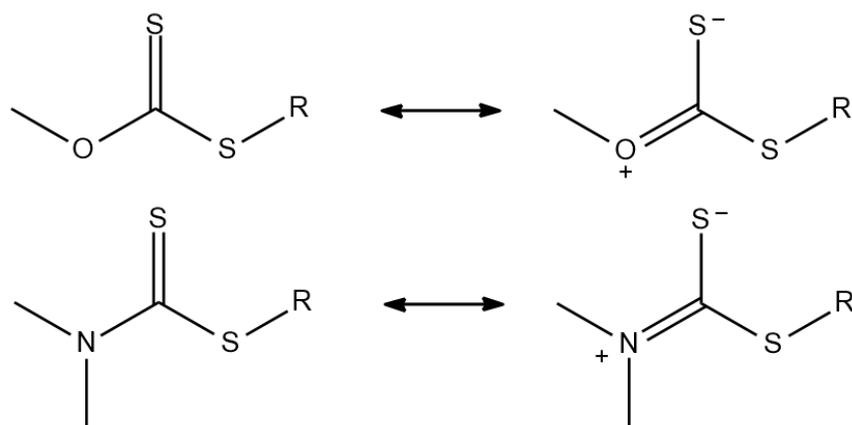


Figura 9: Formule di risonanza di alcuni agenti RAFT.

R deve essere un buon gruppo uscente, cioè deve avere una stabilità uguale o maggiore rispetto alla catena propagante ( $P_n^\bullet$ ) mantenendo comunque buone capacità di iniziazione della polimerizzazione ( $k_i \geq k_p$ ).

Il benzile ad esempio ( $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ) è un ottimo gruppo uscente rispetto a catene stireniche e acriliche ma nella polimerizzazione del PMMA risulta essere il gruppo uscente peggiore; il radicale trifenilmetano è un radicale estremamente stabile ma non può essere usato come gruppo uscente perché a causa dell'ingombro sterico e dell'eccessiva stabilità l'addizione al monomero risulta impedita. Dunque è essenziale bilanciare le forze in gioco e scegliere opportunamente i gruppi R e Z per ottenere un agente RAFT appropriato.

## 1.4 Monomeri nella polimerizzazione RAFT

In base alla reattività dei monomeri nella polimerizzazione RAFT, questi possono essere suddivisi in due classi. I monomeri *meno attivi* (LAMs) sono quelli in cui il doppio legame del monomero è vicino ad uno ossigeno, un azoto, un alogeno o ad una coppia solitaria di uno zolfo; di questa classe fanno parte per esempio il vinil acetato, l'*N*-vinilpirrolidone ed il cloruro di vinile.

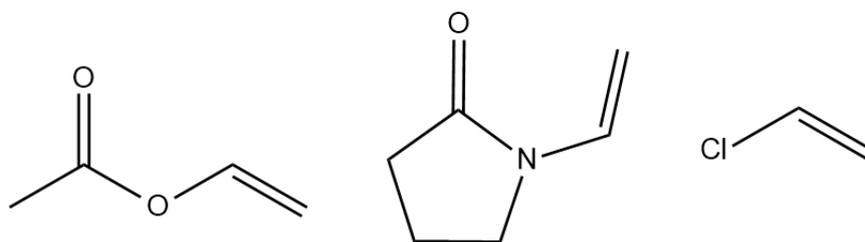


Figura 10: Esempi di monomeri meno attivi (vinil acetato, *N*-vinilpirrolidone e cloruro di vinile).

I monomeri *più attivi* invece hanno la caratteristica di avere il doppio legame coniugato ad un sistema aromatico, un doppio legame, un gruppo carbonile o un nitrile; gli esempi più classici sono lo stirene e i suoi derivati, il metil metacrilato, il metil acrilato e l'acrilonitrile.

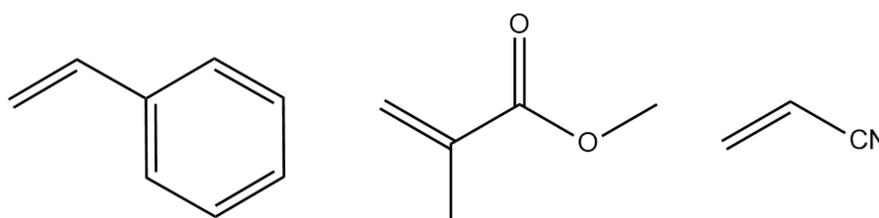


Figura 11: Esempi di monomeri più attivi (stirene, metil-metacrilato e acrilonitrile).

Nel primo caso diventa molto difficile controllare la polimerizzazione perché durante la reazione si formano dei radicali molto reattivi che, una volta legati all'agente RAFT come

catena polimerica, risultano troppo instabili per essere dei buoni gruppi uscenti e re-iniziare la polimerizzazione, con conseguente andamento non controllato della polimerizzazione. In questo caso è possibile agire sul sostituente Z ed utilizzare come agenti RAFT degli xantati (ditiocarbonati) o dei ditiocarbammati: ciò porta ad una destabilizzazione dell'intermedio radicalico favorendo l'uscita del radicale polimerico, in quello che può essere visto come un gioco/bilancio tra stabilità relative.

## 1.5 Sintesi di copolimeri a blocchi mediante tecnica RAFT

Un aspetto chiave della polimerizzazione RAFT consiste nel fatto che il gruppo tiocarbonilico presente nell'agente RAFT originale viene preservato nelle catene di prodotto polimerico, attribuendo le caratteristiche di "polimero vivente" (molto spesso il prodotto ottenuto è colorato il che deriva dal tipo di agente RAFT scelto in partenza): questo significa che il polimero stesso diviene un agente RAFT (macroRAFT). In questo modo aggiungendo un secondo monomero diverso dal precedente è possibile sintetizzare facilmente dei copolimeri a blocchi del tipo AB; ovviamente è possibile creare più blocchi (ABA, ABC) continuando ad aggiungere sequenzialmente altro monomero (Figura 12).

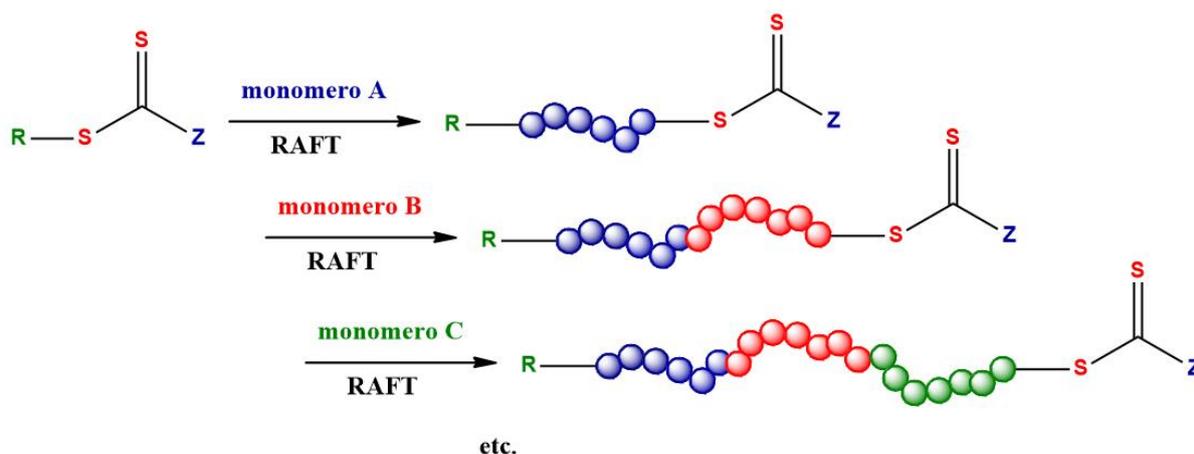


Figura 12: Sintesi di copolimeri a blocchi tramite RAFT.

I copolimeri che si ottengono per altre vie normalmente non sono omogenei in termini di composizione a livello molecolare perché i monomeri vengono consumati con velocità diverse a seconda dell'ingombro sterico e delle caratteristiche elettroniche; il processo RAFT invece permette di ottenere delle catene con la medesima composizione e sequenza di distribuzione. Tuttavia, in questo tipo di processo l'ordine di costruzione dei blocchi è molto importante. Il radicale propagante del primo blocco deve essere un buon gruppo uscente paragonato a quello

del secondo blocco, per cui ad esempio nella realizzazione di copolimeri metacrilato-acrilato o metacrilato-stirene, il blocco metacrilico deve essere preparato per primo perché ha migliori caratteristiche di gruppo uscente e può andare ad attaccare il monomero; questo inoltre previene la formazione di catene omopolimeriche del secondo monomero (B) che però non è possibile eliminare del tutto dall'ambiente di reazione date le caratteristiche della polimerizzazione RAFT, quindi queste ultime saranno statisticamente presenti alla fine della reazione.

## 1.6 Reazioni di post-polimerizzazione

Quando la reazione viene condotta su dei monomeri che oltre alla funzionalità vinilica presentano ulteriori gruppi funzionali, inerti durante la polimerizzazione radicalica, allora è possibile sfruttare questi gruppi per farli reagire in un secondo step ottenendo così dei polimeri con caratteristiche differenti rispetto al materiale di partenza [8]. In linea di principio partendo da un solo polimero è possibile sintetizzare prodotti con caratteristiche diverse in base alle proprietà impartite dall'agente modificante. Il *glicidil metacrilato (GMA)* ad esempio, avendo sia la funzione vinilica che epossidica, si presta bene a questo tipo di trasformazioni (Figura 13).

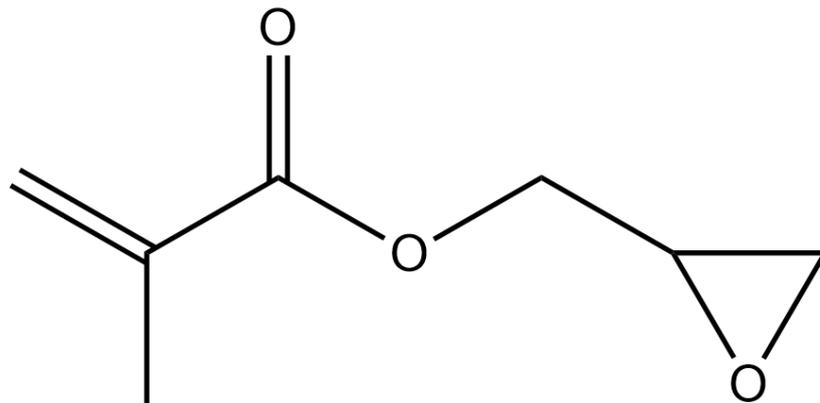


Figura 13: Struttura del GMA.

Esso è un monomero commerciale a basso costo con un ampio range di applicazioni industriali [9] come la produzione di resine metacriliche per adesivi. I polimeri e i copolimeri basati sul

glicidil metacrilato sono molto versatili perché l'anello ossirano può essere aperto tramite un attacco nucleofilo [10] (Figura 14).

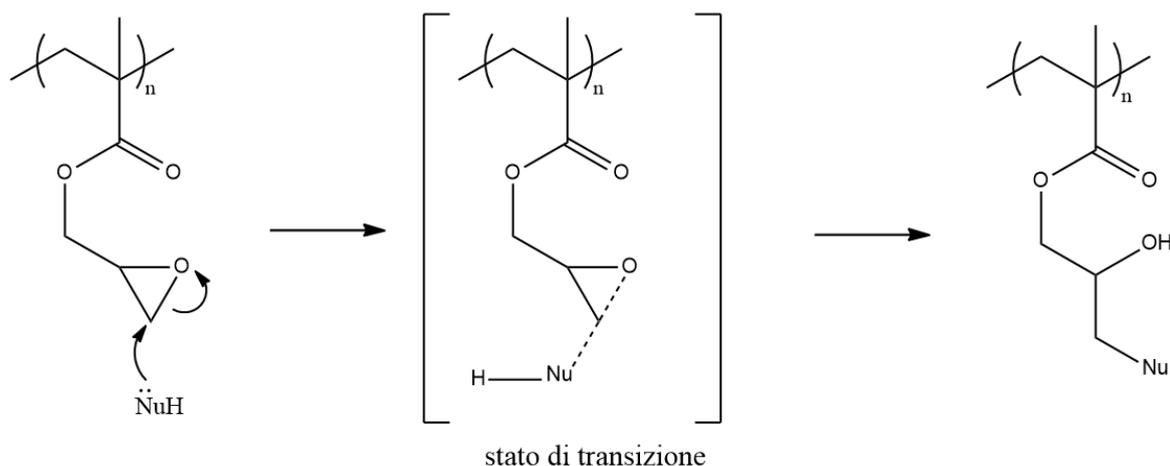


Figura 14: Attacco nucleofilo all'epossido del glicidil metacrilato.

Il nucleofilo attacca l'atomo di carbonio stericamente meno impedito in una reazione di tipo  $S_N2$  che dà come risultato una catena laterale a cui rimane legato il nucleofilo stesso, introducendo inoltre un gruppo ossidrilico che impartisce la reattività tipica degli alcoli. In letteratura esistono numerosi esempi di trattamenti del poli (glicidil metacrilato) con ammine primarie, ammine secondarie, tioli, acqua o azide [11]. Cambiando il tipo di nucleofilo il polimero finale avrà caratteristiche diverse. Utilizzando un'ammina secondaria ciclica come la morfolina il poli (glicidil metacrilato), che normalmente ha delle caratteristiche idrofobiche, acquisterà delle proprietà idrofiliche grazie agli atomi di azoto e di ossigeno presenti sulla morfolina ma dovute anche al gruppo OH che si forma dopo l'attacco [12].

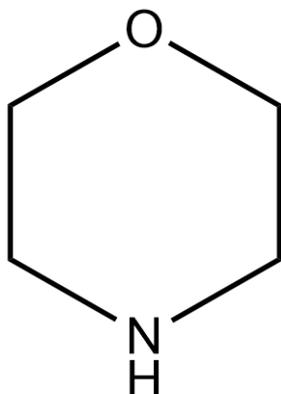


Figura 15: Struttura della morfolina.

Da questo punto di vista il PGMA può essere considerato un polimero estremamente versatile ed interessante che può dar vita a materiali innovativi; infatti tramite metodologie sviluppate è

possibile ottenere dei copolimeri a blocchi in cui il poli (glicidil metacrilato) opportunamente modificato assume caratteristiche idrofiliche, mentre blocchi alifatici come gli acrilati o i metacrilati mantengono le proprietà idrofobiche. Strutture di questo tipo sono capaci di auto-assemblarsi per formare degli aggregati core-shell di dimensioni nanometriche chiamate micelle polimeriche.

## 1.7 Micelle polimeriche

Le micelle polimeriche sono degli aggregati molecolari di dimensioni nanometriche che si formano spontaneamente quando una sostanza *anfifilica*, cioè una sostanza che possiede sia una parte polare che una apolare, viene posta all'interno di un mezzo acquoso [13]; la capacità di auto-assemblarsi dipende dalla diversa affinità che hanno i due blocchi nei confronti del solvente. Tipicamente, una micella polimerica è caratterizzata da un guscio esterno formato dal blocco idrofilico e da un nucleo interno derivante dal blocco polimerico lipofilo [14].

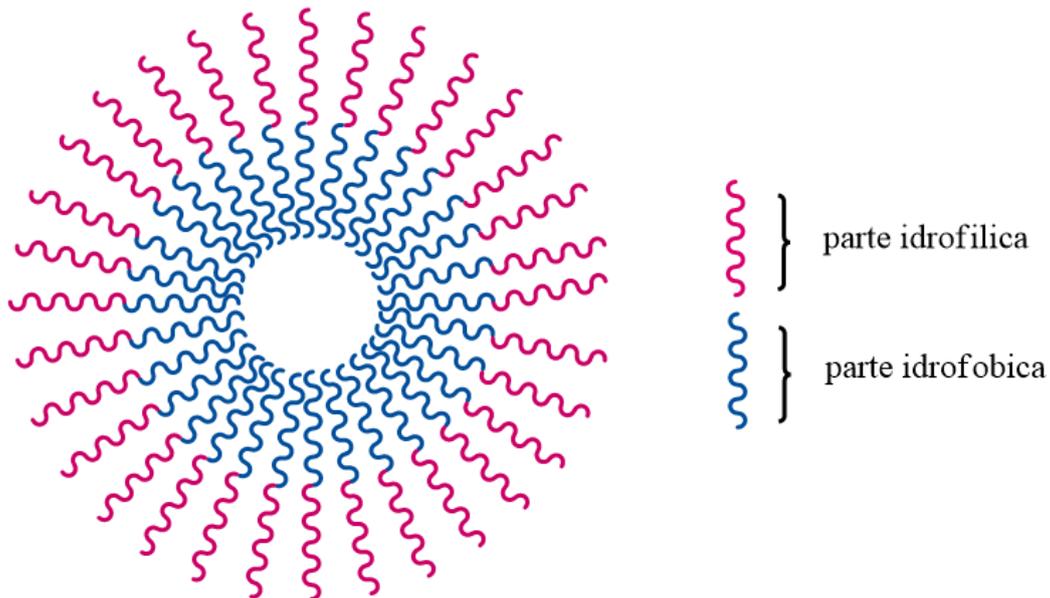


Figura 16: Struttura di una micella polimerica.

L'intero processo è governato sia da forze termodinamiche che da fattori cinetici e coinvolge interazioni non covalenti come legami a idrogeni o interazioni elettrostatiche [15]: la *driving-force* è la diminuzione dell'energia libera del sistema poiché le catene idrofiliche si dispongono intorno al cuore idrofobico formando un involucro protettivo minimizzando le interazioni della

parte idrofobica con il mezzo acquoso. Affinché le micelle si possano formare, sono necessari due requisiti:

- il polimero deve essere presente in soluzione in quantità sufficiente tale da raggiungere un adeguato valore di concentrazione denominato Concentrazione Micellare Critica (CMC);
- la temperatura deve essere uguale o minore ad un certo valore definito come temperatura di Krafft o Temperatura Micellare Critica (CMT).

Se entrambi i requisiti non vengono soddisfatti le molecole anfifiliche non formano delle micelle ma si trovano libere in soluzione, sono cioè degli unimeri. Rispetto alle normali micelle di surfattanti, le micelle polimeriche hanno un peso molecolare più elevato, una CMC minore ed una stabilità maggiore, tutti fattori che non permettono uno scambio dinamico di unimeri con la soluzione esterna, tanto da considerare trascurabile la velocità di uscita di una singola catena polimerica. Le caratteristiche delle micelle polimeriche sono influenzate da diversi fattori quali ad esempio il peso molecolare ed il rapporto fra la parte idrofilica e quella idrofobica: variando questo bilancio cambia sia la stabilità che la morfologia. Quando la grandezza del blocco idrofobico viene aumentata, la concentrazione micellare critica diminuisce e questo si traduce in una maggiore stabilità, viceversa se si aumenta la lunghezza del tratto idrofilo la CMC aumenta. Inoltre se in un polimero anfifilico la parte idrofilica supera quella idrofobica allora le micelle assumeranno una forma prevalentemente sferica, anche se sono possibili diverse forme come cilindri, bacchette, strutture a verme o a fiore [15]. Per ottenere un polimero con le caratteristiche desiderate è dunque molto importante disporre di un metodo di sintesi che consenta di modulare le proprietà del prodotto finale e la tecnica RAFT è uno dei metodi fin' ora più utilizzati a tal proposito [16]. Grazie alle proprietà che possiedono, le micelle polimeriche possono essere utilizzate per caricare al loro interno dei principi attivi di farmaci anti-tumorali aumentandone la solubilità apparente in acqua; in questo modo il farmaco viene somministrato, trasportato ed infine rilasciato in maniera più efficiente nel luogo desiderato tramite il flusso sanguigno, che consiste prevalentemente di acqua.

Uno dei metodi più promettenti per il drug-delivery all'interno delle cellule tumorali si basa su un fenomeno di targeting passivo sfruttando quello che si chiama **effetto EPR** (enhanced permeability and retention). Particelle di nano-dimensioni come dendrimeri, micelle polimeriche e macromolecole al di sopra della soglia di escrezione renale (tipicamente 40000 Dalton) hanno la tendenza ad accumularsi maggiormente nei tessuti tumorali rispetto a quelli sani; questo avviene perché i vasi sanguigni tumorali sono molto più grandi rispetto a quelli di

una cellula sana ed inoltre le cellule tumorali sono caratterizzate da una scarsa clearance linfatica: questo fa sì che le nanoparticelle accumulate non possano essere eliminate rapidamente. Quindi questo drenaggio linfatico difettoso permette alle nanoparticelle di risiedere nel microambiente tumorale per lunghi periodi di tempo, consentendo il rilascio prolungato del carico di farmaco [17].

## 1.8 Stabilizzazione delle micelle con Polidopamina

Le micelle polimeriche sono caratterizzate da un valore di CMC molto basso che le rende stabili anche in soluzioni diluite. Tuttavia questo può non essere sufficiente in casi di applicazioni *in vivo*, dove la stabilità delle micelle polimeriche può essere alterata dai vari componenti presenti nel circolo sanguigno [15]; per aumentare la stabilità delle micelle polimeriche è possibile usare tecniche di complessazione, modifiche alla struttura, coordinazione e reticolazione. Un metodo per formare rivestimenti polimerici che negli ultimi anni ha avuto un interesse considerevole consiste nell'uso della poli(dopamina) (PDA) [18]. La polidopamina è un polimero sintetico derivato dalla dopamina, un neurotrasmettitore che nel cervello dei mammiferi regola l'attività locomotoria, le emozioni, l'assunzione di cibo ed il sistema endocrino [19].

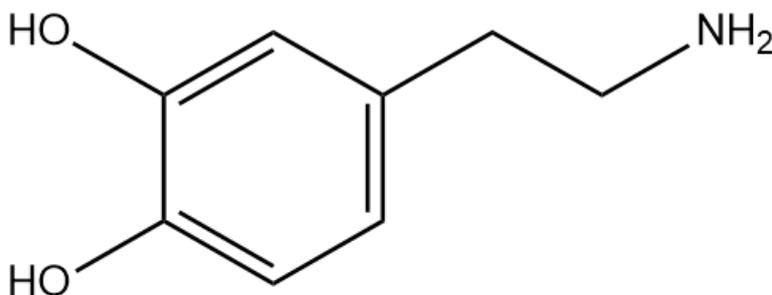


Figura 17: Struttura della dopamina.

Il polimero viene ottenuto facendo reagire la dopamina idrocloruro, disponibile commercialmente, in condizioni basiche e ossidanti. Secondo quanto riportato da Liu et Al. [20] il primo step prevede un'ossidazione, seguita dalla condensazione dell'ammina per dare un anello a cinque:

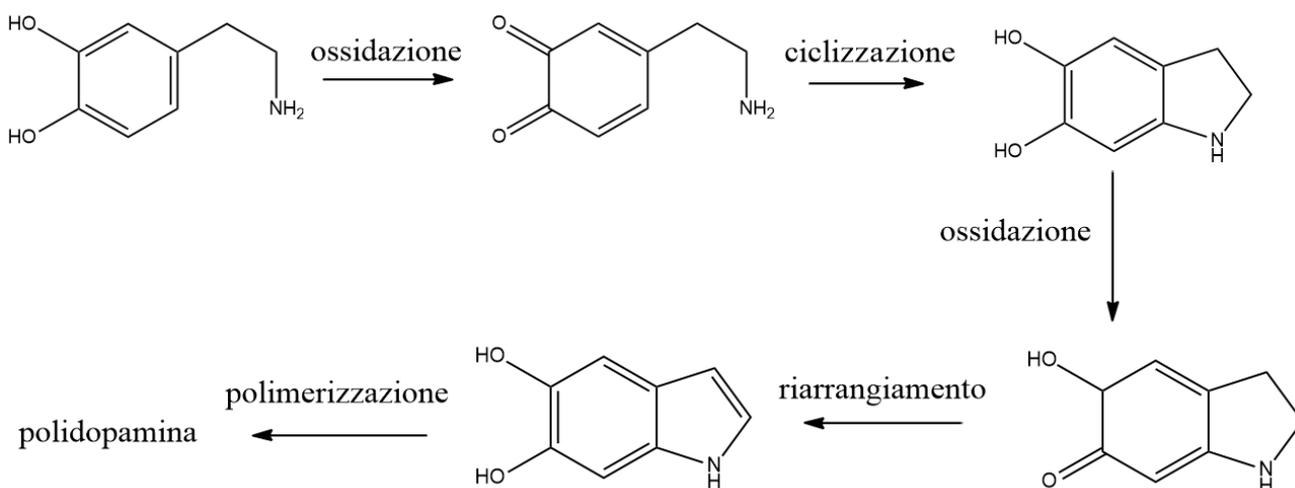


Figura 18: Meccanismo di reazione proposto per la polidopamina.

Tuttavia il meccanismo per la formazione della polidopamina è stato per molto tempo oggetto di dibattito scientifico, che continua ancora oggi poiché sono coinvolti una serie di complessi processi redox nonché la generazione di numerosi intermedi durante la reazione.

In letteratura vengono riportati diversi esempi riguardanti la struttura della polidopamina, poiché la sua composizione non è stata chiarificata del tutto e viene studiata costantemente in ambito di ricerca. Liebscher et Al. [21] hanno ideato un possibile modello della struttura della polidopamina, che consiste in una miscela di differenti oligomeri formati essenzialmente da unità di indolo-dione (funzionalità chinone, Figura 19 in nero), diidrossindolo (funzionalità catecolo, Figura 19 in rosso) e dopamina (Figura 19 in verde) unite fra di loro tramite legami covalenti a formare una catena in cui tali legami coinvolgono quasi esclusivamente gli anelli benzenici.

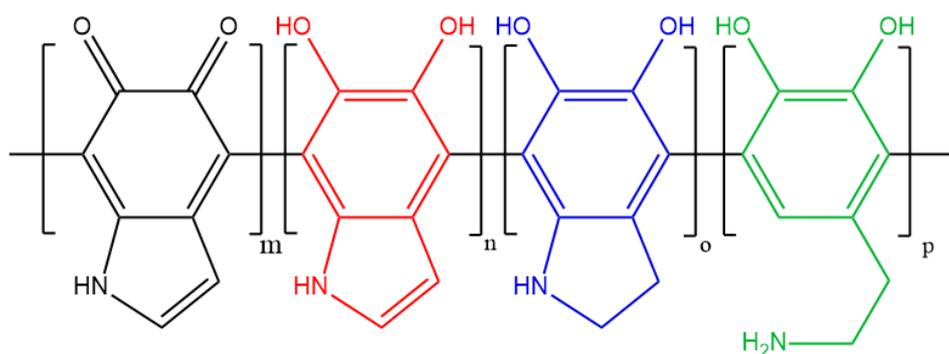


Figura 19: Possibile struttura della PDA.

Vaselbehagh et Al. [22] propongono una struttura del tutto simile a quella precedente, con le stesse unità che si ripetono nello spazio legate fra loro da legami covalenti; in questo caso però

essi assumono che nella formazione dei legami siano coinvolti anche gli anelli a cinque contenenti l'azoto (Figura 20).

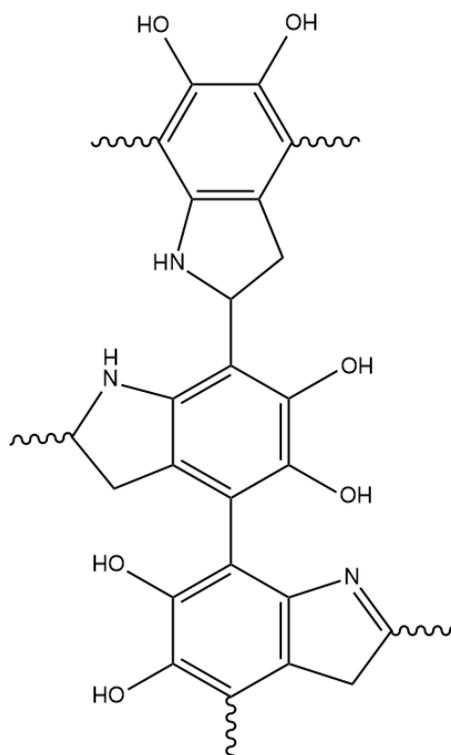


Figura 20: Modello alternativo per la polidopamina.

Secondo gli studi condotti da Dreyer et Al. [23] potrebbe essere considerata la possibilità di una struttura alternativa basata sull'abilità dei monomeri di legarsi in maniera non covalente, fino a formare dei sistemi supramolecolari. I legami principalmente coinvolti sono legami idrogeno ed interazioni  $\pi$ - $\pi$  (Figura 21).

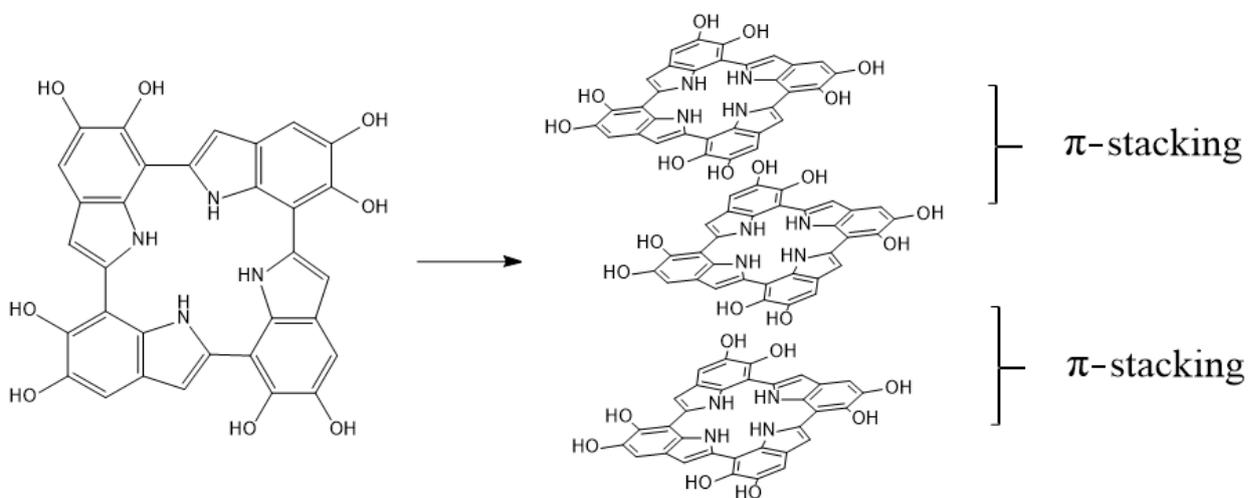


Figura 21: Terzo esempio di composizione ed assemblamento della PDA.

Sulla base di questi ed altri risultati sperimentali negli anni a venire sarà possibile dare un contributo significativo affinché si possa fare chiarezza sulla struttura di questo polimero.

Negli ultimi anni sono state messe in risalto le caratteristiche che possiede la polidopamina; pur sapendo che non tutte sono state ancora completamente messe in luce, eccone di seguito alcune:

- *adesione*: la polidopamina ha la capacità di aderire, potenzialmente, a tutti i tipi di substrati indipendentemente dalla loro natura chimica;
- *reattività chimica*: i gruppi funzionali che si trovano nella polidopamina (fra cui chinone e catecolo) sono in grado di reagire con un ampio range di molecole, ad esempio con ammine o tioli in reazioni di cross-link;
- *chelazione di ioni metallici*: grazie ai gruppi funzionali (oltre a chinone e catecolo sono presenti gruppi carbossilici, amminici, imminici e fenolici) la polidopamina è capace di legarsi a ioni metallici come  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ .
- *biocompatibilità e biodegradazione*: essendo il maggiore componente della melanina (che si trova nel corpo umano come pigmento), la polidopamina mostra una eccellente biocompatibilità promuovendo così la somministrazione di sostanze estranee all'organismo senza causare una risposta immunologica aggressiva; inoltre, tramite delle prove in vivo, è stato dimostrato da Langer et Al. che gli impianti di PDA possono essere degradati, in modo tale da risultare adeguati per applicazioni biomediche.

## 2. SCOPO

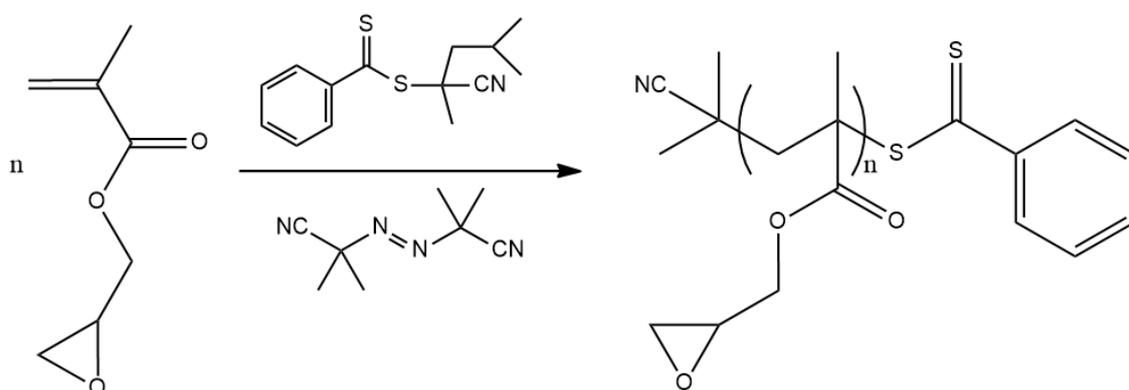
L'obiettivo della presente tesi di laurea sperimentale è di sintetizzare copolimeri a blocchi con proprietà anfifiliche tramite polimerizzazione radicalica controllata e successiva funzionalizzazione di uno dei due blocchi per consentire la formazione di micelle polimeriche per un loro utilizzo nel campo del drug delivery [24]. Utilizzando la tecnica RAFT sono stati sintetizzati il copolimero a blocchi poli(glicidil metacrilato)-b-poli(butil metacrilato) (PGMA-b-PBMA) ed il copolimero a blocchi poli(glicidil metacrilato)-b-poli(metil metacrilato) (PGMA-b-PMMA) impiegando un adeguato agente RAFT ed un giusto rapporto molare fra i reagenti. In questo modo sono stati ottenuti polimeri con peso molecolare controllato e basso valore di polidispersità (inferiore a 1,20) [7]. Le caratteristiche anfifiliche sono state conferite mediante successiva funzionalizzazione, reazione nucleofila di tipo  $S_N2$ , degli anelli epossidici del PGMA con morfolina. In questo modo si ottengono copolimeri formati da un blocco lipofilo di PBMA o PMMA e da una parte idrofila di poli(2-idrossi-3-morfolinopropil metacrilato) (PHMPMA) [8]. I copolimeri anfifilici così ottenuti sono stati impiegati per la formazione di micelle polimeriche stabili in ambiente acquoso e con diametri idrodinamici intorno ai 30-40 nm. Per implementarne la stabilità, la parte sterna di PHMPMA delle micelle ottenute è stata sottoposta ad un'ulteriore reazione di reticolazione con dopamina sfruttando i gruppi OH presenti nella sua catena laterale. Per cercare di correlare il tempo di reazione (e la concentrazione iniziale di dopamina) con il grado di polimerizzazione della polidopamina (PDA), la reazione è stata studiata a fondo, variando sia il tempo di polimerizzazione che la concentrazione iniziale di monomero. La polimerizzazione è stata condotta sia su sospensioni micellari tal quali sia su campioni micellari marcati tramite un cromoforo fluorescente, il Nile-Red, che rende le micelle tracciabili all'interno del corpo umano. I campioni sono stati investigati mediante Dynamic Light Scattering (DLS), UV-Vis con sfera integratrice e Spettrofluorimetria. Infine, i campioni polimerici sono stati studiati mediante calorimetria a scansione differenziale (DSC) che ha permesso di evidenziare l'incremento di rigidità del blocco esterno (incremento di temperatura di transizione vetrosa) dopo reticolazione con dopamina. Mediante analisi termogravimetrica (TGA) è stato possibile studiare i fenomeni di degradazione dei polimeri reticolati e, soprattutto, quantificare la percentuale di PDA residua utilizzando come riferimento il termogramma TGA del copolimero a blocchi anfifilico (PHMPMA-b-PBMA o PHMPMA-b-PMMA) senza dopamina. I risultati TGA ottenuti sono stati correlati all'assorbimento UV-vis delle micelle contenenti polidopamina.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Sintesi dei copolimeri

##### 3.1.1 Sintesi dell'omopolimero poli(glicidil metacrilato) PGMA

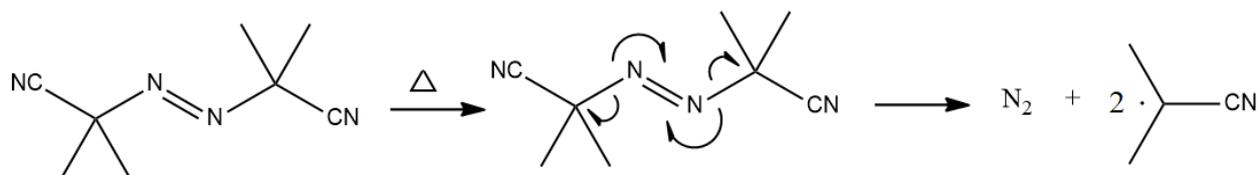
La sintesi del poli(glicidil metacrilato) è stata realizzata utilizzando la tecnica RAFT seguendo lo schema riportato sotto:



Schema 1: Sintesi del poli(glicidil metacrilato)

Il rapporto molare fra i tre reagenti (monomero/RAFT/AIBN) è: 675/1/0,05.

Nella polimerizzazione RAFT (Radical Addition-Fragmentation chain Transfer) le condizioni di reazione sono simili a quelle della polimerizzazione radicalica classica, la differenza sostanziale consiste nella presenza dell'agente RAFT. La quantità di iniziatore utilizzata è molto più bassa rispetto al resto dei reagenti, questo perché si vuole avere nell'ambiente di reazione una quantità di radicali non eccessiva allo scopo di scongiurare il più possibile reazioni di terminazione delle catene polimeriche, che darebbe come risultato delle macromolecole inattive aumentando la polidispersità del polimero ottenuto. L'iniziatore utilizzato nella sintesi è il 2,2'-azobisisobutyronitrile meglio noto come *AIBN* il quale si decompone termicamente fornendo la specie radicalica 2-ciano isoprop-2-il (Schema 2):



Schema 2: Decomposizione termica dell'AIBN.

La scelta dell'iniziatore deve essere ottimale rispetto alla temperatura di polimerizzazione del monomero scelto. Per il glicidil metacrilato che viene polimerizzato a 70°C l'AIBN risulta ottimale in quanto fornisce il giusto flusso di specie radicaliche durante la polimerizzazione. L'agente RAFT per la reazione è il 2-ciano-4-metilpentan-2-il ditiobenzoato (Figura 22):

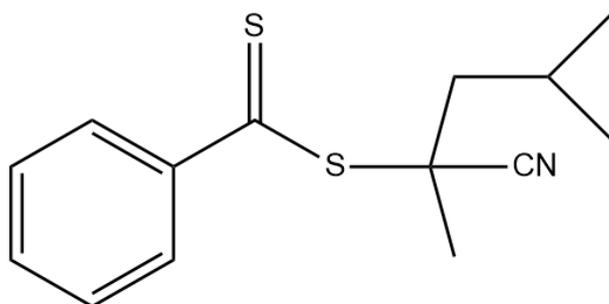


Figura 22: Agente RAFT usato nella sintesi del PGMA.

La scelta dei sostituenti R e Z è importante al fine di garantire un ottimo controllo sulla reazione. Il monomero *glicidil metacrilato* appartiene alla famiglia dei metacrilati e quindi alla classe dei monomeri più attivi che, durante la polimerizzazione, formano dei radicali relativamente meno instabili e quindi necessitano di un gruppo Z in grado di donare maggiore stabilità al radicale intermedio per favorire l'addizione radicalica al legame C=S [25]; in questo caso il gruppo Z è un fenile (Ph). Il gruppo uscente R deve essere scelto in modo tale da avere, dopo il distacco omolitico come radicale, una stabilità paragonabile al radicale della catena polimerica in accrescimento ed inoltre, in genere, la sua scelta ricade su sostituenti molto simili al radicale monomero o all'iniziatore radicalico; nel caso in questione il gruppo R è il 2,4-dimetilpentan-2-il-nitrile. Inoltre, il radicale iniziatore deve avere una buona abilità di addizione al monomero. Un agente RAFT così costituito è perfetto per il controllo della polimerizzazione dei monomeri *più attivi* fra cui il metil metacrilato, il glicidil metacrilato ed il butil metacrilato. In tabella 1 vengono riportate le caratteristiche principali del PGMA omopolimero che è stato sintetizzato in due reazioni successive utilizzando le stesse identiche condizioni.

Campione	t. reaz.	Convers.	PM <sub>th</sub>	PM <sub>n</sub>	PD	Peso
Pol.1	4h	28,36%	25500	23500	1,17	2,284 g
Pol.2	4h	25,70%	23000	19500	1,13	2,070 g

Tabella 1: Dati relativi agli omopolimeri di PGMA.

I valori di conversione molto vicini fra loro ed i bassi valori di polidispersità dimostrano la riproducibilità e l'avvenuto controllo della polimerizzazione RAFT. La percentuale di

conversione è stata calcolata mediante  $^1\text{H}$  NMR della miscela di reazione, rapportando l'integrale dei segnali del monomero non reagito con quelli del polimero.

Il peso molecolare teorico ( $PM_{th}$ ) è stato calcolato tramite l'equazione 1:

$$Mn(calc) = \frac{[M]_0 - [M]_t}{[CTA]} \cdot m_t + m_{CTA}$$

Il peso molecolare medio numerale ( $PM_n$ ) e l'indice di polidispersità sono stati determinati mediante l'analisi GPC utilizzando per la calibrazione degli standard di polistirene; i valori ottenuti si discostano leggermente dai pesi molecolari teorici poiché standard e campione sono chimicamente differenti, con conseguente differente volume idrodinamico. Ciononostante, l'equazione 1 può essere utilizzata per verificare che il peso molecolare del polimero ottenuto corrisponda a quello di interesse.

In figura 23 sono riportati i cromatogrammi GPC relativi ai due omopolimeri.

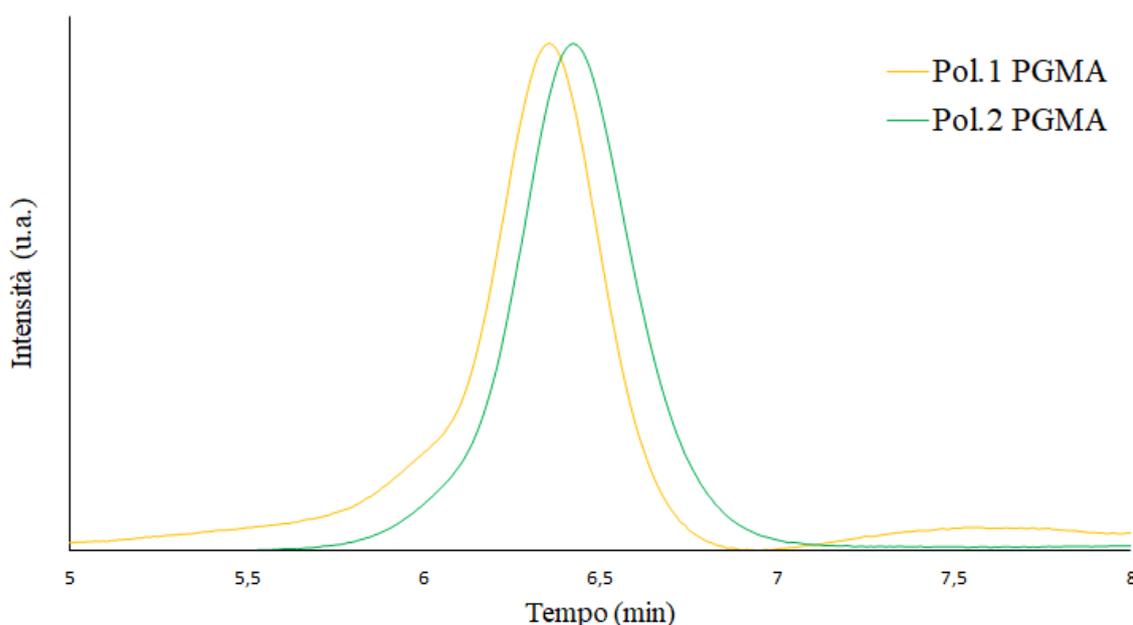


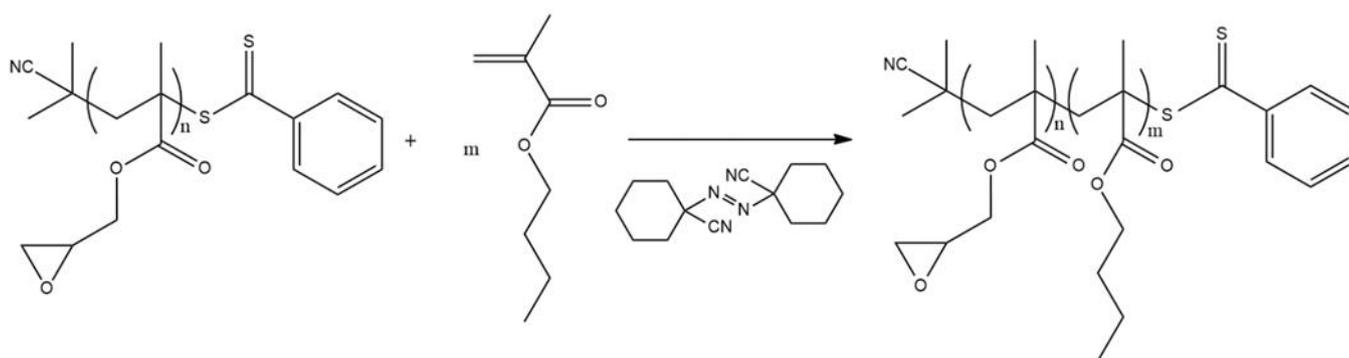
Figura 23: Cromatogrammi GPC degli omopolimeri Pol.1 e Pol.2.

Il primo omopolimero sintetizzato *Pol.1* non ha una traccia GPC perfettamente simmetrica, ma presenta una piccola gobba sulla sinistra corrispondente ad un peso molecolare circa doppio rispetto a quello misurato; è probabile che nel corso della sintesi e durante la lavorazione siano intercorse reazioni secondarie non desiderate. Per questo motivo si è deciso di ripetere l'esperimento e l'omopolimero risultante *Pol.2* non presenta alcun tipo di problema seppur possedendo un grado di conversione leggermente minore e conseguentemente un peso

molecolare leggermente più basso. Questo è il polimero usato poi per la sintesi del copolimero a blocchi con il butil metacrilato ed il metil metacrilato.

### 3.1.2 Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PBMA

Il copolimero a blocchi poli(glicidil metacrilato)-b-poli(butil metacrilato) è stato sintetizzato per polimerizzazione RAFT del butil metacrilato utilizzando come macroRAFT il PGMA omopolimero *Pol.2*; di seguito si riporta lo schema 3 di reazione.



Schema 3: Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PBMA.

In questo caso non è stato possibile mantenere lo stesso rapporto tra monomero ed agente RAFT perché la quantità di polimero necessaria non risulta solubilizzabile nell'ambiente di reazione, per cui è stato usato un rapporto molare monomero/macroRAFT/Vazo88 di 1200/1/0,05; inoltre come solvente per la reazione è stato usato il DMF, e non il toluene come nel caso precedente, perché esso è in grado di sciogliere sia il monomero che l'agente RAFT. L'iniziatore radicalico è il Vazo88 (anziché l'AIBN come per l'omopolimero) poiché esso è caratterizzato da una temperatura di decomposizione maggiore; nell'ambiente di reazione quindi saranno presenti meno radicali e questo aiuta a scongiurare la formazione di blocchi omopolimerici di butil metacrilato, pur sapendo che non possono essere evitati del tutto. La reazione è stata condotta a 75°C. Le principali caratteristiche del copolimero a blocchi PGMA-b-PBMA ottenuto sono riportate in tabella 2.

Campione	t. reaz.	Convers.	PM_copol	PM_copol_th	PM_PBMA	PD
Pol.3	2h	3,9%	25000	26000	5500	1,15

Tabella 2: Dati relativi al copolimero a blocchi PGMA-b-PBMA.

Il valore di conversione è stato calcolato mediante  $^1\text{H}$  NMR della miscela di reazione, rapportando l'integrale dei segnali del monomero con quelli del polimero.

Il peso molecolare del PBMA è stato calcolato tramite  $^1\text{H}$  NMR del copolimero purificato rapportando l'integrale dei segnali del PBMA con quelli del PGMA (19500 Dalton). Il peso molecolare teorico ( $PM_{copol\_th}$ ) è stato calcolato tramite l'equazione:

$$Mn(calc) = \frac{[M]_0 - [M]_t}{[CTA]} \cdot m_t + m_{CTA}$$

In questo caso il valore è pienamente concorde con il dato della GPC, anch'esso di 26000 Dalton (Figura 3), nonostante il campione non abbia la stessa natura dello standard; questo è dovuto probabilmente ad un volume idrodinamico in THF simile tra i due polimeri.

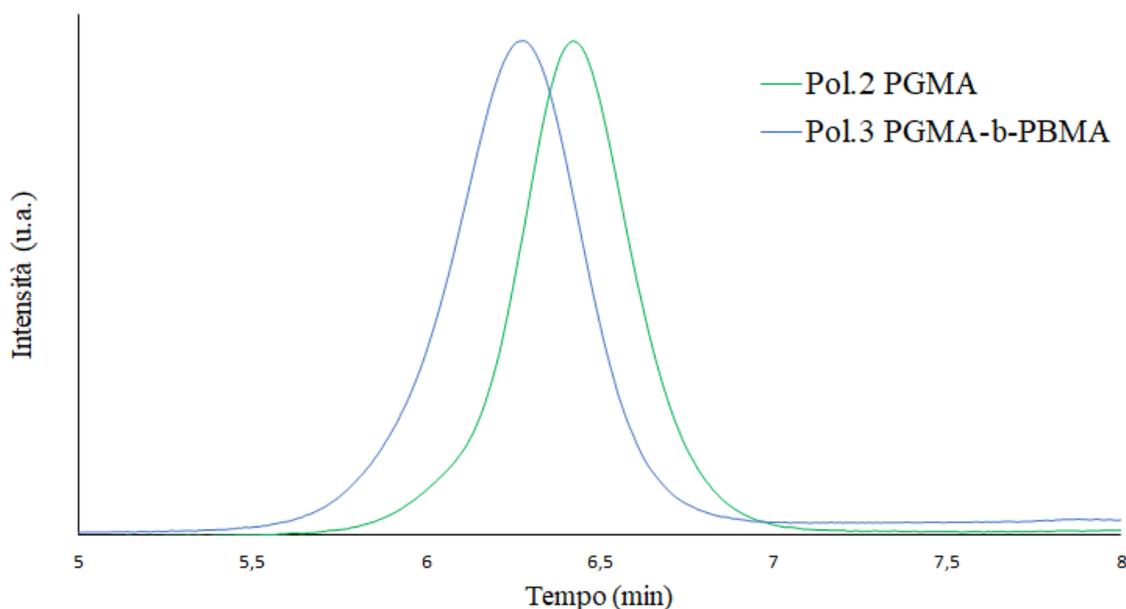


Figura 24: Cromatogrammi GPC del PGMA di partenza e del copolimero a blocchi Pol.3.

In figura 24 vengono riportate le tracce GPC del polimero di partenza PGMA e del prodotto PGMA-b-PBMA in cui si nota uno spostamento a pesi molecolari maggiori ed un segnale del copolimero pressoché simmetrico. Anche l'analisi NMR conferma che la reazione è avvenuta senza problemi (Figura 25). In particolare è possibile notare la comparsa di un picco a 3,94 ppm corrispondente al  $-\text{CH}_2$  del PBMA adiacente al gruppo  $(\text{C}=\text{O})\text{O}$ .

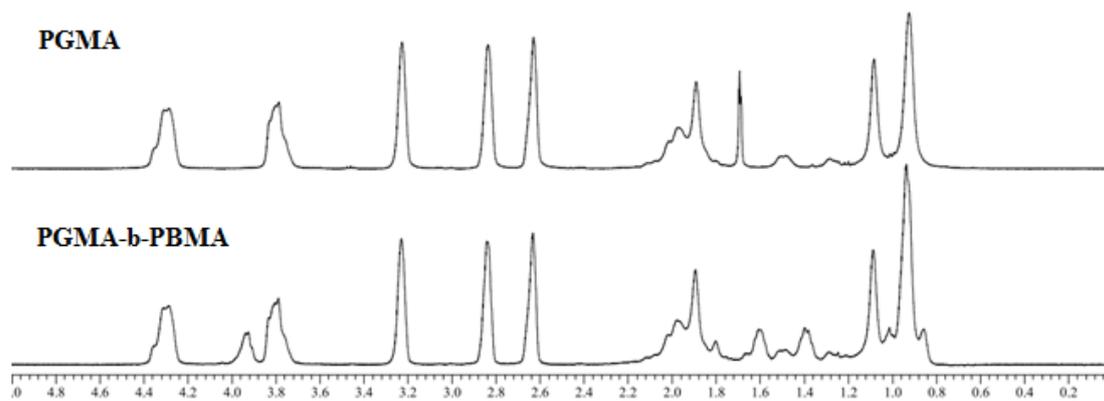


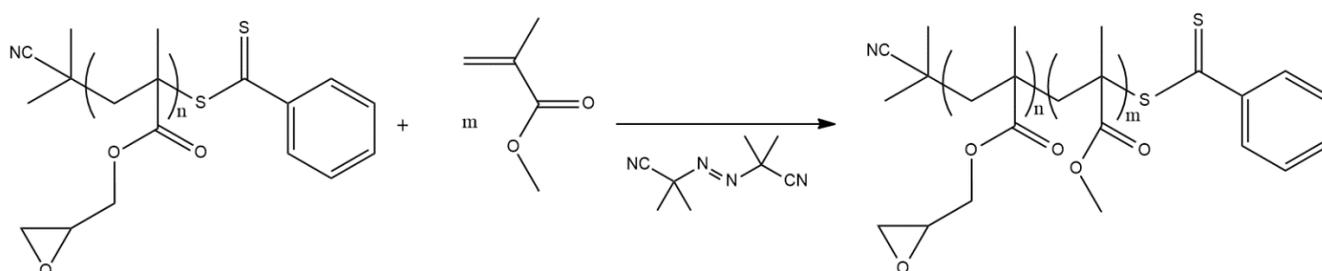
Figura 25: Spettri NMR del Pol.2 e del Pol.3.

Il rapporto molare fra i due blocchi, calcolato tramite NMR, è PGMA:PBMA = 77,7 : 22,3 mol:mol.

Il copolimero a blocchi PGMA-b-PBMA *Pol.3* così ottenuto è stato usato per la successiva reazione di funzionalizzazione.

### 3.1.3 Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA

Questo secondo copolimero è stato sintetizzato allo scopo di avere un ulteriore polimero, da funzionalizzare successivamente con morfolina, con un blocco lipofilico diverso rispetto al precedente campione sia per la natura chimica (contenente butil metacrilato), ma anche per il rapporto stechiometrico ottenibile fra i due blocchi; in questo caso la parte lipofila è costituita da poli(metil metacrilato). Il copolimero a blocchi poli(glicidil metacrilato)-b-poli(metil metacrilato) è stato sintetizzato per polimerizzazione RAFT del metil metacrilato utilizzando come macroRAFT il PGMA omopolimero *Pol.2*; di seguito si riporta lo schema 4 di reazione.



Schema 4: Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA.

Il rapporto molare fra i tre reagenti (monomero/macroRAFT/AIBN) è: 1200/1/0,05.

La reazione è stata condotta ad 80°C ed i principali dati salienti del copolimero ottenuto sono riportati in Tabella 3.

Campione	t. reaz.	Convers.	PM_copol	PM_copol_th	PM_PMMA	PD
Pol.4	6h	15,64%	41500	38500	22000	1,11

Tabella 3: Dati relativi al copolimero a blocchi *Pol.4*.

Il valore di conversione (calcolato mediante <sup>1</sup>H NMR della miscela di reazione, rapportando l'integrale dei segnali del monomero con quelli del polimero) risulta elevato rispetto al caso precedente poiché il sistema è stato posto a reagire per un maggior tempo (6 ore). Il peso molecolare del PMMA è stato calcolato tramite <sup>1</sup>H NMR del copolimero purificato rapportando l'integrale dei segnali del PMMA con quelli del PGMA (19500 Dalton). Il peso molecolare teorico (*PM\_copol\_th*) è stato calcolato tramite l'equazione riportata precedentemente.

Il cromatogramma GPC del copolimero ottenuto è riportato in Figura 26.

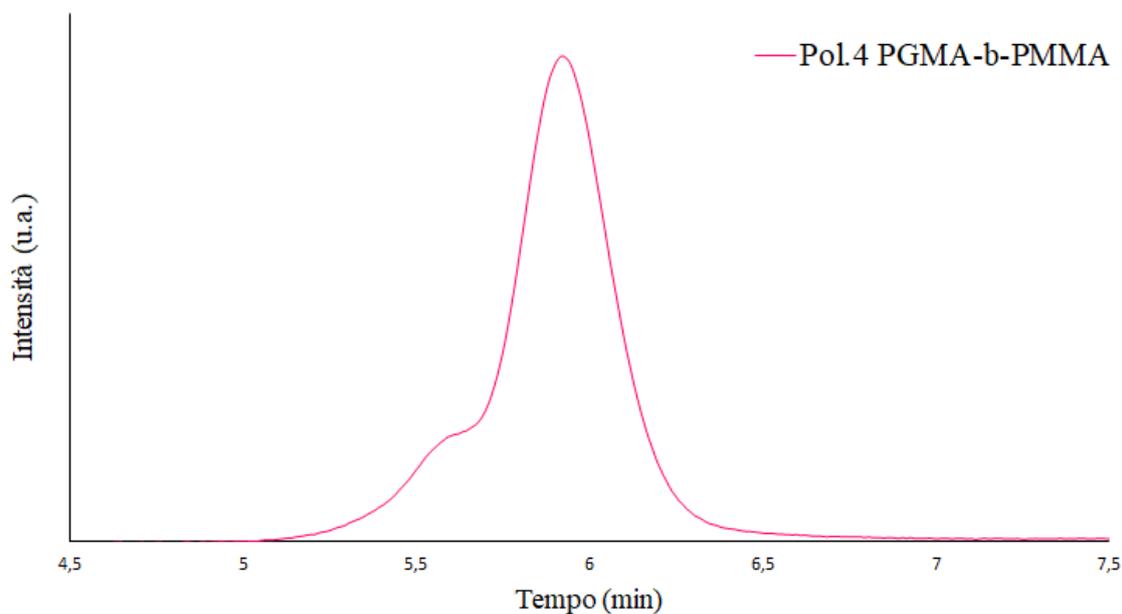


Figura 26: Andamento alla GPC del copolimero a blocchi PGMA-*b*-PBMA.

Il peso molecolare GPC è 50000 Dalton mentre quello da NMR è di 41500 Dalton. Questo è dovuto al diverso volume idrodinamico in THF che c'è tra standard e campione. Il picco a sinistra a 5,6 min circa corrisponde ad un peso molecolare praticamente doppio rispetto al picco principale a 5,91 min. Durante la reazione dunque è possibile che siano avvenute delle reazioni di reticolazione catena-catena che hanno portato ad un raddoppio del peso molecolare o che si sia formato dell'omopolimero di poli(metil metacrilato) in quantità eccessiva. Per avere la certezza sulla natura del fenomeno occorre osservare il picco risultante dalla successiva funzionalizzazione con morfolina: nel primo caso tutta la traccia sarà traslata a pesi molecolari maggiori poiché anche il polimero corrispondente alla zona asimmetrica sarà coinvolto nella reazione; invece, nel caso in cui si trattasse di PMMA omopolimero (che non interagisce con la morfolina) la spalla non subirà alcuno spostamento e verrà in parte coperta dal picco principale che si sposterà verso sinistra.

In figura 27 sono riportati gli spettri  $^1\text{H}$  NMR del PGMA e del copolimero a blocchi risultante. La comparazione del segnale a 3,6 ppm dei protoni del  $\text{CH}_3$  adiacenti al  $(\text{C}=\text{O})\text{O}$  del PMMA conferma che la reazione di copolimerizzazione è avvenuta.

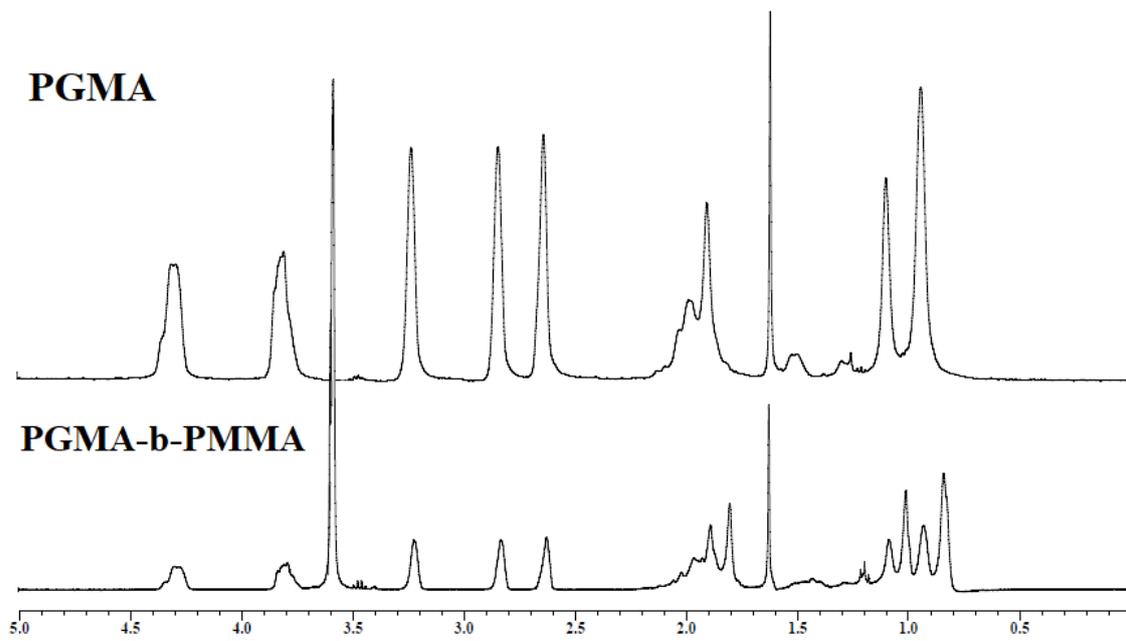


Figura 27: Spettri NMR del PGMA e del suo copolimero a blocchi con il poli(metil metacrilato).

Il rapporto molare fra i due blocchi, calcolato tramite NMR, è PGMA:PMMA = 38,1 : 61,9 mol:mol.

Anche il copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA *Pol.4* è stato usato per la reazione di funzionalizzazione.

## 3.2 Trattamenti di post-polimerizzazione

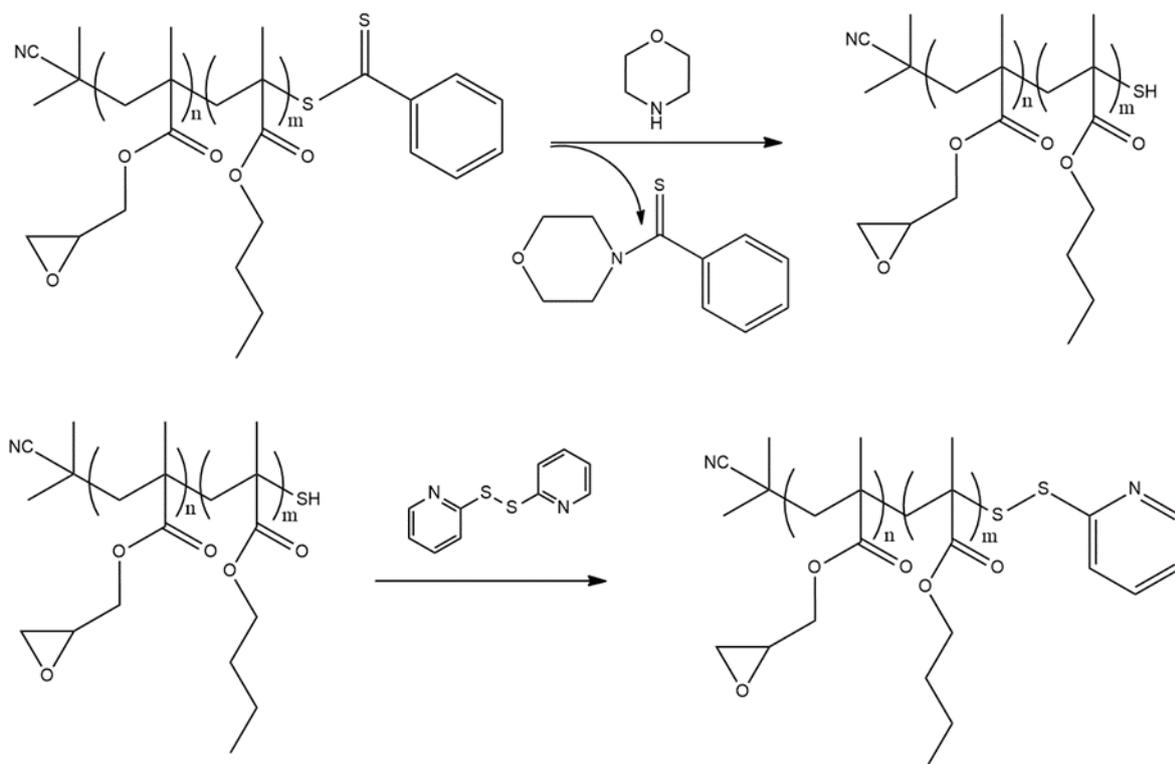
Le micelle polimeriche sono degli aggregati molecolari nanometrici che si vengono a formare nel momento in cui una sostanza anfifilica viene dispersa in acqua (vedi paragrafo 1.7). I copolimeri a blocchi PGMA-b-PBMA e PGMA-b-PMMA precedentemente sintetizzati (*Pol.3* e *Pol.4* rispettivamente) non possiedono ancora queste caratteristiche data la natura dei due blocchi che è essenzialmente lipofilica. Per questo motivo e allo scopo di ottenere un copolimero con le proprietà desiderate e capace di autoassemblarsi in micelle è necessario un'ulteriore funzionalizzazione di uno dei due blocchi. Ciò è possibile grazie ai gruppi epossidici presenti nei sostituenti laterali del PGMA, che sono rimasti intatti durante la reazione di copolimerizzazione. Utilizzando un nucleofilo come la morfolina, un'ammina secondaria, è possibile operare l'apertura degli anelli epossidici conferendo al blocco glicidilico proprietà idrofiliche sia grazie alla morfolina, che è incorporata alla catena dopo la reazione, ma anche per la presenza di gruppi OH che si vengono a formare. I polimeri ottenuti, il poli(2-idrossi-3-morfolinopropil metacrilato)-b-poli(butil metacrilato) PHMPMA-b-PBMA nel primo caso, ed il poli(2-idrossi-3-morfolinopropil metacrilato)-b-poli(metil metacrilato) PHMPMA-b-PMMA nel secondo, possiedono caratteristiche anfifiliche e questo li rende perfetti per la formazione delle micelle a partire da una soluzione del copolimero in THF a cui viene aggiunta gradualmente acqua.

Sfruttando inoltre la reattività dei gruppi OH presenti nel blocco di PHMPMA è possibile realizzare poi un'ulteriore reazione di cross-linking sul guscio esterno idrofilico della struttura micellare in modo tale da garantire una sua maggiore stabilità.

### 3.2.1 Reazione di funzionalizzazione con la morfolina del PGMA-b-PBMA e ottenimento di PHMPMA-b-PBMA

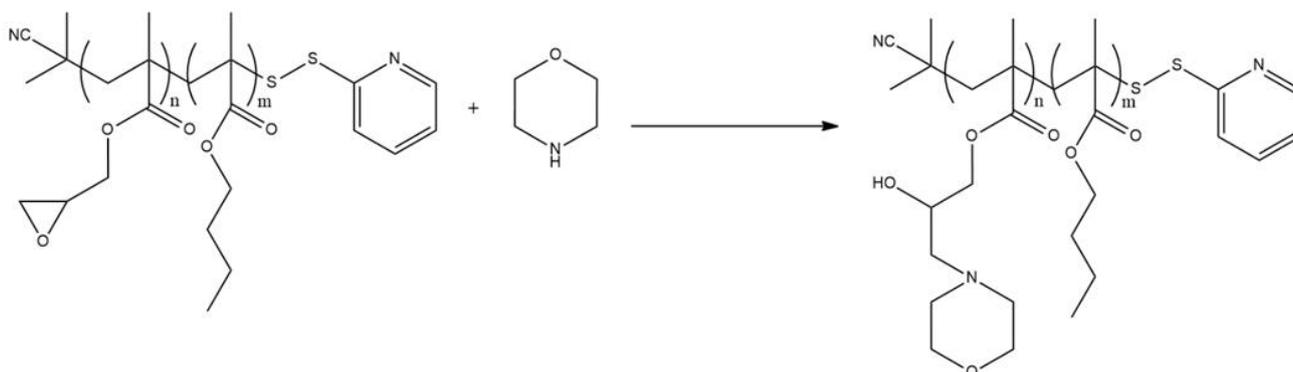
La reazione di post-funzionalizzazione del copolimero PGMA-b-PBMA è stata condotta seguendo la via sintetica in due stadi riportata in schema 5 e 6.

Il processo globale consta di due stadi successivi, il primo svolto a temperatura ambiente (schema 5) e l'altro a 80°C (schema 6). Infatti la morfolina già a basse temperature promuove una reazione di amminolisi sulla funzione ditiocarbossilica del gruppo RAFT causando l'eliminazione di 4-tiobenzoil-morfolina e portando alla formazione di un gruppo tiolico -SH all'estremità del polimero. Questa funzionalità, essendo in forma anionica in presenza di morfolina, è un ottimo nucleofilo ed ha quindi una pronunciata reattività verso i gruppi epossidici. Per evitare reazioni di ramificazione intra ed inter-catena è quindi necessario proteggere il gruppo terminale SH con 2,2'-dipiridil disolfuro (DPDS) per dare luogo a una catena con un gruppo terminale ditio-2-piridina. Questo stadio avviene a temperatura ambiente in tempi brevi (30 minuti).



*Schema 5: Protezione del gruppo terminale del PGMA-b-PBMA con disolfuro.*

Il secondo step consiste in una reazione concertata di sostituzione nucleofila di tipo S<sub>N</sub>2 in cui l'azoto morfolinico attacca l'atomo di carbonio stericamente meno impedito dell'epossido e ciò porta alla formazione di un gruppo ossidrilico sul carbonio secondario. La reazione prevede temperature (80°C) e tempi maggiori (2 ore) rispetto al primo stadio; inoltre affinché la reazione vada a completezza è necessario un forte eccesso di morfolina (10 equivalenti).



*Schema 6: Funzionalizzazione del Pol.3 protetto con morfolina.*

Le caratteristiche salienti del copolimero PHMPMA-*b*-PBMA (Pol.5) ottenuto sono riportate in Tabella 4.

Campione	t. reaz.	PM_copol_th	PM_n	PD	Peso	Resa
Pol.5	2h	36000	33800	1,17	143 mg	94,5 %

*Tabella 4: Dati relativi al polimero funzionalizzato PHMPMA-*b*-PBMA.*

Il peso molecolare è stato calcolato tramite l'equazione:

$$PM_{copol} = PM_{PGMA-PBMA} + \left( \frac{PM_{PGMA}}{PM_{GMA}} * PM_{morf} \right)$$

Mediante analisi GPC sono stati ottenuti i valori di polidispersità e del peso molecolare medio numerale  $PM_n$  che in questo caso risulta essere leggermente inferiore rispetto al valore calcolato; ciò è dovuto probabilmente ad un volume idrodinamico minore del polimero sintetizzato. L'andamento crescente del peso molecolare è evidenziato in Figura 28 dove

vengono confrontati i cromatogrammi GPC di *Pol.2* (PGMA), *Pol.3* (PGMA-*b*-PBMA) e *Pol.5* (PHMPMA-*b*-PBMA).

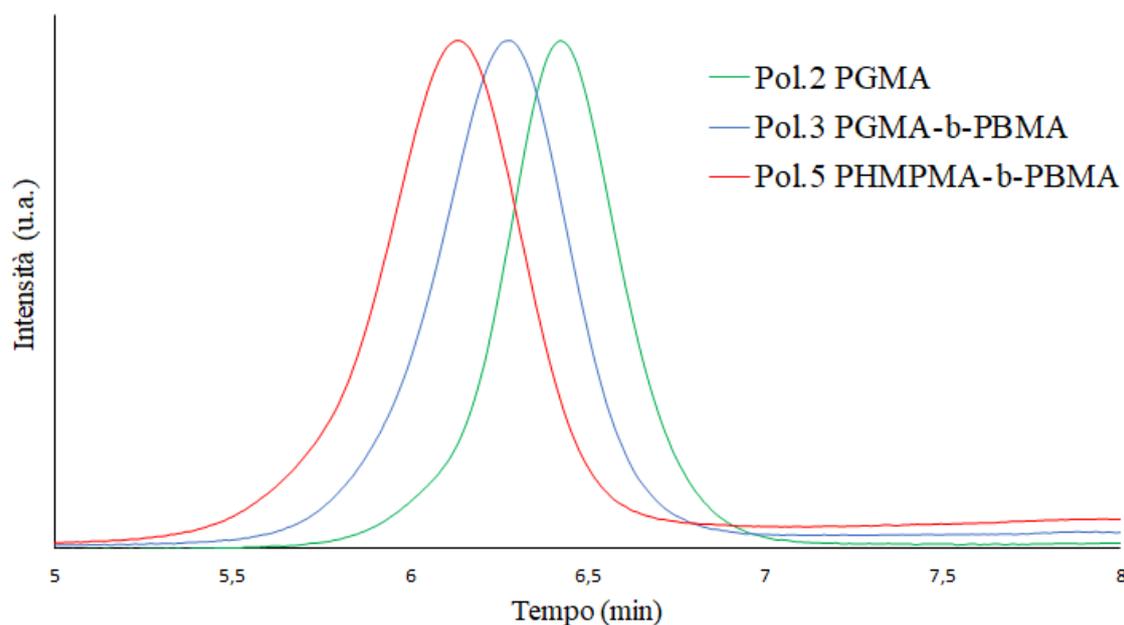


Figura 28: Cromatogrammi GPC del *Pol.2*, *Pol.3* e *Pol.5*.

L'avvenuta reazione di funzionalizzazione con resa quantitativa è confermata dall'analisi NMR (Figura 29) dove sono riportati gli spettri  $^1\text{H}$  NMR del *Pol.3* PGMA-*b*-PBMA e del prodotto PHMPMA-*b*-PBMA *Pol.5*: spostamento dei protoni dell'anello epossidico del poli(glicidil metacrilato) a campi più bassi e parziale sovrapposizione con gli idrogeni dei  $\text{CH}_2$  adiacenti all'ossigeno della morfolina (3,7 ppm); comparsa dei segnali corrispondenti ai protoni in  $\alpha$  all'azoto della morfolina fra i 2,4 e i 2,7 ppm.

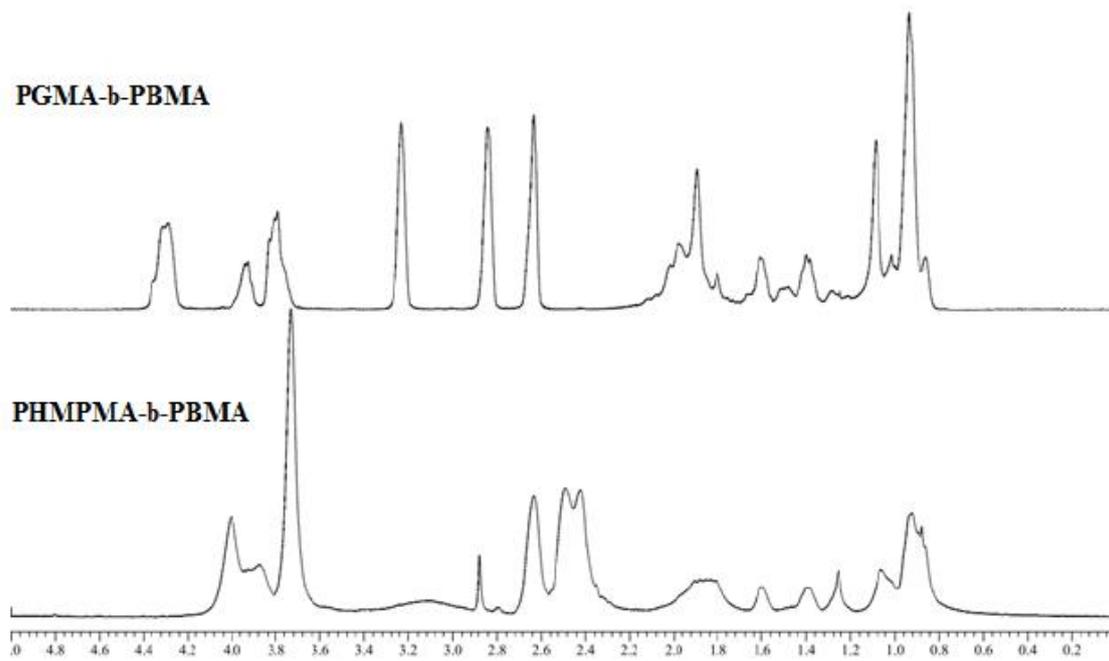
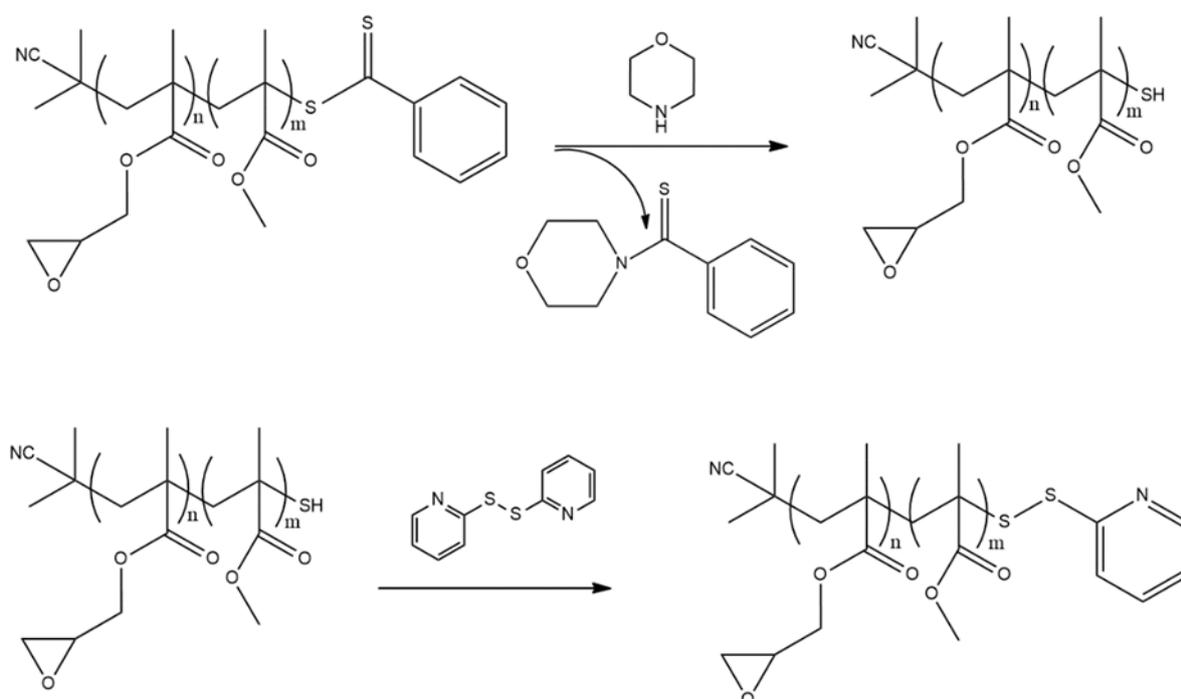


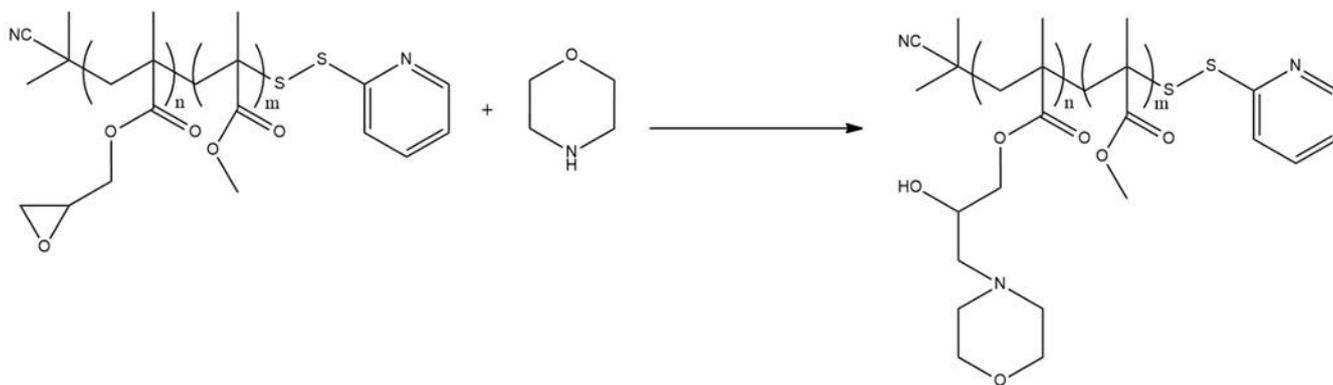
Figura 29: Spettri  $^1\text{H-NMR}$  del PGMA-b-PBMA e del polimero funzionalizzato PHMPMA-b-PBMA.

### 3.2.2 Reazione di funzionalizzazione con la morfolina del PGMA-b-PMMA e ottenimento di PHMPMA-b-PMMA

La reazione di post-funzionalizzazione del copolimero PGMA-PMMA è stata condotta seguendo il medesimo schema sintetico in due stadi già descritto per l'ottenimento del copolimero con butil metacrilato. Nel primo a temperatura ambiente avviene la protezione del gruppo terminale tiolico (Schema 7) e nel secondo (Schema 8: condotto a 80°C per 2 ore e con un eccesso di morfolina di 20 volte e sua concentrazione 2M) la funzionalizzazione completa del gruppo epossidico con morfolina.



Schema 7: Protezione del gruppo terminale con disolfuro.



Schema 8: Funzionalizzazione del PGMA-*b*-PMMA con morfolina.

I dati salienti del copolimero ottenuto sono riportati in Tabella 5.

Campione	t. reaz.	PM_copol_th	PM_n	PD
Pol.6	2h	53500	55500	1,13

Tabella 5: Dati relativi al PHMPMA-*b*-PMMA.

Il peso molecolare teorico è stato calcolato tramite l'equazione sotto riportata.

$$PM_{copol} = PM_{PGMA-PMMA} + \left( \frac{PM_{PGMA}}{PM_{GMA}} * PM_{morf} \right)$$

Esso risulta molto vicino al valore sperimentale ottenuto mediante GPC, unitamente ad un valore di polidispersità molto basso. Confrontando tra loro i cromatogrammi (Figura 30) è possibile osservare direttamente l'incremento di peso molecolare medio ottenuto passando da Pol.2 PGMA, Pol.4 PGMA-*b*-PMMA fino ad arrivare al PHMPMA-*b*-PMMA Pol.6.

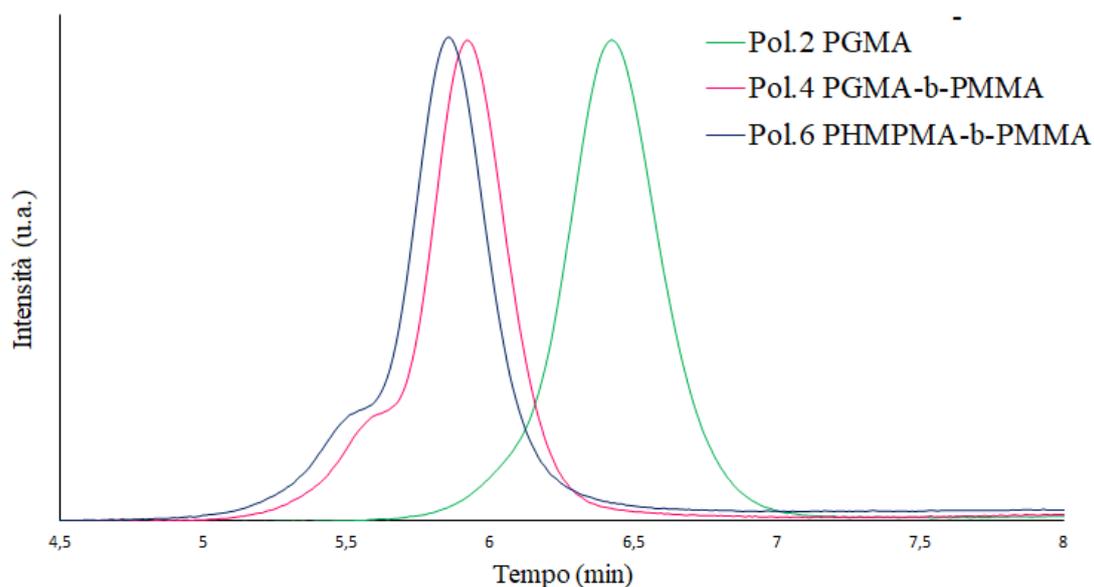
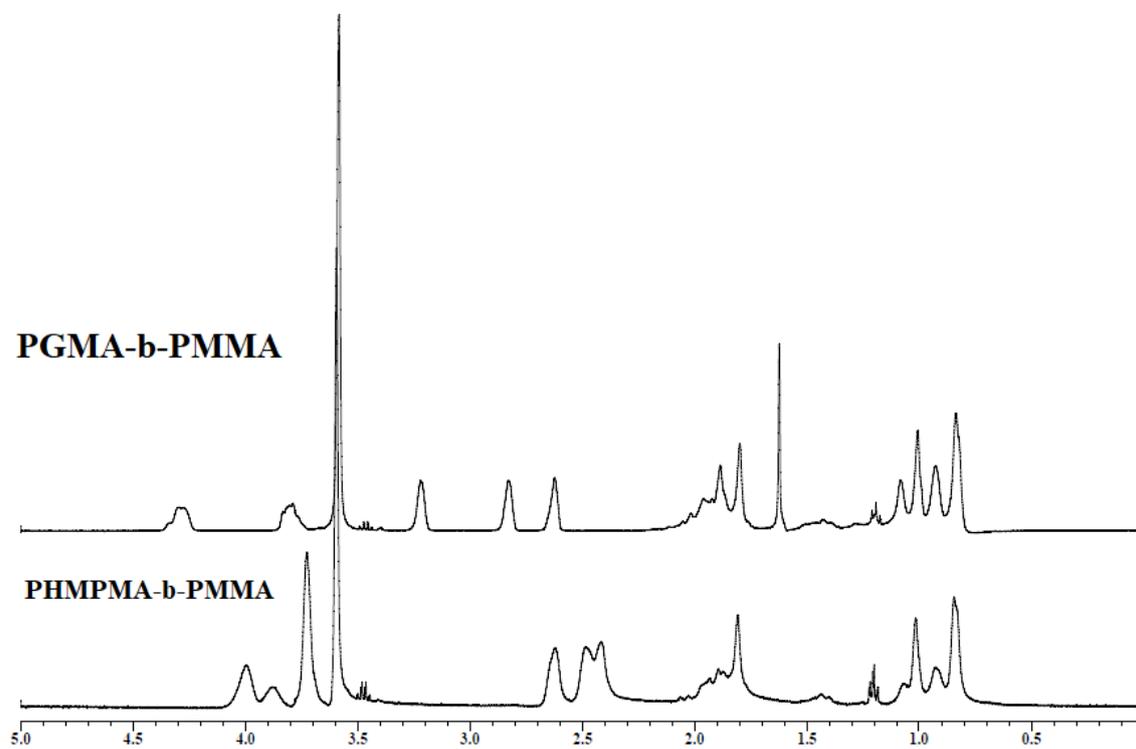


Figura 30: Cromatogrammi GPC di PGMA, PGMA-*b*-PMMA e PHMPMA-*b*-PMMA.

Il segnale a circa 5,5 min (piccola gobba) presente sia in PHMPMA-*b*-PMMA che in PGMA-*b*-PMMA non è presente nel cromatogramma dell' omopolimero di partenza PGMA. Questa evidenza sperimentale suggerisce che sia dovuto a catene ramificate di PGMA (e di conseguenza di PHMPMA) con peso molecolare maggiore e quindi con maggior volume idrodinamico rispetto al resto della distribuzione di pesi molecolari e non a frazioni omopolimeriche formatesi durante le varie reazioni.

Confrontando gli spettri  $^1\text{H}$  NMR del copolimero di partenza e del funzionalizzato (Figura 31) viene mostrato chiaramente che la reazione è stata quantitativa.



*Figura 31: Confronto fra gli spettri NMR del Pol.4 e del Pol.6.*

### 3.3 Formazione, caratterizzazione e stabilizzazione delle micelle polimeriche

Dopo funzionalizzazione con morfolina i due copolimeri possiedono le proprietà adeguate alla formazione delle micelle; una prima trattazione riguarderà quelle sintetizzate a partire dal copolimero con il poli(butil metacrilato), mentre nella seconda parte verranno discussi gli esperimenti basati sul copolimero con la parte di poli(metil metacrilato).

#### 3.3.1 Formazione delle micelle con PHMPMA-b-PBMA

La formazione delle micelle avviene tramite aggiunta graduale di acqua ad una soluzione di copolimero in THF; l'acqua viene addizionata goccia a goccia per dare tempo e modo al sistema di disperderla in modo omogeneo, favorendo l'auto-aggregazione delle micelle. Quando il rapporto tra H<sub>2</sub>O e THF nel mezzo di solubilizzazione non è più in grado di mantenere solvatato il blocco lipofilico le catene si auto assemblano in micelle, le quali godono sia di stabilità cinetica conferita dal nucleo lipofilico che di stabilità termodinamica dovuta alla minimizzazione del contatto superficiale fra il blocco apolare e l'ambiente acquoso (Figura 32).

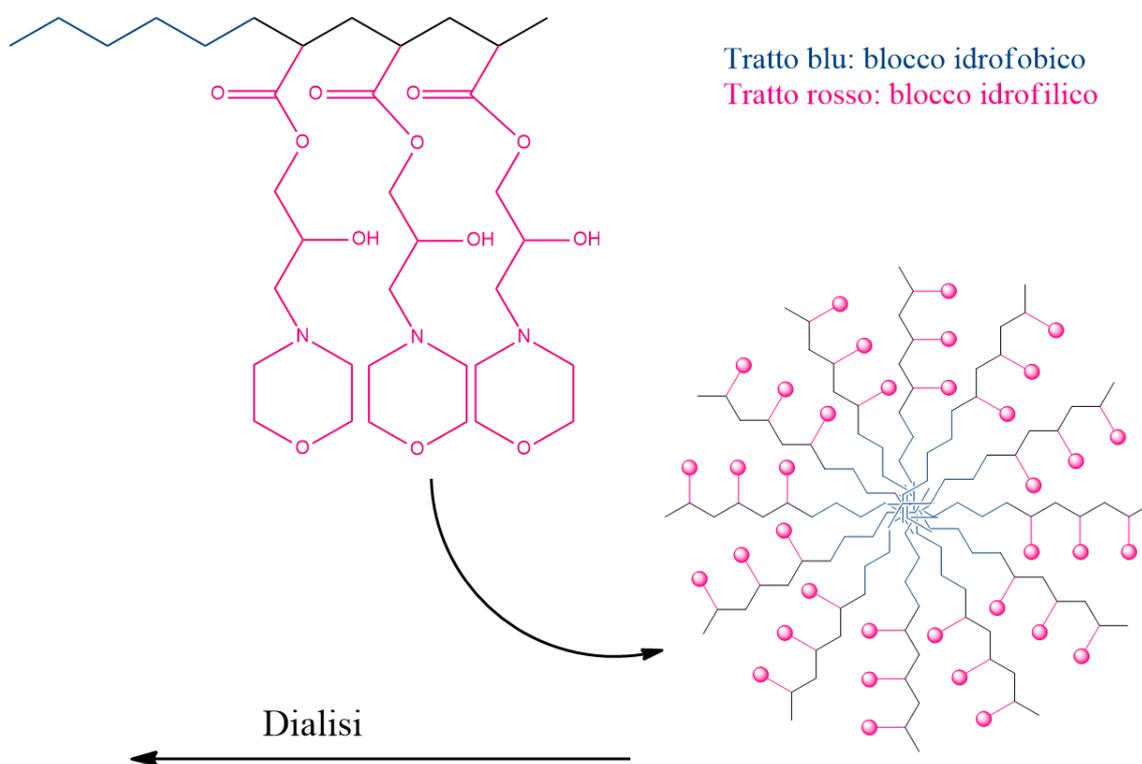


Figura 32: Processo di formazione delle micelle.

Le micelle sono state purificate mediante dialisi per allontanare il THF. Queste presentano, da analisi DLS, una popolazione dell'ordine di grandezza del micron dovuta alle interazioni idrogeno fra particelle. Per disunire questi aggregati è stata necessaria una filtrazione delle sospensioni micellari con un filtro 0,45  $\mu$ . In questo modo è stata ottenuta la scomparsa degli aggregati di 1  $\mu$  e la stabilizzazione delle sospensioni micellari ad un'unica popolazione centrata intorno ai 35-40 nm (Tabella 6).

Campione	Diametro idrodinamico (nm)	polidispersità
Mic.1	45	0,18
Mic.2	30	0,44
Mic.3	30	0,38
Mic.4	40	0,34
Mic.5	35	0,33

*Tabella 6: Caratteristiche delle micelle polimeriche preparate a partire da Pol 4 con PM di 36000 Dalton.*

La riproducibilità della formazione delle micelle è stata verificata ripetendo diverse volte la procedura. Escludendo il primo tentativo (Mic. 1) la polidispersità ottenuta è intorno ai 0,30-0,40 con valori di diametro idrodinamico medio di circa 30-40 nm. La sospensione acquosa si presenta perfettamente limpida sia prima che dopo la purificazione. Sistemi di questo tipo sono ottimi per caricare al loro interno agenti terapeutici per il trattamento di cellule tumorali del corpo umano, ciò è dovuto alla grandezza del blocco lipofilo (5500 Dalton) che permette un adeguato carico, ed al peso molecolare complessivo (36000 Dalton) che rende le singole catene polimeriche facilmente eliminabili dall'organismo.

### 3.3.2 Stabilizzazione delle micelle di PHMPMA-b-PBMA con polidopamina

Le micelle polimeriche godono di un'ottima stabilità; tuttavia al fine di migliorare ulteriormente questo delicato aspetto, sono state sottoposte ad un'ulteriore reazione di funzionalizzazione sfruttando la reattività dei gruppi OH presenti sul guscio esterno in modo tale da ottenere una reticolazione esterna della struttura. Questa è stata ottenuta facendo reagire le micelle con dopamina dando luogo a una reticolazione contenente tratti di polidopamina (PDA). La polidopamina è una sostanza prodotta naturalmente dall'organismo umano e quindi gode di biocompatibilità e biodegradabilità e per questo non comporta nessun problema di riconoscimento da parte del sistema immunitario. Dal punto di vista pratico la reazione è stata condotta semplicemente aggiungendo una determinata quantità di una soluzione madre di dopamina alle micelle. Utilizzando vari campioni micellari sono state condotte diverse prove per correlare il tempo di reazione con il grado di polimerizzazione della dopamina (formazione di PDA). Inizialmente sono stati condotti quattro esperimenti variando il tempo di polimerizzazione da 8 a 48 ore lasciando inalterata la concentrazione di monomero (dopamina) a 10mM. L'analisi DLS delle micelle ottenute dopo dialisi, per eliminare la dopamina non reagita, evidenzia nuovamente la formazione di aggregati di particelle di dimensioni micrometriche per cui è stata ripetuta la filtrazione con filtro 0,45. I valori di polidispersità ottenuti sono molto simili tra loro e leggermente più bassi rispetto alle micelle di partenza, mentre il diametro idrodinamico delle nanoparticelle dopo la reazione con la dopamina risulta simile a quello di partenza (Tabella 7).

Campione	Diametro idrodinamico (nm)	polidispersità
PDA1_8h	50	0,26
PDA1_16h	30	0,28
PDA1_24h	35	0,27
PDA1_48h	30	0,26

Tabella 7: Dati DLS sulle micelle dopo polimerizzazione con dopamina.

I campioni si presentano con una gradazione di colore che va dal grigio pallido (per il *PDA1\_8h*) fino ad un grigio scuro (*PDA1\_48h*) il che suggerisce una maggiore presenza di polidopamina

man mano che aumenta il tempo di reazione (la polidopamina ha un tipico colore grigio/marrone).

La quantità di polidopamina presente è stata dosata mediante spettrofotometria UV-Vis nel range spettrale tra 250 e 850 nm utilizzando la sfera integratrice come rivelatore. La scelta di questo accessorio è dettata dalla sua capacità di integrare globalmente tutta la luce proveniente dal campione, anche quella diffusa (scattering), cosa che un normale spettrofotometro non è in grado di fare. In questo modo si riesce ad eliminare quasi del tutto il problema dello scattering dei campioni, il quale altrimenti avrebbe portato ad un valore di assorbanza maggiore e quindi errato.

Utilizzando la sfera integratrice si può ragionevolmente correlare il valore di assorbanza registrato da una sospensione acquosa di micelle (e non da soluzione omogenea) con il grado di polimerizzazione della polidopamina. Per far questo è stata utilizzato come bianco di riferimento il campione micellare senza dopamina. Ci si aspetta quindi che il valore registrato di assorbanza sia direttamente proporzionale alla quantità di PDA presente in accordo con la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon b c$$

Dove:

- $\varepsilon$  è il coefficiente di estinzione molare ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ );
- $b$  è il cammino ottico ovvero lo spessore della soluzione contenuta nella cuvetta (cm);
- $c$  è la concentrazione (M)

Non è però possibile determinare in maniera assoluta la quantità di PDA in quanto non si può conoscere e/o ricavare il coefficiente di estinzione molare della polidopamina nelle stesse identiche condizioni in cui si trova sul guscio esterno delle micelle.

I dati sperimentali ottenuti a 400 nm sono riportati in Figura 33 e mostrano una buona correlazione tra assorbanza registrata e quindi concentrazione di polidopamina e il tempo di reazione. I valori di assorbimento a 400 nm rappresentano il fit migliore essendo un buon compromesso tra la maggiore assorbanza della PDA e l'interferenza di altri gruppi molecolari del polimero costituente le micelle.

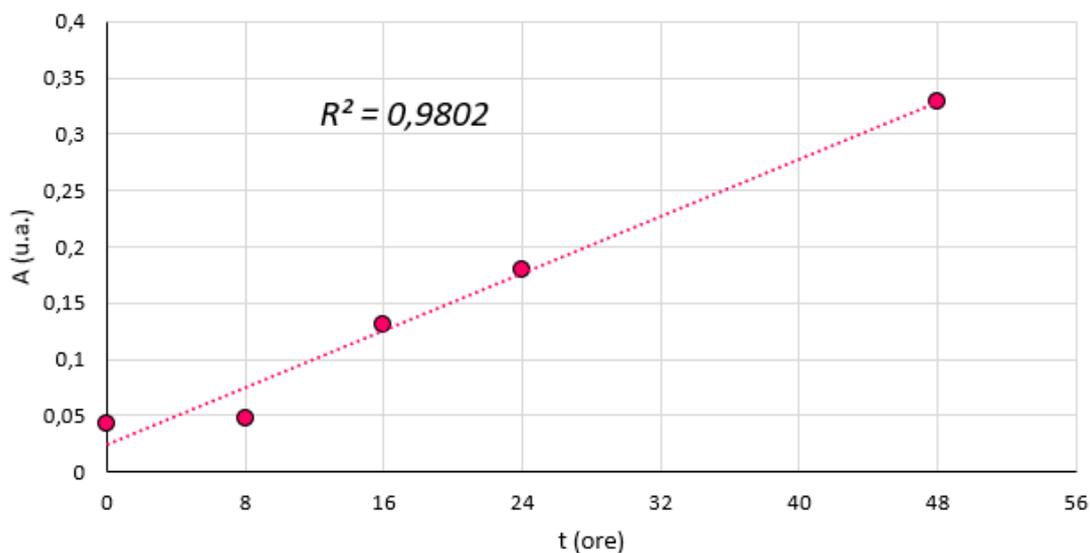


Figura 33: Assorbimento a 400 nm dei campioni PDA1 a 8, 16, 24 e 48 h.

Diminuendo la concentrazione di dopamina iniziale a 6mM si ottengono micelle funzionalizzate con PDA con diametri e polidispersità sostanzialmente identici agli esperimenti precedenti (Tabella 8).

Campione	Diametro idrodinamico (nm)	polidispersità
PDA2_16h	30	0,26
PDA2_24h	30	0,25
PDA2_40h	30	0,28

Tabella 8: Caratteristiche delle micelle polimerizzate con dopamina a conc. 6mM.

In queste condizioni, l'andamento dell'assorbanza delle micelle funzionalizzate rispetto al tempo di reticolazione risulta lineare con un fattore  $R^2$  pari a 0,9965 (Figura 34). I valori di assorbimento maggiori registrati in questa seconda serie di esperimenti, seppur condotti con una concentrazione di monomero inferiore (6mM anziché 10), sono probabilmente riconducibili ad un diverso valore di pH derivante dall'acqua deionizzata con la quale sono state preparate le sospensioni micellari: una piccola variazione in questo senso può modificare la velocità di polimerizzazione della dopamina la quale reagisce più velocemente in condizioni più basiche.

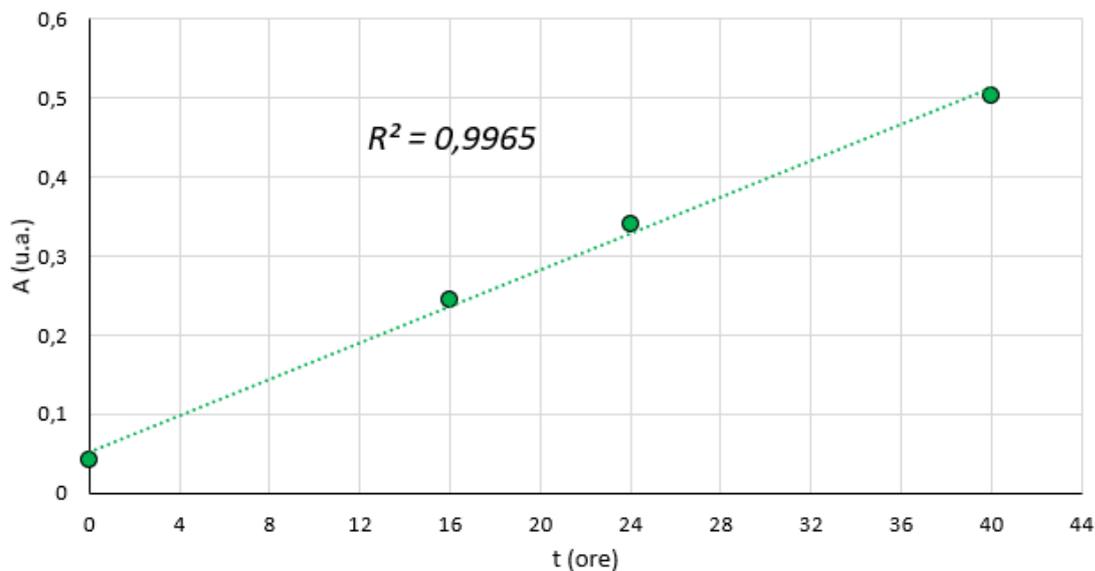


Figura 34: Assorbimento a 400 nm dei campioni PDA2 a 16, 24 e 40 h.

Per confermare la correlazione lineare tra grado di polimerizzazione ed assorbanza è stato implementato un ulteriore set di esperimenti variando la concentrazione di monomero: 2, 4, 6 e 10 mM e mantenendo costante il tempo di reazione (16 ore).

Le micelle ottenute presentano come aspettato diametri idrodinamici e polidispersità simili tra loro e agli esperimenti precedenti (Tabella 9) e una netta correlazione lineare dell'assorbanza all'aumentare della concentrazione di dopamina monomero dell'ambiente di reazione (Figura 35).

Campione	Diametro idrodinamico (nm)	polidispersità
PDA3_2mM	40	0,34
PDA3_4mM	30	0,31
PDA3_6mM	30	0,33
PDA3_10mM	40	0,32

Tabella 9: Dati delle micelle utilizzando dopamina a concentrazione variabile.

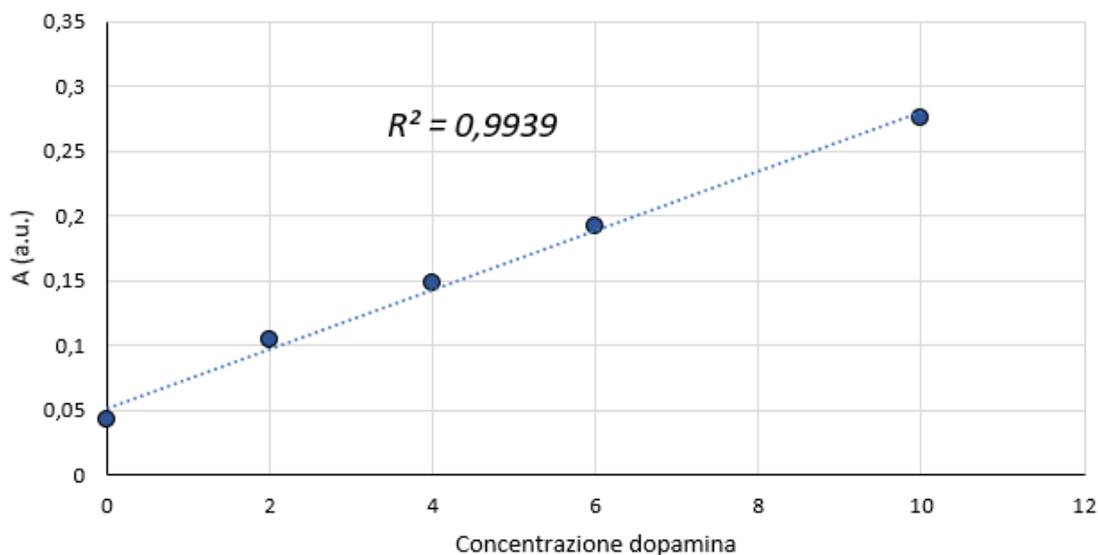


Figura 35: Assorbimento a 400 nm dei campioni PDA3 2, 4, 6 e 10 mM.

È quindi possibile affermare che esiste una correlazione lineare tra la concentrazione di Dopamina presente nel guscio esterno delle micelle sia con il tempo di reazione sia con la sua concentrazione iniziale nell'ambiente di reazione.

Per marcare le micelle e renderle tracciabili all'interno del corpo umano è possibile caricare al loro interno un marcatore fluorescente come ad esempio il Nile Red (Figura 36).

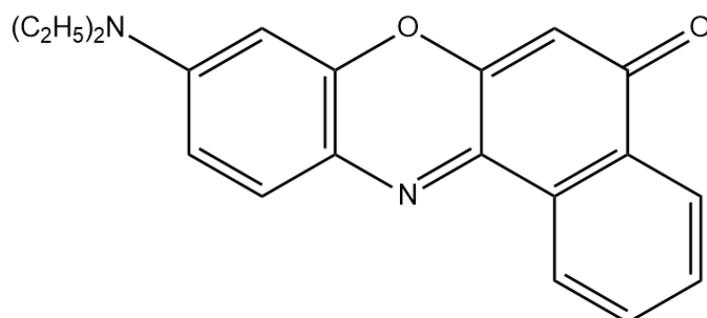


Figura 36: Struttura del Nile Red.

Quest'ultimo è un colorante con caratteristiche idrofobiche (quindi scarsamente solubile in acqua), ma che si discioglie in un'ampia varietà di solventi organici fra cui il THF, in cui assume una colorazione rosso acceso. Grazie alle sue proprietà esso può essere facilmente inglobato all'interno del core idrofobico delle micelle durante il processo di autoaggregazione conferendo alla sospensione una tipica colorazione viola. In letteratura è riportato l'uso del Nile Red per la determinazione di goccioline lipidiche intracellulari [26]. Rivestendo le micelle con il guscio di polidopamina è possibile inoltre studiare fenomeni di quenching dovuti al rivestimento esterno (di colore grigio scuro) che assorbe l'emissione dovuta al cromoforo. Per condurre

questa indagine sono stati preparati quattro campioni micellari a partire da una soluzione in THF di copolimero e Nile Red; la progressiva aggiunta di acqua porta alla formazione delle nanoparticelle che segregano al loro interno la molecola di colorante affine con la parte lipofila di poli(butil metacrilato). Al termine dell'aggiunta di acqua uno dei campioni preparati ha assunto un aspetto torbido e tutti i campioni durante il processo di purificazione per dialisi hanno dato luogo ad un precipitato fucsia di Nile-Red sulla membrana; questi due fenomeni sono imputabili all'insufficiente lunghezza del tratto di catena lipofila del PBMA (5500 Dalton) che non riesce a supportare tutto il carico di cromoforo introdotto. Per eliminare le particelle di precipitato le micelle ottenute sono state filtrate (0,45  $\mu$ ) e successivamente analizzate alla DLS: il diametro idrodinamico risulta simile alle micelle senza cromoforo ad indicare che questo non altera (o altera di poco) le dimensioni della struttura (Tabella 10).

Campione	Diametro idrodinamico (nm)	polidispersità
NR1	40	0,32

Tabella 10: Proprietà delle micelle dopo inglobamento del Nile Red.

La reticolazione successiva con dopamina è stata effettuata mantenendo costante il tempo di polimerizzazione per tutti i campioni, 16 ore, e variando la concentrazione di monomero: 2, 4, 6 e 10 mM. L'analisi UV-Vis con sfera integratrice mostra un andamento lineare dell'assorbimento con l'incremento della concentrazione di dopamina iniziale anche in presenza dell'agente colorante.; il punto 0 rappresenta l'assorbimento a 400 nm delle micelle con il Nile Red prima dell'aggiunta di dopamina (Figura 37).

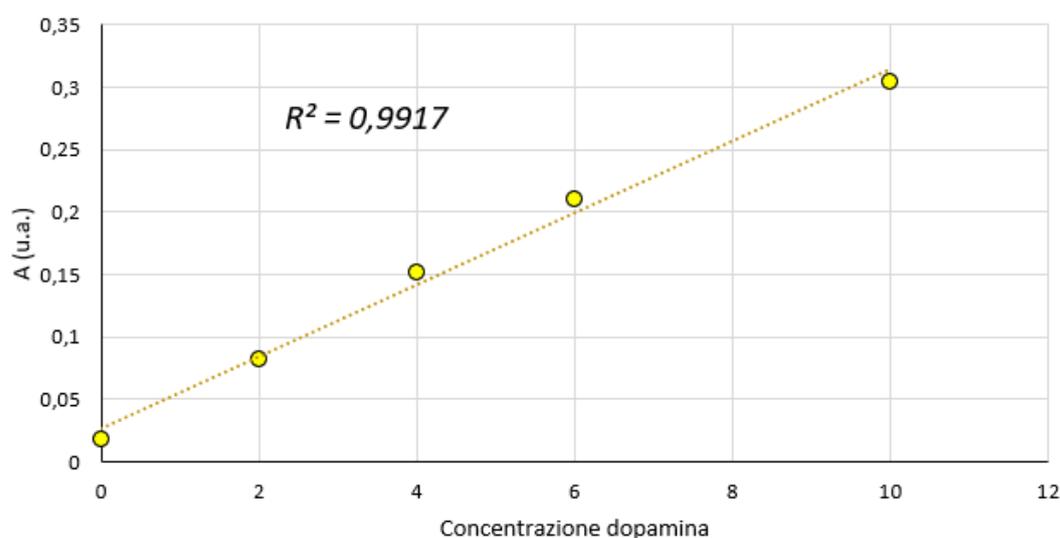


Figura 37: Assorbimento a 400 nm dei campioni NR1 2, 4, 6 e 10 mM.

Gli spettri UV-Vis di questi campioni mostrano che il segnale di massimo assorbimento del Nile Red è centrato intorno ai 530 nm (Figura 38). Questa lunghezza d'onda è stata quindi impiegata per eccitare i campioni allo scopo di registrare gli spettri di emissione allo spettrofluorimetro (Figura 38).

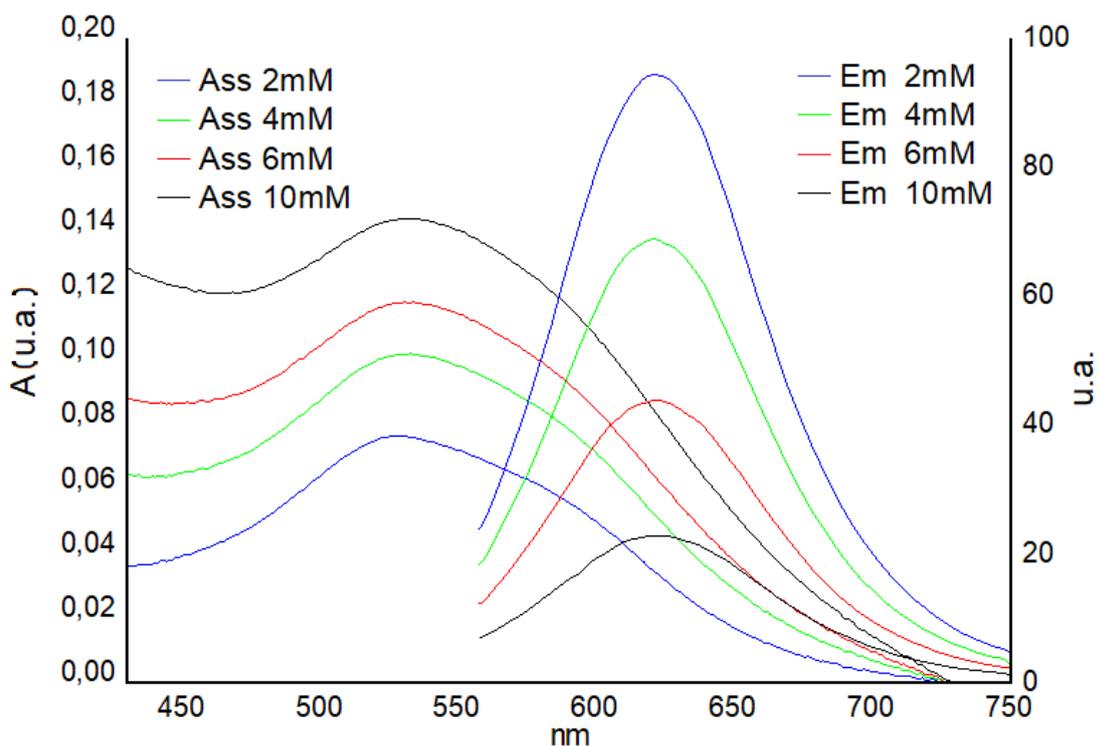


Figura 38: Spettri di assorbimento e di emissione dei campioni NR1 2, 4, 6 e 10 mM.

L'assorbimento a 530 nm cresce in maniera lineare man mano che aumenta la concentrazione di monomero e quindi di PDA, mentre il massimo di emissione è centrato a 620 nm e quindi ad energia minore. L'intensità dell'emissione diminuisce in maniera esponenziale con l'aumentare della concentrazione di dopamina nel guscio esterno (Figura 39).

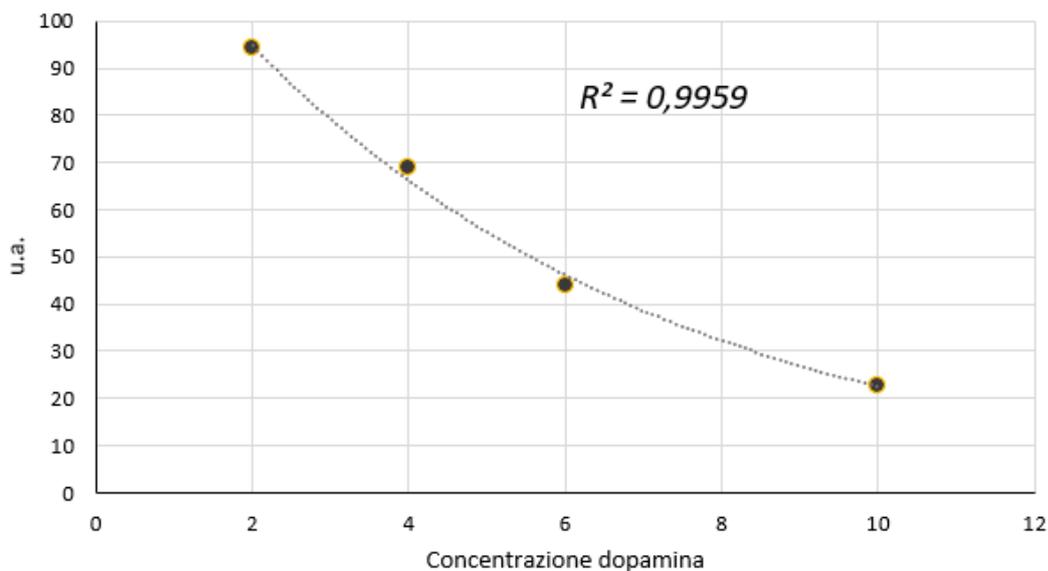


Figura 39: variazione dell'intensità dell'emissione dei campioni NR1 2, 4, 6 e 10 mM.

Questo comportamento è correlato alla presenza di polidopamina nel guscio esterno che inibisce l'emissione del cromoforo in quello che può essere visto come un quenching energetico dovuto alla parziale sovrapposizione della banda di assorbimento della dopamina con quella di emissione del Nile Red: lo strato esterno cattura in parte la radiazione emessa dalle nanoparticelle per cui lo spettrofluorimetro registra un picco di emissione più basso. Al diminuire della presenza di polidopamina l'intensità del picco diviene sempre più intensa fino ad arrivare al campione 2mM.

### 3.3.3 Formazione delle micelle con PHMPMA-b-PMMA

La seconda parte di esperimenti condotta durante il lavoro di tesi sperimentale riguarda la formazione e caratterizzazione di micelle utilizzando l'altro copolimero sintetizzato, il PHMPMA-b-PMMA (Pol.6) in cui la parte lipofila è costituita da poli(metil metacrilato). In questo caso il blocco lipofilo PMMA è stato ottenuto con dimensioni maggiori rispetto al copolimero PHMPMA-b-PBMA avendo un rapporto molare tra le unità monomeriche pari a 61,9 % (PMMA) e 38,1% (PHMPMA).

Per questi motivi le micelle sintetizzate a partire dal Pol.6 godono di una maggiore stabilità cinetica: hanno infatti un tratto idrofobico più lungo e questo si traduce in una concentrazione micellare critica (CMC) inferiore; inoltre la temperatura di transizione vetrosa del PMMA si aggira intorno ai 104 °C contribuendo ulteriormente alla stabilità cinetica rispetto al PBMA che è caratterizzato da una  $T_g$  pari a 37-40 °C circa. Infine le micelle con una parte lipofila molto più estesa permettono di caricare al loro interno quantitativi maggiori di farmaci o di cromofori affini.

Le micelle sono state ottenute come descritto in precedenza nel paragrafo 3.3.1 e presentano diametri idrodinamici e polidispersità simili alle precedenti (Tabella 11).

Campione	Pol. di partenza	PM_copol	Diametro idrodinamico (nm)	polidispersità
Mic.6	Pol.6	53500	50	0,28

*Tabella 11: Micelle polimeriche a partire da PHMPMA-b-PMMA.*

### 3.3.4 Stabilizzazione delle micelle di PHMPMA-b-PMMA con polidopamina

Considerata la maggior praticità sperimentale nel variare la concentrazione della dopamina mantenendo costante il tempo di reazione, la funzionalizzazione di queste micelle è stata realizzata su un set di quattro campioni con concentrazioni di dopamina pari a 2 mM, 4 mM, 6 mM e 10 mM tenendo costante il tempo di polimerizzazione a 16 ore. Dopo la reazione i campioni sono stati filtrati con un filtro 0,22  $\mu$  ed esaminati alla DLS con risultati del tutto simili a quanto già visto per gli esperimenti precedenti (Tabella 12).

Campione	Diametro idrodinamico (nm)	polidispersità
PDA4_2mM	30	0,22
PDA4_4mM	45	0,18
PDA4_6mM	30	0,19
PDA4_10mM	51	0,21

Tabella 12: Analisi DLS delle micelle 6 dopo l'aggiunta di dopamina e successiva polimerizzazione.

Anche in questo caso l'assorbimento UV-Vis a 400 nm di queste micelle incrementa con la concentrazione di dopamina; con  $R^2$  però inferiore ai precedenti (Figura 40).

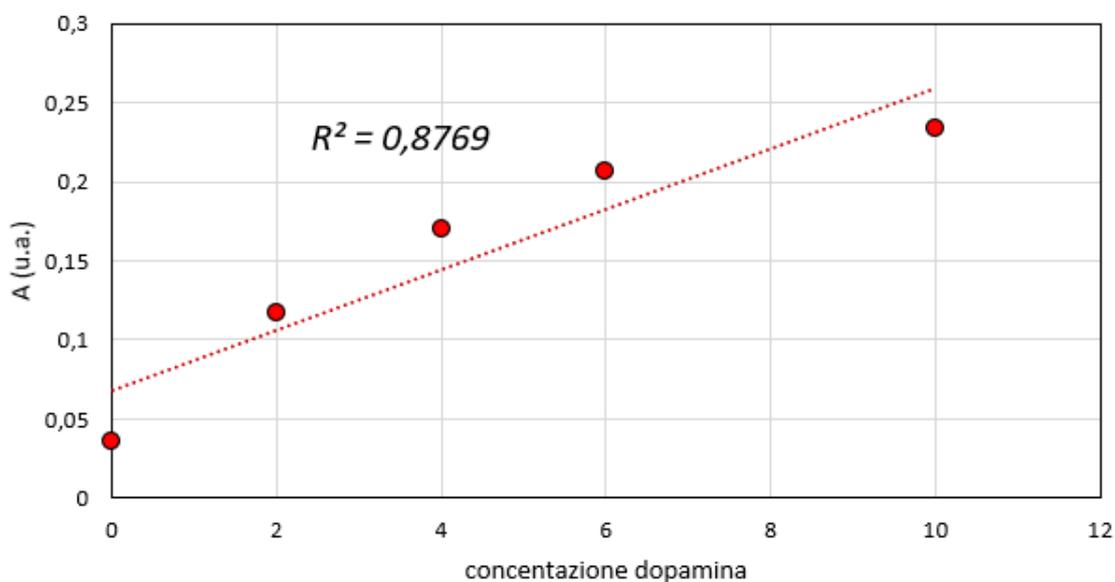


Figura 40: Assorbimento a 400 nm dei campioni PDA4 2, 4, 6 e 10 mM.

Anche le micelle costituite da PHMPMA-b-PMMA sono state caricate con Nile Red usando lo stesso rapporto in mg cromoforo/copolimero impiegato per le micelle di PHMPMA-b-PBMA; il campione è stato suddiviso in due aliquote e per ognuna è stata realizzata la stabilizzazione con polidopamina a concentrazioni 2mM e 10 mM di monomero con tempo di polimerizzazione di 16 ore per entrambi. I risultati delle analisi DLS prima e dopo reazione con la dopamina sono riportati in tabella 13:

Campione	Diametro idrodinamico (nm)	polidispersità
NR2	50	0,32
NR2_2mM	40	0,11
NR2_10mM	50	0,16

*Tabella 13: Dati DLS dei campioni NR2.*

Mentre il diametro idrodinamico resta invariato, la polidispersità dei campioni reticolati mostra valori inferiori. La filtrazione effettuata con filtri da 0,22  $\mu$  riduce quindi sensibilmente la polidispersità delle micelle.

Durante la fase di auto-aggregazione e successiva purificazione delle micelle contenenti Nile Red con MMA rispetto a quelle con BMA sono state osservate alcune differenze importanti di comportamento:

- la soluzione di colore viola è perfettamente limpida e trasparente mentre uno dei campioni NR1 con il blocco lipofilo di PBMA era torbido;
- sulla membrana di dialisi non si nota alcun precipitato di Nile Red, cosa che invece era ben visibile nella membrana delle micelle con BMA.

Queste diversità sono dovute alla maggiore estensione (lunghezza) del blocco lipofilo di PMMA in grado di inglobare all'interno del core la totalità dell'agente colorante utilizzato, cosa non possibile per il Pol.5 PHMPMA-b-PBMA che ha un blocco di PBMA relativamente piccolo (di soli 5000 Dalton)

A riprova di questa ipotesi, gli spettri UV-vis delle micelle contenenti MMA mostrano un'assorbanza, e quindi concentrazione di Nile Red, nettamente superiore rispetto a quelle contenenti BMA (Figura 41). Contemporaneamente anche la loro emissione non viene quenchata come nel caso precedente.

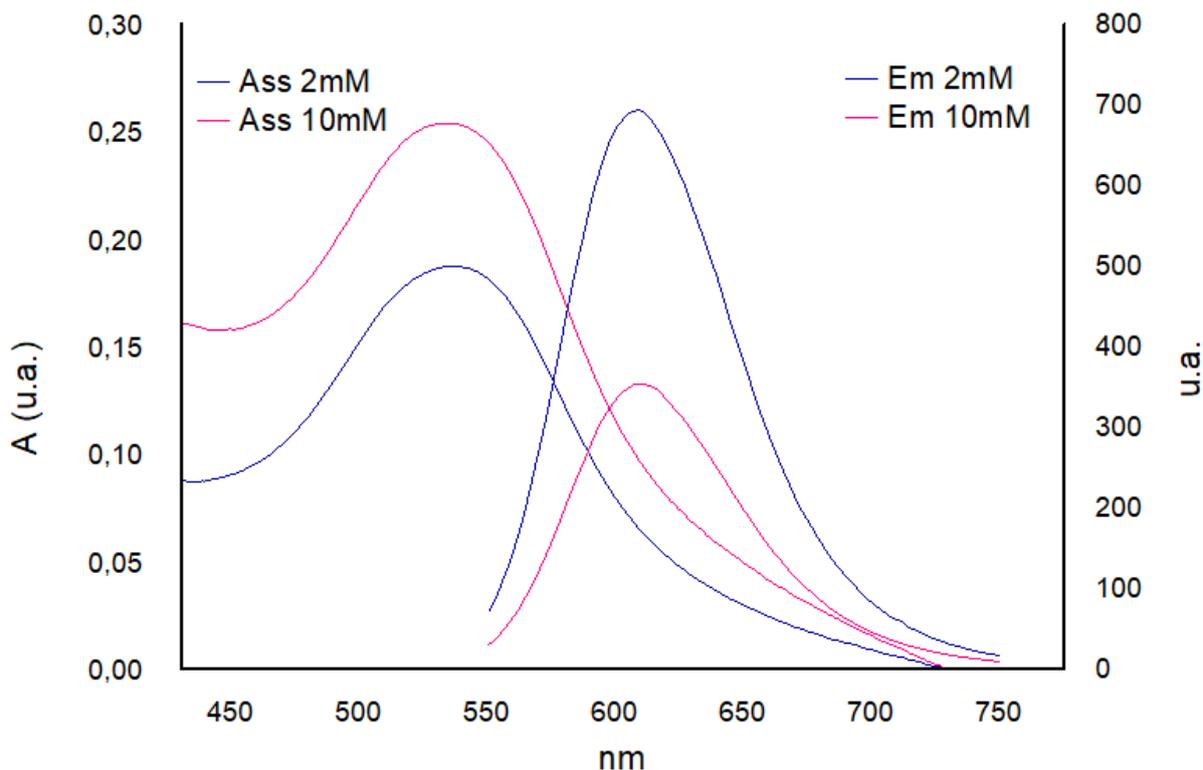


Figura 41: Spettri di assorbimento e di emissione dei campioni NR2 2 e 10 mM.

Ciò dimostra che i campioni NR2 hanno caricato al loro interno la totalità del marcatore fluorescente evitandone la precipitazione durante il processo di dialisi come accaduto nei campioni NR1. Concludendo è possibile affermare che le micelle sintetizzate a partire da PHMPMA-b-PMMA presentano una migliore capacità di inglobare principi attivi ed altre sostanze apolari grazie alla maggiore estensione del blocco di poli(metil metacrilato) (22000 Dalton).

### 3.4 Caratterizzazione termica

I prodotti polimerici sintetizzati e le micelle sono stati caratterizzati mediante DSC e TGA dopo processo di liofilizzazione ed essiccazione per allontanare l'acqua residua.

#### 3.4.1 Analisi DSC

I polimeri sintetizzati sono stati caratterizzati tramite la Differential Scanning Calorimetry (DSC). Come aspettato tutti i termogrammi mostrano solo transizioni termiche del secondo ordine attribuite alle loro transizioni vetrose in accordo alla natura amorfa dei polimeri prodotti. I principali risultati ottenuti sono riportati in Tabella 14.

Campione	Polimero	PM I blocco	PM II blocco	T <sub>g</sub> I blocco	T <sub>g</sub> II blocco
Pol.2	PGMA	19500		82 °C	
Pol.7	PBMA	18800		40 °C	
Pol.3	PGMA-b-PBMA	19500	5500	81 °C	-
Pol.5	PHMPMA-b-PBMA	30500	5500	56 °C	-
Pol.6	PHMPMA-b-PMMA	33500	22000	70 °C	-

Tabella 14: Caratteristiche DSC dei polimeri di sintesi.

Il copolimero PGMA-b-PBMA mostra solo la T<sub>g</sub> del blocco del PGMA intorno a 81°C (l'omopolimero PGMA Pol.2 presenta T<sub>g</sub> a 82°C [27]). In questo caso il blocco di PBMA che avrebbe dovuto mostrare un segnale DSC intorno ai 40°C [28, 29] (T<sub>g</sub> del PBMA Pol.7 appositamente preparato ed investigato) risulta troppo corto rispetto al blocco di PGMA e questo preclude la sua determinazione. Dopo la funzionalizzazione con la morfolina la sua T<sub>g</sub> si abbassa a maniera significativa fino a 56 °C. Questo comportamento è dovuto all'inserzione in catena laterale di gruppi ingombranti stericamente che donano alla struttura macromolecolare maggiore flessibilità con un aumento del volume libero disponibile per i moti conformazionali; la conseguenza diretta è una diminuzione del grado di impaccamento delle macromolecole che si manifesta con una notevole diminuzione della temperatura di transizione vetrosa (Figura 42)

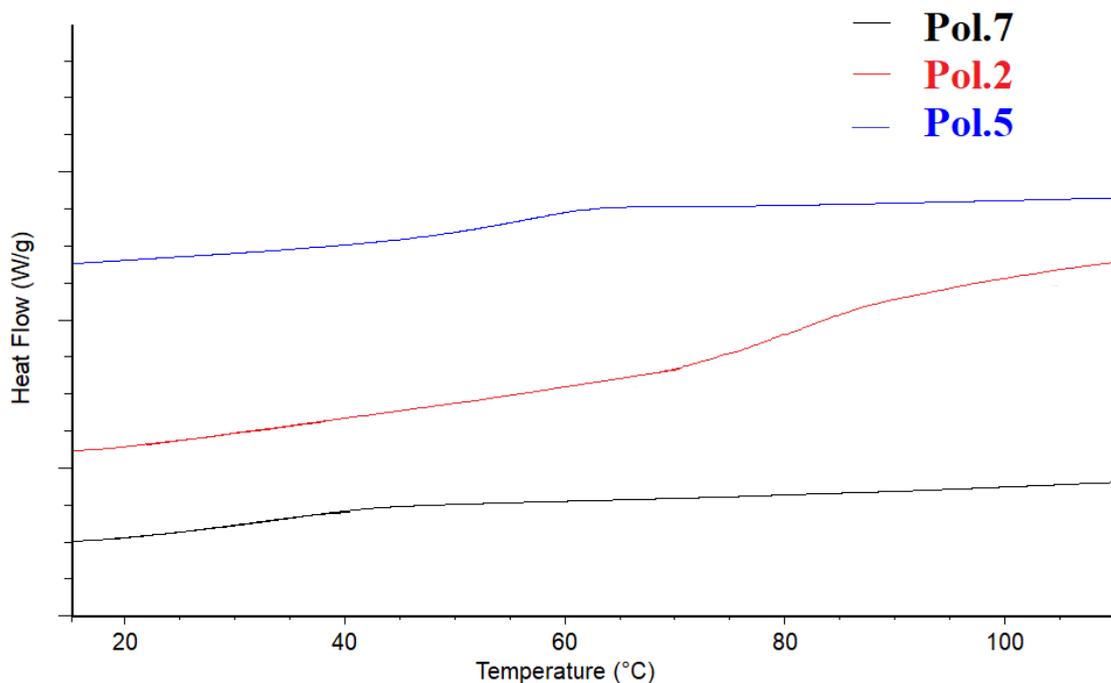


Figura 42: Termogrammi DSC dei polimeri PBMA (Pol.7), PGMA (Pol.2) e PHMPMA-b-PBMA (Pol.5).

Il Pol.6 PHMPMA-b-PMMA presenta invece una  $T_g$  maggiore del blocco di PHMPMA intorno ai 70°C (Tabella 14 e Figura 43). Questo è dovuto alla maggiore rigidità del blocco di PMMA ( $T_g$  di 104°C) [30] rispetto al PBMA che irrigidisce il primo blocco morfolinato.

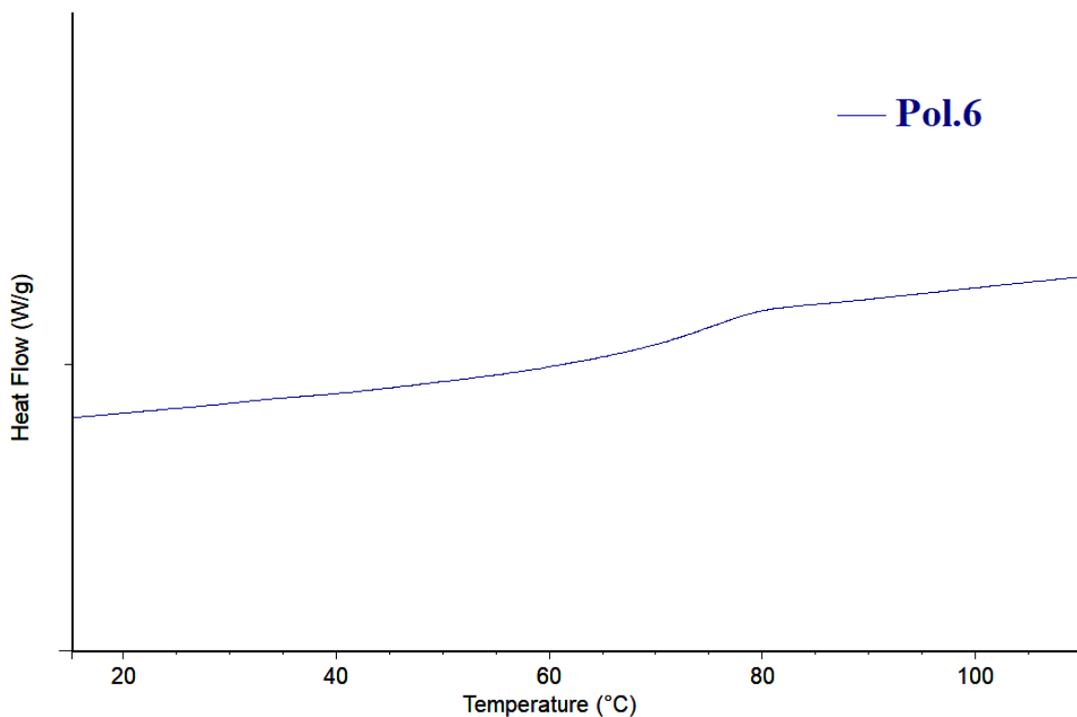


Figura 43: Termogramma DSC del PHMPMA-b-PMMA.

La reticolazione con dopamina sia delle micelle PHMPMA-b-PMMA Pol.6 che di quelle PHMPMA-b-PBMA Pol.5 conferisce una maggiore rigidità al guscio esterno idrofilico morfolinico. In particolare, la  $T_g$  dei campioni PDA1 ovvero quelli preparati a partire dal Pol.5 in cui la  $T_g$  del blocco PHMPMA era di 56°C incrementa all'aumentare del tempo di reazione fino ad arrivare a valori costanti intorno ai 70°C (Figura 44 e Tabella 15).

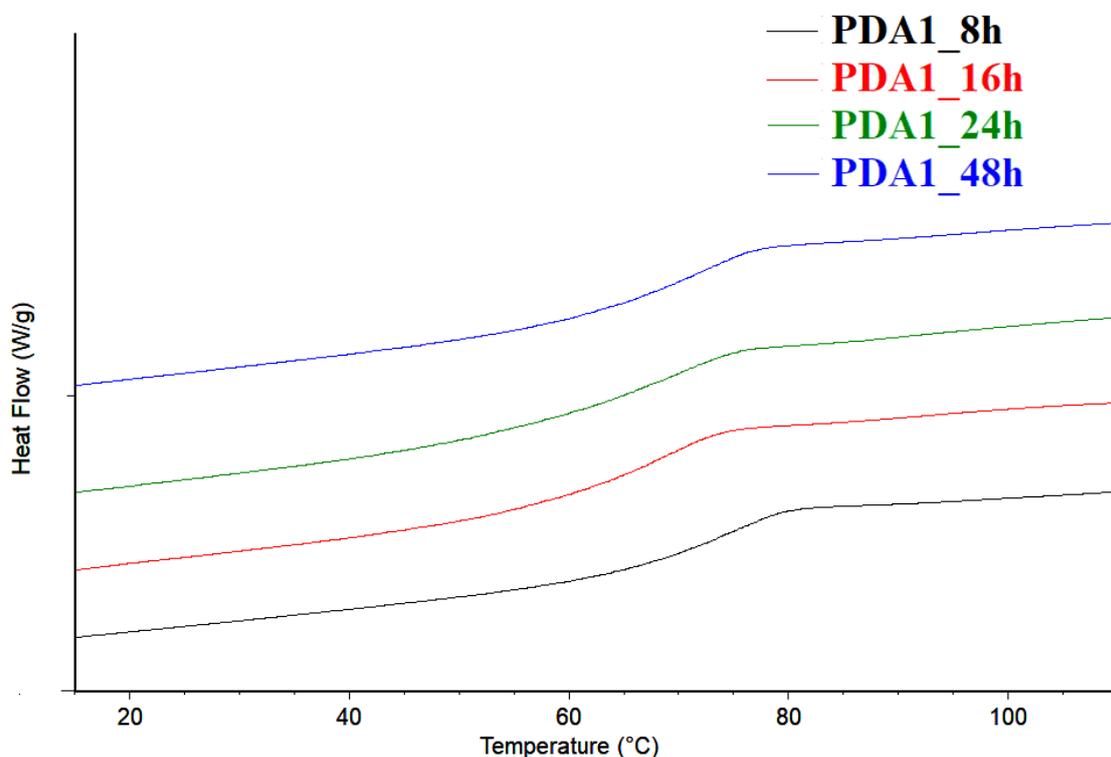


Figura 44: Termogrammi DSC dei campioni PDA1 8, 16, 24 e 48 h.

Campione	$T_g$
PDA1_8h	74 °C
PDA1_16h	67°C
PDA1_24h	68°C
PDA1_48h	70°C
PDA4_2mM	70 °C
PDA4_4mM	70°C
PDA4_6mM	69°C
PDA4_10mM	68°C

Tabella 15:  $T_g$  dei campioni reticolati PDA1 e PDA4.

A conferma di ciò, i campioni PDA4 reticolati a partire da Pol.6 avendo già una  $T_g$  del blocco esterno di circa  $70^\circ\text{C}$  non presentano variazioni di  $T_g$  all'aumentare del grado di reticolazione (Figura 45 e Tabella 15).

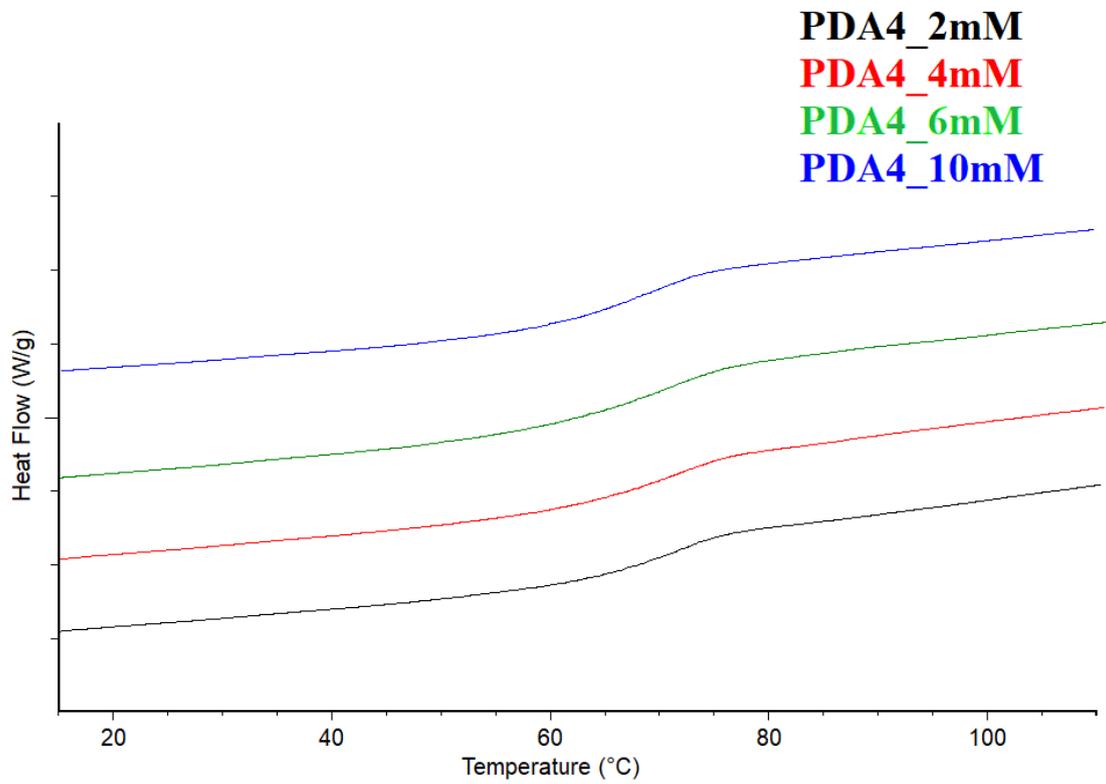


Figura 45: Termogrammi DSC dei campioni PDA4 2, 4, 6 e 10 mM.

### 3.4.2 Analisi TGA

L'analisi termogravimetrica (TGA), effettuata nel range di temperature tra 25 e 800°C con rampa di riscaldamento di 20°C al minuto e in atmosfera inerte (N<sub>2</sub>) ha permesso di quantificare la percentuale in peso di polidopamina presente nei campioni micellari reticolati. I copolimeri Pol.5 e Pol.6 senza polidopamina sono stati utilizzati come standard per calcolare le percentuali di polidopamina residua dei campioni micellari. In Figura 46 sono riportati i termogrammi TGA della serie di campioni PDA1, ovvero il set di micelle ottenute a partire dal Pol.5 con concentrazione di dopamina 10 mM e tempo di polimerizzazione di 8, 16, 24 e 48 ore.

I campioni reticolati presentano una stabilità termica maggiore di circa 100°C delle micelle di Pol 5 (linea nera in Figura 46). Infatti la temperatura di inizio decomposizione passa dai circa 150°C a 250°C circa. I copolimeri presentano diverse perdite di peso nel range di temperature da 150 a 450°C per poi stabilizzarsi da questa temperatura fino agli 800°C. In letteratura è riportato che la polidopamina pura degrada in queste condizioni sperimentali lasciando un residuo molto maggiore rispetto ai copolimeri a blocchi investigati [31].

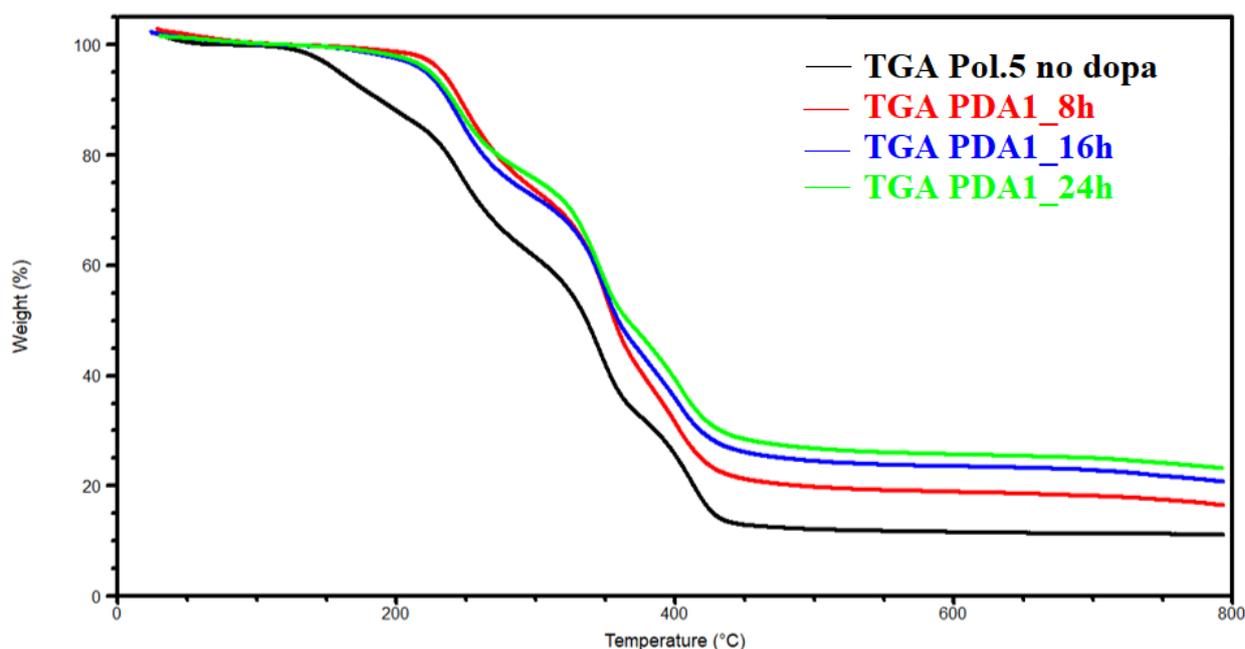


Figura 46: Termogrammi TGA del polimero PHMPMA-b-PBMA e dei campioni PDA1 reticolati con dopamina

Il copolimero PHMPMA-b-PBMA mostra un residuo carbonioso di circa il 10% in peso, mentre i copolimeri reticolati presentano un residuo maggiore che incrementa con la quantità di

dopamina presente che aumenta all'aumentare del tempo di polimerizzazione: 8 ore < 16 ore < 24 ore (Tabella 17).

Tempo (h)	PDA (%)
8	7,190
16	12,989
24	16,284

Tabella 15: percentuale in peso di polidopamina nei campioni PDA1 al variare del tempo di polimerizzazione.

In questo modo, la differenza in peso del residuo dei copolimeri reticolati con dopamina rispetto al copolimero non reticolato è direttamente proporzionale alla quantità di polidopamina presente nel campione come mostrato in Figura 47 passando dal 7 % ca. fino a ca. il 16 % del campione a 24 ore.

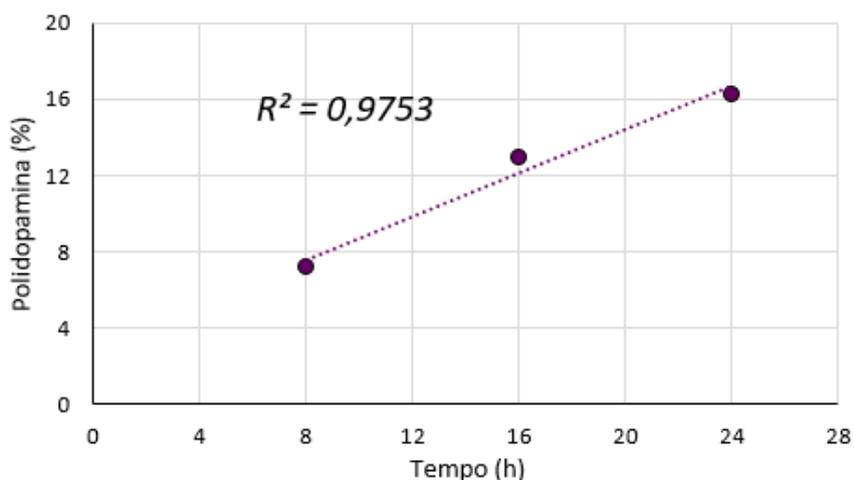


Figura 47: Residuo % di polidopamina a 800°C in funzione del tempo di polimerizzazione.

Il campione a 48 ore ha presentato invece una degradazione non in linea con gli altri sia per quanto riguarda l'andamento che per quanto riguarda il residuo in peso. Questo è stato probabilmente dovuto ad alcuni fenomeni di natura fisica che hanno pregiudicato l'analisi specifica. Purtroppo la quantità di materiale a disposizione non ha consentito la replica dell'analisi e quindi non è stato preso in considerazione nell'elaborazione dei dati sperimentali. Comunque, i risultati UV-Vis di queste micelle reticolate mostravano chiaramente un contenuto

di dopamina maggiore rispetto agli altri campioni e direttamente dipendente dal tempo di polimerizzazione (Figura 47).

Andamento analogo è mostrato dai campioni di PHMPMA-b-PMMA reticolati per 16 ore al variare della concentrazione iniziale di dopamina da 2mM a 10mM (Figura 48). Con alcune differenze rispetto ai copolimeri contenenti il PBMA: il campione non reticolato mostra una perdita di peso a circa 250°C attribuita alla degradazione del blocco di PMMA [32] mentre i copolimeri reticolati mostrano questa volta una degradazione anticipata di circa 150°C.

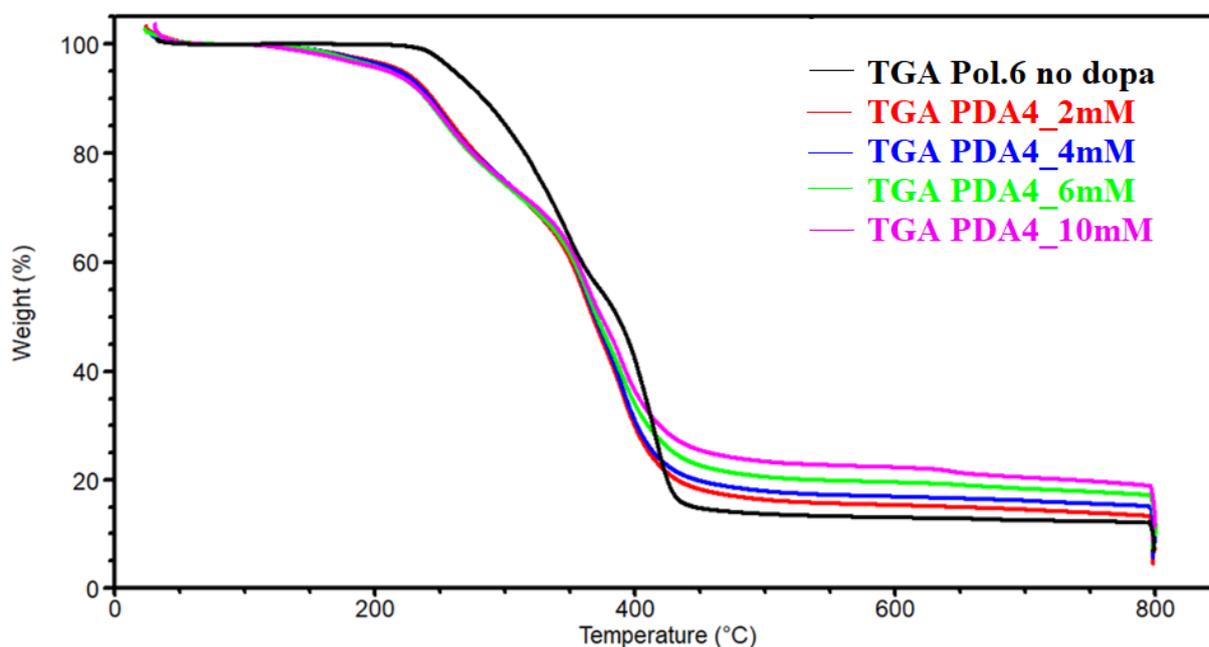


Figura 48: Degradazione TGA del PHMPMA-b-PMMA (nero) e dei campioni PDA4.

Il residuo di polidopamina a 800°C dei campioni reticolati cresce in maniera lineare (Figura 49) all'aumentare della concentrazione di dopamina iniziale, partendo da un minimo dell'1,35 % per il campione 2 mM fino ad arrivare al 9,26 % per quello 10 mM (Tabella 18).

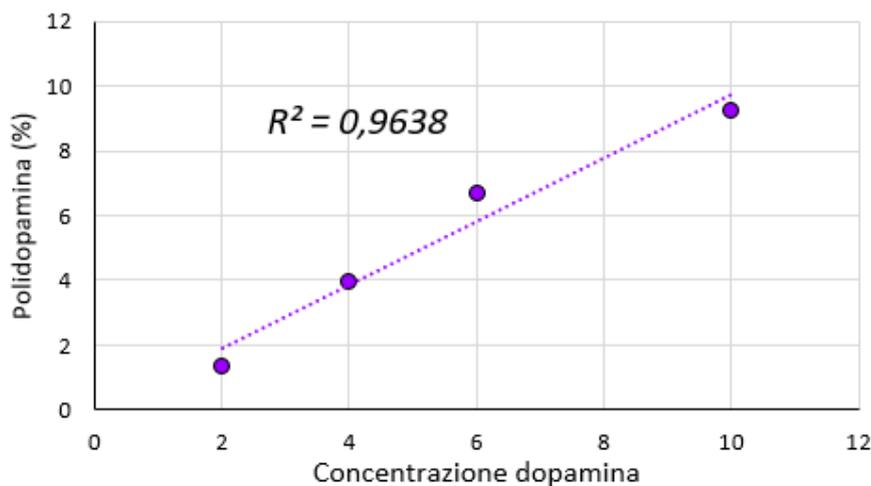


Figura 49: Residuo % di polidopamina a 800°C in funzione della concentrazione iniziale di dopamina.

Conc. dopamina (mM)	PDA (%)
2	1,353
4	3,954
6	6,671
10	9,257

Tabella 16: percentuale in peso di polidopamina nei campioni PDA4 al variare del tempo di polimerizzazione.

L'analisi termogravimetrica ha quindi messo in evidenza una correlazione lineare tra il residuo calcolato a 800°C con la quantità di dopamina presente che è in buon accordo sperimentale con i dati ottenuti mediante spettrofotometria UV-Vis con sfera integratrice. In futuro, la quantità di dopamina potrà quindi essere dosata con la più semplice analisi UV-Vis senza dover ricorrere alla più laboriosa (preparazione di campioni liofilizzati ed essiccati) analisi TGA, che tra l'altro è distruttiva.

## 4. CONCLUSIONI

Tramite la tecnica di polimerizzazione RAFT sono stati preparati i copolimeri a blocchi PGMA-b-PBMA e PGMA-b-PMMA, con bassi valori di polidispersità ed un peso molecolare controllato. Per impartire le adeguate proprietà anfifiliche, questi sono stati sottoposti ad un trattamento di post-polimerizzazione con morfolina così da ottenere la parte idrofilica PHMPMA. I copolimeri anfifilici ottenuti danno luogo a formazione di micelle polimeriche caratterizzate da un diametro di 30-40 nm, dimensioni ideali per un utilizzo nel campo del drug delivery. Utilizzando un marcatore fluorescente come il Nile Red alcuni campioni micellari sono stati marcati e studiati affinché possano essere rintracciabili all'interno del corpo umano. Inoltre, grazie all'impiego della dopamina, un neurotrasmettitore presente nel sistema nervoso dei mammiferi, è stato possibile stabilizzare ulteriormente le micelle attraverso una polimerizzazione sul guscio esterno che ha portato ad un coating formato da polidopamina (PDA), una sostanza biodegradabile e biocompatibile e per questo non rigettata dal sistema immunitario dell'organismo. La reazione di reticolazione è stata studiata attentamente allo scopo di correlare il tempo di reazione (e la concentrazione di dopamina iniziale) con il grado di polimerizzazione. Utilizzando l'analisi UV-Vis dotata di sfera integratrice è stato possibile correlare il valore di assorbanza registrato con il grado di polimerizzazione della polidopamina anche se non si analizza una soluzione omogenea bensì una sospensione acquosa. I risultati ottenuti rivelano che esiste una correlazione di tipo lineare (con valori di  $R^2$  vicinissimi ad 1) tra l'assorbanza registrata e la quantità di PDA presente nelle micelle sia tenendo fissa la concentrazione di monomero e variando il tempo di polimerizzazione sia variando la concentrazione di monomero tenendo costante il tempo di reazione. La funzionalizzazione esterna con polidopamina provoca un irrigidimento della struttura micellare con conseguente aumento della temperatura di transizione vetrosa del blocco esterno di PHMPMA particolarmente evidente per PHMPMA-b-PBMA ( $T_g$  incrementa da  $56^\circ\text{C}$  a circa  $70^\circ\text{C}$ ). Infine, mediante TGA in atmosfera inerte è stata studiata la degradazione termica delle micelle ottenute e in particolar modo è stato possibile risalire alla percentuale di polidopamina residua. I dati sperimentali mostrano anche in questo caso una dipendenza lineare del contenuto di residuo in peso ad alta temperatura con la quantità di PDA presente nelle micelle al variare delle condizioni di sintesi.

È stato quindi dimostrato che in futuro si potrà risalire al grado di polimerizzazione della polidopamina (contenuto % in peso rispetto alle micelle non reticolate) basandosi sull'assorbimento alla sfera integratrice delle micelle tal quali in acqua senza il bisogno di

ricorrere all'analisi termogravimetrica che risulta più laboriosa (liofilizzazione ed essiccazione dei campioni) e soprattutto distruttiva.

## 5. PARTE SPERIMENTALE

### 5.1 Solventi e reagenti

Il toluene è stato distillato prima del suo utilizzo. Il cloruro di metilene ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) è stato anche esso distillato per allontanare impurezze indesiderate. Tutti gli altri solventi sono stati utilizzati senza trattamenti preliminari.

L'agente RAFT è stato purificato tramite colonna cromatografica ed il metil metacrilato è stato filtrato su allumina, mentre tutti gli altri reagenti utilizzati non hanno subito trattamenti di purificazione prima di essere utilizzati nelle reazioni di sintesi.

### 5.2 Misure di caratterizzazione

Per le analisi NMR è stato utilizzato uno spettrometro Varian Mercury 400 con campo magnetico di frequenza 400 Mhz. Come riferimento interno è stato utilizzato il tetrametilsilano (TMS) e come parametri di acquisizione sono stati utilizzati: numero di acquisizioni 32, pulse width  $30^\circ$  e delay 10s.

Le analisi GPC (Gel Permeation Chromatography) sono state effettuate in THF utilizzando una pompa HPLC Merck Hitachi L7100 equipaggiato con una colonna Polymer Laboratories 300x7,5 mm,  $0,3 \mu\text{m}$ , 200-400000 Da e con un rivelatore ad indice di rifrazione Shodex RI-71.

Le analisi di Dynamic Light Scattering (DLS) sono state effettuate utilizzando un Brookhaven NanoBrook Omni a temperatura costante di  $25^\circ\text{C}$ , utilizzando cuvette in materiale polimerico per le analisi condotte in acqua e cuvette in quarzo per le analisi condotte in presenza di solventi organici.

Le analisi di fotoluminescenza sono state effettuate tramite un Perkin Elmer LB 50 B utilizzando le aperture delle finestre a 15 nm sia per la radiazione elettromagnetica proveniente dalla sorgente che per quella di emissione del campione.

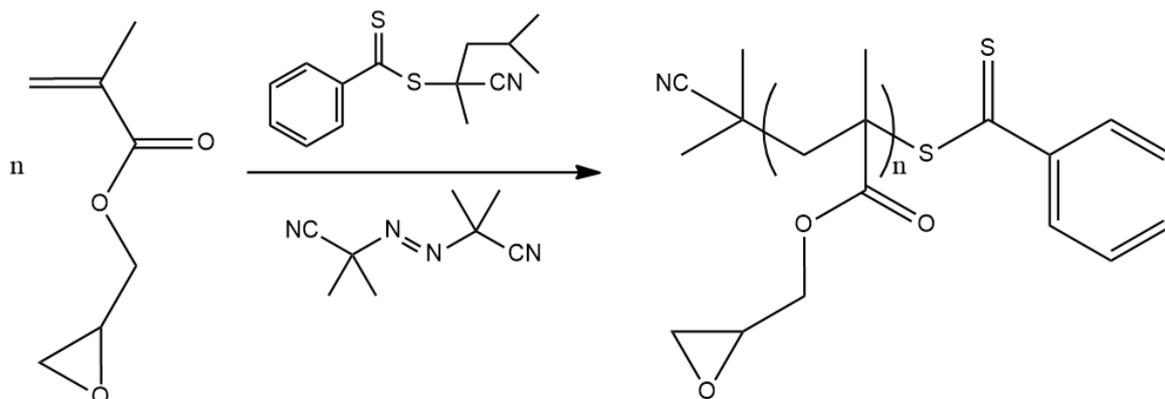
Gli spettri di assorbimento sono stati registrati con un Perkin Elmer LAMBDA 950 con accessorio Sfera 100 MM Pbs. Le analisi sono state eseguite con una scansione di lunghezza d'onda da 850 nm fino a 250 nm utilizzando delle cuvette in quarzo.

Le analisi calorimetriche (DSC) sono state condotte con un calorimetro differenziale a scansione modulato TA Instruments Q2000 collegato a un sistema di raffreddamento RCS. Tutte le misure sono state effettuate utilizzando crogioli di alluminio con chiusura standard contenenti circa 4-6 mg di campione, il quale ha subito un trattamento in stufa per 3 ore prima di essere caratterizzato. Sono state eseguite analisi in condizioni dinamiche. Le analisi dinamiche consistono in un primo ciclo di riscaldamento eseguito a velocità di 20°C/min partendo da -70°C e arrivando a una temperatura massima di 120°C, un raffreddamento controllato a 20°C da 120 a 0°C e infine un riscaldamento con velocità di 20°C/min fino a 120°C.

Le analisi termogravimetriche (TGA) sono state eseguite con uno strumento della TA Instruments modello SDT-600. Le misure sono state effettuate tutte in crogioli di allumina con una quantità di campione di circa 4-6 mg. Prima dell'analisi i campioni vengono tenuti in essiccatore sotto vuoto per allontanare tutta l'acqua. La rampa di riscaldamento utilizzata è stata di 10 °C/min da temperatura ambiente fino a 800°C sotto flusso di azoto seguita da uno step isoterma di 15 minuti in aria.

### 5.3 Sintesi del poli(glicidil metacrilato)

Il poli(glicidil metacrilato) (PGMA) viene sintetizzato tramite tecnica RAFT secondo il seguente schema:

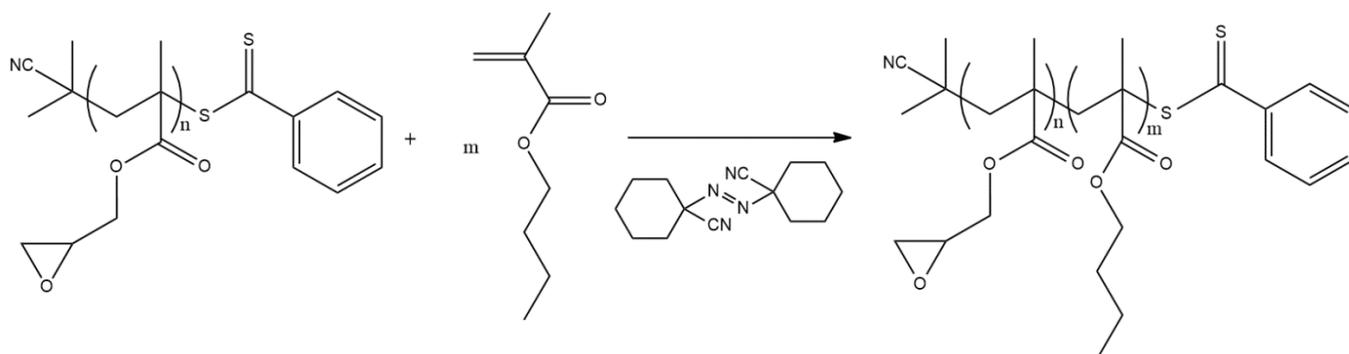


Il rapporto molare fra i tre reagenti (monomero/RAFT/AIBN) è: 675/1/0,05.

In un matraccio da 10 ml si introducono 7,5 ml di glicidil metacrilato, 23 mg di agente RAFT e 0,7 mg di AIBN e si porta a volume con toluene; la soluzione viene posta all'interno dell'ampolla di reazione e si attuano 4 cicli sottovuoto di congelamento con azoto liquido e scongelamento con acqua calda allo scopo di allontanare l'ossigeno dall'ambiente di reazione. La polimerizzazione viene condotta in un bagno d'acqua termostata a 70° C per 4 ore. Trascorso questo tempo, la soluzione viene concentrata al rotavapor e al distillatore Kugelrohr per portare via la maggiore quantità possibile di solvente e di monomero non reagito. Il campione viene sciolto in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e precipitato in 400 ml di etere etilico. Il prodotto finale è recuperato tramite filtrazione ed essiccamento sottovuoto. Il campione è stato analizzato mediante GPC, per risalire al PM e alla polidispersità e <sup>1</sup>H NMR. Il valore di conversione è stato ottenuto prelevando un'aliquota dalla miscela di reazione ed analizzandola all'NMR.

## 5.4 Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PBMA

La reazione di copolimerizzazione viene effettuata utilizzando il butil (metacrilato) come monomero ed il poli(glicidil metacrilato), precedentemente sintetizzato, come agente RAFT (macroRAFT). Lo schema di reazione è il seguente:

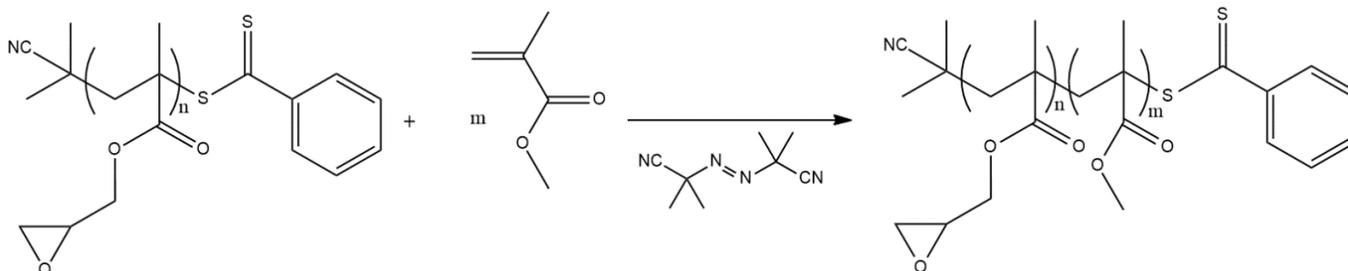


Il rapporto molare fra i tre reagenti (monomero/macroRAFT/Vazo88) è: 1200/1/0,05

In un matraccio da 15 ml si sciolgono 756 mg di PGMA macroRAFT con 5 ml di DMF; dopo aver inserito 6,71 mg (7,5ml) di butil metacrilato e 0,48 mg di iniziatore si porta a volume con DMF. La soluzione viene posta all'interno dell'ampolla per la reazione e dopo aver effettuato 4 cicli sottovuoto di congelamento con azoto liquido e scongelamento con acqua calda, allo scopo di allontanare l'ossigeno dall'ambiente di reazione, la reazione viene condotta in un bagno d'acqua termostata a 75°C per 2 ore. La soluzione viene dunque concentrata al rotavapor per allontanare il solvente ed il monomero non reagito, dopodiché si scioglie il prodotto in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e si precipita in 600 ml di MeOH. Tramite filtrazione sottovuoto si riesce a recuperare il polimero solido che viene caratterizzato tramite GPC, per risalire ai valori di PM e polidispersità, e <sup>1</sup>H NMR. La conversione è stata ottenuta prelevando una piccola aliquota dalla miscela ed analizzandola all'NMR.

## 5.5 Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA

La reazione di copolimerizzazione viene effettuata utilizzando il metil (metacrilato) come monomero ed il poli(glicidil metacrilato), precedentemente sintetizzato, come agente RAFT (macroRAFT). Lo schema di reazione è il seguente:



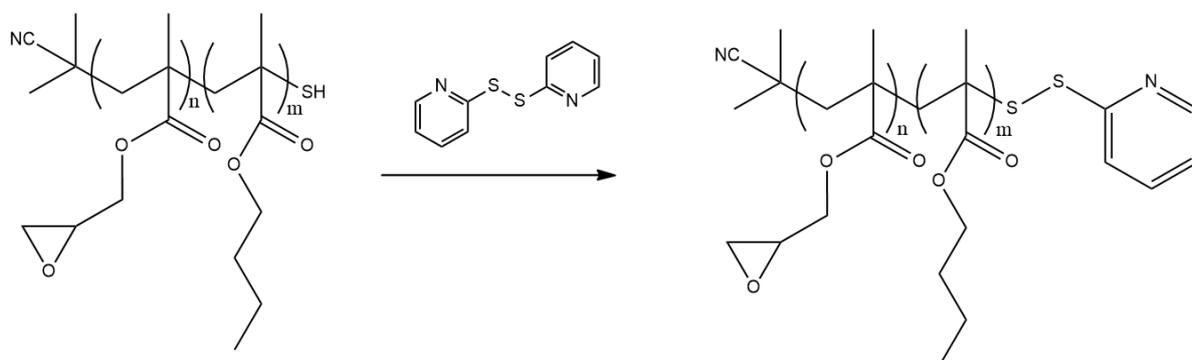
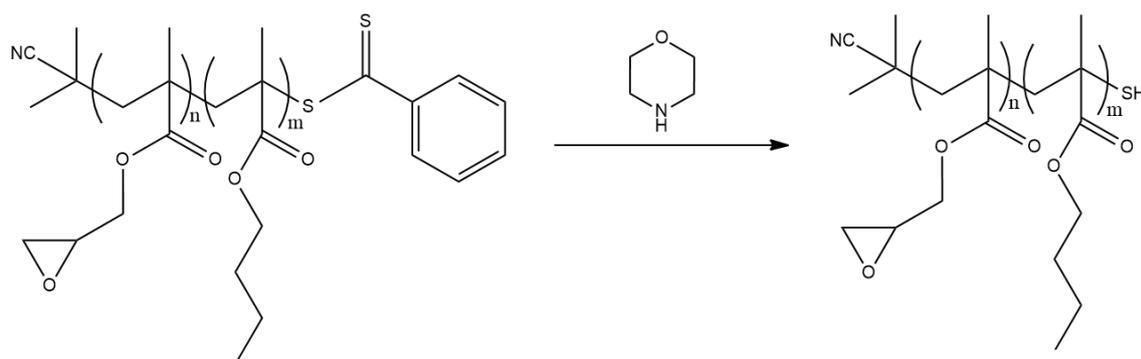
Il rapporto molare fra i tre reagenti (monomero/macroRAFT/AIBN) è: 1200/1/0,05

In un cilindro da 5 ml si introducono 377 mg di PGMA macroRAFT con pochissimo solvente ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) e 2,43 ml di metil metacrilato; dopo completa solubilizzazione si aggiungono 0,160 mg di iniziatore e si porta ad un volume di 3,5 ml con  $\text{CH}_3\text{CN}$ . La soluzione viene posta all'interno dell'ampolla per la reazione e dopo aver effettuato 4 cicli sottovuoto di congelamento con azoto liquido e scongelamento con acqua calda, allo scopo di allontanare l'ossigeno dall'ambiente di reazione, la reazione viene condotta in un bagno d'acqua termostata a  $70^\circ\text{C}$  per 6 ore. La soluzione viene dunque concentrata al rotavapor per allontanare il solvente ed il monomero non reagito, dopodiché si scioglie il prodotto in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e si precipita in 400 ml di  $\text{Et}_2\text{O}$ . Tramite filtrazione sottovuoto si riesce a recuperare il polimero solido che viene caratterizzato tramite GPC, per risalire ai valori di PM e polidispersità, e  $^1\text{H}$  NMR. La conversione è stata ottenuta prelevando una piccola aliquota dalla miscela ed analizzandola all' $^1\text{H}$  NMR.

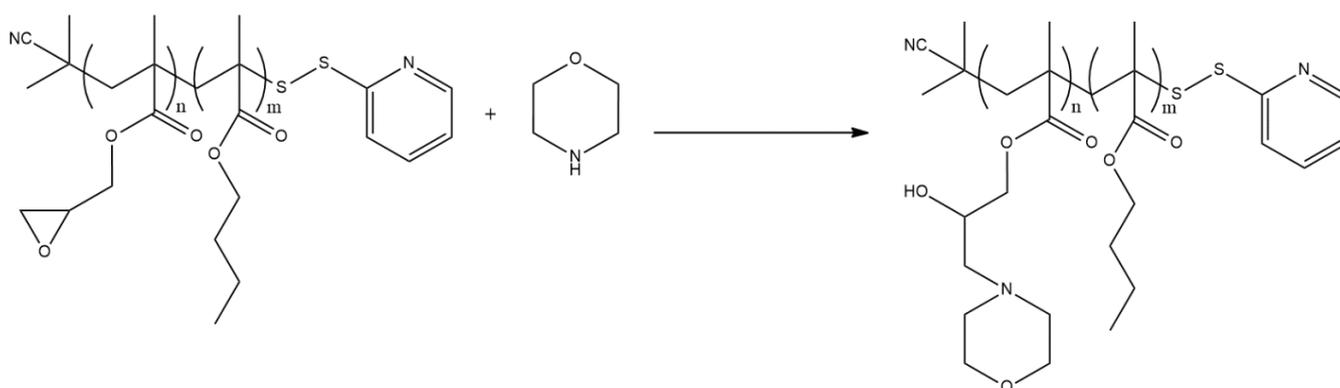
## 5.6 Reazione di funzionalizzazione con la morfolina e ottenimento di PHMPMA-b-PBMA

La reazione di post-funzionalizzazione della parte glicidilica del copolimero PGMA-PBMA viene condotta in due stadi successivi:

### Stadio 1



### Stadio 2



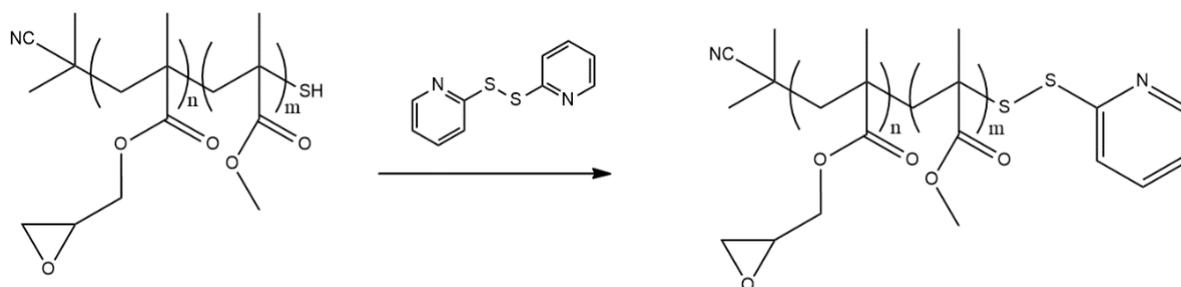
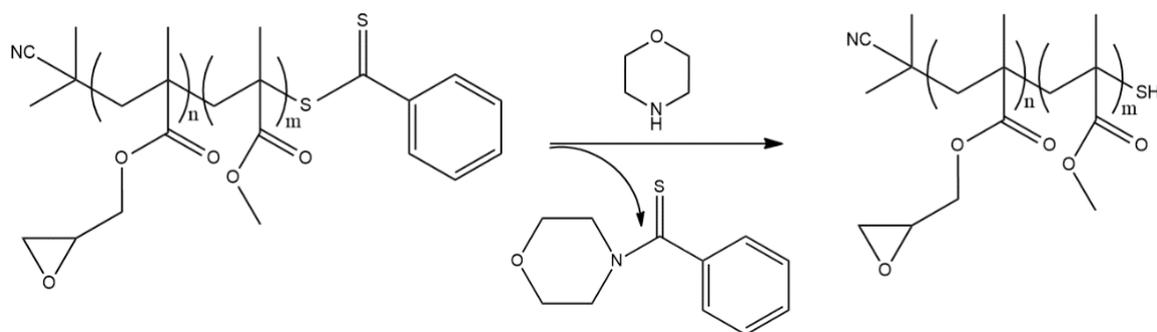
La reazione prevede l'aggiunta di forti eccessi di reagenti: 3 equivalenti di 2,2'-dipiridil disolfuro rispetto alle moli di polimero e 10 equivalenti di morfolina rispetto alle unità glicidiliche.

In un pallone da 25 ml vengono messi 100 mg di copolimero a blocchi PGMA-b-PBMA e 2,75 mg di disolfuro ed il tutto viene sciolto con 2,5 ml di N-metilpirrolidone. Dopo completa solubilizzazione grazie all'agitazione si aggiungono 0,513 ml (511 mg) di morfolina e si lascia reagire a temperatura ambiente per 30 minuti in modo tale da proteggere il gruppo terminale; successivamente il pallone viene immerso in un bagno d'olio a 80°C e la reazione viene condotta per 2 ore. La soluzione viene distillata con un Kugelrohr per eliminare il solvente osservando la formazione di un sottile film polimerico. Si procede con la purificazione tramite la coppia solvente/non solvente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/esano per precipitare il polimero e separarlo da altri residui. La soluzione viene filtrata tramite pompa a vuoto ed il prodotto di reazione viene posto in un essiccatore sotto vuoto per allontanare le tracce di solvente ancora presenti. Il campione viene analizzato tramite GPC, in modo tale da ottenere i valori di peso molecolare e polidispersità, e spettroscopia <sup>1</sup>H NMR.

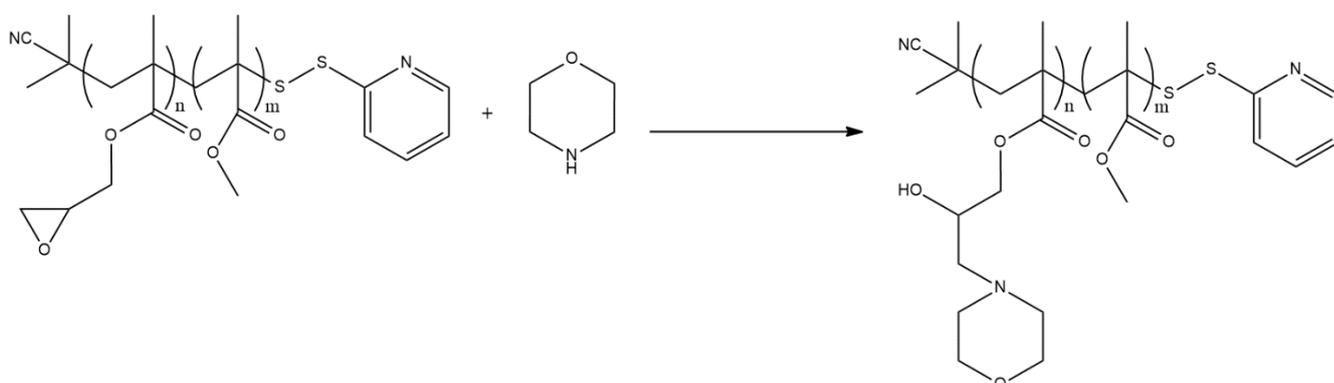
## 5.7 Reazione di funzionalizzazione con la morfolina e ottenimento di PHMPMA-b-PMMA

La reazione di post-funzionalizzazione della parte glicidilica del copolimero PGMA-PMMA viene condotta in due stadi successivi:

### Stadio 1



### Stadio 2



La reazione prevede l'aggiunta di forti eccessi di reagenti: 3 equivalenti di 2,2'-dipiridil disolfuro rispetto alle moli di polimero e 10 equivalenti di morfolina rispetto alle unità glicidiliche. Inoltre per arrivare a completezza nei tempi desiderati, la quantità di morfolina nell'ambiente di reazione deve essere tale da raggiungere una concentrazione  $\approx 2$  M.

In un pallone da 25 ml vengono messi 100 mg di copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA e 1,60 mg di disolfuro ed il tutto viene sciolto con 2,5 ml di N-metilpirrolidone. Dopo completa solubilizzazione grazie all'agitazione si aggiungono 0,53 ml di morfolina e si lascia reagire a temperatura ambiente per 30 minuti in modo tale da proteggere il gruppo terminale; successivamente il pallone viene immerso in un bagno d'olio a 80°C e la reazione viene condotta per 2 ore. La soluzione viene distillata con un Kugelrohr per eliminare il solvente osservando la formazione di un sottile film polimerico. Si procede con la purificazione tramite la coppia solvente/non solvente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/etere etilico per precipitare il polimero e separarlo da altri residui. La soluzione viene filtrata tramite pompa a vuoto ed il prodotto di reazione viene posto in un essiccatore sotto vuoto per allontanare le tracce di solvente ancora presenti. Il campione viene analizzato tramite GPC, in modo tale da ottenere i valori di peso molecolare e polidispersità, e spettroscopia <sup>1</sup>H NMR.

## 5.8 Formazione delle micelle polimeriche

In una provetta si solubilizzano 6 mg di copolimero a blocchi PHMPMA-b-PBMA in 1 ml di THF. Con l'aiuto di un agitatore vortex la soluzione viene agitata e, goccia a goccia, si aggiungono 5 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata, in modo da avere un volume finale di 6 ml. Le micelle vengono purificate tramite un processo di dialisi per allontanare il solvente organico utilizzando una membrana semipermeabile (cutoff 12000-14000); il bagno d'acqua viene cambiato per tre volte ad intervalli regolari e le micelle vengono filtrate con filtro 0,45 µm. Infine si caratterizza il campione tramite tecnica DLS.

La procedura utilizzata per micellare il copolimero a blocchi PHMPMA-b-PMMA è identica a quella precedentemente descritta.

## 5.9 Stabilizzazione delle micelle con polidopamina

### 5.9.1 Concentrazione di dopamina 0,01 M

La procedura per la formazione delle micelle è riportata nel paragrafo 5.8; In questo caso sono stati preparati 4 batch di micelle, ognuno a partire da 12 mg di copolimero PHMPMA-b-PBMA, 1 ml di THF e 10 ml di acqua. Una volta che le micelle sono state purificate e filtrate, vengono riunite fino ad un volume di 60 ml e divise in quattro aliquote da 15 ml. Ad ogni campione viene aggiunto 1ml di una soluzione madre di dopamina 0,16 M in modo tale che la concentrazione finale di monomero sia 0,01 M e si lascia reagire al buio per 8, 16, 24 e 48 ore. Ogni campione viene filtrato nuovamente e caratterizzato tramite tecnica DLS e UV-Vis con sfera integratrice.

### 5.9.2 Concentrazione di dopamina 0,006 M

La procedura per la formazione delle micelle è riportata nel paragrafo 5.8; in questo caso sono stati preparati 3 batch di micelle, ognuno a partire da 6 mg di copolimero PHMPMA-b-PBMA, 0,5 ml di THF e 5 ml di acqua. Una volta che le micelle sono state purificate e filtrate, vengono riunite fino ad un volume di 21 ml e divise in tre aliquote da 7 ml. Ad ogni campione viene aggiunto 1ml di una soluzione madre di dopamina 0,048 M in modo tale che la concentrazione finale di monomero sia 0,006 M e si lascia reagire al buio per 16, 24 e 40 ore. Ogni campione viene filtrato nuovamente e caratterizzato tramite tecnica DLS e UV-vis con sfera integratrice.

### 5.9.3 Concentrazione di dopamina variabile

La procedura per la formazione delle micelle è riportata nel paragrafo 5.8; in questo caso sono stati preparati 3 batch di micelle, ognuno a partire da 12 mg di copolimero PHMPMA-b-PBMA, 1 ml di THF e 10 ml di acqua. Una volta che le micelle sono state purificate e filtrate, vengono riunite fino ad un volume di 42 ml e divise in quattro aliquote da 10,5 ml. Ad ogni campione viene aggiunta la quantità di una soluzione madre di dopamina 0,115 M necessaria per raggiungere le concentrazioni desiderate, vale a dire 0,01 M, 0,006 M, 0,004 M e 0,002 M, secondo la seguente procedura:

- ✓ viene fatta la prima aggiunta di dopamina per il campione 0,01 M raggiungendo un certo volume finale, questo dovrà essere il volume uguale per tutti i campioni di micelle;
- ✓ sulla base del  $V_{\text{finale}}$  si calcolano le altre aggiunte di dopamina (che saranno inferiori) e si porta a volume con acqua.

Si lascia reagire al buio per 16 ore. Ogni campione viene filtrato nuovamente e caratterizzato tramite tecnica DLS e UV-Vis con sfera integratrice.

Lo stesso procedimento è stato adottato per preparare un set di campioni anche con il copolimero PHMPMA-b-PMMA a partire da 4 batch, ognuno formato da 12 mg di copolimero, 1 ml di THF e 10 ml di H<sub>2</sub>O. Il volume finale totale è di 56 ml ed ogni campione ha un volume di 14 ml; le aggiunte di dopamina vengono effettuate a partire a una soluzione madre 0,15 M.

### 5.10 Stabilizzazione con polidopamina di micelle contenenti il Nile-red

In una provetta si introducono 12 mg di copolimero a blocchi PHMPMA-b-PBMA e 0,4 mg di Nile Red e si solubilizza con 1 ml di THF. La procedura per la formazione delle micelle è riportata nel paragrafo 2.4; in questo caso sono stati preparati 2 batch di micelle. Una volta che le micelle sono state purificate e filtrate, vengono riunite fino ad un volume di 28 ml e divise in quattro aliquote da 7 ml. Prima dell'aggiunta della dopamina il campione viene analizzato allo spettrofluorimetro e alla sfera integratrice.

Ad ogni campione viene aggiunta la quantità di una soluzione madre di dopamina 0,08 M necessaria per raggiungere le concentrazioni desiderate, vale a dire 0,01 M, 0,006 M, 0,004 M e 0,002 M. Il ragionamento seguito è identico a quello espresso nel paragrafo 2.5.3. Si lascia reagire al buio per 16 ore. Ogni campione viene filtrato nuovamente e caratterizzato tramite tecnica DLS, spettrofluorimetro e UV-Vis con sfera integratrice.

Lo stesso procedimento è stato utilizzato per preparare un set di due campioni con il copolimero PHMPMA-b-PMMA con concentrazioni 0,01 M e 0,002 M a partire da un unico batch formato da 6 mg di copolimero, 0,5 ml di THF e 5 ml di H<sub>2</sub>O. Il volume finale totale è di 7 ml ed ogni campione ha un volume di 3,5 ml; le aggiunte di dopamina vengono effettuate a partire a una soluzione madre 0,15 M.

### 5.11 Polimerizzazione della dopamina a polidopamina

In un pallone da 250 ml si introducono 50 mg di dopamina e si sciolgono in 150 ml di acqua; dopo completa solubilizzazione vengono aggiunti 0,135 ml di una soluzione di NaOH 1M per avere un rapporto molare dopamina/NaOH = 1/0,5 e la reazione viene condotta a temperatura ambiente per 2 ore e 30 minuti. Si neutralizza la base con HCl e si concentra il tutto al rotavapor; il prodotto viene purificato tramite dialisi e liofilizzato per allontanare l'acqua.

## 5.12 Tecniche di analisi

### 5.12.1 Dynamic Light Scattering (DLS)

Questa tecnica, conosciuta anche come Photon Correlation Spectroscopy [33], è uno dei metodi più utilizzati per determinare la grandezza di particelle in soluzione o sospensione, dal momento che richiede brevi tempi di analisi e costi di sviluppo modesti. Quando una sorgente di un raggio laser investe un campione in cui sono presenti delle particelle soggette al moto Browniano (casuale) queste causano delle fluttuazioni dell'intensità della luce diffusa (scatterata); solitamente la lampada più comune è quella He-Ne operativa ad una lunghezza d'onda di 632,8 nm [34]. Le fluttuazioni, correlate con il tempo [35], dipendono dalla grandezza delle particelle: particelle più piccole si muovono più velocemente e causano variazioni più frequenti dell'intensità e viceversa. Tramite l'analisi dello scattering, assumendo che le particelle siano di forma sferica, lo strumento riesce a determinare il coefficiente di diffusione  $D$  applicando l'equazione di Stoke-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta a}$$

Dove:

- $D$  è il coefficiente di diffusione;
- $k_B$  è la costante di Boltzmann;
- $T$  è la temperatura in gradi Kelvin;
- $\eta$  è la viscosità del solvente;
- $a$  è il diametro idrodinamico.

Avendo a disposizione tutti gli altri dati, è possibile risalire al diametro idrodinamico  $a$ . Quest'ultimo è dato dal diametro della particella unito a quello di eventuali molecole di solvente che possono circondarla e solvatarla, per cui generalmente questo valore viene considerato una sovrastima rispetto al valore reale. Ciononostante la DLS continua ad essere una tecnica molto utilizzata in ambito scientifico perché fornisce una misura indicativa sulle dimensioni delle particelle ottenute.

### 5.12.2 Cromatografia a permeazione di gel (GPC)

La cromatografia a permeazione di gel [36] è la tecnica più recente per il frazionamento dei polimeri ed una delle più usate grazie ad una buona risoluzione in breve periodo ed alla possibilità di automazione. In genere uno strumento utilizzato per questo tipo di analisi è costituito da:

- una pompa, che ha il compito di spingere l'eluente all'interno della colonna;
- una colonna all'interno della quale è presente una fase stazionaria; in questo caso si tratta di una resina stirene-divinilbenzene;
- un rivelatore, per registrare la quantità di solvente eluito.

In linea di principio all'interno della colonna, impaccata con un polimero reticolato che contiene pori di vario diametro, viene fatto passare il campione da analizzare sciolto nello stesso solvente che funge da eluente. Durante il processo di separazione le molecole più piccole riescono a penetrare all'interno dei pori e dunque vengono ritenute più a lungo in colonna, mentre particelle con peso molecolare maggiore riescono a passare più velocemente e quindi vengono eluite più rapidamente. La tecnica, che prende anche il nome di *cromatografia ad esclusione sterica*, si basa sulla diversa quantità di volume necessaria affinché le varie frazioni di polimero vengano separate.

Il volume totale di una colonna può essere espresso come la somma di tre termini:

$$V_t = V_0 + V_i + V_s$$

Dove:

- $V_0$  è il volume di solvente interstiziale;
- $V_i$  è il volume di solvente nei pori del gel o del solido;
- $V_s$  è il volume occupato dalla matrice solida o dal gel.

Invece il volume di eluizione di ogni specie è indicato dalla seguente formula:

$$V_e = V_0 + K_d V_i$$

Se le molecole sono abbastanza grandi tali da essere escluse da tutti i pori allora  $K_d = 0$ , mentre per molecole più piccole che vengono trattenute dai pori  $K_d$  può assumere diversi valori fino ad un massimo di 1. Al termine dell'analisi il computer elabora i volumi di eluizione

per produrre un cromatogramma, ovvero un grafico che riporta la quantità di sostanza rilevata in funzione del tempo; il software sarà in grado, dopo una taratura con composti a peso molecolare noto, di ricavare il peso molecolare dei campioni polimerici analizzati.

### 5.12.3 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale [37] è la tecnica di analisi termica più popolare, considerando la cospicua quantità di campione necessaria per l'analisi (pochi mg) e la possibilità di automatizzare al 100% il suo andamento. Essa è una tecnica a compensazione di energia, in cui viene monitorata costantemente la differenza del flusso di calore tra il campione ed un riferimento, entrambi sottoposti ad un programma di temperatura controllato. Poiché non è possibile misurare direttamente il flusso di calore l'analisi viene svolta in maniera indiretta misurando la differenza di temperatura fra campione e riferimento; questi ultimi vengono posti all'interno di portacampioni in pan (alluminio ultra-puro) o di costantana (lega rame-nichel) e vengono scaldati in maniera separata da due resistenze elettriche mentre si misura la temperatura con delle termocoppie. Durante l'analisi lo strumento provvede a mantenere nulla la differenza di temperature fra i due portacampioni. Al termine dell'analisi si ottiene un grafico che mette in relazione la variazione di entalpia nel tempo ( $dH/dt$ ) in funzione della temperatura, risalendo così alle transizioni che si sono verificate nel campione ad una certa temperatura.

### 5.12.4 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica o termogravimetria [37] (TG) è una tecnica che misura la perdita di massa di un campione in funzione del tempo o della temperatura mentre il campione è soggetto ad un programma controllato di temperatura in atmosfera monitorata. Lo strumento consiste di un pan supportato da una termobilancia, il tutto all'interno di una fornace che riscalda/raffredda durante l'esperimento; l'ambiente viene controllato da un sistema di spurgo che, a seconda del settaggio, può mandare sul campione un gas inerte o reattivo (come ossigeno o aria) [38]. Al termine dell'analisi viene registrato un termogramma in cui viene riportata la perdita di peso percentuale in funzione del tempo o della temperatura. Questo tipo di analisi è utile per indagare la degradazione di materiali come i polimeri, ma non fornisce informazioni sulla loro natura e composizione; per questo motivo risulta spesso utile accoppiare la TGA ad altri metodi di analisi, come la spettroscopia di massa (MS) o la spettroscopia infrarossa (IR).

### 5.12.5 Sfera integratrice

La sfera integratrice è un accessorio dello spettrofotometro in grado di misurare la radiazione ottica [39]; la sua funzione è quella di integrare spazialmente il flusso radiante proveniente dai vari campioni che diffondono o riflettono la luce. In genere una sfera integratrice è composta da:

- una sfera cava rivestita internamente da un materiale altamente riflettente, come lo Spectralon;
- un sistema a doppio raggio, uno per il riferimento ed uno per il campione;
- dei baffles, ovvero dei deflettori rivestiti dello stesso materiale della sfera che garantiscono che tutta la luce vada incontro a riflessione, migliorando l'integrazione del segnale.

La sfera raccoglie la radiazione elettromagnetica da una fonte (il campione) completamente esterna al dispositivo ottico. La radiazione introdotta nella sfera di integrazione colpisce le pareti riflettenti e subisce riflessioni diffuse multiple. Dopo numerose riflessioni, essa viene dispersa in modo altamente uniforme sulle pareti della sfera; il livello di radiazione integrato risultante è direttamente proporzionale al livello di radiazione iniziale e può essere misurato facilmente utilizzando un rilevatore [40].

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Moad G, *Polym. Chem.*, 2017, 8, 177.
- [2] Moad G., Rizzardo E., Thang SH., *Acc Chem Res.* 2008 Sep;41(9):1133-42.
- [3] Jennings J., He G., Howdle S. M. and Zetterlund P. B., *Chem. Soc. Rev.*, 2016, 45, 5055.
- [4] Atilla Tasdelen M., U. Kahveci M., Yagci Y., *Progress in Polymer Science* 2011, 36, 455–567.
- [5] Xue Z., He D. and Xie X., *Polym. Chem.*, 2015, 6, 1660.
- [6] Sciannamea V., Jérôme R., and Detrembleur C., *Chem. Rev.* 2008, 108, 1104-1126.
- [7] Moad G., Rizzardo E., Thang SH., *Aust. J. Chem.* 2005, 58, 379-410.
- [8] Benaglia M., Alberti A., Giorgini L., Magnonia F., and Tozzia S., *Polym. Chem.*, 2013, 4, 124.
- [9] Cañamero P. F., de la Fuente J. L., López Madruga E., Fernández-García M., *Macromol. Chem. Phys.* 2004, 205, 2221–2228.
- [10] Nan A., Radu T. and Turcu R., *RSC Adv.*, 2016, 6, 43330.
- [11] Muzammil E. M., Khan A. and Stuparu M.C., *RSC Adv.*, 2017, 7, 55874.
- [12] Di Maria F., Blasi L., Quarta A., Bergamini G., Barbarella G., Giorgini L. and Benaglia M., *J. Mater. Chem. B*, 2015, 3, 8963.
- [13] Kulthe S.S., Choudhari Y.M., Inamdar N.N. & Mourya V. Polymeric micelles: authoritative aspects for drug delivery, *Designed Monomers and Polymers*, 2012, 15:5, 465-521.
- [14] Zachary L. Tyrrell, Youqing Shen, Maciej Radosz, *Progress in Polymer Science* 2010, 35, 1128-1143.
- [15] Dai Y., Zhang X. and Zhuo R., *RSC Adv.*, 2016, 6, 22964.
- [16] Benaglia M., Alberti A., Spisni E., Papi A., Treossi E. and Palermo V., *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 2555.

- [17] Wahab Amjada M., Kesharwanib P., Amin M.C.I.M., Iyer A.K., Progress in Polymer Science 2017, 64, 154–181.
- [18] Lynge M. E., van der Westen R., Postma A. and Städler B., Nanoscale, 2011, 3, 4916.
- [19] Missale C., S. Russel Nash, W. Robinson S., Jaber M., and Marc G. Caron, Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* 1998, 78: 189–225.
- [20] Liu Y., Ai K. and Lu L., Chem. Rev. 2014, 114, 5057–5115.
- [21] Liebscher J., Mrówczyński R., A. Scheidt H., Filip C., D. Hädade N., Turcu R., Bende A. and Beck S., Langmuir 2013, 29, 10539–10548.
- [22] Vasselbehagh M., Karkhanechi H., Mulyati S., Takagi R., Matsuyama H., Desalination 2014, 332, 126–133.
- [23] Dreyer D. R., Miller D. J., Freeman B. D., Paul D. R. and Bielawski C. W., Chem. Sci., 2013, 4, 3796.
- [24] Chen J. and Liu M., RSC Adv., 2014, 4, 9684.
- [25] Perrier S., Macromolecules 2017, 50, 7433-7447.
- [26] Greenspan P., Mayer E.P., and Fowler S.D., The Journal of Cell Biology - Volume 100 march 1985 965 973.
- [27] Cheng D., Wei P., Zhang L. and Ca J., RSC Adv., 2018, 8, 27045.
- [28] Li J., Chen H., Mu ., Sun J., Sun Y., Wang C., Ren Q., Ji J. Reactive & Functional Polymers 73 (2013) 1517–1522.
- [29] Sha Y., Li L., Wang X., Wan Y., Yu J., Xue G. and Zhou D., Macromolecules 2014, 47, 8722–8728.
- [30] Kumar M., Suk Chung J. and Hyun Hur S., Kumar et al. Nanoscale Research Letters 2014, 9:345.
- [31] Lee W., Uk Lee J., Yi J-W, Lee S-B, Byun J-H, Kim B-S, eccm15 - 15th European conference on composite materials, Venice, Italy, 24-28 June 2012.
- [32] Lee I.S., Yoon S.H., Jin H.-J., Choi H.J., Diamond & Related Materials 15 (2006) 1094 – 1097.

- [33] Sartor M., DLS Lab View UCSD.
- [34] Chang, Dynamic Light Scattering M., BGGN 266, June 14, 2010.
- [35] Gollwitzer C., Bartczak D., Goenaga-Infante H., Kestens V., Krumrey M., Minelli C., Pálmai M., Ramaye Y., Roebben G., Sikora A. and Varga Z., Anal. Methods, 2016, 8, 5272–5282.
- [36] Johnson J. F. and Porter R. S., Gel Permeation Chromatography, Progress in Polymer Science Volume 2, 1970, Pages 201, 203-256.
- [37] Menczel J.D., Prime R.B., Thermal analysis of polymers: fundamentals and applications, Apr 2009, 696 pages.
- [38] Perkin Elmer, A Beginner's Guide to Thermogravimetric Analysis.  
[https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/4474556GDE\\_TGABeginnersGuide.pdf](https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/4474556GDE_TGABeginnersGuide.pdf)
- [39] Jeffrey L. Taylor, Ph.D., Integrating Sphere Functionality: The Scatter Transmission Measurement.  
[http://www.perkinelmer.com/cmsresources/images/44156124tch\\_011486\\_01\\_integratingsphererefunctionalitythescattertransmissionmeasurement.pdf](http://www.perkinelmer.com/cmsresources/images/44156124tch_011486_01_integratingsphererefunctionalitythescattertransmissionmeasurement.pdf)
- [40] Integrating Sphere Fundamentals and Applications, White Paper.  
[https://www.newport.com/medias/sys\\_master/images/images/h9d/h95/8941616922654/MI-051606-White-Paper-Single-1-.pdf](https://www.newport.com/medias/sys_master/images/images/h9d/h95/8941616922654/MI-051606-White-Paper-Single-1-.pdf)