

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 stabilizzate con  
polidopamina e loro interazione con acido  
folico

Tesi di laurea sperimentale

**CANDIDATO**

Enrico Dall'Olio

**RELATORE**

**Chiar.mo Prof.** Loris Giorgini

**CORRELATORE**

**Dott.** Massimo Benaglia

---

**Anno Accademico 2018-2019**

---

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
1.1 La polimerizzazione radicalica.....	1
1.2 La polimerizzazione RAFT .....	5
1.3 L'agente RAFT .....	8
1.4 Monomeri nella polimerizzazione RAFT .....	11
1.5 Sintesi di copolimeri a blocchi mediante tecnica RAFT .....	12
1.6 Reazioni di post-polimerizzazione .....	14
1.7 Micelle polimeriche.....	17
1.8 Stabilizzazione delle micelle polimeriche.....	19
1.9 Funzionalizzazione delle micelle polimeriche con acido folico .....	24
<b>2. SCOPO</b> .....	<b>25</b>
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>27</b>
3.1 Sintesi agente RAFT .....	27
3.2 Sintesi dei polimeri.....	29
3.2.1 Sintesi dell'omopolimero poli-(glicidil metacrilato) PGMA .....	29
3.2.2 Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA .....	32
3.3 Trattamenti di post-polimerizzazione.....	34
3.3.1 Reazione di funzionalizzazione con la morfolina del PGMA-b-PMMA e ottenimento di PHMPMA-b-PMMA.....	35
3.4 Formazione, caratterizzazione e stabilizzazione delle micelle polimeriche.....	39
3.4.1 Formazione delle micelle con PHMPMA-b-PMMA .....	39

3.4.2 Stabilizzazione delle micelle di PHMPMA-b-PMMA con polidopamina.....	41
3.5 Analisi termogravimetrica (TGA) .....	46
3.6 Funzionalizzazione delle micelle polimeriche con acido folico, risultati dell'interazione polimero-acido folico tramite esperimenti DOSY .....	49
3.6.1 PHMPMA - acido folico in D <sub>2</sub> O .....	51
3.6.2 PHMPMA reticolato con polidopamina (2mM) – acido folico in D <sub>2</sub> O .....	52
3.6.3 PHMPMA reticolato con polidopamina (10mM) – acido folico in D <sub>2</sub> O .....	53
3.6.4 Acido folico in DMSO .....	54
3.6.5 Conclusioni degli esperimenti DOSY .....	55
3.7 Funzionalizzazione delle micelle con cromoforo fluorescente Nile-Red .....	56
3.8 Funzionalizzazione delle micelle con acido folico .....	59
3.9 Trattamento cellulare con micelle e risultati .....	60
3.9.1 Conclusioni esperimenti biologici.....	63
<b>4. CONCLUSIONI.....</b>	<b>64</b>
<b>5. PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>66</b>
5.1 Solventi e reagenti .....	66
5.2 Strumentazione.....	66
5.2.1 Spettrometri NMR.....	66
5.2.2 Gel Permeation Chromatography (GPC) .....	66
5.2.3 Dynamic Light Scattering (DLS) .....	67
5.2.4 Zeta Potenzial.....	67
5.2.5 Spettrofotometria UV-Vis .....	68
5.2.6 Termogravimetria (TGA).....	68

5.3 Sintesi agente RAFT (2-ciano-4-metilpentan-2-il ditiobenzoato) .....	69
5.4 Sintesi del poli(glicidil metacrilato) .....	70
5.5 Sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA .....	71
5.6 Reazione di funzionalizzazione con la morfolina e ottenimento di PHMPMA-b-PMMA	72
5.7 Formazione delle micelle polimeriche .....	74
5.8 Stabilizzazione delle micelle con polidopamina, a concentrazione di dopamina variabile	75
5.9 Stabilizzazione con polidopamina di micelle contenenti il Nile-red.....	76
5.10 Funzionalizzazione delle micelle contenenti Nile-red con acido folico .....	77
5.11 Tecniche di analisi.....	78
5.11.1 Dynamic Light Scattering (DLS) .....	78
5.11.2 Zeta Potential.....	79
5.11.3 Cromatografia a permeazione di gel (GPC).....	80
5.11.4 Sfera integratrice .....	82
5.11.5 Analisi termogravimetrica (TGA).....	83
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>84</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 La polimerizzazione radicalica

Sono noti quattro tipi di polimerizzazione per ottenere poliolefine:

- Radicalica
- Anionica
- Cationica
- Organometallica (Ziegler-Natta)

Storicamente però la maggior parte dei polimeri di addizione è stata ottenuta e lo è tuttora per polimerizzazione radicalica. Quest'ultima è una reazione a catena iniziata da radicali liberi, a livello industriale il 50% dei polimeri è preparato con questa procedura (Es. LDPE, PS, PMMA, PVC, SBR).

Il processo consiste in vari stadi:

- Inizio
- Propagazione
- Terminazione
- Trasferimenti

L'inizio in genere è costituito da due stadi, formazione di radicali primari (Figura 1a) e reazione dei radicali primari con il monomero per dare il centro attivo della catena in crescita (Figura 1b).

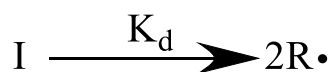


Figura 1a.



Figura 1b.

La fase di propagazione è molto veloce e lo stadio lento rimane la formazione dei radicali primari. Il radicale primario ( $P_1\cdot$ ) reagisce con più monomeri in successione, formando un radicale composto da un numero elevato di unità ripetitive, secondo una reazione del tipo della Figura 1c:

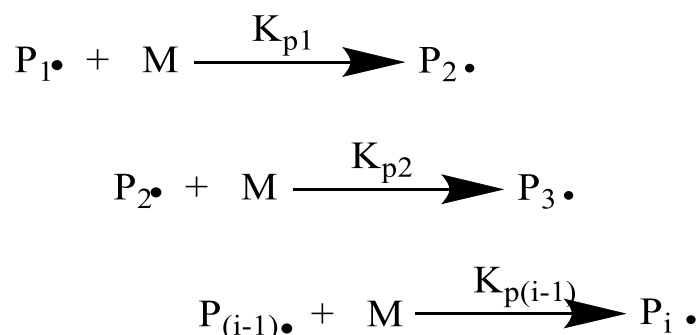


Figura 1c.

La fase di terminazione invece può avvenire in due modi, per accoppiamento (Figura 1d) in cui una catena polimerica reagisce con una seconda portando alla formazione di un polimero con un numero di unità ripetitive pari alla somma delle unità ripetitive che componevano le singole catene, oppure per disproporzionamento (Figura 1e) in cui nell'interazione di due catene una porterà alla formazione di un doppio legame terminale.

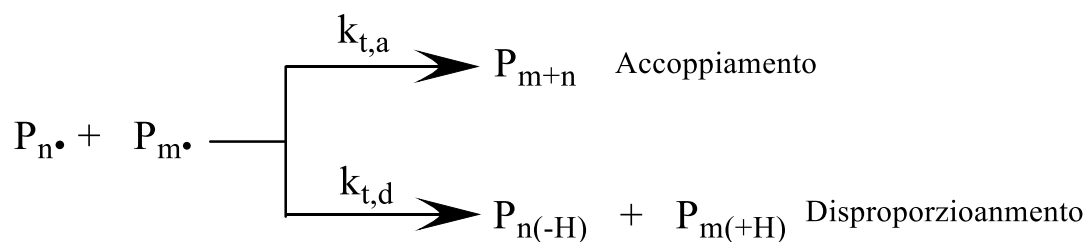
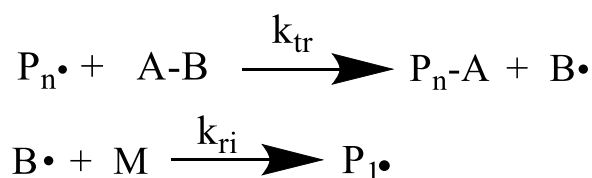


Figura 1d,e.

Infine, si può verificare anche la terminazione della catena (figura 1f) attraverso il trasferimento ad essa di un atomo di idrogeno o di altri atomi provenienti da qualche composto presente nel sistema come un monomero, un iniziatore, un solvente o una generica impurezza. Questi ultimi possono avvenire sia con meccanismo intermolecolare che intramolecolare, il trasferimento di catena però non sopprime l'attività radicalica.



A-B= monomero, solvente, polimero, "regolatore"

Figura 1f.

La polimerizzazione radicalica possiede numerosi vantaggi che la pongono fra le prime vie di sintesi [1]:

- 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;
- compatibilità con diverse condizioni di reazione (bulk, soluzione, sospensione, emulsione) e facilità di realizzazione;
- semplicità e basso costo di realizzazione.

Nonostante ciò la polimerizzazione radicalica presenta diversi limiti [2] riconducibili essenzialmente al controllo del peso molecolare, della polidispersità, della composizione dei copolimeri e della struttura della macromolecola finale. Uno dei modi per poter controllare questi parametri consiste nel conferire al processo le caratteristiche di una polimerizzazione radicalica controllata, definita anche “vivente”, in cui tutte le catene crescono ad una velocità simile e al termine della polimerizzazione non c'è trasferimento irreversibile né terminazione incontrollata, ciò consente di estendere la lunghezza della catena con l'aggiunta di ulteriore monomero. Queste caratteristiche sono possibili solo se è presente un agente in grado di disattivare in reversibilmente le specie radicaliche propaganti (P<sub>n</sub>•) che diventano così delle catene dormienti (P<sub>n</sub>X) fino a che non viene raggiunto l'equilibrio fra le due specie.

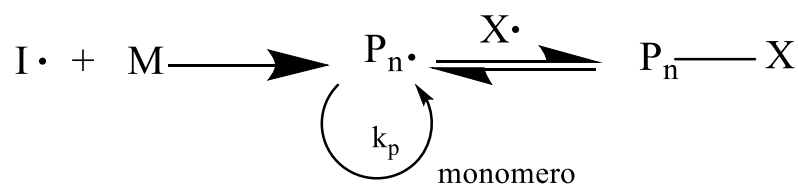


Figura 2: Instaurarsi dell'equilibrio tra specie attive e dormienti.

È importante che quest'ultima condizione si verifichi abbastanza velocemente in modo tale che tutte le catene abbiano la stessa possibilità di reagire e crescere; in queste condizioni i pesi molecolari crescono linearmente con la conversione ottenendo una distribuzione dei pesi molecolari ottimale.

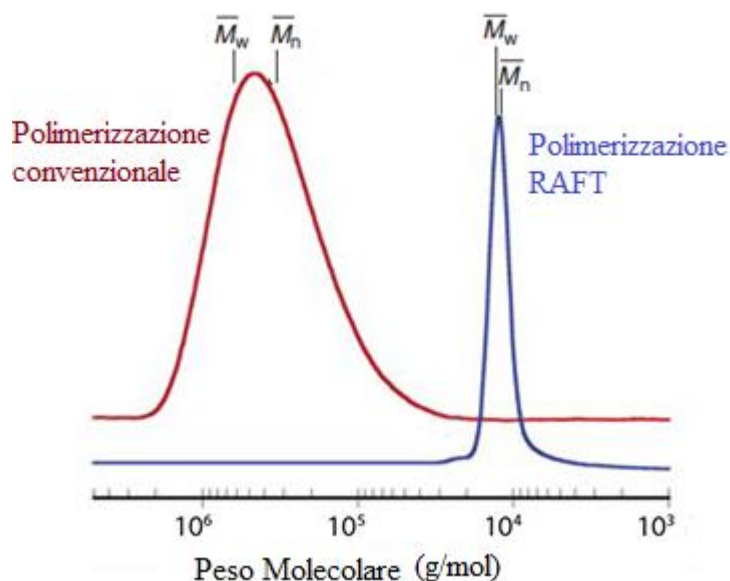


Figura 3: Confronto della distribuzione dei PM di due polimeri ottenuti con polimerizzazione radicalica classica e controllata (RAFT).

Le tecniche più utilizzate per fornire carattere vivente alla polimerizzazione radicalica e quindi un coerente controllo del peso molecolare sono tre [3]: l'ATRP, la NMP e la RAFT.

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 Pn-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.

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

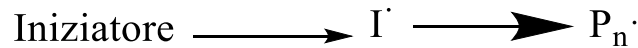


La polimerizzazione tramite RAFT (anch'essa sviluppata nei laboratori del CSIRO) è la tecnica più conveniente e versatile perché permette di avvicinarsi molto alle condizioni di reazione normalmente utilizzate per la polimerizzazione radicalica.

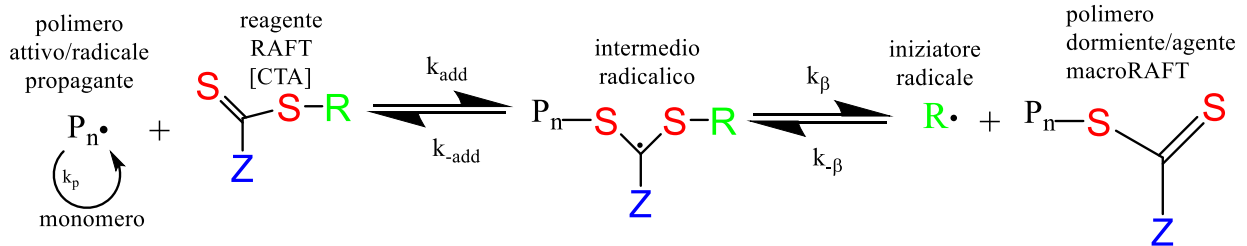
## 1.2 La polimerizzazione RAFT

La tecnica RAFT [7,8] (Reversible Addition Fragmentation chain Transfer), introdotta per la prima volta nel 1998 dal dottor Ezio Rizzardo e il suo team, 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 chiamate macroRAFT:

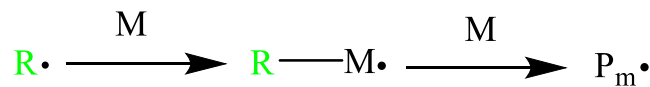
**Inizio:**



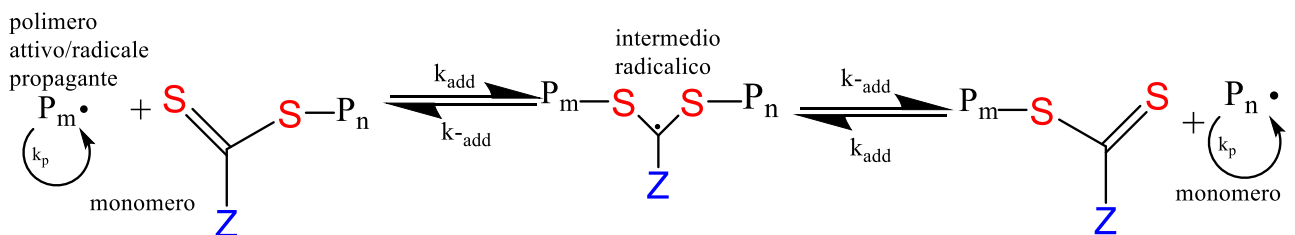
**Trasferimento reversibile di catena:**



**Riattivazione:**



**Equilibrio principale di catena:**



### Terminazione:

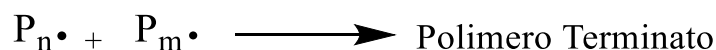


Figura 4: Meccanismo della polimerizzazione RAFT.

Il primo stadio definito come inizio 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 ( $P_n\bullet$ ); in seguito l'attacco al carbonio di-tiocarbonilico ( $RSC(Z)=S$ ) comporta la formazione di un radicale intermedio abbastanza stabile che è in grado di scindersi per dare luogo ad un di-tio derivato (ditioestere) polimerico ( $P_nS(Z)C=S$ ) e liberando una specie radicalica ( $R\bullet$ ) capace di iniziare la propagazione di una nuova catena ( $RM\bullet$ ). La reazione di quest'ultimo con altro monomero genera una nuova catena polimerica attiva ( $P_m\bullet$ ), il rapido instaurarsi dell'equilibrio fra le specie attive ( $P_n\bullet$  e  $P_m\bullet$ ) e quelle delle macromolecole dormienti (macroRAFT) garantisce la stessa probabilità di crescita per tutte le catene, ottenendo così una distribuzione uniforme dei pesi molecolari dei polimeri con una polidispersità prossima a uno.

Una volta terminata la polimerizzazione (perché è finito il monomero o perché questo viene allontanato dall'ambiente di reazione oppure, come nel nostro caso, per l'abbassamento della temperatura) la maggior parte delle catene conserva la funzione "vivente" di-tiocarbonilica dell'agente RAFT permettendo così di isolare il polimero come prodotto stabile e in seguito estenderlo attraverso l'aggiunta di un secondo monomero.

Le caratteristiche principali della polimerizzazione RAFT sono le seguenti:

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

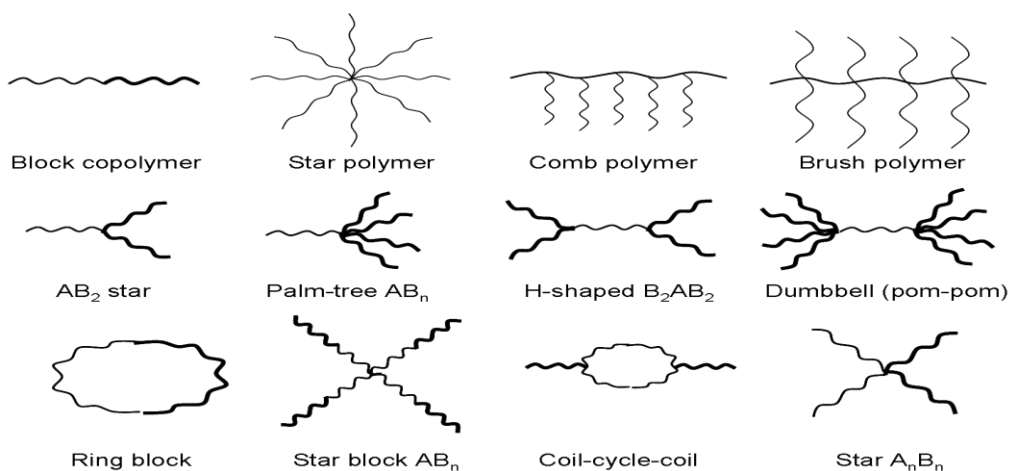


Figura 5: Strutture dei copolimeri ottenibili con la polimerizzazione RAFT.

Nonostante la grande versatilità della tecnica RAFT vi è un'importante limitazione che prevede di ottimizzare per ogni monomero le condizioni di reazione (solvente, tipo di agente RAFT e procedura). 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 fonte di radicali è la chiave del processo, in termini di:

- controllo, poiché il numero di radicali generati determina la quantità di catene morte nel sistema;
- tasso di polimerizzazione, in quanto è direttamente correlato alla concentrazione di radicali;
- condizioni di reazione (ad es. temperatura di reazione appropriata, processo, ecc.).

La concentrazione di iniziatore deve essere scelta con attenzione al fine di ottenere un bilancio ottimale tra velocità di polimerizzazione e reazioni di terminazione per accoppiamento fra radicali, cercando però di minimizzare quest'ultima 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 poiché al processo di trasferimento derivante dall'interazione di ogni specie radicalica con l'agente RAFT corrisponde una nuova specie iniziatrice ( $R\bullet$ );
- all'aumento di concentrazione dell'iniziatore e quindi di radicali, al diminuire cioè del rapporto RAFT/iniziatore, corrisponde una maggiore velocità di conversione (propagazione) ma un peggiore controllo del peso molecolare e sulla polidispersità;

- contrariamente, un aumento della concentrazione di agente RAFT corrisponde la formazione di polimeri a peso molecolare più basso ma caratterizzati da una polidispersità minore; al tempo stesso si minimizzano le reazioni di terminazione, in modo tale da avere un maggiore controllo sulla reazione.

A causa dei motivi sopra elencati tendenzialmente vengono utilizzati rapporti RAFT/iniziatore elevati ( $\gg 1$ ). 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:

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

Equazione 1: Equazione per il calcolo del peso molecolare.

In cui  $[M]_0$  rappresenta la concentrazione iniziale di monomero e  $[M]_0 - [M]_t$  il monomero consumato ( $= [M]_0 \cdot \text{conversione}$ ),  $[CTA]$  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:

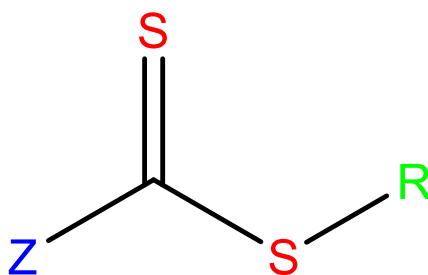


Figura 6: Struttura di un generico agente RAFT

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:

- Il doppio legame  $C=S$  sia più reattivo nei confronti di un'addizione radicalica rispetto al legame  $C=C$  del monomero;

- il sostituito Z è il principale responsabile della reattività del legame C=S verso l'addizione radicalica e governa la stabilità del radicale intermedio;
- Dalla buona efficienza di R come gruppo uscente capace di allontanarsi per scissione omolitica del legame S-R, dando il radicale R• capace di riattivare efficacemente la polimerizzazione.

La velocità di addizione al doppio legame è fortemente influenzata dal sostituito 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 7).

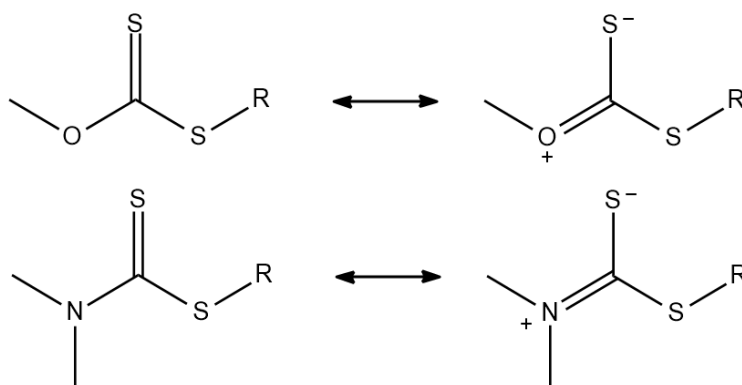


Figura 7: Formule di risonanza di alcuni agenti RAFT

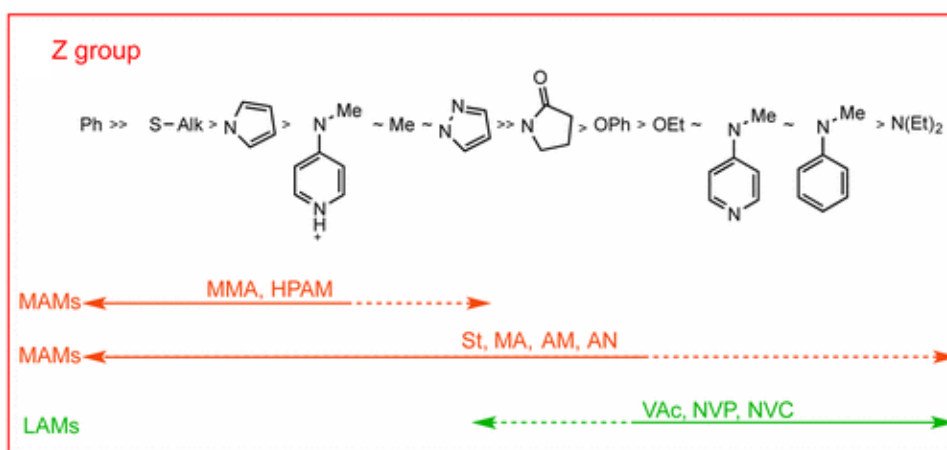


Figura8: Linee guida per la selezione del gruppo Z di agenti RAFT (ZC(=S)SR) per varie polimerizzazioni.

Il gruppo R invece deve essere un buon gruppo uscente, cioè deve avere una stabilità uguale o maggiore rispetto alla catena propagante (Pn•) mantenendo comunque buone capacità di

iniziazione della polimerizzazione. Il benzile ad esempio (-CH<sub>2</sub>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. Perciò è essenziale bilanciare le forze in gioco e scegliere opportunamente i gruppi R e Z per ottenere un agente RAFT appropriato.

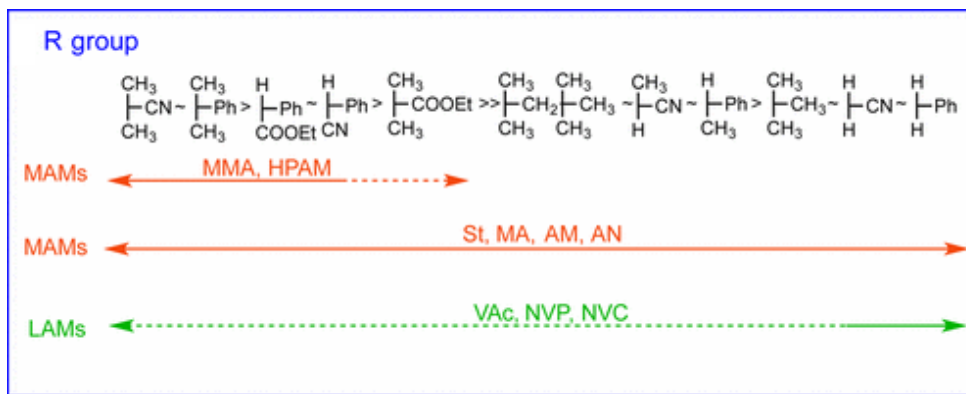


Figura 9: Linee guida per la selezione del gruppo R di agenti RAFT (Z-C(=S)S-R) per varie polimerizzazioni.

I coefficienti di trasferimento diminuiscono da sinistra a destra come anche i tassi di frammentazione; la linea tratteggiata invece, indica un controllo parziale (cioè controllo della massa molare ma scarso controllo sulla dispersione).

Abbreviazioni: MMA=metilmetacrilato, HPMAM=N-(2-idrossipropil)metacrilammide, St=stirene, MA=metilacrilato, AM=acrilammide, AN=acrilonitrile, VAc= acetato di vinile, NVP=N-vinilpirrolidone, NVC=N-vinilcarbazolo.

## 1.4 Monomeri nella polimerizzazione RAFT

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

- Monomeri “più-attivati”: hanno la caratteristica di avere il doppio legame coniugato ad un sistema aromatico, un doppio legame, un gruppo carbonile o un nitrile, includono monomeri vinilici aromatici (stirene e vinilpiridina), metacrilici (MMA, metacrilammide, etc), e acrilici (MA, acido acrilico, acrilamide, acrilonitrile etc.).

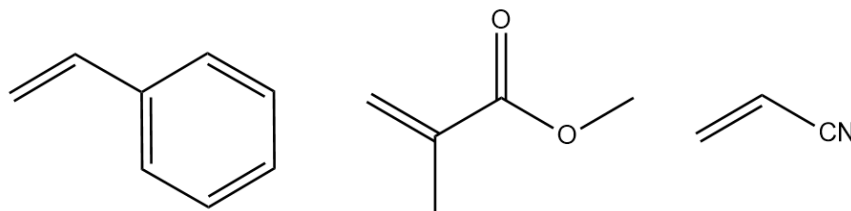


Figura 10: Esempi di monomeri più attivi.

- Monomeri “meno attivati”: 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 vinil esteri (vinil acetato) e vinil ammidi (N-vinilpirrolidone, N-vinilcarbazolo).

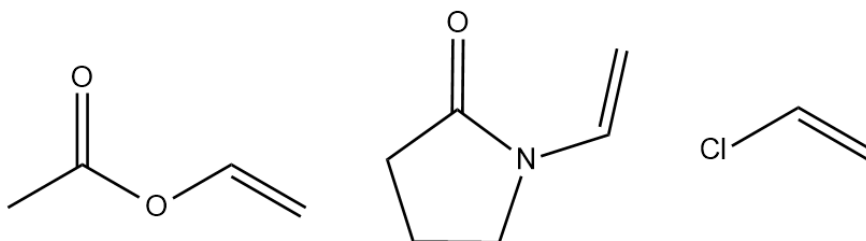


Figura 11: Esempi di monomeri meno attivi.

Nel secondo 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 riattivare 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 di-tiocarbammati, ciò porta ad una destabilizzazione dell'intermedio radicalico favorendo l'uscita del radicale polimerico.

## 1.5 Sintesi di copolimeri a blocchi mediante tecnica RAFT

La caratteristica peculiare della tecnica RAFT è che al termine della polimerizzazione il gruppo tiocarbonilico dell'agente RAFT viene preservato nelle catene di prodotto polimerico, attribuendo ad esso la caratteristica di catena "vivente". Questo significa che il polimero stesso diviene un agente RAFT (macroRAFT) e può andare a polimerizzare un secondo monomero (B) e quindi formare un copolimero a blocchi AB, con peso molecolare controllato e bassa polidispersità, inoltre polimeri a blocchi di ordini superiori (ABA, ABC, ecc.) possono anch'essi essere formati per addizioni sequenziali di ulteriori monomeri:

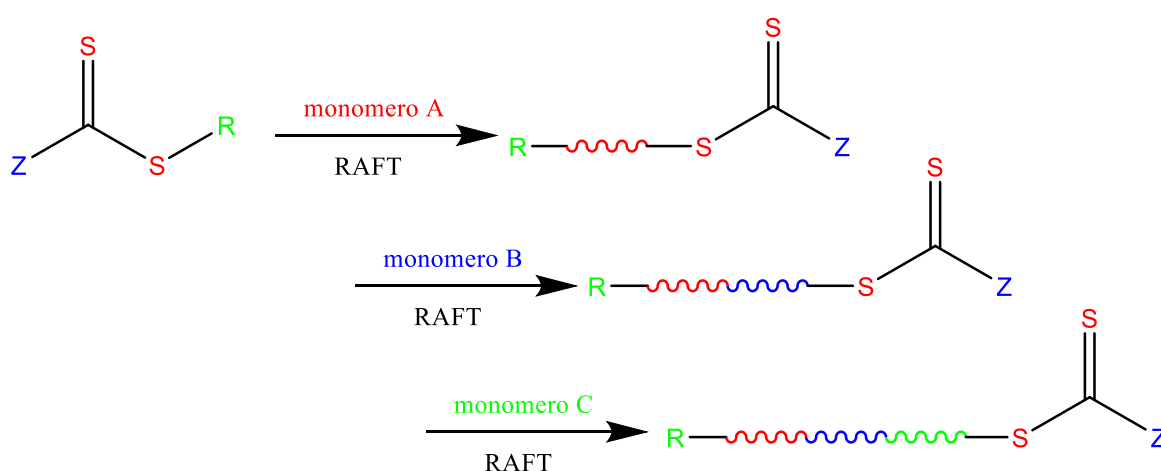


Figura 12: Sintesi polimeri a blocchi con tecnica RAFT.

I copolimeri che si ottengono con altre tecniche, 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. Nella sintesi di un copolimero AB di questo tipo è molto importante l'ordine con il quale vengono formati i due blocchi. Il radicale propagante del primo blocco formato (A) deve essere un buon gruppo uscente rispetto a quello del secondo blocco (B), se così non fosse la polimerizzazione risulterebbe rallentata e la polidispersità maggiore. 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. Se si invertisse l'ordine della sintesi, dopo aver aggiunto il secondo monomero, la reazione di scissione dell'intermedio radicalico risulterebbe fortemente spinta verso i reagenti.

## 1.6 Reazioni di post-polimerizzazione

Quando la reazione viene condotta su monomeri che oltre alla funzionalità vinilica presentano altri gruppi funzionali, inerti durante la polimerizzazione radicalica, allora è possibile sfruttare questi gruppi per farli reagire in un secondo momento, ottenendo così dei polimeri con caratteristiche differenti rispetto al materiale di partenza. Il glicidil metacrilato (GMA) [9] ad esempio, avendo sia la funzione vinilica che epossidica, si presta bene a questo tipo di reazioni.

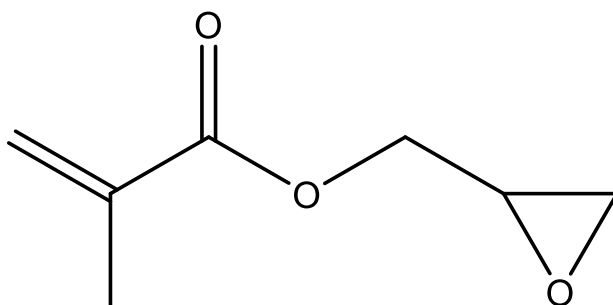


Figura 13: Struttura del GMA.

Esso è un monomero commerciale a basso costo con un ampio range di applicazioni industriali 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 processo catalizzato da acidi (Figura 14) oppure attraverso un forte nucleofilo (Figura 15).

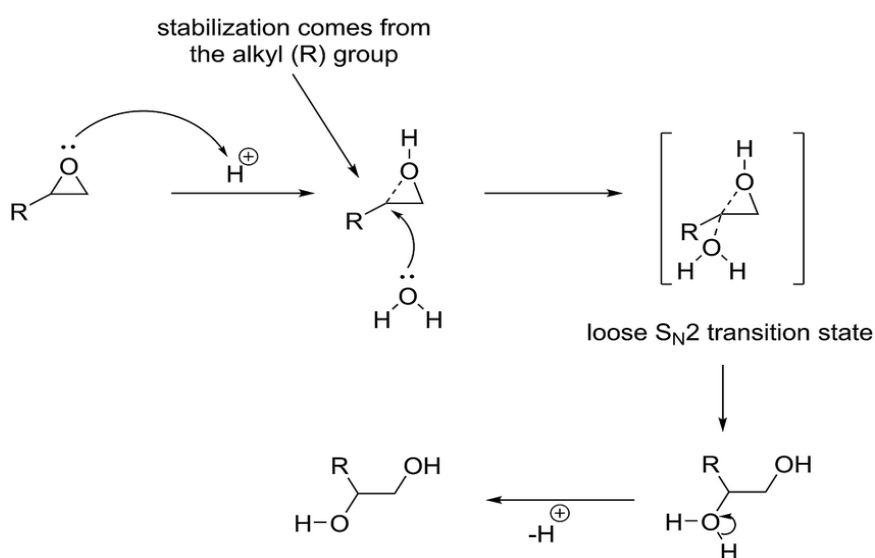


Figura 14: Reazione di apertura dell'anello di ossirano catalizzata con acido.

Il primo step è la protonazione dell'atomo di ossigeno che è stabilizzato dall'effetto induttivo dell'atomo di carbonio più sostituito (più ricco di elettroni). Ciò rende elettrofilo l'atomo di carbonio terziario e suscettibile ad un attacco nucleofilo da parte di un nucleofilo debole come acqua o metanolo, che altrimenti non sarebbe in grado di forzare la reazione di apertura dell'anello se agisse da solo.

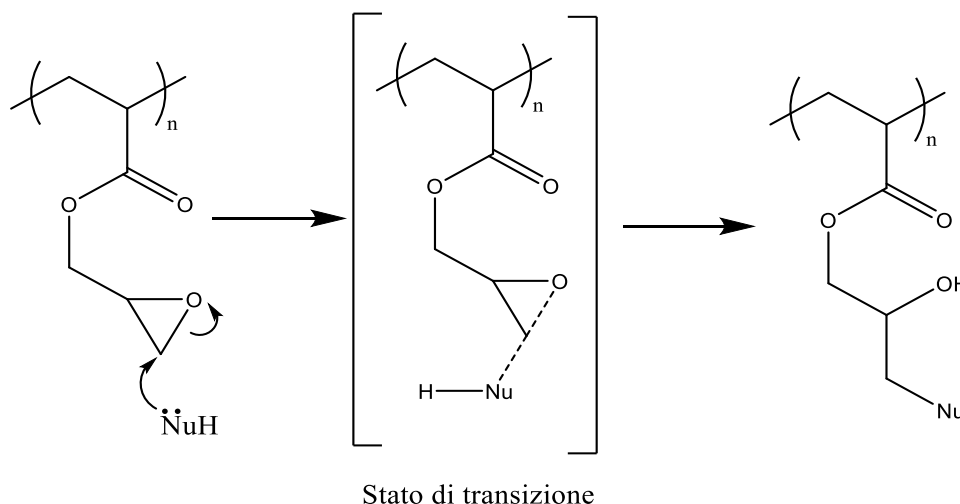


Figura 15: Attacco nucleofilo all'epossido del glicidil metacrilato.

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. Cambiando il tipo di nucleofilo il polimero finale avrà caratteristiche diverse. Utilizzando un'ammina secondaria ciclica come la morfolina (Figura 16) 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 [10].

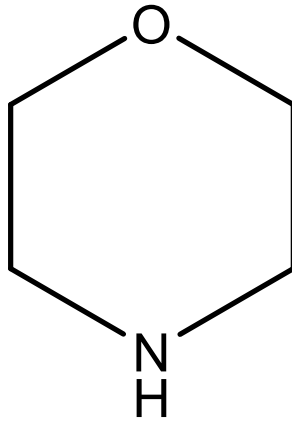


Figura 16: Struttura della morfolina.

Da questo punto di vista il PGMA può essere considerato un polimero estremamente interessante; infatti tramite la sua funzionalizzazione è possibile ottenere dei copolimeri a blocchi in cui il poli-(glicidil metacrilato) opportunamente modificato (ad esempio con la morfolina) assume caratteristiche idrofiliche, mentre blocchi alifatici come gli acrilati o i metacrilati mantengono le proprietà idrofobiche. Copolimeri di questo tipo sono capaci di auto-assemblarsi per formare degli aggregati core-shell di dimensioni nanometriche chiamate micelle polimeriche.

## 1.7 Micelle polimeriche

Uno dei sistemi più utilizzati per la produzione di micelle polimeriche consiste nella sintesi di copolimeri a blocchi anfifilici, una sostanza che presenti quindi sia una parte polare che una apolare, posta all'interno di un mezzo acquoso [11]. Questi composti sono in grado di auto-assemblarsi in micelle ad una certa concentrazione e temperatura. Tipicamente queste micelle sono composte da un blocco esterno idrofilico e da uno interno idrofobico, come in Figura 17.

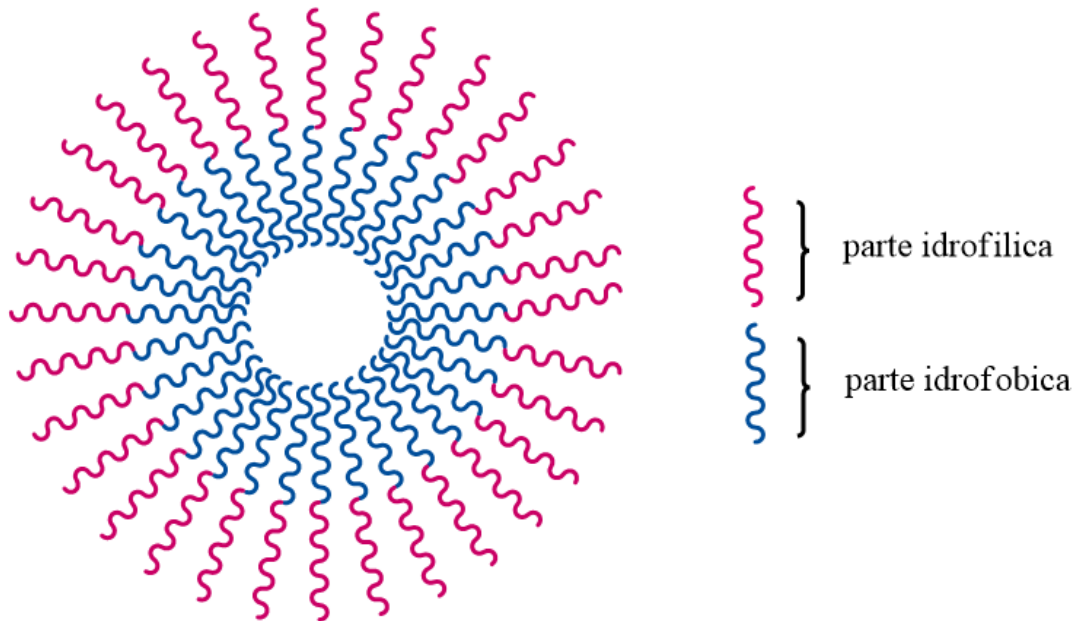


Figura 17: Struttura micella polimerica

La formazione di queste micelle è governata dall'equilibrio tra le interazioni attrattive e repulsive [12]. Le forze attrattive includono interazioni idrofobiche ed interazioni elettrostatiche, d'altra parte, le interazioni steriche, la repulsione elettrostatica e l'idratazione contribuiscono alle forze repulsive, queste permettono di mantenere le dimensioni nanometriche utili a fini clinici. La driving force del processo di micellizzazione è la diminuzione dell'energia libera del sistema [13], poiché le catene idrofiliche si dispongono intorno al cuore idrofobico formando un involucro protettivo che minimizza le interazioni della parte idrofobica con il mezzo acquoso. Per far sì che le micelle si possano formare sono necessari due requisiti, ovvero la concentrazione micellare critica (CMC) e la temperatura micellare critica (CMT). Analogamente ai tensioattivi a basso peso molecolare, anche i copolimeri anfifilici possiedono una caratteristica concentrazione CMC nel processo di formazione delle micelle; a concentrazioni inferiori alla CMC i copolimeri esistono solo come

single molecole in soluzione (unimeri), mentre al di sopra della CMC le catene di copolimeri anfifilici si assemblano sotto forma di micelle in modo tale che la parte idrofobica del copolimero non sia a contatto diretto con il mezzo acquoso. La CMC invece deve essere uguale o minore ad un certo valore definito anche come temperatura di Krafft. Oltre a questi requisiti le caratteristiche delle micelle polimeriche sono influenzate anche dal peso molecolare e dal rapporto fra la parte idrofilica e quella idrofobica; infatti variando questo bilancio cambia sia la stabilità che la morfologia. All'aumentare delle dimensioni del blocco idrofobico la CMC 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 le dimensioni della parte idrofilica superano quelle della parte idrofobica allora le micelle assumeranno una forma prevalentemente sferica, anche se sono possibili diverse forme come cilindri, bacchette, strutture a verme o a fiore. 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 finora più utilizzati a tal proposito [14]. Le micelle polimeriche vengono utilizzate nella somministrazione di farmaci, definita come “drug delivery”, a causa delle loro caratteristiche interessanti, come la biocompatibilità, la bassa tossicità, la disposizione nucleo-guscio, l'associazione micellare, la morfologia, le dimensioni nanometriche e la stabilità relativamente elevata. La funzionalità delle micelle polimeriche dipende dalla loro struttura nucleo-guscio, per cui il nucleo idrofobico trasporta e protegge il farmaco, mentre il guscio idrofilico supporta e stabilizza il nucleo nel mezzo acquoso e migliora la solubilità in acqua dei polimeri; e ciò avvantaggia anche la somministrazione del farmaco. Interessanti applicazioni cliniche relative alle micelle polimeriche comprendono la protezione del farmaco incapsulato e la solubilizzazione di farmaci scarsamente solubili [15]. Numerosi fenomeni patologici, responsabili di provocare nell'organismo alterazioni di tipo infettivo, infiammatorio o ischemico, producono nelle aree colpite anche un'aumentata permeabilità dei vasi sanguigni che le irrorano, facendo sì che si verifichi in tali sedi un accumulo preferenziale di nanocarrier. Nei tumori solidi inoltre, insieme alla maggiore permeabilità dei vasi, si riscontra un danneggiamento delle vie linfatiche, che permette un ulteriore accumulo delle molecole trasportate negli interstizi cellulari causato da uno scarso drenaggio linfatico, fenomeno che provoca un aumento della ritenzione della zona interessata (effetto EPR, Enhanced Permeability and Retention). Affinché si assista però alla diffusione e all'accumulo di carrier nei tessuti, è necessario che le dimensioni di questi sistemi colloidali siano paragonabili ai

diametri delle fenestrature dei capillari che irrorano le masse tumorali, diametri che variano in base al tipo stesso di tumore. I sistemi micellari, rispetto a quelli nanoparticellari, grazie alle dimensioni ridotte (comprese tra 10 e 50 nm) esercitano bene la funzione di vettori di principi attivi poiché le loro dimensioni risultano essere inferiori alle più piccole fenestrature riscontrate in sede tumorale.

## 1.8 Stabilizzazione delle micelle polimeriche

Le micelle polimeriche a causa del peso molecolare elevato dei polimeri che le formano, hanno una CMC molto bassa che permette loro di avere un'alta stabilità. Tuttavia, è stato dimostrato che questa loro stabilità viene a mancare nei trattamenti "in vivo". Le micelle polimeriche utilizzate clinicamente devono rimanere stabili dopo l'iniezione endovenosa per essere utili per il rilascio mirato. Dopo l'iniezione, le micelle sono soggette a una serie di cambiamenti ambientali, inclusi cambiamenti nella concentrazione salina, diluizione e contatto con le proteine sieriche; il CMC, il parametro fondamentale della stabilità termodinamica, è ampiamente influenzato [16]. Per ovviare a questi problemi è possibile usare diverse tecniche chimico-fisiche che permettano di aumentare la stabilità delle micelle polimeriche, quali, aspetti fisici (ad es. stacking  $\pi - \pi$ , complessazione, coordinazione e legami a idrogeno), e chimici (ad es. polimerizzazione dei radicali liberi e reticolazioni). Un metodo per formare rivestimenti polimerici che negli ultimi anni ha avuto un interesse considerevole consiste nell'uso della poli(dopamina) (PDA) [17]. 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.

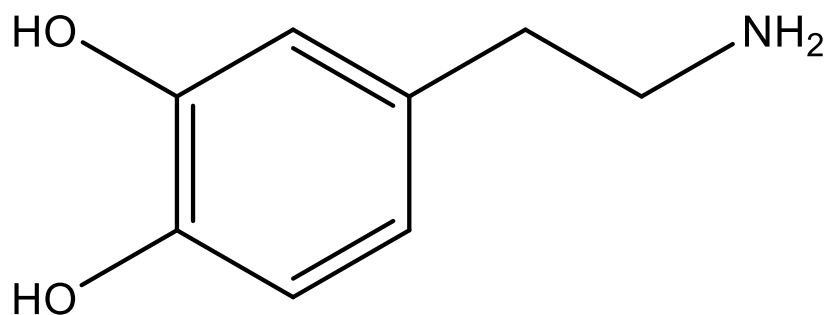


Figura 18: Struttura della dopamina.

La poli(dopamina) è formata spontaneamente dalla polimerizzazione ossidativa indotta dal pH della dopamina-cloridrato in soluzioni basiche [17]. Il primo step prevede l'ossidazione della dopamina a dopamina-chinone, la sua ciclizzazione intramolecolare, l'ossidazione a dopaminechrome, la formazione di 5,6-dihydroxyindole (DHI) e l'ulteriore ossidazione a 5,6-indolequinone (IDQ); come rappresentato dalla Figura 19:

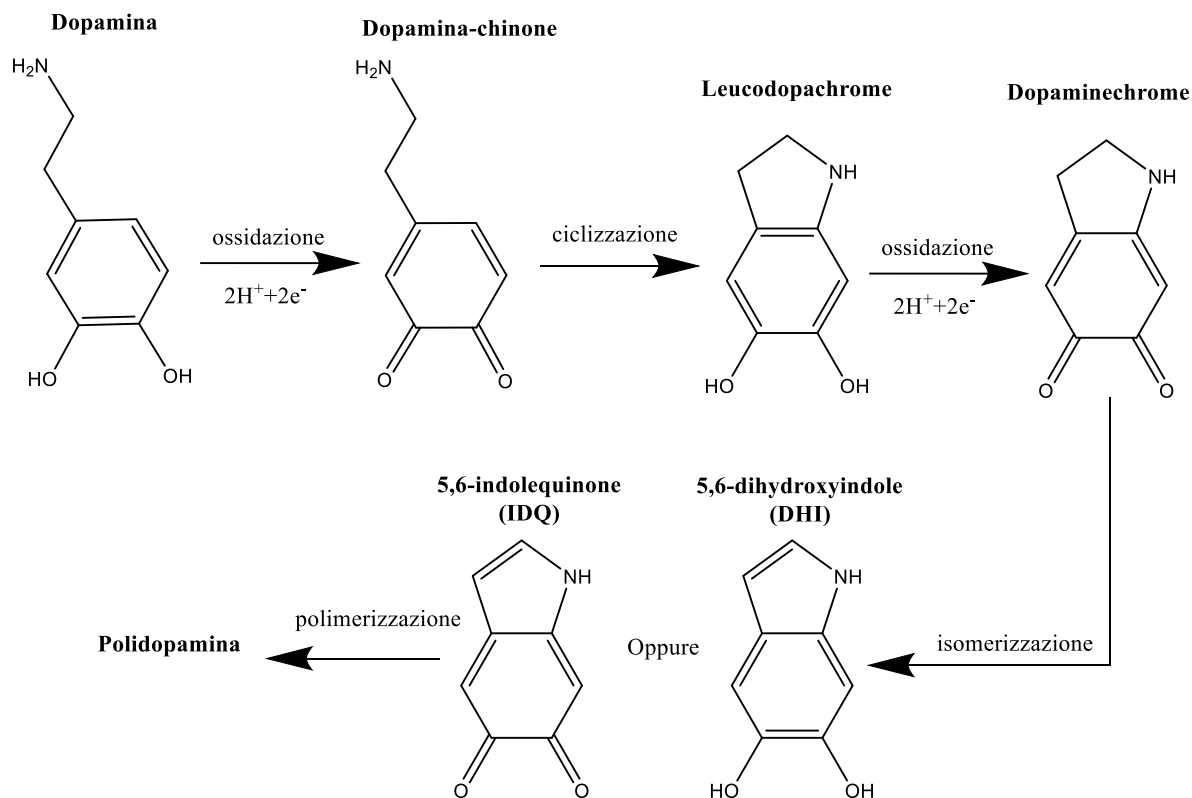


Figura 19: Meccanismo di reazione proposto per la polidopamina.

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. Nel 2007, Messersmith e collaboratori [17] hanno suggerito una struttura polimerica (Figura 20) in cui le molecole DHI subiscono reazioni di ramificazione nelle posizioni 2, 3, 4 e 7, portando a più isomeri di dimeri e successivamente a oligomeri superiori, che alla fine formano la struttura delle polidopamina.



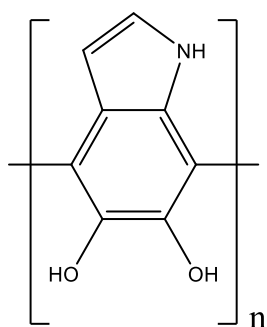


Figura 20: Possibile struttura della polidopamina.

Successivamente, Liebscher e colleghi [18] 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 21 in nero), diidrossindolo (funzionalità catecolo, Figura 21 in rosso) e dopamina (Figura 21 in verde) unite fra di loro tramite legami covalenti a formare una catena in cui tali legami coinvolgono quasi esclusivamente gli anelli benzenici.

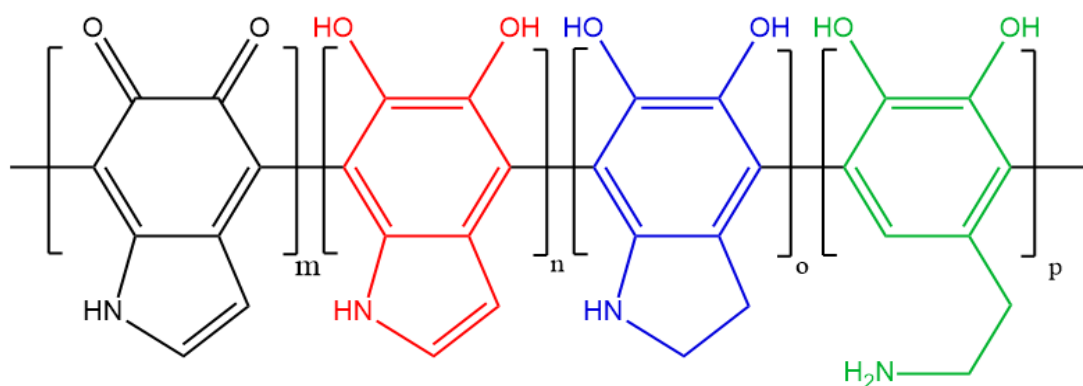


Figura 21: Possibile struttura della polidopamina.

Contrariamente ai modelli di polimeri covalenti, Bielawski e collaboratori [17] hanno analizzato la struttura della PDA e dai loro dati hanno rivelato la presenza di legami a idrogeno nel nucleo arilico della PDA e strutture sovrapposte formate da monomeri. Pertanto, hanno proposto che la PDA non è un polimero covalente ma piuttosto un aggregato supramolecolare di monomeri (principalmente DHI e del suo derivato dione) tenuti insieme tramite una combinazione di interazioni di trasferimento di carica,  $\pi$ -stacking e legami a idrogeno.

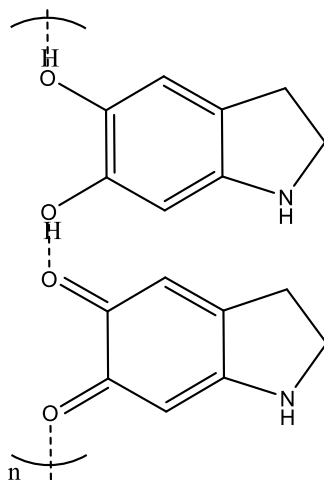


Figura 22: Possibile struttura della polidopamina.

In un altro studio Lee e collaboratori [17] hanno monitorato la formazione di PDA e hanno identificato l'esistenza di un tris di molecole autoassemblate composte di  $(\text{dopamina})^2 / \text{DHI}$ .

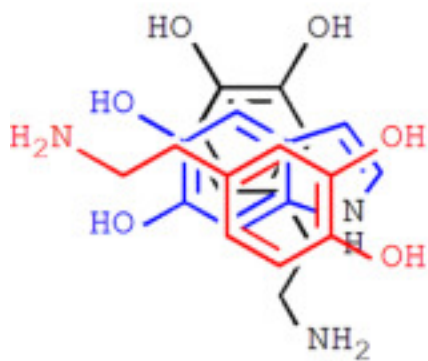


Figura 23: Possibile struttura della polidopamina.

Sulla base di questi ed altri risultati sperimentali sarà possibile dare un contributo significativo affinché si possa fare chiarezza sulla struttura di questo polimero. Negli ultimi anni però, sono state messe in risalto le caratteristiche che possiede la polidopamina [17]:

- adesione, in quanto la polidopamina ha la capacità di aderire, potenzialmente, a tutti i tipi di substrati indipendentemente dalla loro natura chimica, come fibroblasti e megacariociti (cellule del midollo osseo), nanofibre di policaprolattone, nanofibre non modificate e rivestite di gelatina e promuovendo inoltre l'adesione cellulare di diversi tipi di cellule;

- reattività chimica, poichè i gruppi funzionali che si trovano nella polidopamina (fra cui chinone e catecolo) porta la bio-superficie modificata dal rivestimento in PDA ad avere proprietà affascinanti, non solo per stimolare risposte cellulari positive ma anche per una facile post-funzionalizzazione, in grado ad esempio di reagire con un ampio range di molecole, come ammine o tioli in reazioni di cross-link, con la capacità di legarsi anche con ioni metallici come  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ;
- biocompatibilità, essendo la componente principale della melanina naturale che è ampiamente distribuita nel corpo umano, la polidopamina mostra una eccellente biocompatibilità promuovendo così la somministrazione per Targeting Attivo di sostanze estranee (ad esempio antitumorali) nell'organismo senza causare una risposta immunologica aggressiva. Inoltre, la PDA è emersa come una piattaforma potente ed universale per la progettazione di bio-superfici altamente personalizzate per varie applicazioni biomediche e tissutali.

## 1.9 Funzionalizzazione delle micelle polimeriche con acido folico

L'acido folico o acido pteroil(mono)-glutammico o vitamina M o vitamina B9 o folacina, è una vitamina del gruppo B necessario per la replicazione in vivo del materiale genico in quanto ricopre un ruolo chiave nella biosintesi di purine e pirimidine (costituenti del DNA e dell'RNA) oltre che di aminoacidi, sia nell'organismo umano sia nell'organismo batterico. Questa vitamina si compone strutturalmente dell'unione di tre molecole: 6-metilpterina, acido p-aminobenzoico (PABA) ed acido glutammico, rappresentati in figura 24:

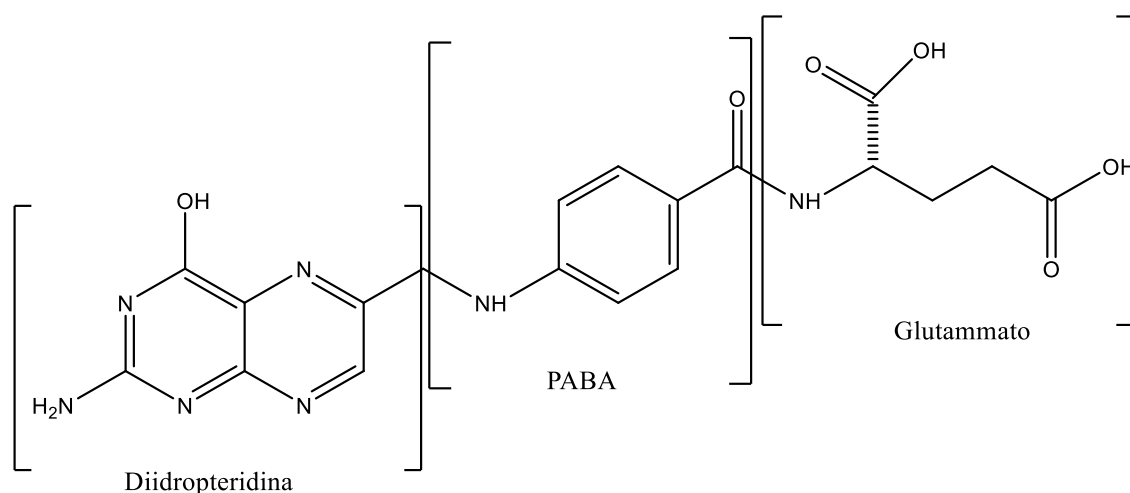


Figura 24: Struttura dell'acido folico.

La realizzazione di sistemi micellari polimerici può prevedere la coniugazione sulla loro superficie di molecole direzionanti (Targeting Attivo) [19]. Tra i possibili ligandi vanno ricordati anticorpi, porzioni zuccherine, transferrina e residui di folato. Gli ultimi due sono attualmente adoperati nel direzionamento di principi attivi a cellule tumorali, poiché la maggior parte di esse presenta una sovraespressione sulla loro superficie di recettori specifici per il folato e per la transferrina. È quindi necessario dimostrare che micelle di dimensioni comprese tra 30 e 100 nm, formate dai copolimeri anfifilici se opportunamente coniugate siano capaci di direzionare attivamente farmaci a tumori. L'acido folico quindi, essendo un nutriente fondamentale per la crescita e replicazione cellulare può essere sfruttato per aumentare l'affinità micella-cellula per un migliore inglobamento.

## 2. SCOPO

L'obiettivo della presente tesi di laurea sperimentale è di sintetizzare copolimeri a blocchi con proprietà anfifiliche tramite polimerizzazione radicalica controllata (RAFT) e successiva funzionalizzazione di uno dei due blocchi per consentire la formazione di micelle polimeriche per un loro utilizzo nel campo del drug delivery. Utilizzando la tecnica RAFT è stato sintetizzato 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. 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 PMMA e da una parte idrofila di poli(2-idrossi-3-morfolinopropil metacrilato) (PHMPMA). 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, il guscio esterno della micella composta da PHMPMA è stata sottoposta a reticolazione con dopamina sfruttando i gruppi OH presenti in catena laterale. Quest'ultima reazione è stata studiata variando la concentrazione di dopamina nell'ambiente di reazione e quindi il grado di reticolazione della polidopamina (PDA). I campioni sono stati caratterizzati mediante Dynamic Light Scattering (DLS), Zeta Potenziale e UV-Vis con sfera integratrice. Successivamente, i campioni polimerici sono stati studiati mediante analisi termogravimetrica (TGA) dalla quale 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-PMMA) senza dopamina. I risultati TGA ottenuti sono stati correlati all'assorbimento UV-Vis e ai valori del Potenziale Zeta delle micelle contenenti polidopamina. Inoltre, nell'ottica di migliorare l'inglobamento delle micelle con le cellule target, è stato necessario effettuare una funzionalizzazione del guscio esterno delle micelle reticolate con PDA, con acido folico, nutriente fondamentale per la replicazione cellulare. Per verificare l'affinità dell'acido folico con il polimero sintetizzato è stato necessario studiare e correlare, tramite tecnica NMR DOSY, il coefficiente di diffusione dell'omopolimero (PHMPMA), dell'omopolimero reticolato con PDA e delle micelle reticolate composte dal copolimero a blocchi (PHMPMA-b-PMMA), con il coefficiente di diffusione dell'acido folico. Infine, 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 delle cellule target; ciò ha permesso di preparare micelle reticolate, marcate e funzionalizzate con acido folico, per verificare e comparare l'inglobamento delle micelle all'interno delle cellule attraverso microscopia confocale.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Sintesi agente RAFT

L'agente RAFT utilizzato è il 2-ciano-4-metilpentan-2-il ditiobenzoato, è stato sintetizzato secondo lo schema riportato in Figura 25:

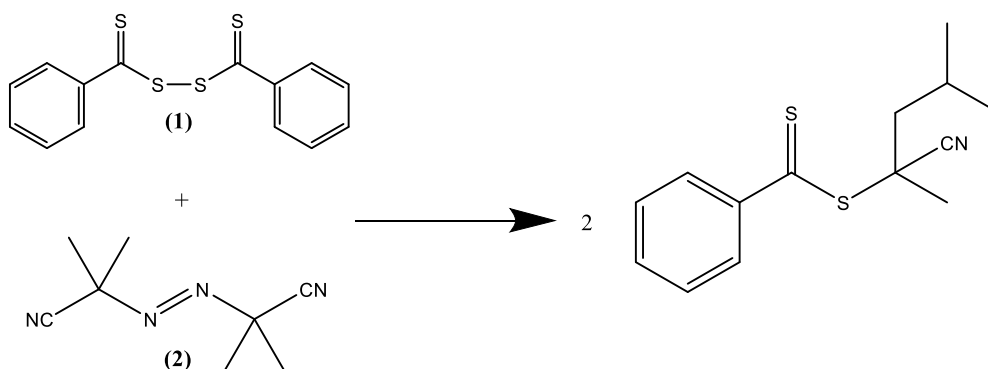


Figura 25: Reazione agente RAFT

Il 2-ciano-4-metilpentan-2-il ditiobenzoato è stato ottenuto facendo reagire il disolfuro (1) con l'azocomposto 2,2'-azobis(2,4-dimetilpentanitrile) (2) con una resa del 51%. La scelta dei sostituenti R e Z è importante al fine di garantire un ottimo controllo sulla reazione. Si è deciso questo tipo di agente RAFT poiché la reazione di polimerizzazione del monomero glicidil metacrilato appartiene alla famiglia dei metacrilati e quindi alla classe dei monomeri più attivi che, durante la polimerizzazione, formano dei radicali 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 [8]; 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. Un agente RAFT così costituito è perfetto per il controllo della polimerizzazione dei monomeri più attivi fra cui il metil metacrilato e il glicidil metacrilato. Lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  del prodotto ottenuto è riportato in Figura 26.

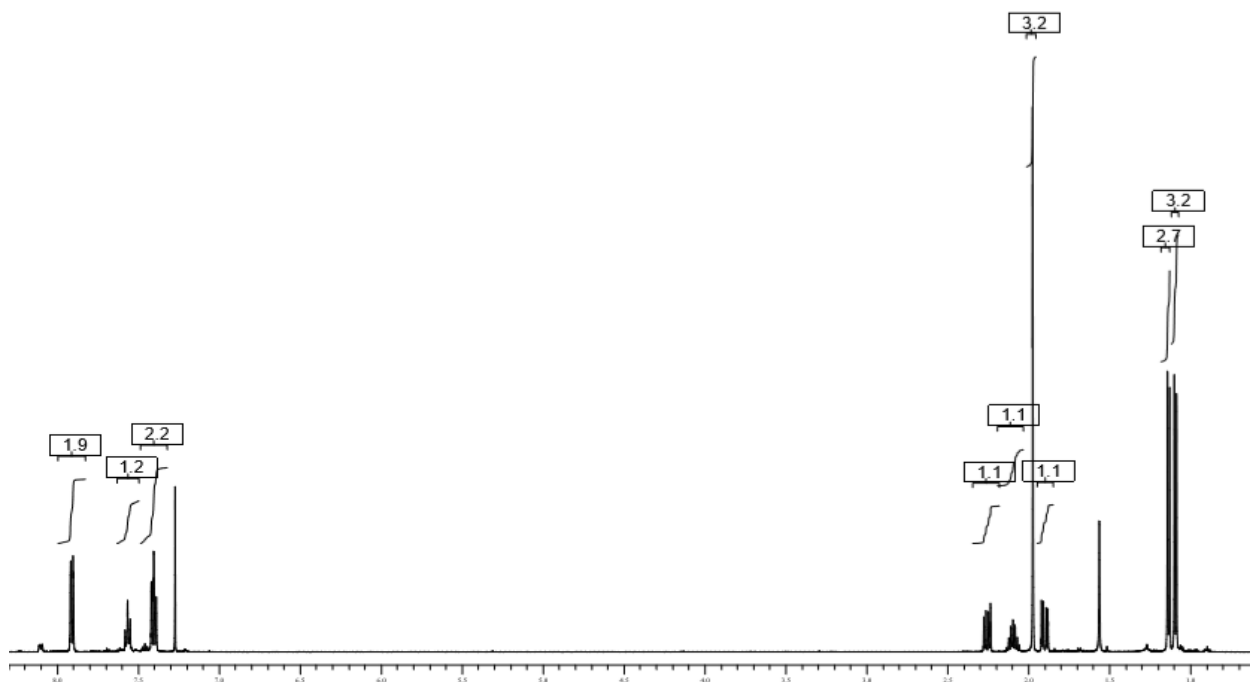


Figura 26: Spettro NMR dell'agente RAFT

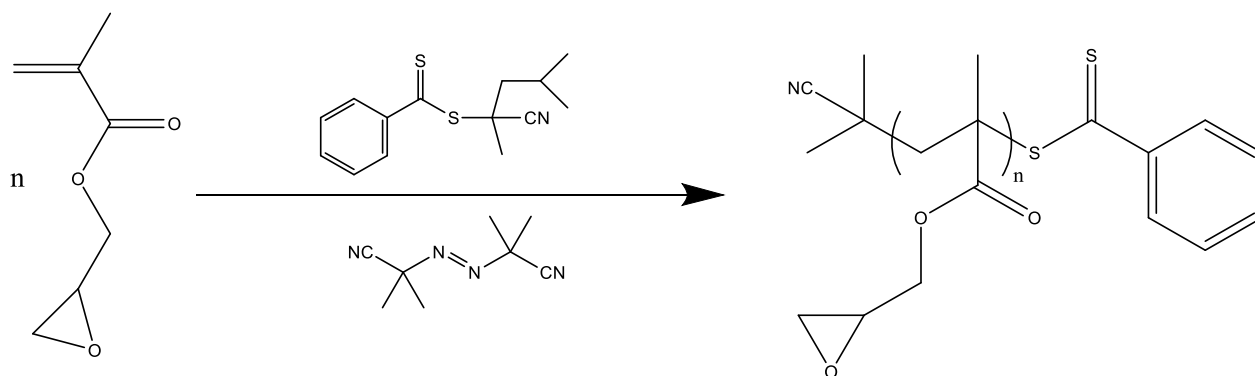
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : [1.07 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H); 1.12 (d,  $J = 7.8$  Hz, 3H) ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); [1.88 /dd,  $^1J = 14.1$  Hz,  $^2J = 5.6$  Hz, 1H); 2.24 (dd,  $^1J = 14.1$  Hz,  $^2J = 6.6$  Hz, 1H) ( $\text{CH}_2$ ); 1.95 (s, 3H,  $\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CN}$ ); 2.08 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHMe}_2$ ); 7.39 (dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 7.4$  Hz, 2H, m-ArH); 7.53 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, p-ArH); 7.89 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, o-ArH).



## 3.2 Sintesi dei polimeri

### 3.2.1 Sintesi dell'omopolimero poli-(glicidil metacrilato) PGMA

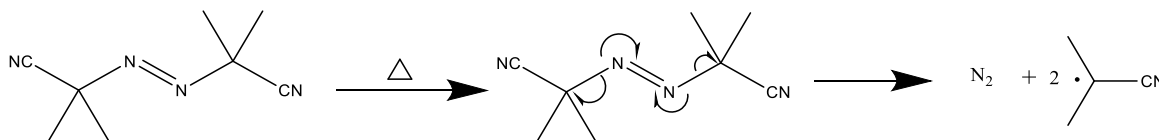
La sintesi del poli-(glicidil metacrilato) è stata realizzata utilizzando la tecnica RAFT seguendo il seguente schema di reazione (Schema 1):



Schema 1: Sintesi del poli-(glicidil metacrilato)

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

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 evitare il più possibile reazioni di terminazione delle catene polimeriche, che darebbe come risultato macromolecole inattive, con conseguente aumentando della polidispersità del polimero ottenuto. L'iniziatore utilizzato nella sintesi è il 2-2'-azobisisobutirronitrile meglio noto come AIBN il quale 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.

In Tabella 1 vengono riportate le caratteristiche principali degli omopolimeri PGMA sintetizzati con due tempi di reazione diversi con tecnica RAFT:

Campione	t.reazione	Conversione	PM_th	PMn	PD	Peso
<b>Pol.1</b>	4h	25%	22000	20000	1,11	0,989 g
<b>Pol.2</b>	5h	31%	27800	24500	1,10	1,166 g

Tabella 1: Dati relativi agli omopolimeri di PGMA.

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. Mentre il peso molecolare teorico (PM\_th) è stato calcolato tramite l'equazione 1:

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

Il peso molecolare medio numerale (PMn) e l'indice di polidispersità (PD) sono stati determinati mediante l'analisi GPC utilizzando come calibrazione della colonna 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 seguito in Figura 27 sono riportati i cromatogrammi GPC relativi ai due omopolimeri:

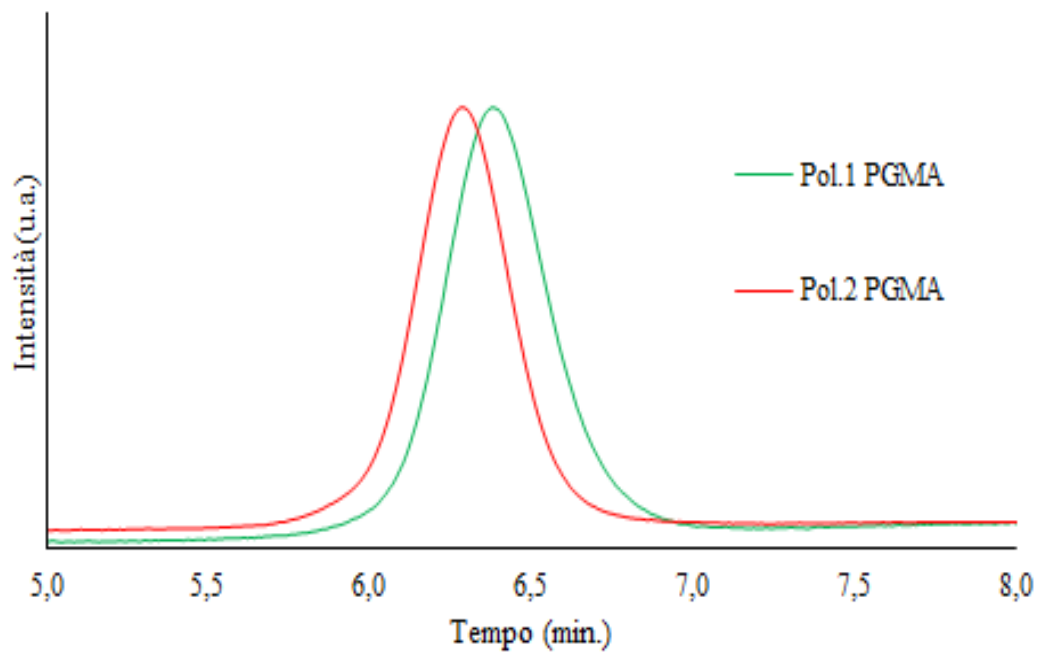
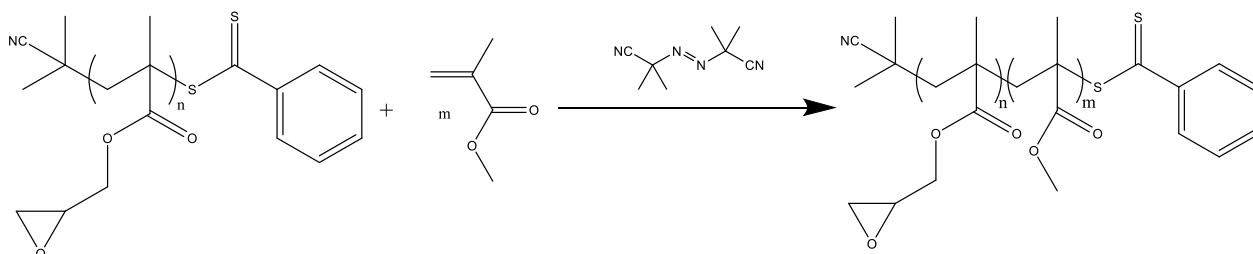


Figura 27: Cromatogrammi GPC degli omopolimeri Pol.1 e Pol.2.

I due cromatogrammi sono pressoché simmetrici e si nota, come previsto, uno spostamento a pesi molecolari maggiori dell'omopolimero che ha reagito 5 ore (Pol.2). L'omopolimero che ha reagito 4 ore (Pol.1) è il polimero usato poi per la sintesi del copolimero a blocchi con il metil metacrilato.

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

Il copolimero a blocchi poli(glicidil metacrilato)-b-poli(metil metacrilato) è stato sintetizzato con tecnica RAFT del metil metacrilato utilizzando come macroRAFT il PGMA omopolimero Pol.1 reagito per 4 ore; di seguito si riporta lo schema di reazione (Schema 3).



Schema 3: 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 a 70°C e i principali dati del copolimero ottenuto sono riportati in Tabella 2.

Campione	t.reazione	Conversione	PM_copol	PM_copol_th	PM_PMMA	PD
Pol.3	5h	27,25%	40000	47000	20000	1,09

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

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 PMMA è stato calcolato tramite  $^1\text{H}$  NMR del copolimero purificato rapportando l'integrale dei segnali del PMMA con quelli del PGMA (20000 Dalton). Il peso molecolare teorico (PM\_copol\_th) è stato calcolato tramite l'equazione 1 riportata precedentemente. In Figura 28 è riportato il cromatogramma GPC del copolimero ottenuto.

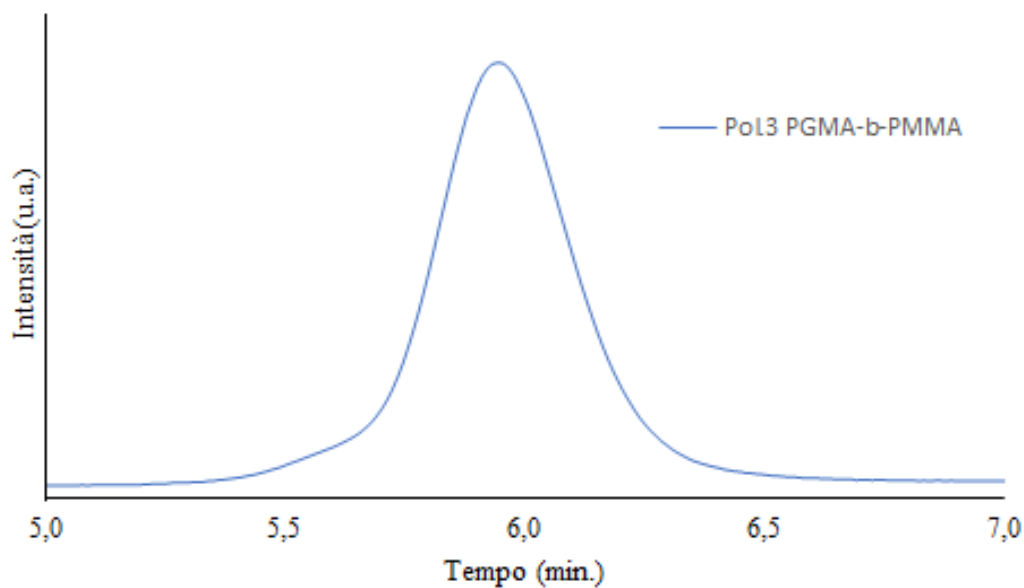


Figura 28: Cromatogrammi GPC del copolimero a blocchi Pol.3.

Il peso molecolare GPC è 45000 Dalton mentre quello da NMR è di 40000 Dalton. Questa differenza è dovuta al diverso volume idrodinamico in THF dello standard e del campione. In Figura 29 sono riportati gli spettri  $^1\text{H}$  NMR del PGMA e del copolimero a blocchi risultante. La verifica dell'avvenuta reazione di copolimerizzazione si ha comparando il segnale a 3.6 ppm dei protoni del  $\text{CH}_3$  adiacenti al  $(\text{C}=\text{O})\text{O}$  del PMMA.

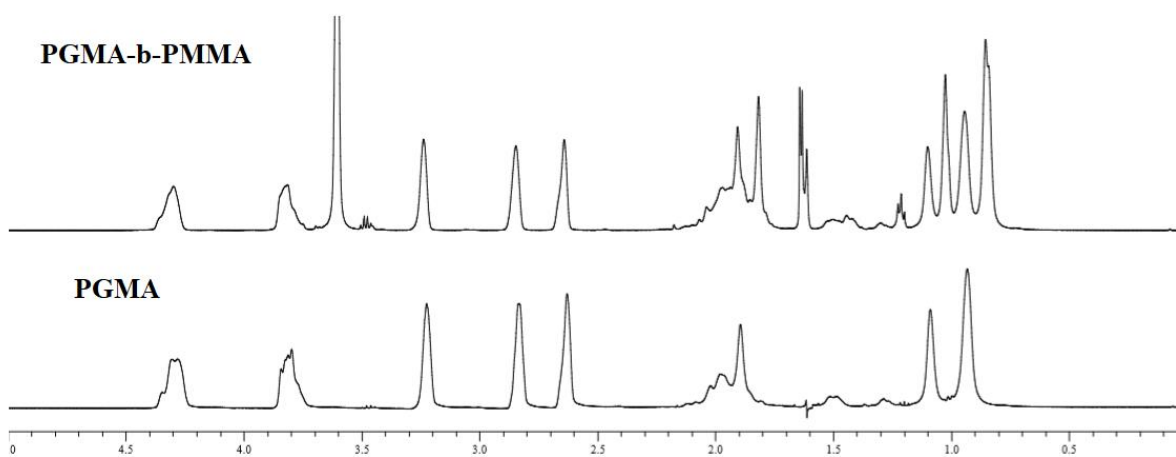


Figura 29:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ), spettri NMR del PGMA e del suo copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA.

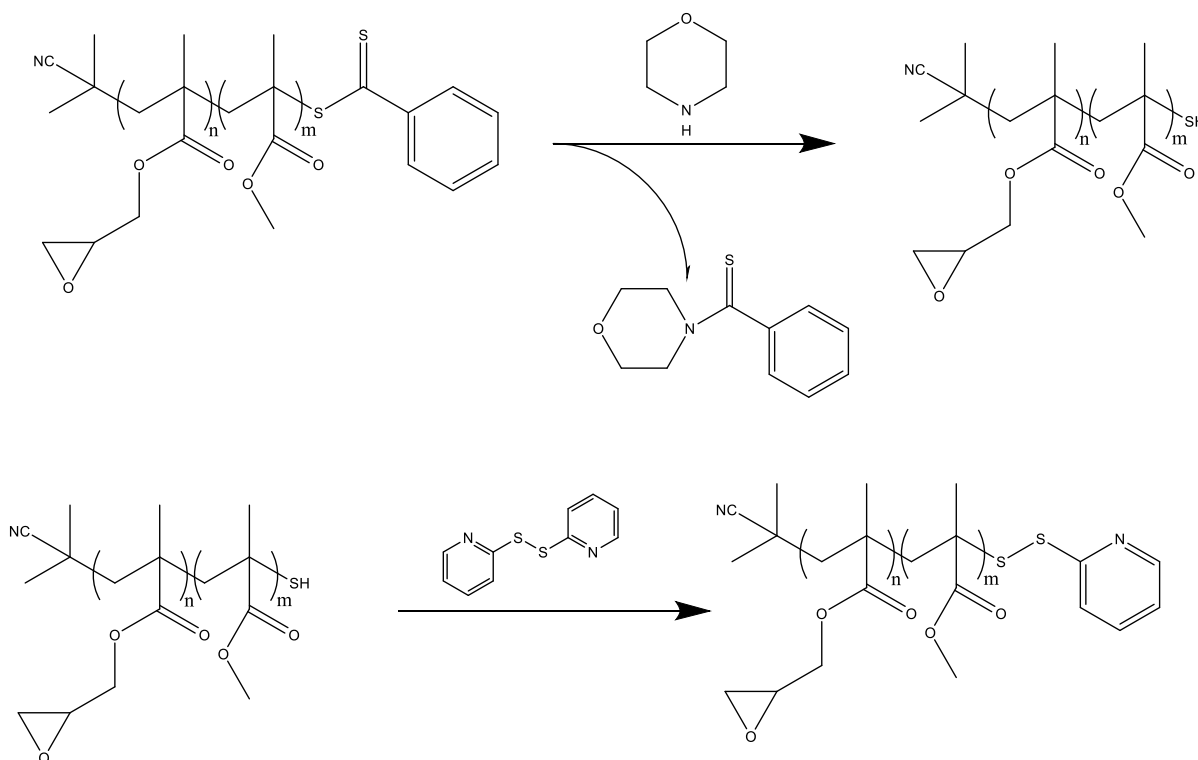
Il rapporto molare fra i due blocchi, calcolato tramite NMR, è PGMA : PMMA = 41,5 : 58,5 mol:mol. Il Pol.3 così ottenuto sarà utilizzato per la successiva reazione di funzionalizzazione con morfolina.

### 3.3 Trattamenti di post-polimerizzazione

Come visto nel paragrafo 1.7 le micelle sono aggregati nanometrici che si vengono a formare nel momento in cui una sostanza anfifilica viene dispersa in acqua. Il copolimero PGMA-b-PMMA (Pol.3) sintetizzato precedentemente però, non ha ancora questa funzionalità anfifilica, quindi, per ottenere un copolimero con le proprietà desiderate e capace di auto-assemblarsi 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. Dal paragrafo 1.6 abbiamo visto che l'apertura dei gruppi epossidici può avvenire o con una reazione catalizzata da acidi oppure per mezzo di un nucleofilo come la morfolina. Sfruttando quest'ultima opzione è possibile operare l'apertura degli anelli epossidici conferendo al blocco glicidilico (GMA) proprietà idrofiliche sia grazie alla morfolina, che anche per la presenza di gruppi OH che si vengono a formare. Il polimero che si viene a formare il poli(2-idrossi-3-morfolinopropil metacrilato)-b-poli(metil metacrilato) PHMPMA-b-PMMA, possiede caratteristiche anfifiliche e questo lo rende perfetto per la formazione delle micelle a partire da una soluzione del copolimero in THF a cui viene aggiunta gradualmente acqua. Infine, sfruttando inoltre la reattività dei gruppi OH presenti nel blocco di PHMPMA è possibile realizzare un'ulteriore reazione di reticolazione sul guscio esterno idrofilico della struttura micellare in modo tale da garantire una sua maggiore stabilità (vedi paragrafo 1.8).

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

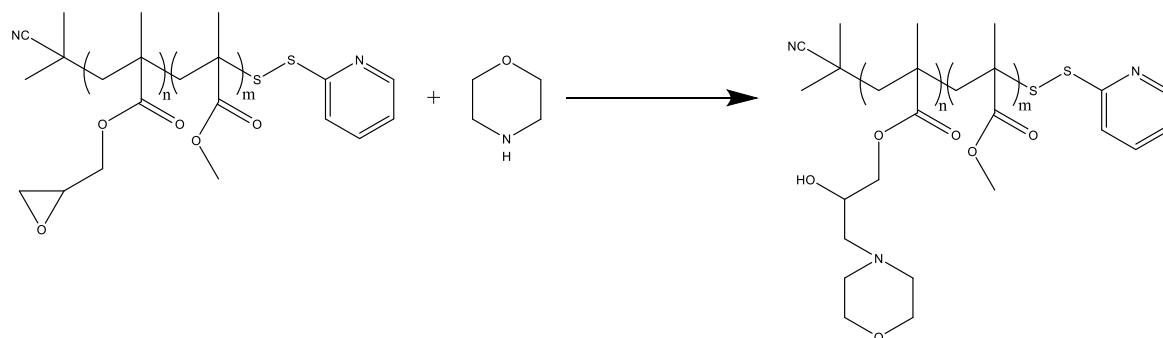
Il processo globale di funzionalizzazione comprende due stadi successivi, il primo svolto a temperatura ambiente (Schema 4) e l'altro a 80°C (Schema 5). Infatti, la morfolina già a basse temperature promuove una reazione di aminolisi sulla funzione ditiocarbossilica del gruppo RAFT causando l'eliminazione 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 4: Protezione del gruppo terminale 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'eossido 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 5: Funzionalizzazione del PGMA-b-PMMA con morfolina.

I dati più importanti del copolimero funzionalizzato così ottenuto sono riportati in Tabella 3:

Campione	t.reazione	PM_copol_th	PMn	PD
Pol.4	2h	52000	50000	1.10

Tabella 3: Dati relativi al PHMPMA-b-PMMA.

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

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

Equazione 2: Calcolo peso molecolare teorico del compolimero funzionalizzato con morfolina.

Mediante analisi GPC sono stati ottenuti i valori di polidispersità e del peso molecolare medio numerale PMn. Confrontando tra loro i cromatogrammi (Figura 30) è possibile osservare direttamente l'incremento di peso molecolare medio ottenuto passando da Pol.1 PGMA, Pol.3 PGMA-b-PMMA fino ad arrivare al Pol.4 PHMPMA-b-PMMA.



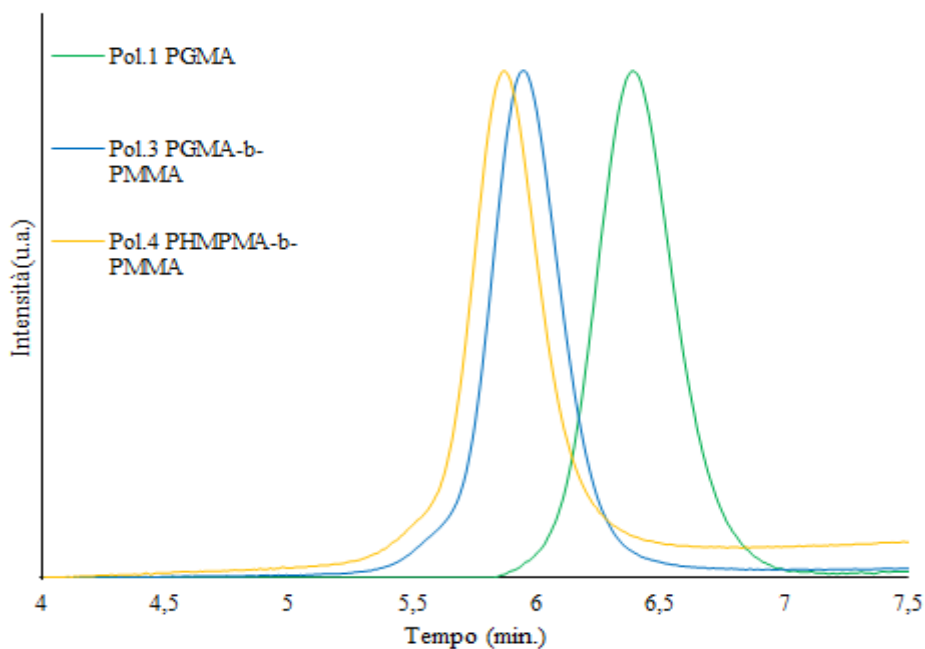


Figura 30: Cromatogrammi GPC di PGMA, PGMA-b-PMMA e PHMPMA-b-PMMA.

Infine, confrontando gli spettri  $^1\text{H}$  NMR dell'omopolimero, del copolimero di partenza e del copolimero funzionalizzato (Figura 31) si osserva chiaramente che la reazione è stata quantitativa. In particolare, si nota lo 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.

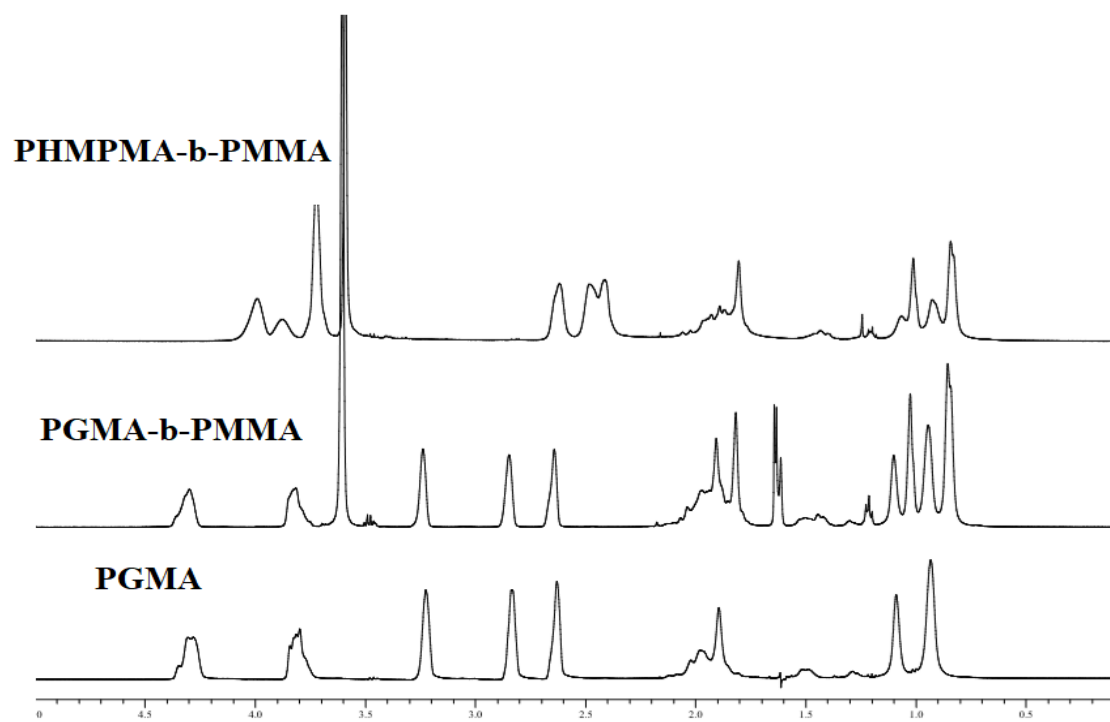


Figura 31:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ), confronto fra gli spettri NMR del Pol.1, Pol.3 e del Pol.4.

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

Dopo la funzionalizzazione con la morfolina il copolimero a blocchi (Pol.4) ha le caratteristiche adeguate ad auto-assemblarsi, con l'aggiunta di acqua, per formare le micelle polimeriche.

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

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 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 (composto dal PMMA) 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).

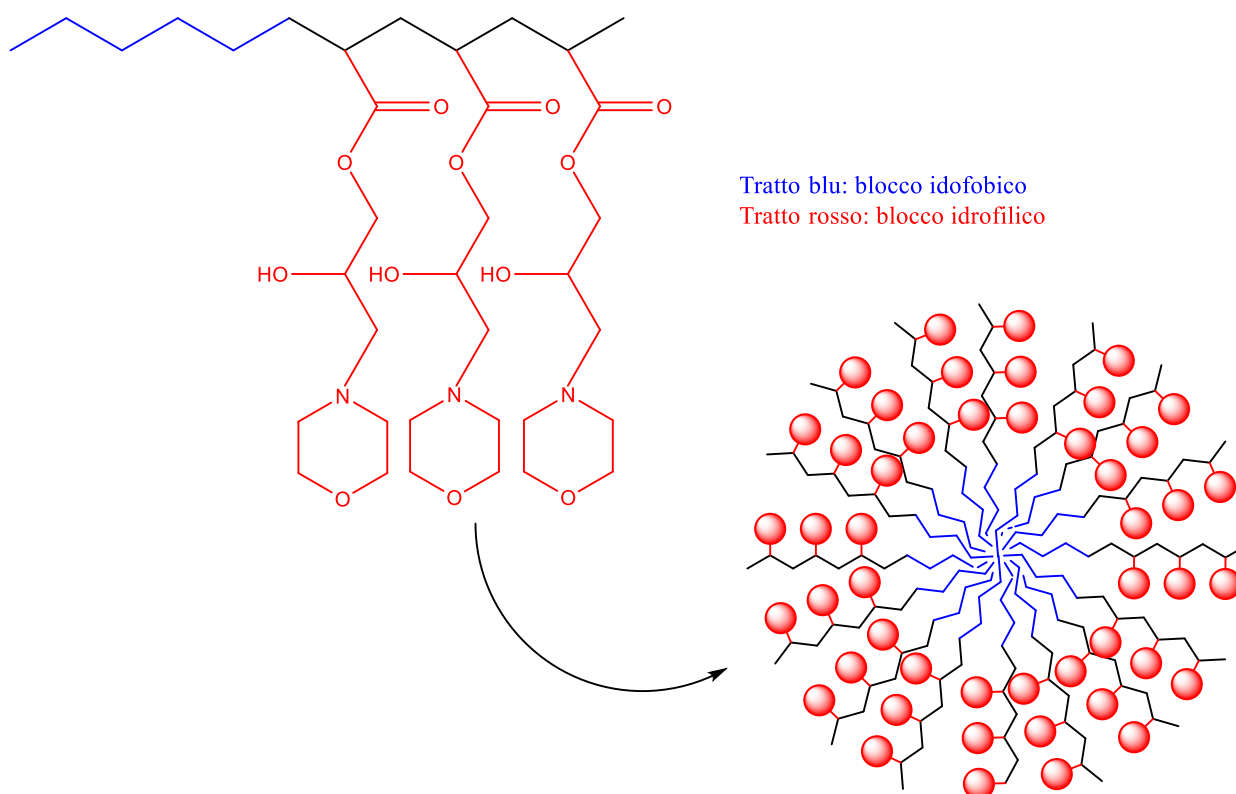


Figura 32: Processo di formazione delle micelle

Le micelle sono state purificate mediante dialisi per allontanare il THF dalla soluzione. Inizialmente, quando la concentrazione di polimero in THF + H<sub>2</sub>O era rispettivamente 2:1 le micelle che si andavano a caratterizzare alla DLS avevano una popolazione dell'ordine di grandezza del micron; ovviamente troppo grandi per i nostri scopi. Per disunire questi aggregati è stato necessaria una filtrazione delle sospensioni micellari con un filtro 0,45 µ. Per evitare quest'ultimo passaggio si è deciso di operare con una concentrazione polimero:soluzione 1:1, in questo modo si sono formate micelle con le giuste dimensioni nanometriche; come mostra la Tabella 4:

<b>Campione</b>	<b>Diametro Idrodinamico [nm]</b>	<b>Polidispersità</b>
<b>Mic.1</b>	30	0,36
<b>Mic.2</b>	30	0,32
<b>Mic.3</b>	30	0,35
<b>Mic.4</b>	30	0,30
<b>Mic.5</b>	40	0,12
<b>Mic.6</b>	40	0,19

Tabella 4: Caratteristiche delle micelle polimeriche preparate a partire da Pol. 4 con PM di 52000 Dalton.

La sospensione micellare risulta perfettamente limpida sia prima che dopo la purificazione in dialisi, mentre le micelle che presentavano popolazioni micrometriche risultavano torbide già prima della purificazione. Oltre all'analisi del raggio idrodinamico tramite la DLS si è provveduto ad effettuare un ulteriore studio sulle micelle; ovvero quello del Potenziale Zeta (o potenziale elettrocinetico). Il suo valore può essere correlato alla stabilità a breve e lungo termine delle sospensioni [20]. Le sospensioni con un elevato potenziale zeta (negativo o positivo) sono stabilizzate elettricamente mentre le emulsioni con un potenziale zeta basso tendono a coagulare o flocculare, portando probabilmente a una scarsa stabilità fisica. In generale, quando il potenziale zeta è elevato, le forze repulsive superano le forze attrattive, con il risultato di un sistema relativamente stabile.

<b>Campione</b>	<b>Potenziale Zeta [mV]</b>	<b>Mobilità [(<math>\mu</math>/s)/(V/cm)]</b>	<b>Conduttanza [<math>\mu</math>S]</b>
<b>Mic.1</b>	32,04	2,50	85
<b>Mic.2</b>	35,09	2,74	64
<b>Mic.3</b>	33,27	2,60	124
<b>Mic.4</b>	43,09	3,37	63

Tabella 5: Potenziale Zeta delle micelle polimeriche.

Dalla Tabella 5 si nota che tutti i campioni superano potenziali zeta di 30 mV. Questo porta a ritenere che le sospensioni siano piuttosto stabili, in particolare il campione Mic.4.

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

Le micelle polimeriche ottenute godono di una buona stabilità, tuttavia però le micelle polimeriche utilizzate clinicamente devono rimanere stabili dopo l'iniezione endovenosa. Per questo motivo esse, sono state sottoposte ad un'ulteriore reazione di funzionalizzazione sfruttando la reattività dei gruppi OH presenti sul guscio esterno (ottenuti grazie alla reazione con morfolina) in modo tale da ottenere una reticolazione esterna della struttura. Oltretutto, grazie a questo trattamento le micelle possono essere liofilizzate, allo scopo di effettuare ulteriori analisi di caratterizzazione, ad esempio termiche. Questa stabilizzazione è stata ottenuta facendo reagire le micelle con dopamina dando luogo a una reticolazione contenente polidopamina (PDA) sulla superficie esterna delle micelle. La polidopamina è una sostanza prodotta naturalmente dall'organismo umano e quindi, biocompatibile e biodegradabile e non comporta nessun problema di riconoscimento da parte del sistema immunitario. Dal punto di vista pratico la reazione è stata condotta aggiungendo una determinata quantità di una soluzione madre di dopamina alla sospensione micellare. Utilizzando vari campioni sono state condotte diverse prove per correlare la concentrazione in soluzione di dopamina nella sospensione con il grado di polimerizzazione/reticolazione. Sono stati condotti quattro esperimenti variando la concentrazione di dopamina, lasciando invariato però il tempo di reazione (16h). L'analisi DLS è stata effettuata dopo dialisi per eliminare il monomero non reagito; da questo primo studio si evidenzia la formazione di aggregati di particelle di dimensioni micrometriche, per cui è stato necessario effettuare una filtrazione (per ognuno dei

quattro campioni) con filtro 0,45 $\mu$ . Si ottengono così i valori di diametro idrodinamico e polidispersità delle micelle a diverse concentrazioni di dopamina (Tabella 6).

<b>Campione</b>	<b>Diametro Idrodinamico [nm]</b>	<b>Polidispersità</b>
<b>PDA_1 2mM</b>	30	0,29
<b>PDA_1 4mM</b>	30	0,28
<b>PDA_1 6mM</b>	30	0,31
<b>PDA_1 10mM</b>	30	0,26

Tabella 6: Caratteristiche delle micelle stabilizzate PDA.

I campioni si presentano con una gradazione di colore che va dal grigio chiaro (PDA\_1 2mM), fino al grigio scuro (PDA\_1 10mM), ciò è dovuto da una maggior grado di reticolazione di polidopamina, man mano che si aumenta la concentrazione iniziale di dopamina nell'ambiente di reazione (Figura 33). La polidopamina in soluzione infatti, ha un tipico color grigio/marrone.



Figura 33: Campioni di PDA\_1, da sinistra a destra 10mM, 6mM, 4mM e 2mM.

Un'indagine utile per verificare l'incremento di stabilità delle micelle reticolate con polidopamina prevede, come dimostrato precedentemente, l'analisi del potenziale zeta dei vari campioni. Da quest'analisi, si nota un andamento quasi lineare dell'aumento del

potenziale (e quindi di stabilità) in funzione della concentrazione di dopamina reagita, come mostrato in figura 34.

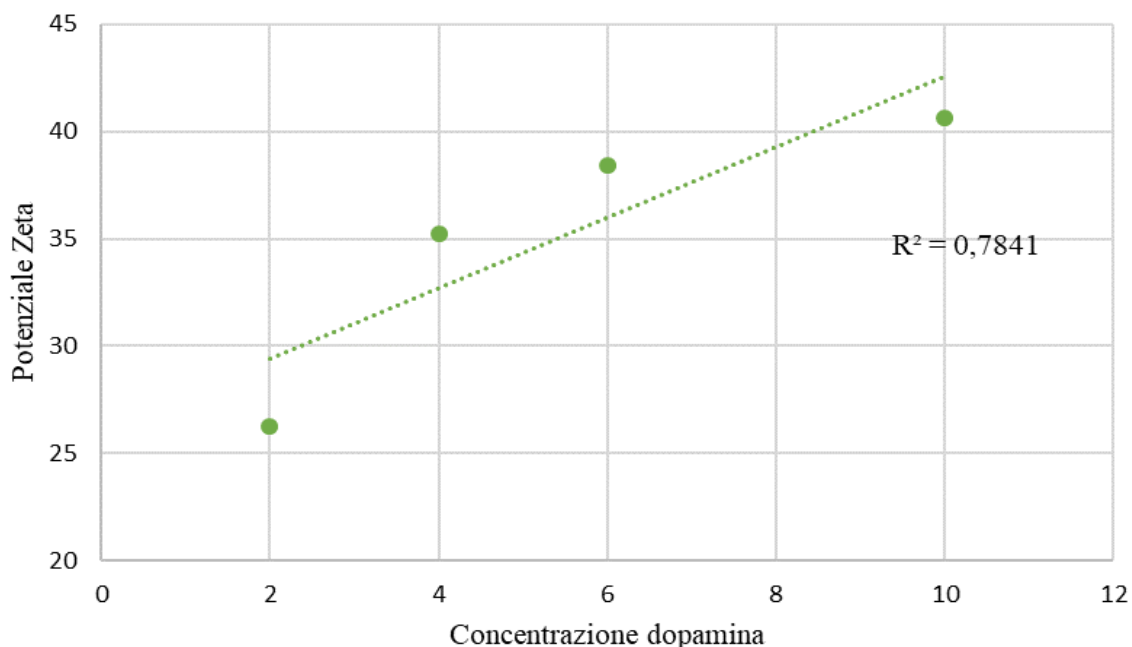


Figura 34: Variazione del potenziale zeta in funzione della concentrazione di dopamina.

La tecnica invece, utilizzata per studiare indirettamente la quantità di polidopamina presente è mediante spettrofotometria UV-Vis, nel range spettrale tra 250 e 850 nm, utilizzando come rivelatore dello strumento la sfera integratrice. 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 sovrastimato e quindi errato. Utilizzando la sfera integratrice si può quindi correlare il valore di assorbanza registrato da una sospensione acquosa di micelle, con il grado di polimerizzazione della polidopamina. 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)

In Figura 35 sono riportati gli spettri UV-Vis ottenuti, mentre in Figura 36 sono riportate le assorbanze ottenute a 400 nm, che rappresenta il miglior compromesso tra la maggiore assorbanza della PDA e l'interferenza di altri gruppi molecolari del polimero costituente le micelle.

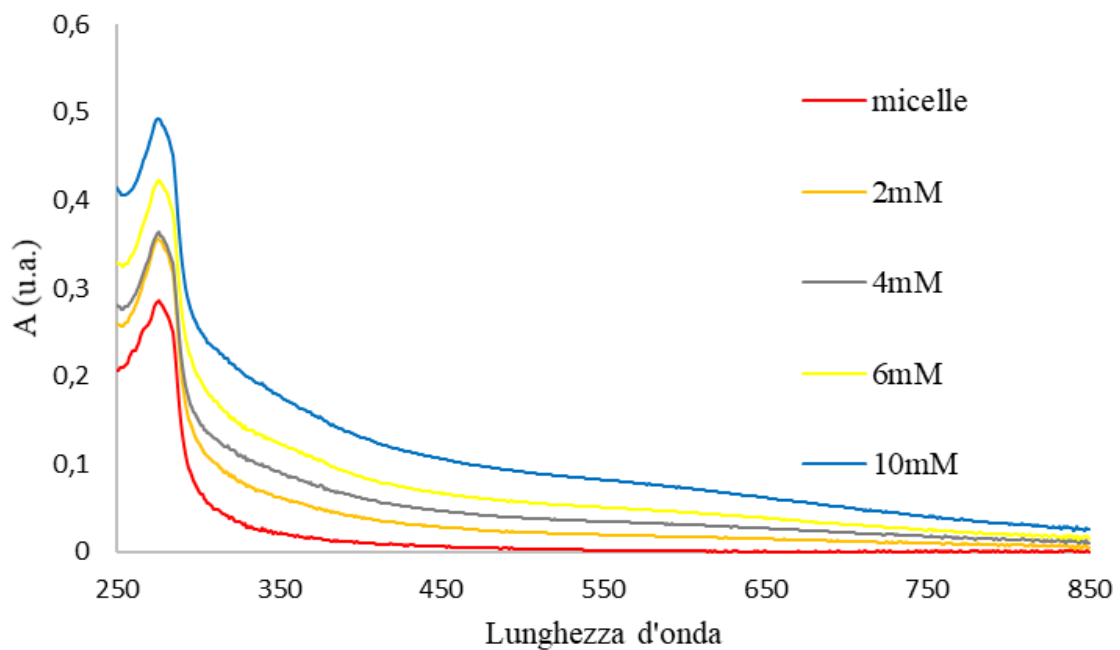


Figura 35: Spettri UV-Vis ottenuti con lo spettrofotometro con sfera integratrice.



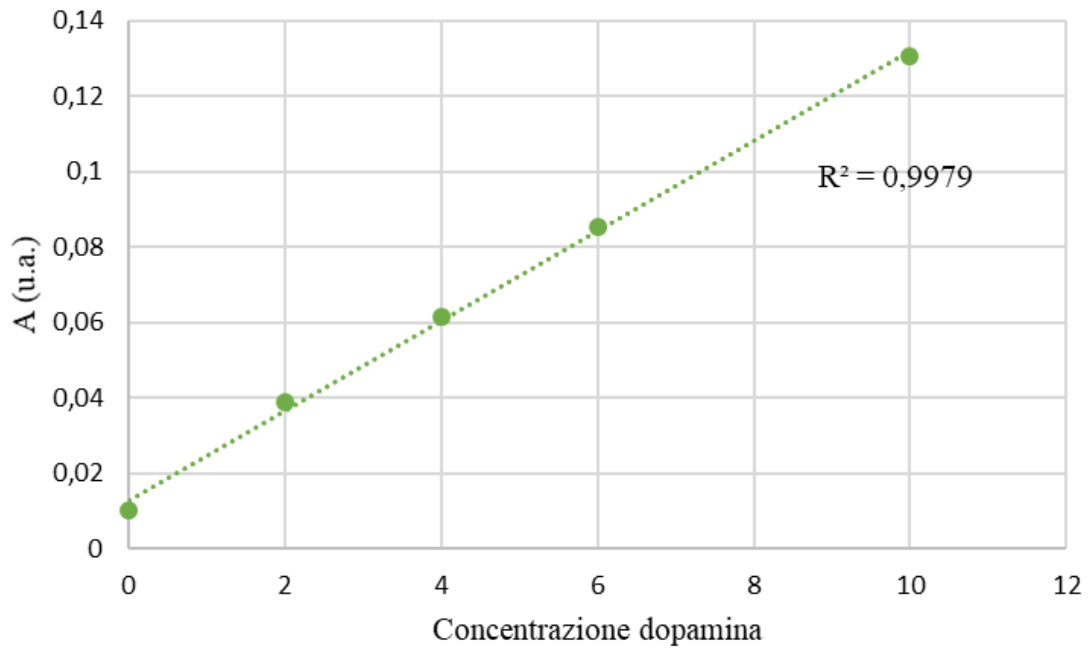


Figura 36: Assorbimento a 400 nm dei campioni PDA\_1 2, 4, 6 e 10 mM.

I dati ottenuti mostrano una netta linearità; è quindi possibile affermare che esiste una correlazione lineare tra la concentrazione di dopamina che ha reagito sul guscio esterno delle micelle e la sua concentrazione iniziale nell'ambiente di reazione. Il valore a concentrazione 0 di dopamina deriva dall'assorbimento delle micelle non reticolate.

### 3.5 Analisi termogravimetrica (TGA)

I prodotti polimerici ottenuti sono stati caratterizzati mediante TGA previa processo di liofilizzazione per allontanare l'acqua residua. L'analisi termogravimetrica (TGA), è stata 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>). Ciò ha permesso di quantificare la percentuale in peso di polidopamina presente nei campioni di micelle reticolati. Il copolimero Pol.4 senza polidopamina è stato utilizzato come standard per calcolare le percentuali di polidopamina residua degli altri campioni; non è stato possibile effettuare questa analisi sulle micelle senza PDA in quanto l'assenza di quest'ultima avrebbe portato alla loro distruzione durante il processo di liofilizzazione, in ogni caso il copolimero che le costituisce è sempre lo stesso. In Figura 37 sono riportati i termogrammi TGA della serie di campioni PDA1, ovvero il set di micelle ottenute a partire dal Pol.4 con concentrazione di dopamina variabile da 10mM a 2mM e medesimo tempo di reazione (16h).

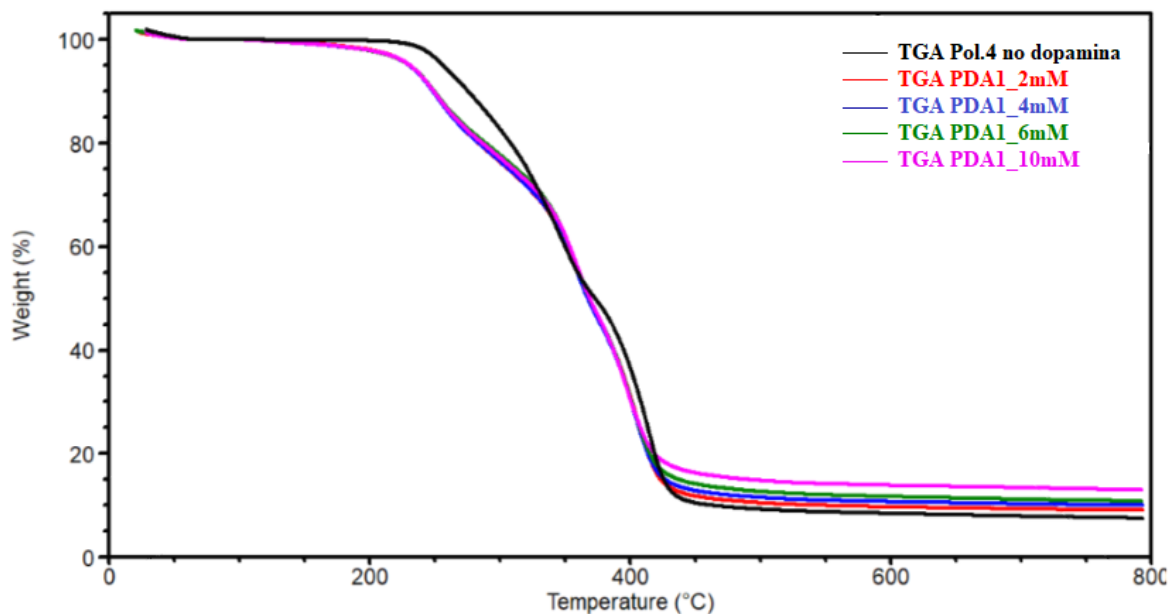


Figura 37: Degradazione TGA del PHMPMA-b-PMMA (nero, Pol.4) e dei campioni PDA1.

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. Il campione non reticolato (linea nera in figura 37) mostra una perdita di peso a circa 250°C attribuita alla degradazione del blocco di PMMA [21]. In letteratura è riportato che la polidopamina pura degrada in queste condizioni sperimentali lasciando un residuo molto maggiore rispetto ai copolimeri a blocchi investigati [22].

Il residuo di polidopamina a 800°C dei campioni reticolati cresce in maniera lineare (Figura 38) all'aumentare della concentrazione di dopamina iniziale; i valori % del residuo sono rappresentati in Tabella 7.

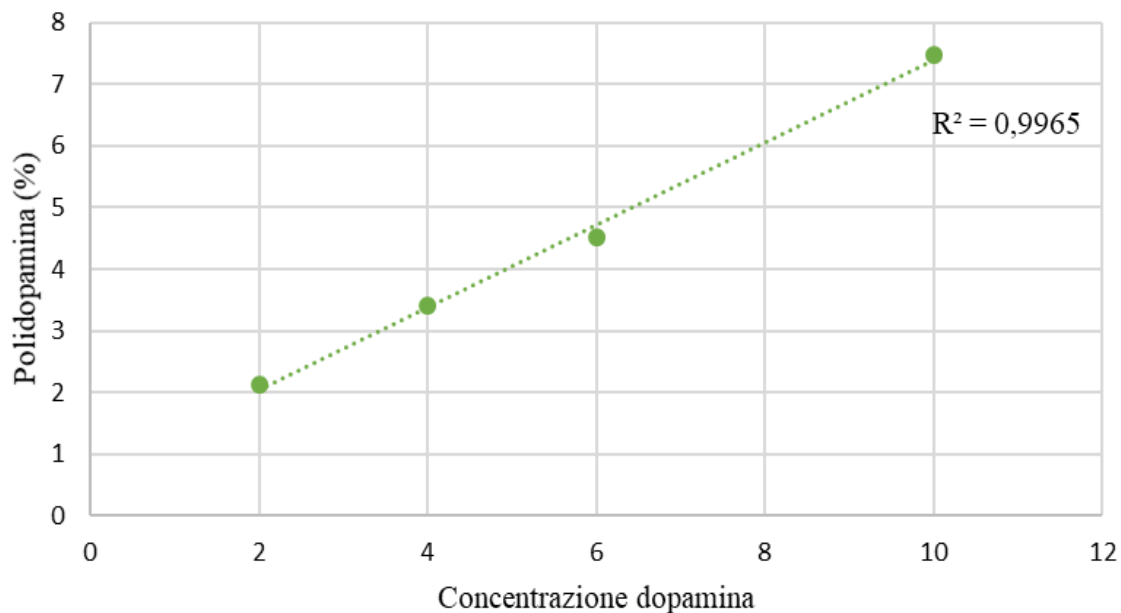


Figura 38: Residuo % di polidopamina a 800°C in funzione della concentrazione iniziale di dopamina.

<b>Concentrazione dopamina (mM)</b>	<b>Residuo PDA (%)</b>
<b>2</b>	2,124
<b>4</b>	3,398
<b>6</b>	4,513
<b>10</b>	7,466

Tabella 7: Percentuale in peso di polidopamina nei campioni PDA1 al variare della concentrazione iniziale di dopamina.

Mettendo quindi in relazione le 3 analisi: del potenziale zeta, spettrofotometrica UV-Vis e termogravimetrica (in particolare quest'ultime due), è stato possibile evidenziare una correlazione lineare tra il residuo calcolato a 800°C mediante TGA con i valori di assorbanza dei vari campioni reticolati. In futuro quindi la quantità di dopamina potrà essere quantificata con la più semplice analisi UV-Vis senza dover ricorrere alla più laboriosa (liofilizzazione ed essiccazione in stufa) analisi TGA, che tra l'altro è distruttiva.

### 3.6 Funzionalizzazione delle micelle polimeriche con acido folico, risultati dell'interazione polimero-acido folico tramite esperimenti DOSY

Tipicamente gli esperimenti DOSY (Diffusion-ordered spectroscopy) [23] forniscono un modo per analizzare i diversi composti in una miscela in base ai diversi coefficienti di diffusione (e quindi alle differenze nelle dimensioni, nella forma della molecola, nonché alle proprietà fisiche dell'ambiente circostante come viscosità, temperatura, ecc.) di ciascuna specie chimica in soluzione. Nel nostro caso invece, abbiamo sfruttato questa tecnica spettroscopica per evidenziare la presenza o meno di interazioni polimero-acido folico in base ai loro coefficienti di diffusione. Il coefficiente di diffusione viene misurato in  $\text{m}^2\text{s}^{-1}$  ed è più grande per molecole piccole e in solventi poco viscosi rispetto a molecole grandi in fluidi viscosi.

Gli spettri DOSY sono stati registrati a 600 MHz utilizzando la sequenza DBPPSTE, utilizzando un diffusion delay di 250 ms e un array di gradiente di campo da 1 a 65 G/cm in progressione quadratica. Per ciascun valore di gradiente di campo sono stati acquisiti 64 spettri. La sequenza di spettri è stata poi rielaborata dal Software VNMRJ-2.1D utilizzando i parametri standard dello strumento.

Inizialmente, sono state studiate le micelle (composte dal copolimero a blocchi PHMPMA-b-PMMA) reticolate con polidopamina, a concentrazione 10mM di dopamina iniziale, trattate con acido folico. Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR relativo è riportato in Figura 39.

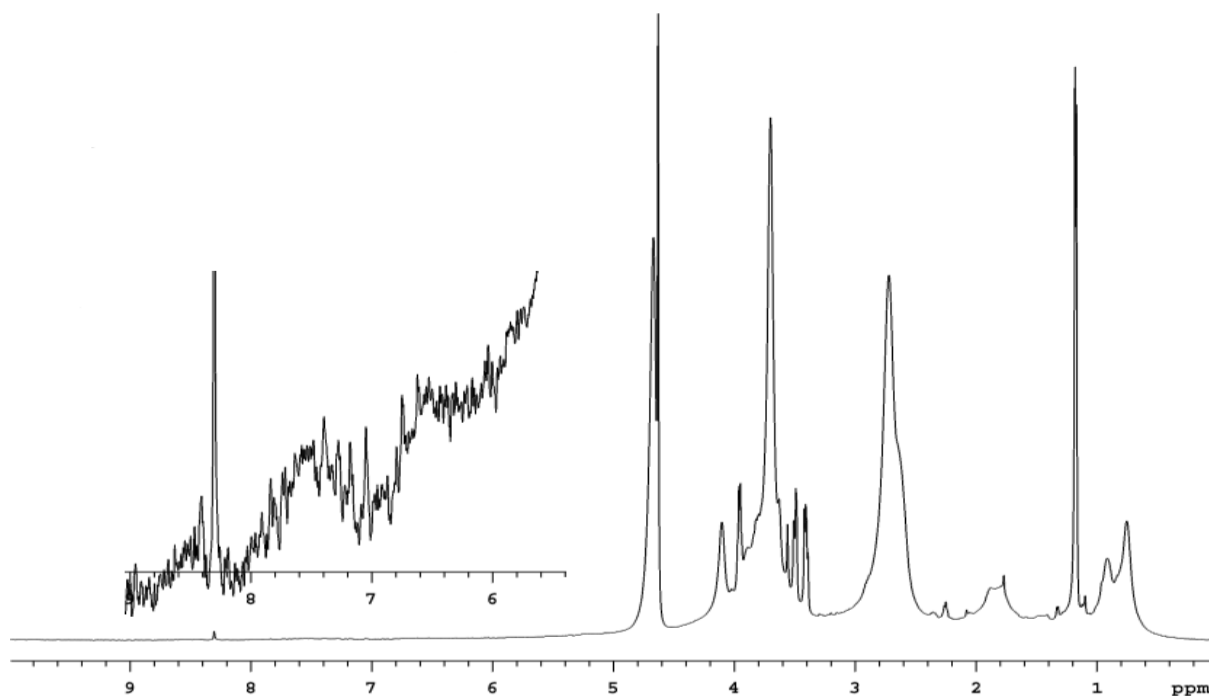


Figura 39:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz  $\text{D}_2\text{O}$ ), spettro NMR delle micelle reticolate (10mM) funzionalizzate con acido folico.

In questo primo esperimento non è stato possibile effettuare l'analisi DOSY poiché i segnali dell'acido folico sono estremamente larghi e di poco distinguibili dal rumore dello strumento; (vedi ingrandimento della zona aromatica). Questo primo dato sperimentale ha suggerito la presenza di una forte interazione polimero-acido folico in quanto i segnali di quest'ultimo risultano molto allargati dalla presenza del polimero, con il quale quindi condividono le caratteristiche magnetiche, in particolare per quanto riguarda il tempo di rilassamento  $T_2$ . Quindi, per poter confermare e verificare l'interazione tra il guscio esterno delle micelle e l'acido folico, sono stati effettuati altri esperimenti che consistono:

1. Interazione omopolimero (PHMPMA)-acido folico in  $\text{D}_2\text{O}$ .
2. Interazione omopolimero reticolato con polidopamina 2mM-acido folico in  $\text{D}_2\text{O}$ .
3. Interazione omopolimero reticolato con polidopamina 10mM-acido folico in  $\text{D}_2\text{O}$ .
4. Spettro DOSY acido folico in DMSO.

Nei paragrafi successivi (3.6.1, 3.6.2, 3.6.3, 3.6.4), andando ad analizzare i diagrammi DOSY risultanti da questi primi esperimenti, si nota una notevole differenza dei segnali del polimero (2.6, 3.6 e 4.0 ppm) e dell'acido folico (6.6, 7.6 e 8.6 ppm). Quindi, per facilitarne la lettura si è deciso di separarli in due diagrammi, quello riferito al polimero e quello all'acido folico.

### 3.6.1 PHMPMA - acido folico in D<sub>2</sub>O

Da questi spettri DOSY (Figura 40) si nota che i segnali del polimero sono molto più intensi dei segnali dell'acido folico che risultano allargati e quindi, di bassa intensità. Questo aspetto incide anche sulla difficile attribuzione ai segnali dell'acido folico di un valore esatto di coefficiente di diffusione. Il polimero ( $0.5 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ) e l'acido folico hanno coefficienti di diffusione pressoché identici, quindi hanno la stessa velocità di diffusione all'interno della soluzione di D<sub>2</sub>O, ciò fa intuire una forte interazione dell'acido folico con il polimero.

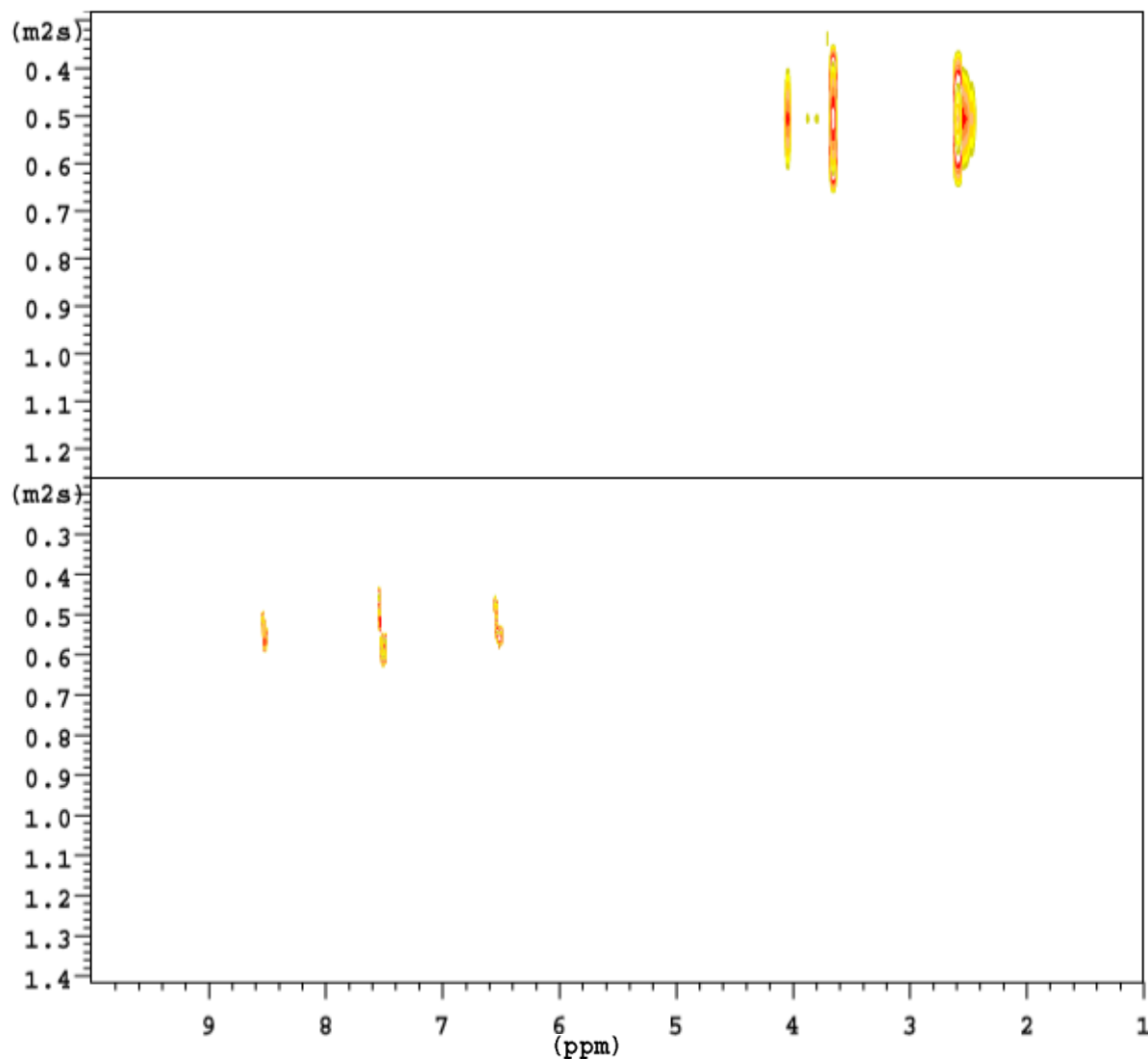


Figura 40: DOSY (600 MHz D<sub>2</sub>O), spettri DOSY, segnali dell'omopolimero (in alto) e dell'acido folico (in basso).

### 3.6.2 PHMPMA reticolato con polidopamina (2mM) – acido folico in D<sub>2</sub>O

Anche in questo esperimento il polimero ( $0.48 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ) e l'acido folico hanno quasi gli stessi valori di coefficiente di diffusione, quindi anche con la presenza di reticolazione della polidopamina le velocità di diffusione sono paragonabili (Figura 41).

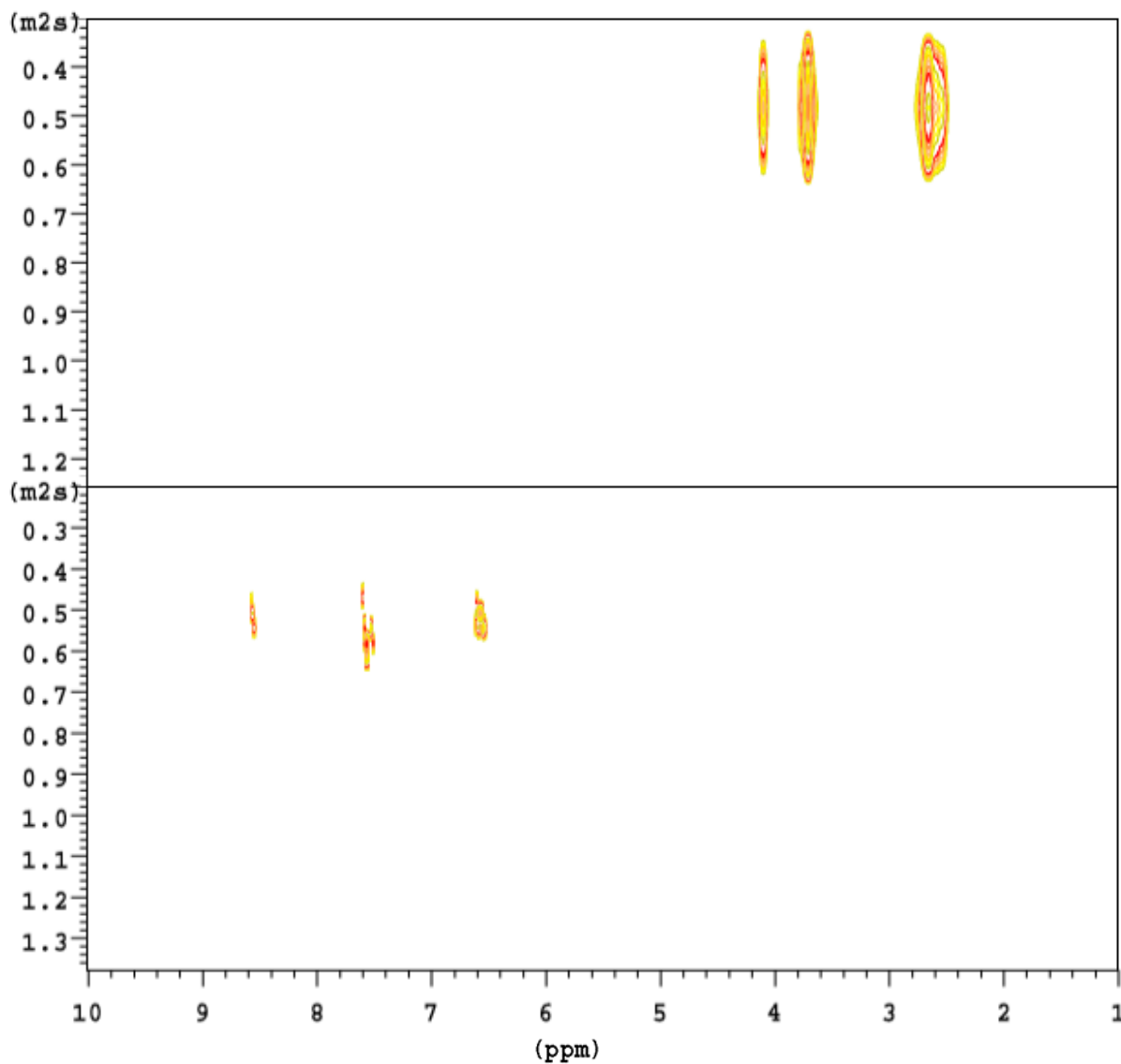


Figura 41: DOSY (600 MHz D<sub>2</sub>O), spettri DOSY, segnali omopolimero reticolato 2mM (in alto) e dell'acido folico (in basso).



### 3.6.3 PHMPMA reticolato con polidopamina (10mM) – acido folico in D<sub>2</sub>O

Anche in questo esperimento (Figura 42), il coefficiente di diffusione dell'omopolimero reticolato ( $0.43 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ) e dell'acido folico hanno valori paragonabili e portano a ritenere che esista una buona interazione tra i due componenti in soluzione. Il coefficiente di diffusione dell'omopolimero reticolato con polidopamina 10mM risulta essere leggermente più basso ( $0.43 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ) (Figura 42), rispetto ai valori mostrati da quello reticolato 2mM ( $0.48 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ) (Figura 41) e dell'omopolimero tal quale ( $0.5 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ) (Figura 40); ciò può essere spiegato dal fatto che una maggior reticolazione, porti ad un rallentamento della velocità di diffusione in soluzione.

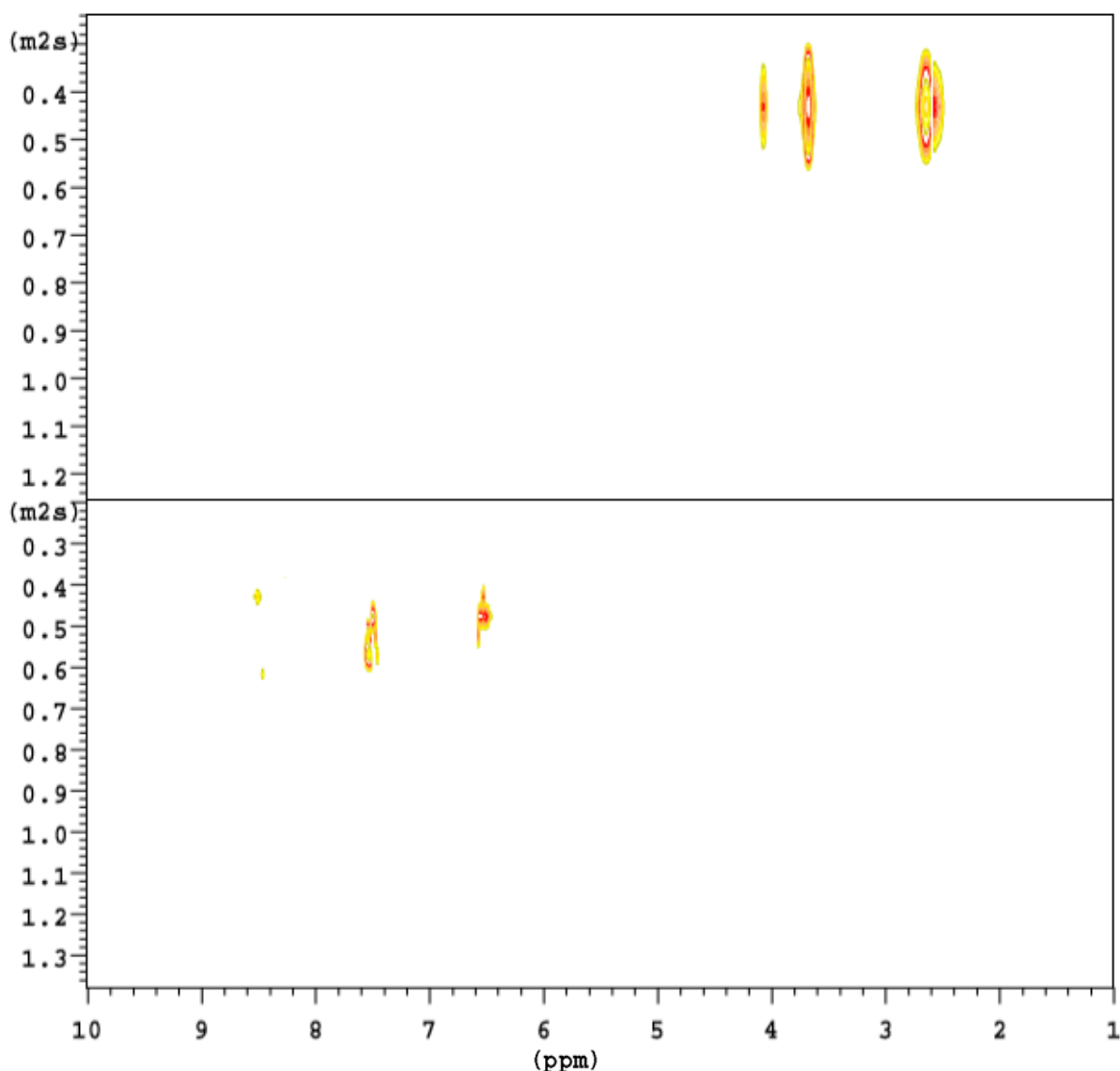


Figura 42: DOSY (600 MHz D<sub>2</sub>O), spettri DOSY, segnali omopolimero reticolato 10mM (in alto) e dell'acido folico (in basso).

### 3.6.4 Acido folico in DMSO

Per verificare invece che il coefficiente di diffusione del solo acido folico in soluzione si discosti dai valori analizzati precedentemente e si comporti quindi come una molecola di piccole dimensioni, abbiamo effettuato un esperimento DOSY del solo acido folico in DMSO; non è stato possibile compiere l'esperimento in D<sub>2</sub>O poiché l'acido folico non è solubile in acqua. Lo spettro ottenuto è riportato in Figura 43.

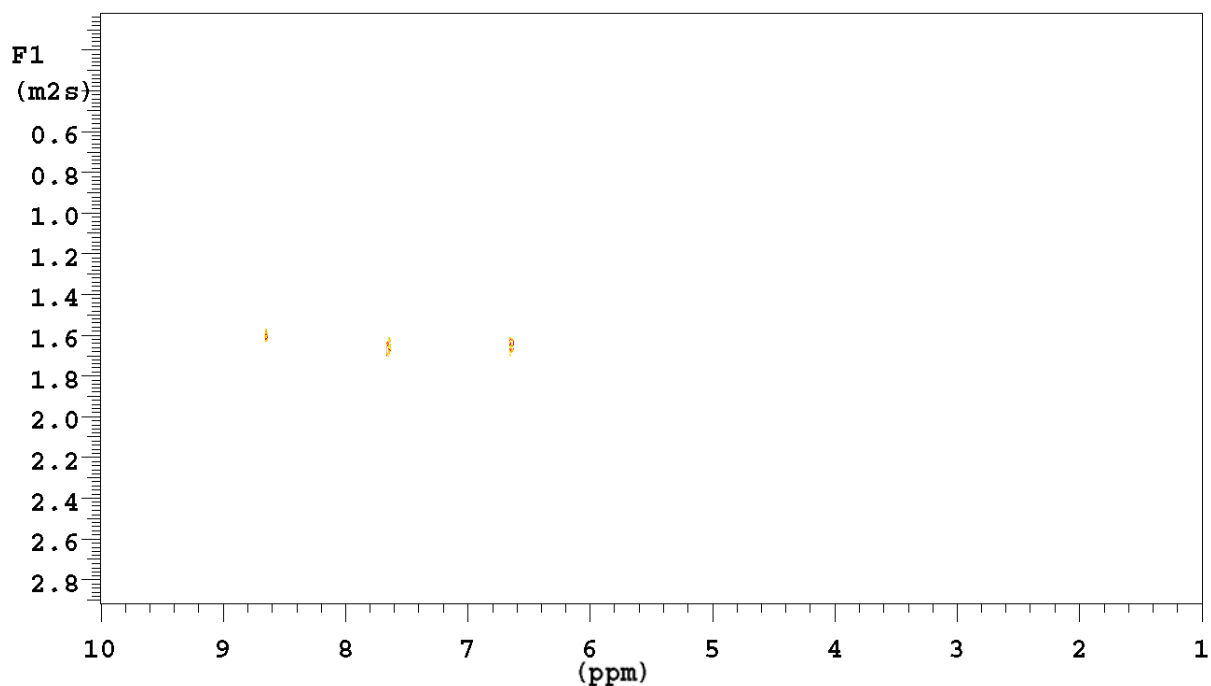


Figura 43: DOSY (600 MHz DMSO), spettro DOSY acido folico in DMSO.

I segnali dell'acido folico, oltre ad essere più stretti, hanno un coefficiente di diffusione triplo ( $1.66 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ) rispetto agli esperimenti precedenti. Considerando inoltre che il DMSO ha una viscosità più elevata ( $1.99 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ) della D<sub>2</sub>O ( $0.89 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ), se fosse stato possibile effettuare l'esperimento in acqua, in quest'ultimo solvente l'acido folico avrebbe un coefficiente di diffusione ancora più alto.

### 3.6.5 Conclusioni degli esperimenti DOSY

Al termine di questi esperimenti è stato dimostrato che l'omopolimero (sia in forma libera sia dopo reticolazione con PDA) e l'acido folico in soluzione acquosa sono fortemente associati e quindi è possibile confermare la tesi iniziale, ovvero la presenza di una forte interazione tra acido folico e micelle reticolate con polidopamina.

### 3.7 Funzionalizzazione delle micelle con cromoforo fluorescente Nile-Red

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 44).

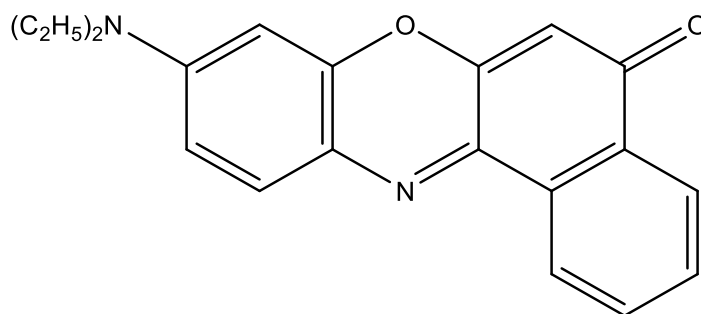


Figura 44: Struttura del Nile-Red.

Il Nile-Red [24] non ha cariche formali ed è intensamente fluorescente, tuttavia, in acqua, il colorante è scarsamente solubile e non mostra alcuna fluorescenza. Il suo cromoforo è altamente suscettibile alle variazioni della polarità del solvente e della costante dielettrica che conferisce a questo colorante un ampio intervallo solvatocromico. Il Nile-red è però solubile in molti solventi organici tra cui il THF (solvente usato per la preparazione di micelle), portando ad una soluzione di un colore rosso acceso. Il Nile-Red appartiene alla famiglia benzo[ $\alpha$ ]fenossazina ed in letteratura ne è riportato l'uso come coloranti istologici per l'imaging di lisosomi e lipidi in vitro. È stato quindi deciso di formare micelle polimeriche contenenti Nile-Red a partire da una soluzione in THF di copolimero e Nile Red (0,2mg); la progressiva aggiunta di acqua porta alla formazione delle micelle che contengono al loro interno la molecola cromoforica affine con la parte lipofila di poli(metil metacrilato). La soluzione micellare risulta di colore viola e ciò conferma l'avvenuta incorporazione della molecola all'interno del core idrofobico delle micelle. Successivamente alla dialisi si nota una leggera variazione di colore (da viola a fucsia) dovuta all'eliminazione del THF che è ripartito tra la soluzione acquosa e l'interno delle micelle; l'allontanamento del THF tramite dialisi porta alla formazione di un nucleo solido di PMMA all'interno delle micelle e ne provoca il cambiamento di colore. Una volta purificate le micelle ed allontanato il THF si è provveduto alla filtrazione della soluzione con filtro 0,45 micron; ottenendo i seguenti risultati DLS di diametro idrodinamico e polidispersità (Tabella 8):

<b>Campione</b>	<b>Diametro Idrodinamico (nm)</b>	<b>Polidispersità</b>
<b>NR1</b>	40	0,29
<b>NR2</b>	35	0,29
<b>NR3</b>	35	0,29
<b>NR4</b>	45	0,25

Tabella 8: Caratteristiche delle micelle marcate con cromoforo, Nile-Red.

Oltre all'analisi del diametro idrodinamico è stato verificato il potenziale zeta delle seguenti micelle che incorporano il fluoroforo (Tabella 9):

<b>Campione</b>	<b>Potenziale Zeta [mV]</b>	<b>Mobilità [(<math>\mu</math>/s)/(V/cm)]</b>	<b>Conduttanza [<math>\mu</math>S]</b>
<b>NR3</b>	30,06	2,35	98
<b>NR4</b>	28,87	2,26	183

Tabella 9: Potenziale Zeta delle micelle marcate con cromoforo, Nile-Red.

Successivamente le micelle sono state divise 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 dopo reazione con la dopamina ed ulteriore filtrazione con filtro da 0,45 micron sono riportati in Tabella 10:

<b>Campione</b>	<b>Diametro idrodinamico (nm)</b>	<b>Polidispersità</b>
<b>NR1_2mM</b>	35	0,26
<b>NR1_10mM</b>	35	0,23
<b>NR3_2mM</b>	30	0,26
<b>NR3_10mM</b>	30	0,27

Tabella 10: Caratteristiche delle micelle marcate con cromoforo, Nile-Red e reticolate con polidopamina.

È stato determinato anche il potenziale zeta delle micelle del campione NR3 (Tabella 11). I risultati mostrano, come previsto, un leggero aumento del potenziale in relazione alla concentrazione di dopamina presente:

<b>Campione</b>	<b>Potenziale Zeta [mV]</b>	<b>Mobilità [(<math>\mu</math>/s)/(V/cm)]</b>	<b>Conduttanza [<math>\mu</math>S]</b>
<b>NR3_2mM</b>	29,00	2,27	86
<b>NR3_10mM</b>	31,88	2,49	85

Tabella 11: Potenziale Zeta delle micelle marcate con cromoforo, Nile-Red e reticolate con polidopamina.

### 3.8 Funzionalizzazione delle micelle con acido folico

Successivamente agli esiti positivi riscontrati nel paragrafo 3.6, si è deciso di funzionalizzare le micelle reticolate con polidopamina e marcate con Nile-Red, con l'acido folico. Per poter confrontare l'inglobamento delle micelle all'interno delle cellule target sono stati preparati 5 campioni di soluzioni micellari ed un campione di Nile-Red in DMSO:

1. Nile-Red in DMSO, questo campione funge da "controllo", ovvero per verificare che le cellule si colorino in presenza di questo marcatore fluorescente.
2. Micelle contenenti il Nile-Red (Nude).
3. Micelle contendi Nile-Red e reticolate con polidopamina (2mM).
4. Micelle contendi Nile-Red e reticolate con polidopamina (2mM) e funzionalizzate con acido folico.
5. Micelle contendi Nile-Red e reticolate con polidopamina (10mM).
6. Micelle contendi Nile-Red e reticolate con polidopamina (10mM) e funzionalizzate con acido folico.

La funzionalizzazione con acido folico è stata effettuata aggiungendo una determinata quantità da una sospensione madre in acqua di acido folico (in quanto non solubile in acqua) all'interno dei due campioni di micelle reticolate (2 e 10mM), marcati con il Nile-Red.

### 3.9 Trattamento cellulare con micelle e risultati

Per il trattamento delle cellule sono stati effettuati una serie di esperimenti nel dipartimento di biologia dell'Università di Bologna con tre tipi cellulari differenti:

- CACO-2, cellule tumorali umane della mucosa del colon.
- NCM, cellule sane umane della mucosa del colon.
- SW620, cellule tumorali umane già in metastasi del colon, prelevate dai linfonodi.

Per ogni classe cellulare sono stati effettuati trattamenti con le micelle riportate nel paragrafo 3.8 e mantenute nei rispettivi terreni di coltura per 30 minuti e 2 ore, per un totale di 36 vetrini. Successivamente le cellule sono state analizzate al microscopio confocale. Nelle seguenti immagini (Figura 45, 46 e 47) non saranno presenti le cellule trattate con il Nile-Red in DMSO (controllo), poiché davano tutte esito positivo al microscopio e quindi, poco interessanti.

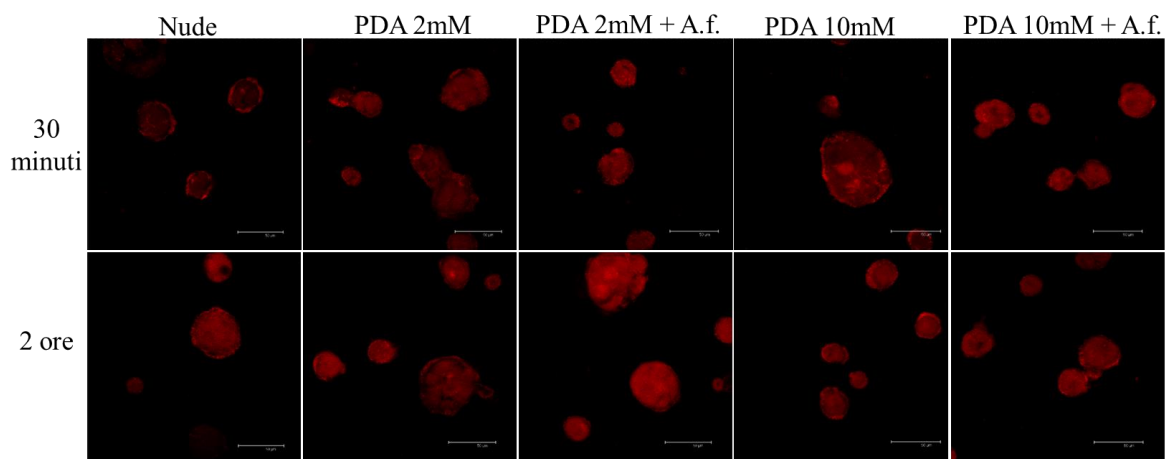


Figura 45: Trattamento delle cellule CACO-2, rilevate al microscopio confocale.

Tutti i tipi di micelle testate sono state inglobate all'interno delle cellule CACO-2. Confrontando le cellule dopo un trattamento di 30 minuti, le micelle “nude” risultano le meno fluorescenti, mentre si osserva un incremento leggero e graduale dell'intensità con le cellule trattate rispettivamente con le micelle PDA2mM e PDA2mM+A.f.. L'acido folico quindi, migliora leggermente l'inglobamento all'interno delle CACO-2. Valutando invece il risultato dopo 2 ore, si nota un leggero aumento della fluorescenza, rispetto ai 30 minuti, delle micelle “nude” e delle micelle reticolate con PDA 2 e 10mM. Un netto incremento della fluorescenza



si ha invece per le cellule trattate con le micelle PDA2mM+A.f. rispetto a quelle PDA2mM (a 2 ore). Da questi risultati è possibile dedurre un miglior inglobamento dovuto alla presenza sulla superficie esterna delle micelle dell'acido folico, che promuove meccanismi di internalizzazione cellulare mediati da recettori specifici per l'acido folico. La PDA rispetto alle micelle "nude" provoca un miglior inglobamento a causa del suo potenziale di carica, più positivo e quindi una interazione elettrostatica con la membrana cellulare che è negativa. Invece, le micelle PDA10mM+A.f. rispetto alle PDA10mM, presentano un medesimo comportamento. È quindi ipotizzabile a una minore disponibilità dell'acido folico che rimane maggiormente intrappolato sulla superficie micellare dalla trama più fitta di reticolazione della PDA.

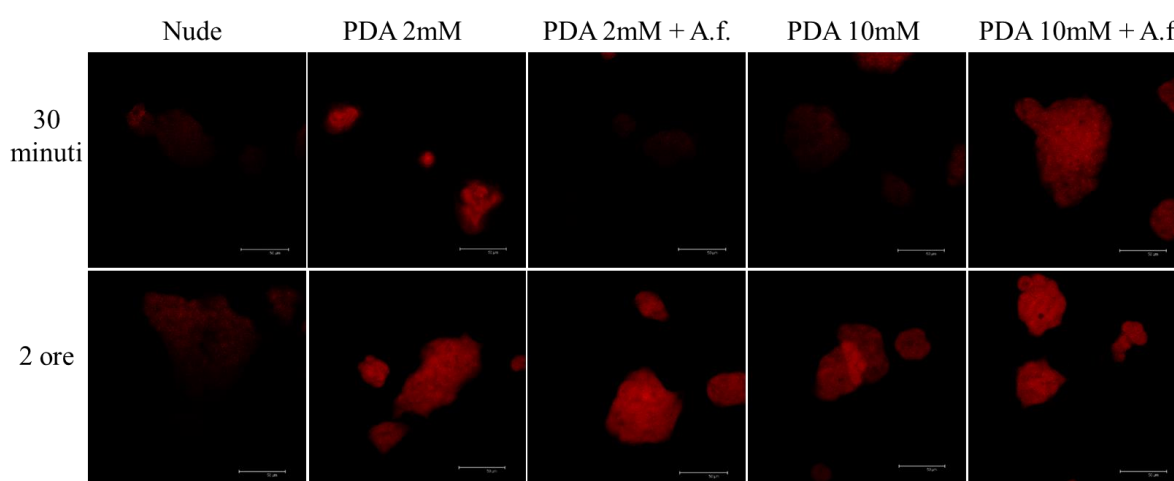


Figura 46: Trattamento delle cellule NCM, rilevate al microscopio confocale.

Le cellule NCM hanno forme differenti e sono più piccole dalle precedenti, in quanto si dispongono in aggregati cellulari anche molto ampi, per cui risulta complessa la valutazione visiva della fluorescenza poiché più le cellule sono stratificate più la fluorescenza risulterà marcata. In ogni caso si può notare dall'immagine in Figura 46 che, le micelle "nude" vengono assimilate con fatica anche dopo le 2 ore. A 30 minuti la PDA delle micelle PDA2mM incentiva l'inglobamento cellulare dovuto dall'effetto della carica positiva. Il PDA2mM+A.f., presenta esternamente cariche negative (dovute all'acido folico), e quindi dopo soli 30 minuti non si osserva fluorescenza e quindi non riesce ad entrare nelle NCM. A 2 ore invece il processo di internalizzazione, che per le NCM è più lento, avviene, con una colorazione omogenea delle cellule target. Infine, le cellule trattate con PDA10mM e PDA10mM+A.f., presentano comportamento inverso. A prescindere dall'interpretazione, si

può però notare un aumento della fluorescenza e quindi dell'internalizzazione favorito dalla presenza dell'acido folico.

Infine, le cellule SW620, più aggressive delle CACO-2, sono caratterizzate da processi di espulsione di “farmaci” o più in generale di tutte quelle sostanze non utili alla cellula (Figura 47).

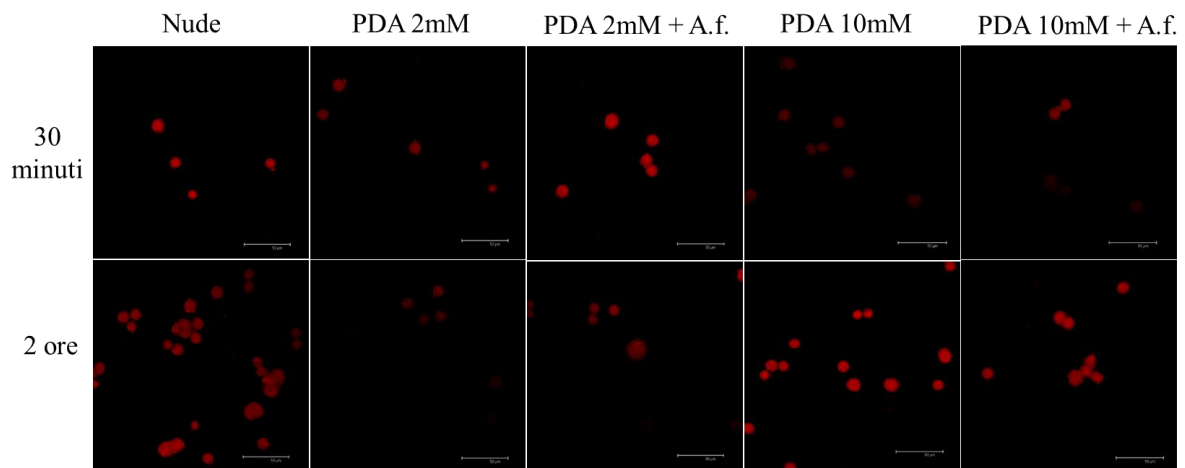


Figura 47: Trattamento delle cellule SW620, rilevate al microscopio confocale.

Questo aspetto si nota immediatamente utilizzando PDA2mM e PDA2mM+A.f., in cui la fluorescenza risulta maggiore nei primi 30 minuti e minore dopo 2 ore. Nelle micelle “nude” questo aspetto non si verifica poiché essendo quest’ultime non stabilizzate dal guscio di PDA, si disgregano rilasciando il Nile-Red nei distretti lipofili della cellula (lipoproteine e membrane degli organelli interni come i mitocondri). Infine, le micelle PDA10mM e PDA10mM+A.f. non risultano avere lo stesso andamento delle 2mM.

### 3.9.1 Conclusioni esperimenti biologici

Queste prime conclusioni ipotizzate in seguito ai trattamenti sulle cellule dovranno comunque essere confermate da ulteriori esperimenti effettuati dai biologi.

## 4. CONCLUSIONI

Tramite polimerizzazione RAFT è stato possibile sintetizzare il copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA, con peso molecolare controllato e bassi valori di polidispersità. Successivamente per apportare le caratteristiche anfifiliche, necessarie per l'autoassemblaggio delle micelle, questo è stato sottoposto ad un trattamento di post-polimerizzazione con morfolina, così da ottenere il copolimero funzionalizzato PHMPMA-b-PMMA. Una volta ottenuto il copolimero finale si dà luogo alla formazione delle micelle polimeriche, caratterizzate da un diametro idrodinamico di 30-40nm, ideali per l'utilizzo nel campo del drug delivery; è stata inoltre studiata la stabilità fisica, misurando il potenziale zeta delle sospensioni micellari, 30-40mV, verificando così la loro buona stabilità. Inoltre, grazie all'uso della dopamina, neurotrasmettitore presente nel cervello dei mammiferi, è stato possibile incrementare la stabilità fisica delle micelle con una polimerizzazione superficiale sul guscio esterno, portando ad avere un coating di polidopamina, sostanza biodegradabile e biocompatibile, utile quindi agli scopi di targeting attivo. Quest'ultima reazione è stata studiata con grande interesse correlando la concentrazione di dopamina iniziale presente nell'ambiente di reazione con il grado di polimerizzazione della PDA. Utilizzando l'analisi del potenziale zeta ma soprattutto dell'analisi UV-Vis dotata di sfera integratrice è stato possibile correlare il valore di assorbanza registrato con il grado di polimerizzazione della PDA. I risultati ottenuti suggeriscono che esiste una correlazione lineare, con valore di  $R^2$  prossimo ad 1, tra l'assorbanza registrata e la quantità di PDA presente nelle micelle. Un'ulteriore conferma del grado di polimerizzazione è stata data dall'analisi termica TGA in atmosfera inerte, la quale ha permesso di studiare la % di PDA residua durante la degradazione delle micelle preventivamente liofilizzate, mostrando anche in questo caso una dipendenza lineare del contenuto di residuo in peso a 800°C con la quantità di PDA presente nelle micelle al variare della concentrazione iniziale di dopamina in soluzione. In questo modo è stato possibile dimostrare che è possibile risalire al grado di polimerizzazione basandosi sull'assorbimento allo spettrofotometro con sfera integratrice delle micelle in acqua, evitando così l'analisi termica più laboriosa e distruttiva. Per poter incrementare la possibilità di inglobamento delle micelle all'interno delle cellule target, è stata effettuata un'ulteriore funzionalizzazione del guscio esterno delle micelle con l'aggiunta di acido folico, che è un nutriente fondamentale per la crescita e replicazione cellulare, all'interno della soluzione micellare. Per verificare l'interazione polimero-acido folico, sono stati effettuati esperimenti NMR DOSY, per studiare

i coefficienti di dispersione dei due componenti, tenendo in considerazione le varie combinazioni di polimero reticolato e non con l'acido folico. Questi hanno messo in evidenza una forte affinità (o legame) tra i due, in quanto i coefficienti di diffusione in soluzione si eguagliano. Infine, per verificare l'inglobamento delle micelle all'interno di cellule target per endocitosi, è stato necessario tracciarle con un cromoforo fluorescente, il NileRed. Ciò ha permesso di studiare anche il differente inglobamento a seconda della funzionalizzazione delle micelle. Da questi esperimenti è stato confermato che la PDA e soprattutto l'acido folico agiscono come molecole direzionanti e che incentivano l'internalizzazione all'interno delle cellule target. Questi risultati sperimentali rendono molto promettente l'utilizzo di questa famiglia di derivati polimerici per l'inglobamento e trasporto di antitumorali all'interno di cellule malate.

## 5. PARTE SPERIMENTALE

### 5.1 Solventi e reagenti

L'etilacetato e il toluene sono stati distillati prima del loro utilizzo, stessa cosa vale per il cloruro di metilene ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) che è stato anch'esso distillato per allontanare impurezze indesiderate. Tutti gli altri solventi (Sigma-Aldrich) sono stati utilizzati senza trattamenti preliminari. Per quanto riguarda i reagenti, l'agente RAFT è stato purificato tramite cromatografica flash con miscela eluente: 80% esano, 15%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 5% etilacetato. Il metilmetacrilato è stato filtrato su allumina e l'acido folico è stato purificato tramite trattamento acido e successiva ricristallizzazione. Mentre tutti gli altri reagenti utilizzati non hanno subito trattamenti di purificazione prima di essere utilizzati nelle reazioni di sintesi.

### 5.2 Strumentazione

#### 5.2.1 Spettrometri NMR

Per le analisi NMR è stato utilizzato uno spettrometro di risonanza magnetica nucleare Varian Mercury NMR System 400 MHz dotato del probe  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}/^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$  5mm IDPFG 400MHz. 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. Mentre lo spettrometro di risonanza magnetica nucleare Agilent DD2 NMR System 500 MHz è dotato del probe  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}/^{15}\text{N}$ - $^{31}\text{P}$  5mm PFG OneNMR; riferimento e parametri di acquisizione uguali ai precedenti. Infine, per gli esperimenti NMR DOSY è stato utilizzato uno spettrometro di risonanza magnetica nucleare Varian Mercury NMR System 600 MHz dotato di un probe indiretto (che porta ad un notevole aumento della sensibilità) a tripla risonanza.

#### 5.2.2 Gel Permeation Chromatography (GPC)

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.

### 5.2.3 Dynamic Light Scattering (DLS)

Le analisi di Dynamic Light Scattering (DLS) sono state effettuate utilizzando un Brookhaven NanoBrook Omni a temperatura costante di 25°C, utilizzando cuvette in policarbonato per le analisi condotte in acqua e cuvette in quarzo per le analisi condotte in presenza di solventi organici.

### 5.2.4 Zeta Potenziale

Le analisi del potenziale zeta sono state effettuate utilizzando un Brookhaven NanoBrook Omni a temperatura costante di 25°C utilizzando cuvette in policarbonato, all'interno delle quali viene immerso un elettrodo per la misura del potenziale; per queste misurazioni è stato utilizzato un gruppo elettrodo di tipo Uzgiris, mostrato in figura:

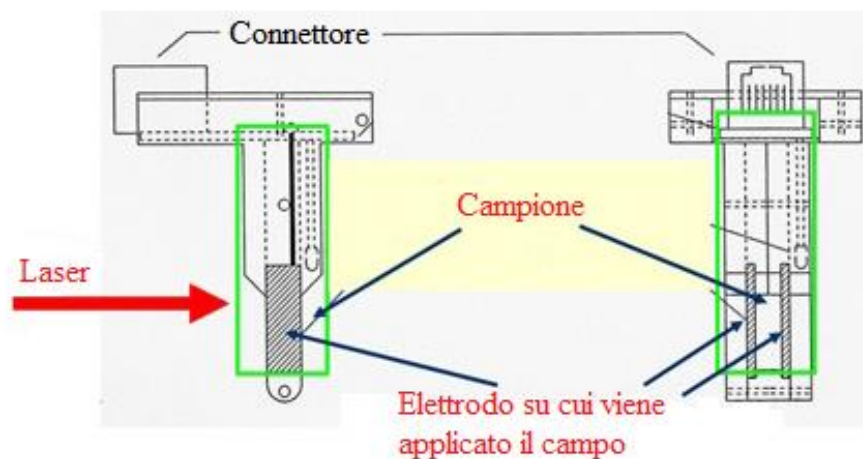


Figura 48: Elettrodo per la misurazione del potenziale zeta.

### 5.2.5 Spettrofotometria UV-Vis

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.

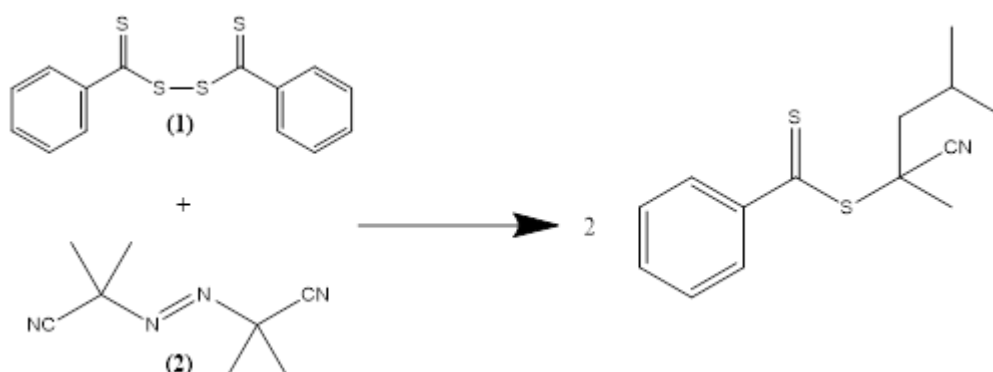
### 5.2.6 Termogravimetria (TGA)

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 sottovuoto 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 agente RAFT (2-ciano-4-metilpentan-2-il ditiobenzoato)

La reazione viene condotta seguendo il seguente schema:

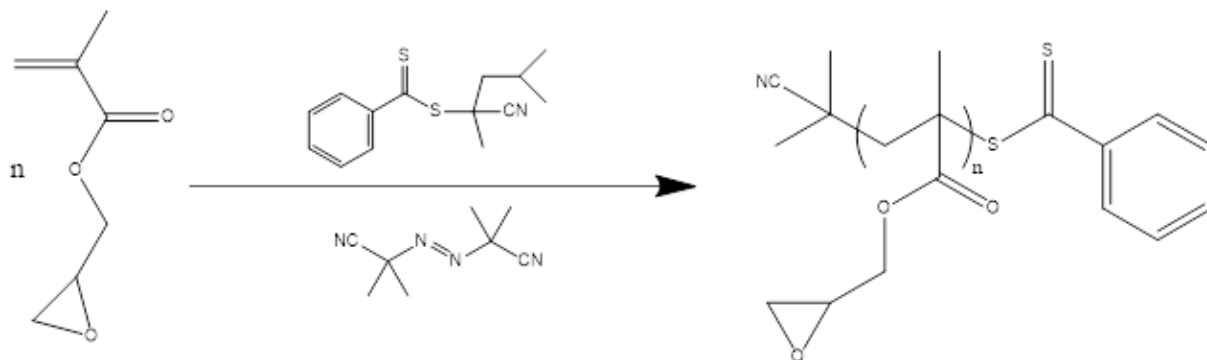


In un pallone a due colli da 250 ml, munito di agitatore magnetico e in atmosfera di  $N_2$ , si mettono 0,429 g di disolfuro (1) e 0,402 g di AIBN (2) e si sciolgono in 120 ml di etilacetato. Si effettuano 5 cicli di vuoto/ $N_2$  per eliminare l'ossigeno dall'ambiente di reazione. Successivamente si inserisce il pallone in un bagno d'olio a  $85^\circ C$ , continuando a riflussare per 16 ore. Si elimina il solvente e si purifica il prodotto tramite cromatografia flash, inizialmente è stata usata la miscela eluente 85% esano, 15% etilacetato; ottenendo però un prodotto non del tutto purificato (verifica tramite NMR). Si è quindi deciso di effettuare una seconda purificazione con miscela eluente 80% esano, 15%  $CH_2Cl_2$ , 5% etilacetato. Il prodotto si presenta come un liquido molto viscoso dal colore rosso intenso. Resa 51%.

$^1H$  NMR (500 MHz  $CDCl_3$ ),  $\delta$ : [1.07 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H); 1.12 (d,  $J = 7.8$  Hz, 3H) ( $CH(CH_3)_2$ ); [1.88 /dd,  $^1J = 14.1$  Hz,  $^2J = 5.6$  Hz, 1H); 2.24 (dd,  $^1J = 14.1$  Hz,  $^2J = 6.6$  Hz, 1H) ( $CH_2$ ); 1.95 (s, 3H,  $C(CH_3)-CN$ ); 2.08 (m, 1H,  $CH_2CHMe_2$ ); 7.39 (dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 7.4$  Hz, 2H, m-ArH); 7.53 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, p-ArH); 7.89 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, o-ArH).

## 5.4 Sintesi del poli(glicidil metacrilato)

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

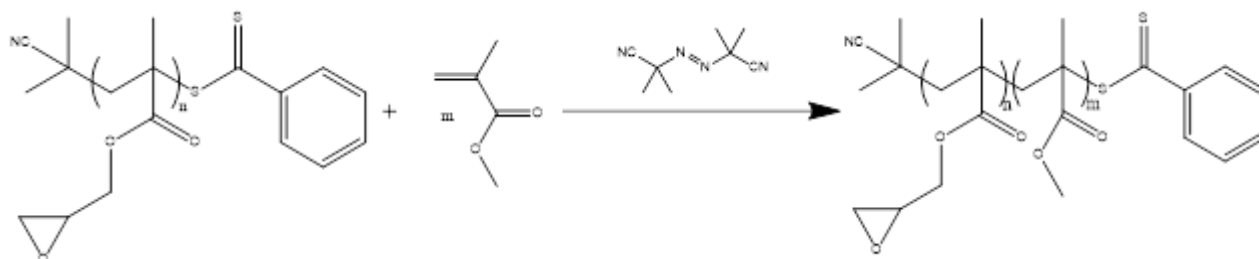


Il rapporto molare fra i tre reagenti (monomero/RAFT/AIBN) è: 675/1/0,05.

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. Abbiamo suddiviso la soluzione da 10 ml in 2 aliquote da 5 ml, ognuna viene posta all'interno di un'ampolla di reazione e si attuano 4 cicli sotto alto vuoto ( $\sim 10^{-5}$  atm) 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 (Pol.1) e 5 ore (Pol.2). Trascorsi questi tempi, le soluzioni vengono concentrate al rotavapor e al distillatore Kugelrohr per portare via la maggiore quantità possibile di solvente e di monomero non reagito. I campioni vengono sciolti in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e precipitati 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  $^1\text{H}$  NMR. Il valore di conversione è stato ottenuto prelevando un'aliquota dalla miscela di reazione 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), seguendo il seguente schema di reazione:



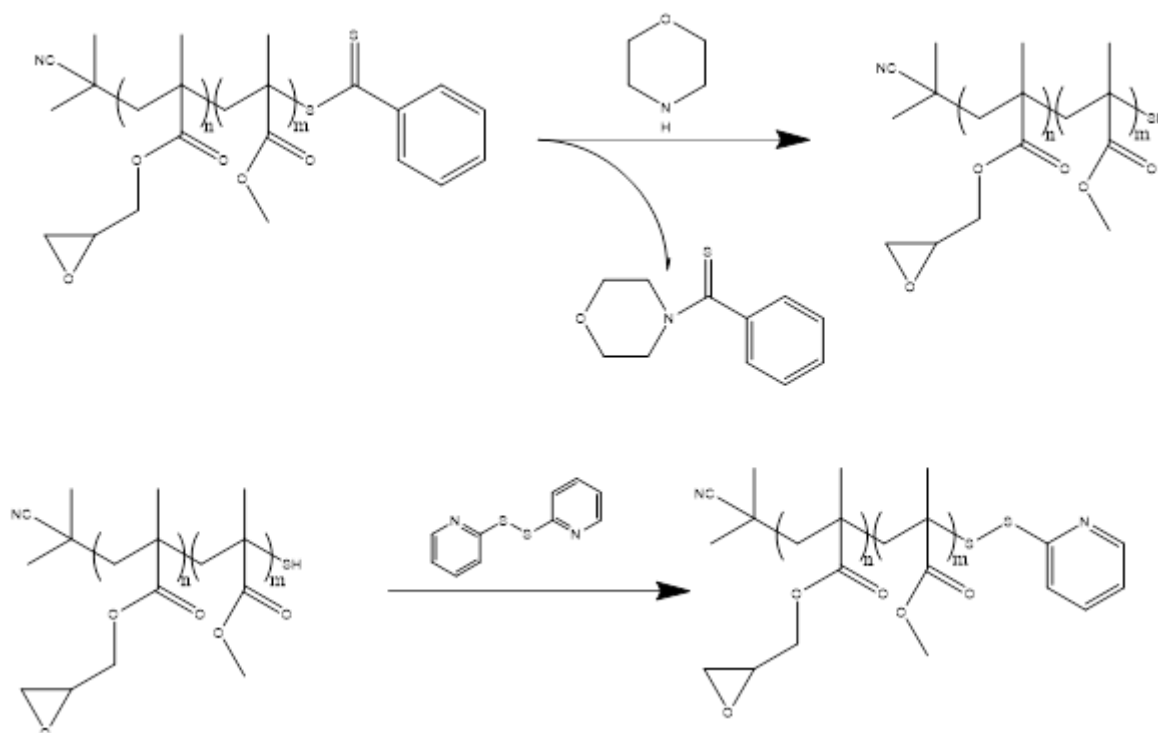
Il rapporto molare fra i tre reagenti (monomero/macroRAFT/AIBN) è: 1200/1/0,05.

In un matrecio da 5 ml si introducono 548 mg di PGMA macroRAFT con pochissimo solvente ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) e 3,5 ml di metil-metacrilato; dopo completa solubilizzazione si aggiungono 0,22 mg di iniziatore (AIBN) e si porta a volume con  $\text{CH}_3\text{CN}$ . La soluzione viene posta all'interno dell'ampolla di reazione e dopo aver effettuato 4 cicli sotto alto vuoto di congelamento con azoto liquido e scongelamento con acqua calda, allo scopo di allontanare l'ossigeno. La reazione viene condotta in un bagno d'acqua termostata a  $70^\circ\text{C}$  per 5 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 etere etilico. 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'NMR.

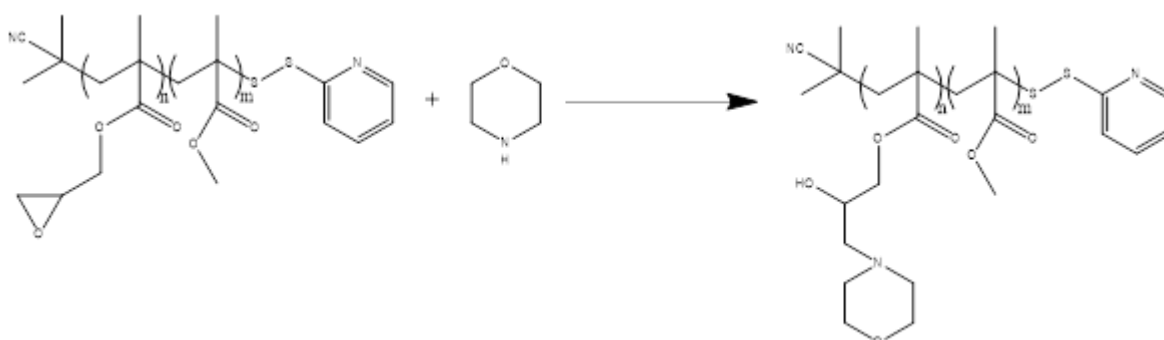
## 5.6 Reazione di funzionalizzazione con la morfolina e ottenimento di PHMPMA-b-PMMA

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 giungere 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 1,70 mg di disolfuro ed il tutto viene sciolto con 2,5 ml di N-metilpirrolidone (NMP). Dopo completa solubilizzazione grazie all'agitazione, si aggiungono 0,44 ml di morfolina e si lascia reagire a temperatura ambiente per 30 minuti in modo tale da proteggere il gruppo terminale (stadio 1); successivamente il pallone viene immerso in un bagno d'olio a 80°C e la reazione viene condotta per 2 ore (stadio 2). 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  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /etere etilico per precipitare il polimero. La soluzione viene filtrata tramite pompa a vuoto ed il prodotto di reazione viene posto in un essiccatore sottovuoto per allontanare le tracce di solvente ancora presenti. Il campione viene analizzato tramite GPC, in modo tale da ottenere i valori di PM e polidispersità, e spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR.

## 5.7 Formazione delle micelle polimeriche

In una provetta si solubilizzano 6 mg di copolimero a blocchi PHMPMA-b-PMMA 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, il volume finale risulta 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. Infine, si caratterizza il campione tramite tecnica DLS e si misura il potenziale zeta.

## 5.8 Stabilizzazione delle micelle con polidopamina, a concentrazione di dopamina variabile

La procedura per la formazione delle micelle è riportata nel paragrafo 5.7; in questo caso sono stati preparati 8 batch di micelle, ognuno a partire da 6 mg di copolimero PHMPMA-b-PMMA, 1 ml di THF e 5 ml di acqua. Una volta che le micelle sono state purificate e caratterizzate (DLS e potenziale zeta), vengono riunite e portate a volume con H<sub>2</sub>O deionizzata fino a 52 ml e divise in quattro aliquote da 13 ml. Ad ogni campione viene aggiunta la quantità di una soluzione madre di dopamina necessaria per raggiungere le concentrazioni desiderate, ovvero: 0,01 M, 0,006 M, 0,004 M e 0,002 M. Si lascia reagire al buio per 16 ore ed infine ogni campione viene filtrato con filtro da 0,45 micron e caratterizzato tramite tecnica DLS, potenziale zeta e UV-Vis con sfera integratrice.

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

In una provetta si introducono 5 mg di copolimero a blocchi PHMPMA-b-PMMA e 0,2 mg di Nile-Red e si solubilizza con 1 ml di THF. La procedura per la formazione delle micelle è riportata nel paragrafo 5.7; in questo caso sono stati preparati 2 batch di micelle. Una volta che le micelle sono state purificate e filtrate con filtro da 0,45 micron, vengono riunite e portate a volume con H<sub>2</sub>O deionizzata fino a 14 ml e divise in due aliquote da 7 ml. Ad ogni campione viene aggiunta la quantità di una soluzione madre di dopamina necessaria per raggiungere le concentrazioni desiderate, ovvero: 0,01 M, e 0,002 M. Si lascia reagire al buio per 16 ore. Ogni campione viene filtrato nuovamente e caratterizzato tramite tecnica DLS, potenziale zeta, e UV-Vis con sfera integratrice.



## 5.10 Funzionalizzazione delle micelle contenenti Nile-red con acido folico

Il trattamento con acido folico è avvenuto preparando una sospensione madre di acido folico, addizionandone nelle soluzioni micellari una quantità tale che si potesse riprodurre la concentrazione presente nel terreno di coltura cellulare. Una volta ottenuti i campioni di micelle reticolate del paragrafo 5.9, se ne preleva 2ml da ognuno e si aggiunge 0,2ml di sospensione di acido folico, così da ottenere una concentrazione finale in ogni campione di 4mg/l. Successivamente è stato verificato alla DLS che il diametro idrodinamico delle micelle con acido folico fosse uguale alle micelle non trattate.

## 5.11 Tecniche di analisi

### 5.11.1 Dynamic Light Scattering (DLS)

Dynamic Light Scattering [25] (DLS, noto anche come Photon Correlation Spectroscopy) è una delle tecniche di diffusione della luce più usate per il dimensionamento di particelle fino a 1nm di diametro. Tipicamente le sue applicazioni sono sviluppate su emulsioni, micelle, polimeri, proteine, nanoparticelle o colloidi. Questa tecnica si basa sul moto browniano delle particelle disperse. Quando le particelle vengono disperse in un liquido, si muovono casualmente in tutte le direzioni, causando anche scontri con molecole di solvente. Queste collisioni causano il trasferimento di una certa quantità di energia, che induce il movimento delle particelle. Di conseguenza, le particelle più piccole si muovono a velocità più elevate rispetto alle particelle più grandi. La relazione tra la velocità delle particelle e la dimensione delle particelle è data dall'equazione di Stokes-Einstein [26]. La velocità delle particelle è data dal coefficiente di diffusione traslazionale  $D$ . Inoltre, l'equazione include la viscosità del disperdente e la temperatura poiché entrambi i parametri influenzano direttamente il movimento delle particelle.

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

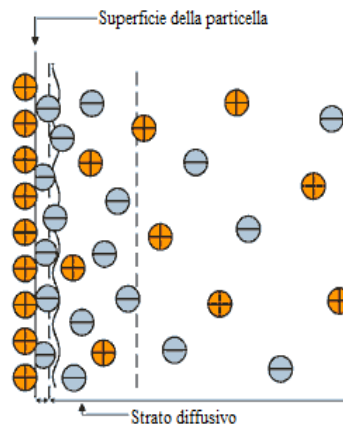
Dove:

- $D$  è il coefficiente di diffusione;
- $k_B$  è la costante di Boltzman;
- $T$  è la temperatura in 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.

### 5.11.2 Zeta Potential

Il potenziale Zeta [27] è la carica del doppio strato elettrico che si sviluppa all'interfaccia tra una superficie solida e il suo mezzo liquido, misurato in MilliVolts. Questo doppio strato è costituito da due parti, una regione interna che include ioni legati alla superficie e una regione esterna in cui un equilibrio di forze elettrostatiche e movimento termico casuale determina la distribuzione degli ioni.



Fondamentalmente [28], per determinare il potenziale zeta, si tiene traccia della velocità con cui una particella carica si muove in risposta a un campo elettrico. Le particelle che possiedono un potenziale zeta migreranno verso l'elettrodo caricato opposto. Il tasso di migrazione è proporzionale al potenziale zeta. Il principio fisico fondamentale è quello dell'elettroforesi. Una dispersione viene introdotta in una cella contenente due elettrodi. Un campo elettrico viene applicato agli elettrodi e particelle o molecole che hanno una carica netta, o più strettamente un potenziale zeta netto, migreranno verso l'elettrodo caricato opposto con una velocità, nota come mobilità, che è correlata al loro potenziale zeta.

$$\mu_{ep} = \frac{\varepsilon_1 \varepsilon_0 \zeta}{\eta}$$

Dove:

- $\mu_{ep}$  è la mobilità elettroforetica;
- $\varepsilon_1$  è la costante dielettrica del liquido;
- $\varepsilon_0$  è la costante dielettrica del vuoto;
- $\zeta$  è il potenziale zeta;
- $\eta$  è la viscosità del liquido.

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

La cromatografia a permeazione di gel [29], chiamata anche cromatografia di esclusione dimensionale (SEC), è attualmente il metodo di gran lunga più comune per la separazione e la caratterizzazione molecolare di polimeri sintetici. Il SEC è anche ampiamente usato per la separazione di vari polimeri naturali e per la purificazione di campioni complessi. Il metodo è veloce, semplice, piuttosto economico, ripetibile e il consumo di campione è ridotto. In genere uno strumento GPC è composto da:

- una pompa, che fornisce il polimero in soluzione attraverso il sistema;
- un iniettore, che introduce la soluzione polimerica nella fase mobile;
- una colonna, che separa in modo efficiente i componenti del campione l'uno dall'altro, all'interno della quale è presente una fase stazionaria; in questo caso si tratta di una resina stirene-divinilbenzene;
- un rivelatore, che monitora la separazione e risponde ai componenti mentre eluiscono dalla colonna;
- apparecchiature automatiche per l'elaborazione dei dati, le quali calcolano registrano e riportano automaticamente valori numerici.

La tecnica si basa esclusivamente sul principio di separazione fisica in funzione delle dimensioni [30], generalmente proporzionale al peso molecolare. Il campione che passa attraverso la colonna subisce un rallentamento proporzionale alle dimensioni delle macromolecole e alle dimensioni dei pori presenti nella colonna. L'ordine di uscita andrà dalle molecole di dimensione maggiore, che non passano attraverso i pori e quindi escono rapidamente, a quelle di dimensione inferiore, le quali penetrando nei pori della fase stazionaria impiegheranno un tempo maggiore a percorrere la colonna.

Il volume totale della colonna può essere suddiviso in tre termini [31]:

$$V_t = V_0 + V_i + V_s$$

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.

Mentre il volume di eluizione è dato da:

$$V_e = V_0 + K_d \cdot V_i$$

In cui se le molecole sono abbastanza grandi la loro  $K_d$  risulta uguale a 0, mentre negli altri casi risulta avere valori diversi fino ad un massimo di 1. Infine, al termine dell'analisi il computer elabora i volumi di eluizione per comporre un cromatogramma, il software sarà in grado, dopo una taratura con composti a peso molecolare noto (nel nostro caso Polistirene), di ricavare il peso molecolare dei campioni polimerici analizzati.

#### 5.11.4 Sfera integratrice

La sfera integratrice è un accessorio dello spettrofotometro e raccoglie la radiazione elettromagnetica da una sorgente esterna o interna al dispositivo ottico. La radiazione introdotta in una sfera integratrice colpisce le pareti riflettenti e subisce molteplici riflessioni diffuse. Dopo numerose riflessioni, la radiazione viene dispersa in modo uniforme sulle pareti della sfera. Il livello di radiazione risultante è direttamente proporzionale al livello di radiazione iniziale e può essere misurato facilmente utilizzando un rivelatore. Le sfere integratrici utilizzano un materiale riflettente di tipo PTFE solido, esso presenta una riflettanza diffusa molto elevata nell'intervallo spettrale di 250 - 2500 nm con una riflettanza maggiore del 99% tra 400 nm e 1500 nm.

### 5.11.5 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi TGA determina la quantità e la frequenza di variazione di peso dei campioni rispetto a temperatura e tempo in atmosfera controllata (ad es. di azoto). La TGA può essere utilizzata principalmente per indagare la stabilità termica (la resistenza del materiale a una data temperatura), la stabilità ossidativa (tasso di assorbimento dell'ossigeno sul materiale), oltre a proprietà composizionali (ad esempio, fillers, resine, solventi) dei campioni. L'aumento/perdita di peso dei campioni corrisponde a diversi fattori. Generalmente, l'aumento di peso è attribuito all'adsorbimento o all'ossidazione, mentre la perdita di peso è attribuito a decomposizione, desorbimento, disidratazione, volatilizzazione. Lo strumento è costituito da tre diversi componenti, bilancia (per misurare il peso di campione), forno (fornisce il riscaldamento), programmatore di temperatura (per misurazioni e controllo della temperatura) ed un registratore (per la registrazione delle variazioni di peso e temperatura).

Esistono diverse variabili che possono influire sulla sensibilità dello strumento; considerando quelle variabili, lo strumento deve essere calibrato prima di condurre un esperimento:

- Campione, la descrizione chimica che include la fonte, la purezza ed eventuali pretrattamenti;
- supporto del campione, la sua capacità deve essere abbastanza grande da contenere l'intero campione per evitare la perdita di segnale a causa di perdite incontrollate (ad es. schizzi);
- crogioli, che sono presenti in vari materiali a seconda della temperatura di utilizzo;
- atmosfera, scelta a seconda del tipo di gas scaricato, potrebbe essere inerte o ossidante per il campione;
- velocità di riscaldamento, il tasso di decomposizione dipende dalla frequenza di riscaldamento, in cui maggiore è la velocità di riscaldamento, maggiore è la temperatura di decomposizione.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Moad, G.; Solomon, D. H. *The Chemistry of Radical Polymerization*, 2nd ed.; Elsevier: Oxford, U.K., 2006; pp 1-9.
- [2] Moad G., 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] 50th Anniversary Perspective: RAFT Polymerization-A User Guide. Sébastien Perrier, Department of Chemistry, The University of Warwick, U.K. Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Monash University, Australia. September 27, 2017
- [9] Post-polymerization modification reactions of poly(glycidyl methacrylate). Ezzah M. Muzammil a, Anzar Khan and Mihaiela C. Stuparu. From the journal, *RSC Advances*.
- [10] Di Maria F., Blasi L., Quarta A., Bergamini G., Barbarella G., Giorgini L. and Benaglia M., *J. Mater. Chem. B*, 2015, 3, 8963.
- [11] 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.
- [12] Synthesis and Bioconjugation of Hybrid Nanostructures for Biomedical Applications A.P. Tiwari, S.S. Rohiwal, in *Hybrid Nanostructures for Cancer Theranostics*, 2019. Edited by: Raghvendra Ashok Bohara and Nanasaheb Thorat
- [13] Dai Y., Zhang X. and Zhuo R., *RSC Adv.*, 2016, 6, 22964.



- [14] Benaglia M., Alberti A., Spisni E., Papi A., Treossi E. and Palermo V., *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 2555.
- [15] Blog di chimica - chimica farmaceutica - Chemistry and Pharmaceutical Chemistry blog- Chimica Organica - Organic Chemistry <https://cupratodilitio.blogspot.com/2017/03/liposomi-effetto-epr.html>
- [16] Physico-Chemical Strategies to Enhance Stability and Drug Retention of Polymeric Micelles for Tumor-Targeted Drug Delivery. Yang Shi Twan Lammers Gert Storm Wim E. Hennink. *Macromol Biosci.* 2017 Jan
- [17] Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization. Y.H.Dinga M.Florenab W.Tan. *Biosurf Biotribol.* 2016 Dec, 121-136
- [18] Structure of Polydopamine: A Never-Ending Story Jürgen Liebscher, Radosław Mrówczyński, Holger A. Scheidt §Claudiu Filip, Niculina D. Hădăde, Rodica Turcu, Attila Bende, Sebastian Beck. *Langmuir* 2013, 29, 33, 10539-10548.
- [19] Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs. V. P. Torchilin. *Cell Mol Life Sci.* 2004 ottobre; 61 (19-20): 2549-59.
- [20] Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. Guang Wei Lu Ping Gao. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, pp.59-94.
- [21] Lee I.S., Yoon S.H., Jin H.-J., Choi H.J., *Diamond & Related Materials* 15 (2006) 1094 – 1097.
- [22] 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.
- [23] Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) as applied to polymers. Patrick Groves. From the journal, *Polymer Chemistry*
- [24] Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues. Vincent Martinez Prof. Dr. Maged Henary. 2016 WILEY - VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [25] <https://lsinstruments.ch/en/technology/dynamic-light-scattering-dls>.

- [26] <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/>.
- [27] <https://www.brookhaveninstruments.com/what-is-zeta-potential>.
- [28] Definition of Zeta Potential by Anne Marie Helmenstine, Ph.D. January 05, 2019.
- [29] Size exclusion chromatography by Dušan Berek. J Sep Sci. 2010 Feb;33(3):315-35.
- [30] Gel permeation chromatography J.F.JohnsonabR.S.Porter.
- [31] Johnson J. F. and Porter R. S., Gel Permeation Chromatography, Progress in Polymer Science Volume 2, 1970, Pages 201, 203-256.
- [32] <https://www.ophiropt.com/laser--measurement/knowledge-center/article/10145>.
- [33] Thermogravimetric Analysis of Polymers. Norshahirah mohamad saidi, Ramesh T subramaniam, Shahid Bashir Baig, Rameshkasi Kasi, University of Malaya. Article in, Ionics, August 2019.