

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

SCUOLA DI SCIENZE
Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Sintesi e caratterizzazione di micelle polimeriche stabilizzate da un rivestimento di polidopamina

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Francesco Semplici

RELATORE

Chiar.mo Prof. Loris Giorgini

CORRELATORE

Dott. Massimo Benaglia

Anno Accademico 2020-2021

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 Polimerizzazione radicalica.....	4
1.2 Polimerizzazione Radicalica a Disattivazione Reversibile (RDRP).....	7
1.3 Polimerizzazione RAFT.....	10
1.4 Sintesi di copolimeri a blocchi tramite polimerizzazione RAFT.....	17
1.5 Reazioni di Post-Polimerizzazione.....	19
1.6 Micelle Polimeriche.....	21
1.7 Stabilizzazione delle Micelle.....	23
1.8 Polidopamina (PDA) come stabilizzatore.....	25
2. SCOPO.....	29
3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	31
3.1 Sintesi Copolimeri a Blocchi PGMA-b-PMMA.....	31
3.2 Trattamento post-polimerizzazione.....	33
3.3 Funzionalizzazione con morfolina del PGMA-b-PMMA.....	34
3.4 Formazione micelle polimeriche.....	37
3.5 Stabilizzazione con Polidopamina e Caratterizzazione.....	38
4. CONCLUSIONI.....	50
5. PARTE SEPRIMENTALE.....	51
5.1 Solventi e reagenti.....	51
5.2 Strumentazione.....	51
5.2.1 NMR.....	51
5.2.2 GPC.....	51
5.2.3 DLS.....	52
5.2.4 UV-Vis.....	52
5.2.5 IR.....	52
5.2.6 TGA.....	52
5.3 Sintesi copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA.....	53
5.4 Funzionalizzazione con morfolina per ottenere PHMPMA-b-PMMA.....	54
5.5 Formazione micelle.....	56
5.6 Stabilizzazione micelle con Polidopamina.....	57
5.7 Sintesi PDA.....	58

5.8 Tecniche di analisi.....	59
5.8.1 DLS.....	59
5.8.2 GPC.....	61
5.8.3 Sfera integratrice.....	63
5.8.4 IR-ATR.....	64
5.8.5 TGA.....	65
6. BIBLIOGRAFIA.....	67

1. INTRODUZIONE

1.1 Polimerizzazione radicalica

Con il termine polimerizzazione si identifica una reazione chimica che partendo da molecole semplici, dette monomeri, porta alla formazione di una catena polimerica composta dal ripetersi in sequenza di queste unità.

Si possono distinguere diversi tipi di polimerizzazione ognuna delle quali con specifici meccanismi di reazione e applicazioni.

Nello specifico, per ottenere come prodotto delle poliolefine, se ne possono distinguere quattro tipi:

- a. Polimerizzazione Anionica
- b. Polimerizzazione Cationica
- c. Polimerizzazione Ziegler-Natta (organometallica)
- d. Polimerizzazione Radicalica

In particolare la polimerizzazione radicalica possiede numerosi vantaggi, quali:

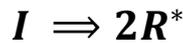
- a. Basso costo e semplicità di realizzazione
- b. Applicabile in diverse condizioni operative e di reazione
- c. Capacità di polimerizzare un alto numero di monomeri

Grazie ai quali la rendono preferibile alle altre in numerosi casi, infatti molti polimeri di interesse industriale vengono preparati mediante questa procedura (PVC, resine ABS, PS, PMMA, PTFE ecc.).

Il processo è articolato in più fasi e appartiene alla famiglia delle reazioni a catena mediate da radicali liberi:

a. Fase di Inizio: può essere suddivisa in due fasi/reazioni distinte:

1. Formazione di radicali primari (R^*) da una molecola detta iniziatore (I)

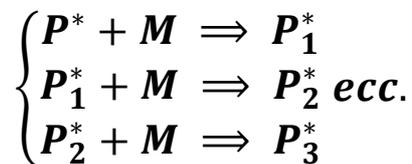


2. Reazione dei radicali primari (R^*) con il monomero (M) che portano alla formazione di un centro attivo per la crescita della catena (P^*)



In particolare la formazione dei radicali primari è lo stadio lento dell'intero processo, regolando quindi la velocità complessiva della polimerizzazione.

b. Fase di Propagazione: stadio molto veloce, nel quale il radicale primario ottenuto precedentemente reagisce in successione con diversi monomeri formando un radicale composto da un elevato numero di unità ripetitive.



Il numero di unità ripetitive può variare molto e dipende da diversi fattori, ma principalmente dalla reattività del radicale primario e della catena.

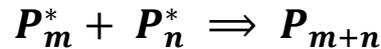
Quando il processo di propagazione è incominciato si può interrompere solamente in due modi:

1. Non vi sono più monomeri (solo nel caso di polimerizzazioni "viventi")
2. Avviene una terminazione

c. Fase di terminazione: è inevitabile e dipende dall'altissima reattività dei radicali formati, ne consegue che per ottenere catene di lunghezza maggiore la concentrazione di iniziatore deve essere bassa.

La terminazione di catena può avvenire in diversi modi:

1. Per accoppiamento: avviene quando due catene reagiscono tra loro per formarne un polimero composto dalla somma delle unità ripetenti che componevano le singole catene.



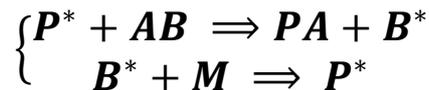
2. Per Disproporzionamento radicalico: avviene quando un atomo di idrogeno presente sulla parte terminale di una catena viene estratto da un'altra catena, portando alla formazione di un polimero con un doppio legame terminale e un secondo senza.



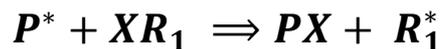
3. Per combinazione di una catena attiva e un iniziatore radicale



4. Per interazione con impurità (AB) presenti nell'ambiente di reazione, principalmente l'ossigeno molecolare (O₂) che forma radicali meno reattivi.



- d. Trasferimenti di Catena: si tratta di un'ulteriore modalità di terminazione con la differenza che il trasferimento di catena disattiva un radicale formandone però uno nuovo (R₁^{*}), normalmente non capace di continuare la propagazione inibendola.



Come per il disproporzionamento tutti i meccanismi di trasferimento di catena avvengono con l'estrazione di un atomo specifico (X) come:

1. Idrogeno dal solvente
2. Idrogeno dal monomero
3. Parte di un iniziatore
4. Parte di un polimero

Questa tecnica di polimerizzazione però, a causa dell'altissima reattività dei radicali, non riesce a fornire un adeguato controllo del peso molecolare, della struttura finale o della composizione del polimero, né della polidispersità.

1.2 Polimerizzazione Radicalica a Disattivazione Reversibile (RDRP)

Le RDRP si distinguono dalle altre tecniche di polimerizzazione poiché forniscono al processo caratteristiche di una polimerizzazione radicalica controllata; ovvero l'accrescimento di tutte le macromolecole avviene contemporaneamente e quando il monomero si esaurisce non vi sono reazioni di terminazione o trasferimento incontrollate.

Grazie alla mancanza di reazioni incontrollate al termine della polimerizzazione vi è la possibilità di aggiungere ulteriore monomero per far riprendere il processo ed allungare ulteriormente le macromolecole.

Per poter sfruttare questa caratteristica è necessaria la presenza di uno specifico agente che disattivi reversibilmente le catene radicaliche propaganti trasformandole in catene dormienti, queste rimarranno in quello stato fino al raggiungimento dell'equilibrio fra le specie. [1]

Si possono distinguere diverse tecniche RDRP, ma le principali sono tre:

a. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): [2]

Questa tecnica impiega come iniziatore un alogenuro alchilico (R-X) e necessita di un complesso di un metallo di transizione (Cu, Fe, Ru, ecc.) che funge da catalizzatore.

Il catalizzatore metallico è la chiave per riuscire ad attivare le catene dormienti formando radicali attraverso un processo di trasferimento di elettroni (redox).

Si presentano due situazioni distinte:

1. Il metallo sottrae un elettrone a una catena dormiente ossidandosi e formando un radicale;
2. Il metallo cede un elettrone a una catena radicalica propagante riducendosi e formando una catena dormiente;

Questo processo reversibile stabilisce un equilibrio prevalentemente spostato dalla parte con una concentrazione di catene radicaliche molto basse e una concentrazione di catene dormienti molto elevata.

Le reazioni ATRP sono molto utilizzate grazie alla loro alta tollerabilità a molti gruppi funzionali presenti nel monomero o nell'iniziatore, alla semplicità di preparazione e al contenuto costo dei catalizzatori e degli iniziatori.

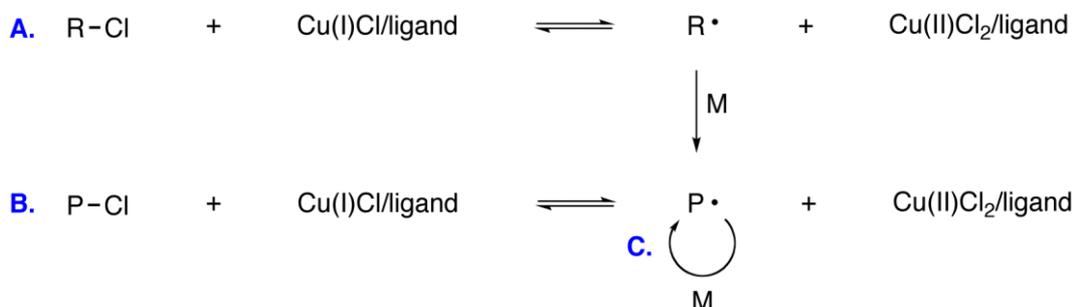


Figura 1: Reazione ATRP generica (A: inizio ; B: equilibrio ; C: propagazione)

b. Nitroxide-Mediated Polymerization (NMP): [3]

La NMP impiega come iniziatori dei nitrossidi per generare polimeri con una stechiometria controllata e una bassissima polidispersità.

In questo caso i radicali nitrossidi catturando le catene radicaliche propaganti portano alla formazione di alcossiammine disattivandole e rendendole catene dormienti.

L'utilità delle alcossiammine è quello che in determinate condizioni può avvenire l'omolisi del legame C-O producendo una nuova catena propagante e un nuovo radicale nitrossido.

Per far sì che la polimerizzazione avvenga con successo l'iniziatore nitrossido deve essere un radicale stabile quindi deve avere i due sostituenti R legati all'azoto ingombranti stericamente, principalmente si utilizzano sostituenti benzilici.

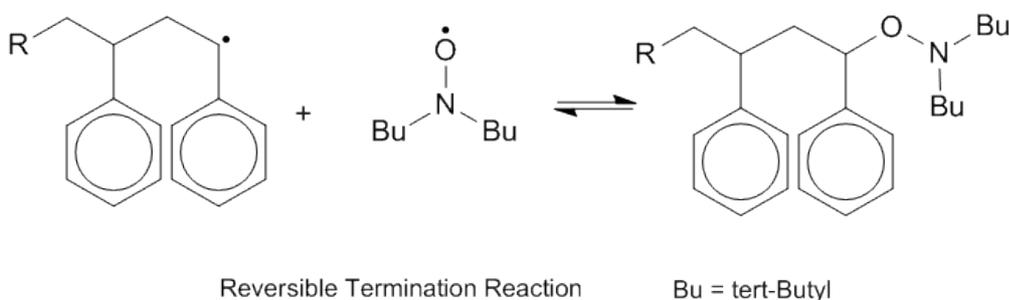


Figura 2: Reazione NMP generica

c. Reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) [4]

La tecnica RAFT differentemente da quelle precedenti viene controllata da reazioni di trasferimento di catena quindi nessun radicale viene generato o distrutto; necessita quindi di una fonte esterna di radicali per l'inizio e il mantenimento della reazione di propagazione.

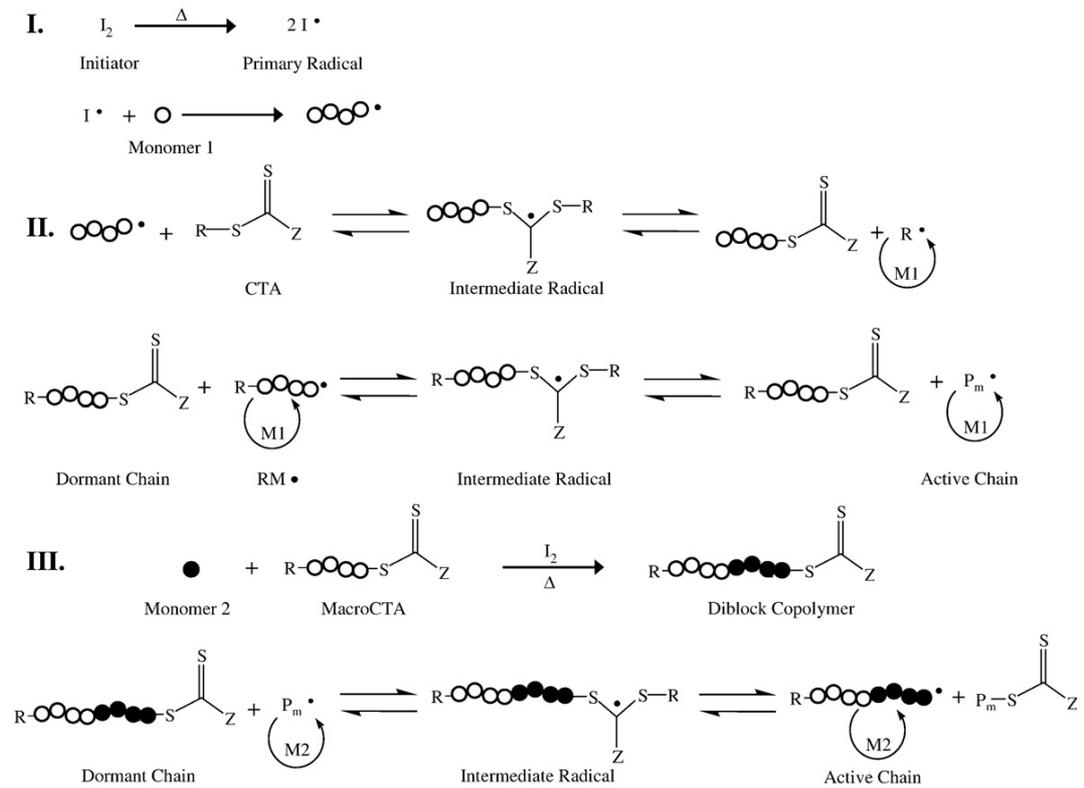


Figura 3: Schematizzazione generica reazione RAFT

1.3 Polimerizzazione RAFT

La tecnica RAFT si basa sulla disattivazione reversibile dei radicali propaganti mediante un meccanismo di trasferimento di catena che scambia le funzionalità delle specie dormienti con quelle dei radicali ancora attivi. [5]

Grazie a questa tecnica è possibile, mantenendo invariate le condizioni di reazione, ottenere polimeri con architetture complesse e bassi valori di polidispersità ($<1,2$) aggiungendo unicamente una giusta quantità dell'appropriato agente RAFT.

Normalmente un sistema di polimerizzazione RAFT richiede quattro elementi essenziali:

1. Fonte esterna di radicali poiché non se ne formano durante il procedere della reazione di polimerizzazione;
2. Agente RAFT appropriato per la reazione
3. Monomero
4. Solvente

Il processo complessivo può essere suddiviso in 6 fasi distinte: [6]

1. Fase iniziale: la reazione, similmente alla polimerizzazione radicalica classica, è avviata dalla decomposizione in radicali primari dell'iniziatore, che reagiscono con il monomero presente per formare catene radicaliche propaganti.
2. Propagazione: le catene radicaliche aumentano la loro lunghezza reagendo con il monomero presente, mantenendo invariata la loro reattività.

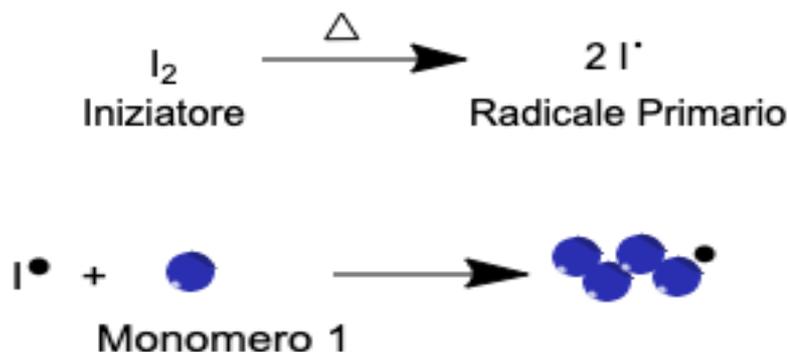


Figura 4: Fase iniziale e propagazione RAFT

3. Trasferimento reversibile di catena: è un passaggio in cui una catena radicalica reagisce con l'agente RAFT formando un radicale (addotto) RAFT relativamente stabile, questo a sua volta può facilmente frammentarsi per fornire una nuova specie radicalica e un agente macroRAFT (ditioestere polimerico).

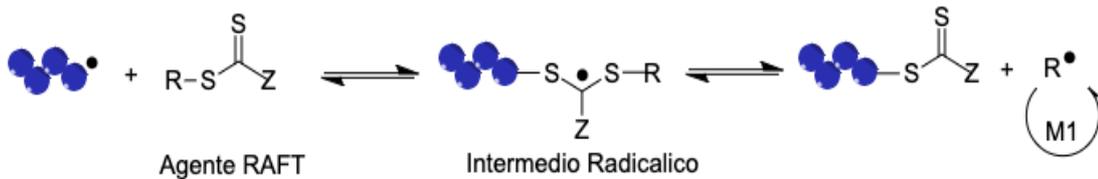


Figura 5: Fase di trasferimento reversibile di catena RAFT

4. Riattivazione: il radicale formatosi durante la precedente fase reagisce con il monomero presente avviando una nuova catena polimerica attiva.

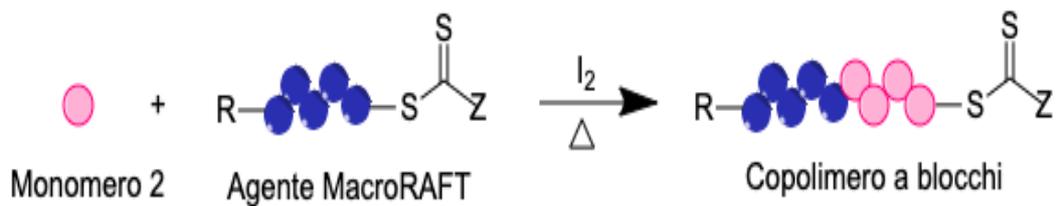


Figura 6: Fase di riattivazione con monomero

5. Equilibrio principale di catena: questa è la parte più importante dell'intero processo, infatti l'instaurarsi di un equilibrio tra le catene dormienti (macroRAFT) e quelle attive fa sì che i radicali presenti vengano condivisi equamente tra tutte le catene che non hanno subito terminazione.

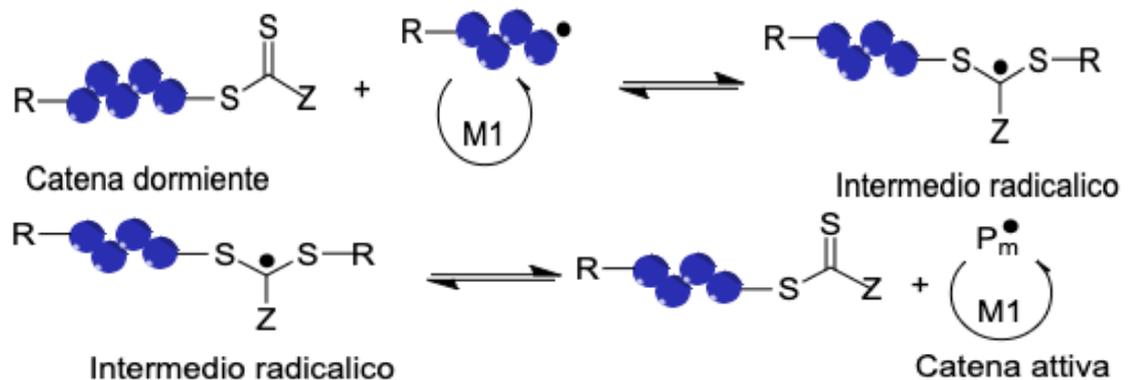


Figura 7: Equilibrio di catena

6. Terminazione: avviene quando due catene attive reagiscono tra loro formando una macromolecola che non può reagire ulteriormente (polimero morto). Normalmente il radicale RAFT è sufficientemente impedito e non subisce reazioni di terminazione.

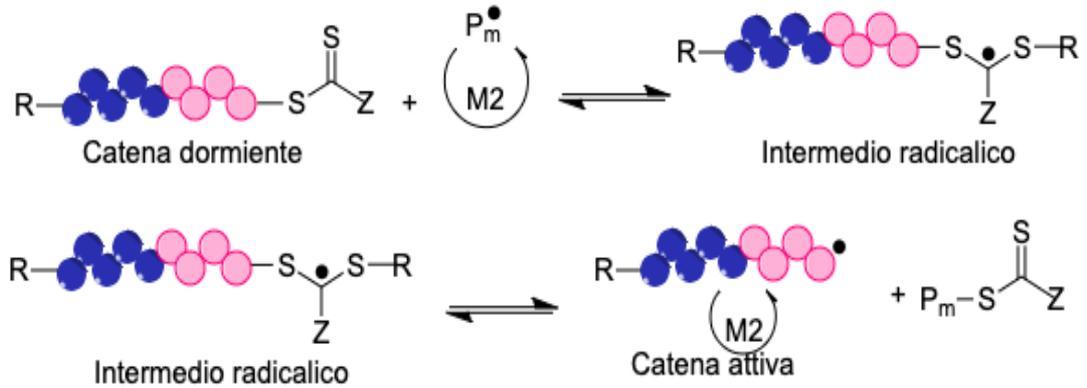


Figura 8: Fase di Terminazione

Anche in seguito alla conclusione del processo di polimerizzazione le catene mantengono la loro funzione diotiocarbonilica dell'agente RAFT permettendo di isolare il polimero ottenuto come prodotto stabile e procedere, in un secondo momento, a un'ulteriore polimerizzazione con un altro monomero.

La tecnica RAFT necessita però di un'ottimizzazione delle condizioni di reazione per ogni diverso monomero (solvente, agente RAFT, procedura); si possono quindi definire tre elementi principali che regolano l'intero processo:

1. Iniziatore radicalico: determina diversi parametri durante il processo come:
 - a. Controllo: il numero di radicali generati determina la quantità di catene morte nel sistema;
 - b. Tasso di polimerizzazione: direttamente correlato al numero di radicali presenti nel sistema;

Ne deriva che la concentrazione di iniziatore viene stabilita con l'obiettivo di ottenere la maggior velocità di polimerizzazione con il minor numero di reazioni di terminazione per accoppiamento fra radicali (che formerebbero catene morte).

Dato che anche una piccola quantità di iniziatore porta all'attivazione di un gran numero di agenti RAFT, bisogna definire al meglio la concentrazione di iniziatore da utilizzare considerando alcuni fattori:

- a. Aumentando la concentrazione di iniziatore otterremo una maggior quantità di radicali primari che si riflette in una maggior velocità di propagazione ma in un peggior controllo del peso molecolare e della polidispersità delle macromolecole ottenute;
- b. Aumentando l'agente RAFT si ottengono polimeri a peso molecolare minore ed, in genere, con una polidispersità più bassa, inoltre si ha un controllo maggiore sulla reazione dovuta alla minimizzazione delle reazioni di terminazione;

Ne deriva che normalmente il rapporto tra agente RAFT e iniziatore viene mantenuto molto elevato (RAFT/iniziatore $\gg 1$).

Si possono descrivere tre principali variazioni dovute al sostituito Z:

1. Z è alifatico o tioalchilico: non si notano grandi cambiamenti nella reattività dell'agente RAFT;
2. Z ha la capacità di coniugare con il doppio legame tiocarbonilico ottenendo una stabilizzazione considerevole dell'intermedio radicalico, ad esempio un gruppo fenile delocalizzerebbe la carica nell'anello aromatico rendendo stabile l'intermedio.
3. Z è un atomo con un doppietto elettronico facilmente delocalizzabile verso il doppio legame C=S, formando forme di risonanza in cui lo zolfo, essendo altamente elettronegativo rende meno attivo il legame tiocarbonilico per un attacco da parte di una catena propagante.

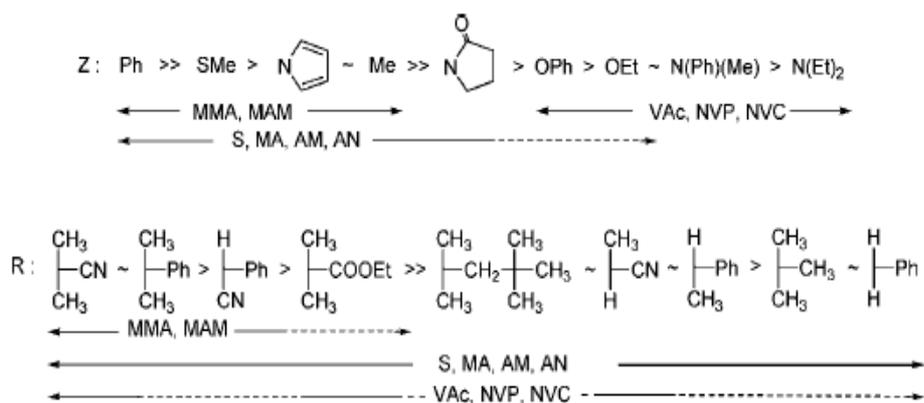


Figura 10: Influenza dei gruppi R e Z dell'agente RAFT

3. Monomero: si distinguono principalmente due gruppi di monomeri adatti alla polimerizzazione RAFT [7]:

a. Monomeri “meno-attivati”: comprendono tutti quei monomeri che presentano un doppio legame adiacente a un ossigeno, un azoto, un alogeno o una coppia solitaria di uno zolfo. Il controllo della polimerizzazione in questo caso è difficoltosa, infatti partendo da questi monomeri si ha la formazione di radicali altamente reattivi, che dopo essersi legati all’agente RAFT, risultano troppo instabili per essere buoni gruppi uscenti e riattivare la propagazione.

Per sopperire a questo problema si può agire sul sostituente Z dell’agente RAFT portando ad una destabilizzazione dell’intermedio radicalico e l’allontanamento del radicale polimerico.

b. Monomeri “più-attivati”: comprendono tutti i monomeri con un doppio legame coniugato ad un sistema aromatico, un sostituente carbonilico o nitrile. In questo caso si ha la formazione di radicali meno reattivi che sono buoni gruppi uscenti e possono riprendere la propagazione.

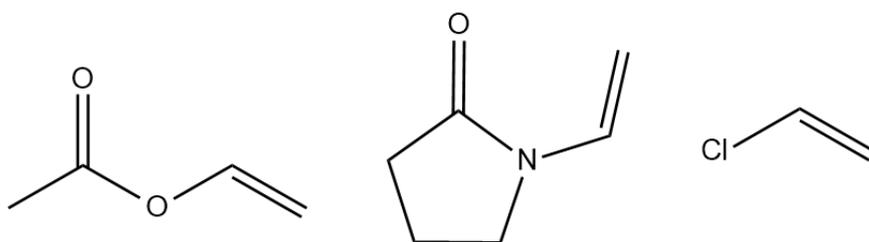


Figura 11: esempio di monomero per sintesi RAFT meno attivati

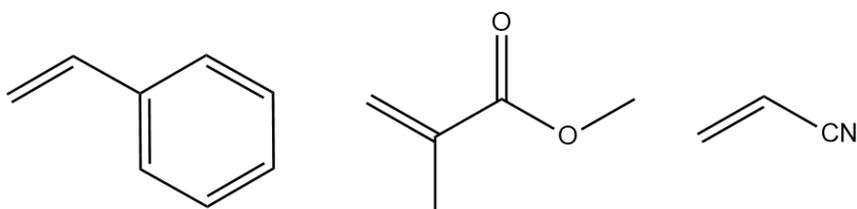


Figura 12: esempio di monomero per sintesi RAFT più attivati

1.4 Sintesi di copolimeri a blocchi tramite polimerizzazione RAFT

Come detto in precedenza la caratteristica che distingue le polimerizzazioni radicaliche classiche da quelle a disattivazione reversibile è la capacità di poter continuare la reazione di polimerizzazione, aggiungendo ulteriore monomero al bulk di reazione, grazie alla funzione “vivente” delle catene dovuta dall’agente RAFT legato ad esse.

Le catene “viventi” ottenute sono quindi, a tutti gli effetti, degli agenti RAFT polimerici (macroRAFT) che potranno proseguire la reazione di polimerizzazione all’aggiunta di ulteriore monomero.

Se il monomero addizionato è diverso dal primo si otterranno copolimeri a blocchi altamente omogenei, in termini di composizione molecolare, con pesi molecolari controllati e una bassa polidispersità.

Per ottimizzare il risultato di una polimerizzazione di questo tipo bisogna definire correttamente l’ordine con il quale vengono formati i blocchi di monomeri, si distinguono tre casi principali [8]:

- a. Il radicale propagante del primo blocco è un buon gruppo uscente rispetto a quello del secondo blocco, ottenendo una buona velocità di reazione e una bassa polidispersità;
- b. Il radicale propagante del primo blocco è un gruppo uscente migliore rispetto a quello del secondo blocco, ottenendo una velocità di polimerizzazione minore e una polidispersità maggiore;
- c. Il radicale propagante del primo blocco è un pessimo gruppo uscente rispetto a quello del secondo blocco, ottenendo l’interruzione della copolimerizzazione.

In tutti i casi esaminati vi è anche la formazione di catene omopolimeriche del secondo monomero, la quantità aumenta con la diminuzione della capacità di uscita del radicale propagante primario.

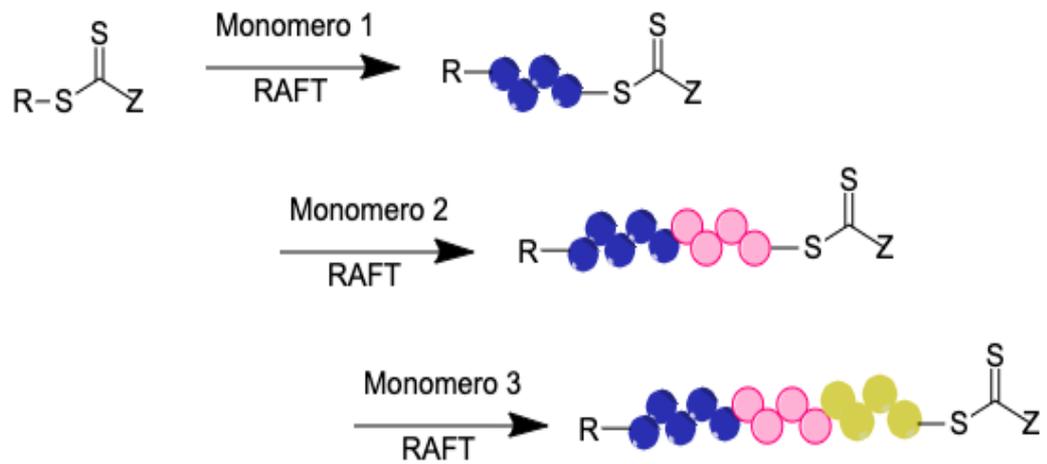


Figura 13: Sintesi copolimeri a blocchi tramite tecnica di polimerizzazione RAFT

1.5 Reazioni di Post-Polimerizzazione

L'impiego di monomeri che possiedono, oltre alla funzionalità vinilica, altri gruppi funzionali aggiuntivi, inerti durante il processo di polimerizzazione radicalica, rende possibile trasformazioni posteriori al processo di polimerizzazione; ottenendo polimeri con caratteristiche differenti rispetto al materiale di partenza.

È possibile quindi ottenere da un unico polimero un gran numero di materiali differenti in base al trattamento di post-polimerizzazione impiegato.

Un monomero che si adatta bene a questo tipo di processo sintetico è il glicidil metacrilato (GMA) che possiede sia una funzione vinilica, necessaria alla polimerizzazione, sia un sostituente epossidico, relativamente reattivo e facilmente apribile mediante attacco nucleofilo o attraverso un processo catalizzato da acidi. [9]

L'apertura dell'anello ossiranicico porta alla formazione di gruppi idrossilici altamente reattivi che, in ambiente acquoso, tendono a formare legami idrogeno con i gruppi nucleofili introdotti fornendo al glicidil metacrilato caratteristiche idrofiliche che prima non possedeva.

Sfruttando questa caratteristica del PGMA è stato possibile ottenere copolimeri a blocchi anfifilici; ovvero macromolecole con un blocco idrofobico, composto da acrilati o metacrilati (alifatici), e uno idrofilico, composto dal PGMA opportunamente modificato.

La peculiare caratteristica di questo tipo di polimeri è quella di potersi auto-assemblare in nanoaggregati core-shell chiamati micelle polimeriche al cui interno vi è la presenza della parte idrofobica della macromolecola e all'esterno quella idrofilica.

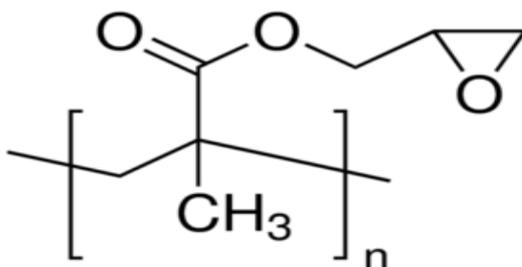


Figura 14: Struttura del PGMA

La reazione di attacco dell'anello epossidico da parte di un nucleofilo si può schematizzare così:

- Il primo passaggio è quello di protonare l'atomo di ossigeno presente nell'anello, che però è stabilizzato dall'effetto induttivo del carbonio più sostituito (terziario).
- A seguito della protonazione dell'ossigeno il carbonio terziario è più suscettibile all'attacco di un nucleofilo debole come l'acqua
- L'attacco nucleofilo avviene sul carbonio meno sostituito (primario) dell'anello con formazione di un gruppo ossidrilico (-OH) e una catena laterale a cui è legato il nucleofilo stesso.

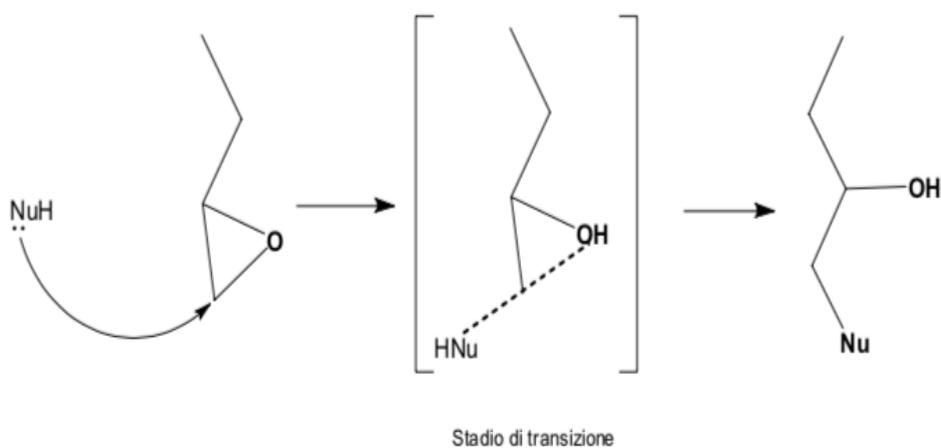


Figura 15: Meccanismo di attacco nucleofilo dell'anello epossidico

Questo processo ha un meccanismo di reazione S_N2 in cui la formazione del legame nucleofilo/carbonio avviene contemporaneamente all'apertura dell'anello epossidico.

A seguito di questo processo si ottiene una molecola con la tipica reattività degli alcoli, grazie alla presenza del gruppo ossidrilico (-OH) formatosi, in aggiunta ad altre caratteristiche dettate dalla scelta del nucleofilo impiegato.

Utilizzando ad esempio un'ammina secondaria ciclica, come la morfolina, il glicidil metacrilato otterrà caratteristiche idrofiliche che prima non possedeva grazie alla presenza di atomi di ossigeno e azoto, propri della morfolina, oltre che, come detto in precedenza, il gruppo ossidrilico formatosi. [10]

1.6 Micelle Polimeriche

Le micelle sono nello specifico aggregati nanoscopici composti da polimeri a blocchi anfifilici dispersi all'interno di un opportuno solvente. Normalmente le micelle si auto-assemblano disponendo al loro interno il blocco idrofobico circondato da quello idrofilico. Nello specifico, la formazione di questi aggregati nanoscopici è governata dall'equilibrio tra le forze attrattive (interazioni elettrostatiche/idrofobiche) e repulsive (interazioni steriche, idratazione e repulsione elettrostatica) presenti, descrivibile efficacemente con la teoria DLVO che considera l'interazione complessiva delle varie forze in gioco.

Affinchè il processo di micellizzazione avvenga correttamente occorre minimizzare l'energia libera del sistema, in questo modo le nanoparticelle si struttureranno con le catene idrofiliche a formare uno scudo attorno ad il nucleo idrofobico, per minimizzarne l'esposizione e, di conseguenza, l'interazione con il solvente.

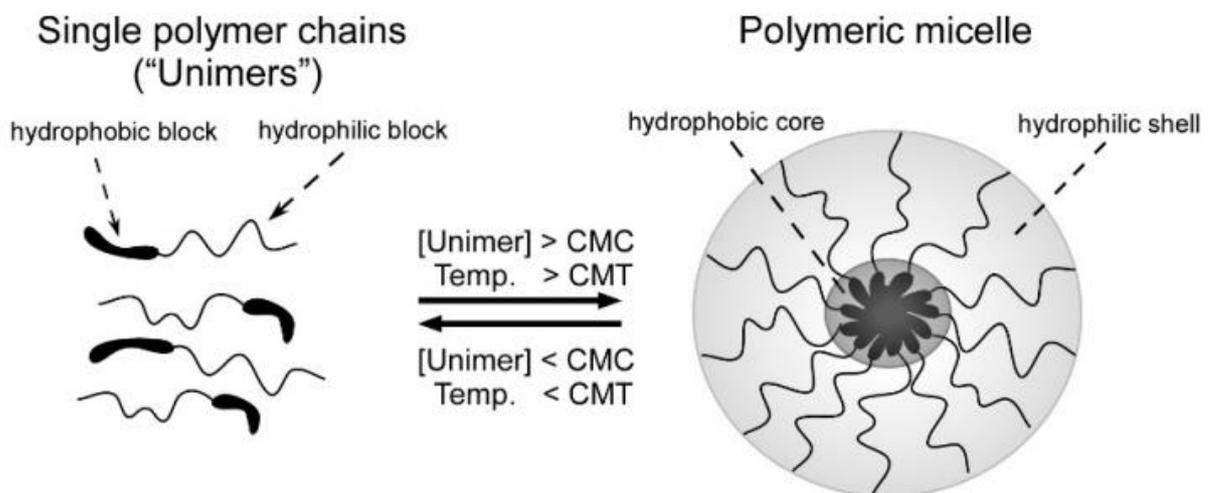


Figura 14: Auto-assemblamento di copolimeri a blocchi in micelle polimeriche

L'auto-assemblamento delle catene può avvenire solamente in determinate condizioni quali: [11]

- Temperatura Micellare Critica (CMT): deve essere mantenuta uguale o maggiore rispetto a un valore definito punto di Krafft. Il punto o temperatura di Krafft è un intervallo di temperatura sopra alla quale la solubilità di un tensioattivo aumenta molto. La temperatura di Krafft è quindi un punto di cambiamento delle fasi dove

al di sotto del quale il tensioattivo rimane in forma cristallina anche all'interno di una soluzione acquosa.

- b. Concentrazione Micellare Critica (CMC): esprime il valore di concentrazione di una soluzione di tensioattivo alla quale, superata la temperatura di Krafft, corrisponde l'aggregazione di un certo numero di monomeri per formare micelle polimeriche. A concentrazioni inferiori rispetto al CMC si noteranno solamente singole macromolecole, non assemblate, in soluzione chiamate unimeri.

Bisogna però considerare che queste due condizioni vengono fortemente influenzate da due ulteriori parametri, ovvero:

- a. Peso del Polimero: all'aumentare del peso molecolare globale la CMC diminuisce aumentando la stabilità complessiva;
- b. Rapporto tra il blocco idrofilico/idrofobico:
 - 1. All'aumentare delle dimensioni del blocco idrofobico la CMC diminuisce aumentando la stabilità complessiva;
 - 2. All'aumentare delle dimensioni del blocco idrofilico la CMC aumenta diminuendo la stabilità.

1.7 Stabilizzazione delle Micelle

La ricerca sulle micelle polimeriche nel campo della medicina è molto rilevante, infatti grazie alle loro molteplici caratteristiche positive quali: dimensioni nanometriche, stabilità elevata, biocompatibilità e struttura nucleo/guscio; risultano molto versatili e utilizzabili in diverse situazioni.

Alcuni dei recenti studi riguardo alle micelle polimeriche comprendono:

- a. Chemioterapia: è riscontrato che nella zona interessata da un tumore solido vi sia una maggiore permeabilità dei vasi oltre che un danneggiamento delle vie linfatiche che rende possibile l'accumulo di molecole trasportate negli interstizi cellulari causato da uno scarso drenaggio linfatico e di conseguenza un accumulo preferenziale di normali nanocarrier.

Le micelle in questo caso sono altamente efficienti poiché di dimensioni minori (10-50nm) delle più piccole finestrate capillari che irrorano il tumore solido non rimanendo intrappolate come i nanocarrier. [12]

- b. Drug-Delivery al Cervello: per poter raggiungere direttamente il cervello bisogna attraversare la barriera ematoencefalica (BBB), questo è molto difficile poiché altamente selettiva.

Vi sono due principali modi per poter aggirare il problema della BBB:

1. Modificare le micelle con molecole capaci di transitori attraverso la membrana ematoencefalica;
2. Utilizzare uno specifico copolimero a blocchi che inibisca l'efflusso di un farmaco specifico aumentando selettivamente la permeabilità della membrana. [13]

- c. Trasporto di Agenti di Imaging: le micelle vengono caricate con un agente di contrasto rilevabile con risonanza magnetica (RM) o tomografia computerizzata per poter diagnosticare diverse malattie senza utilizzare un metodo invasivo e con un emivita di sole 24 ore dopo l'immissione. [14]

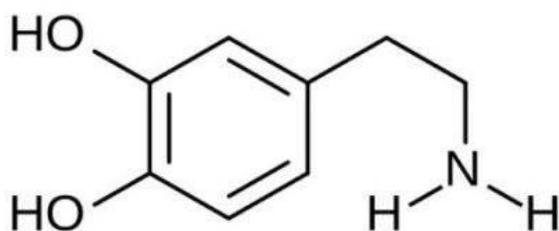
Come detto in precedenza le micelle polimeriche sono relativamente stabili, infatti grazie al loro elevato peso molecolare posseggono una CMC molto bassa, ma per l'utilizzo in trattamenti 'in vivo' occorre comunque stabilizzarla ulteriormente poiché sottoposta a molti e differenti stress che modificherebbero ampiamente la CMC modificandone la stabilità.

Per ovviare a questo problema si può ricorrere a diverse tecniche e aumentare la stabilità complessiva degli aggregati:

- a. Tecniche di stabilizzazione fisiche: legami ad idrogeno, complessazione o stacking π - π ;
- b. Tecniche di stabilizzazione chimiche: reticolazioni superficiali e polimerizzazione dei radicali liberi.

1.8 Polidopamina (PDA) come stabilizzatore

La polidopamina (PDA) è ottenuta dalla reazione di polimerizzazione della dopamina, una feniletilammina che, all'interno del cervello dei mammiferi, funge da neurotrasmettitore e regola diverse funzioni specifiche (emozioni, attività locomotoria, ecc.).



Dopamine

Figura 15: Struttura della dopamina

Diversi studi [15 ; 16 ; 17] indicano che la polidopamina possa essere impiegata per formare dei coating (rivestimenti) polimerici applicabili anche nel caso delle micelle per aumentarne la stabilità.

Nel corso degli ultimi anni sono state svolte numerose ricerche sulla polidopamina che hanno portato alla luce molte caratteristiche di questo polimero, alcune delle quali di notevole interesse per la stabilizzazione di nanoparticelle e l'utilizzo sanitario:

- a. Biocompatibilità [18]: come detto in precedenza è naturalmente presente nel cervello dei mammiferi e costituisce buona parte della molecola della melanina naturale, ciò la rende immune ad una risposta immunologica aggressiva. Sfruttando questa caratteristica è possibile somministrare sostanze estranee all'organismo senza che questo promuova una risposta immunologica.
- b. Adesione [19]: è stato riscontrato che la PDA riesce ad aderire ad una grande varietà di materiali indipendentemente dalla loro natura chimica. Si trovano applicazioni a substrati come: metallo, polimeri, silani [20; 21; 22], ecc.

- c. **Reattività Chimica:** grazie ai gruppi funzionali chinonici e catecolici presenti nella polidopamina rendono possibile l'interazione della superficie rivestita dal polimero con una grande varietà di molecole (ammine, tioli ecc.) compresi ioni metallici (Cu^{2+} ; Fe^{3+} ; Mn^{2+} , ecc)

La formazione della polidopamina avviene spontaneamente per mezzo di una ossidazione, indotta da un pH basico, della dopamina-cloridrato in soluzione.

Il meccanismo di reazione che porta alla formazione di PDA può essere schematizzato genericamente così:

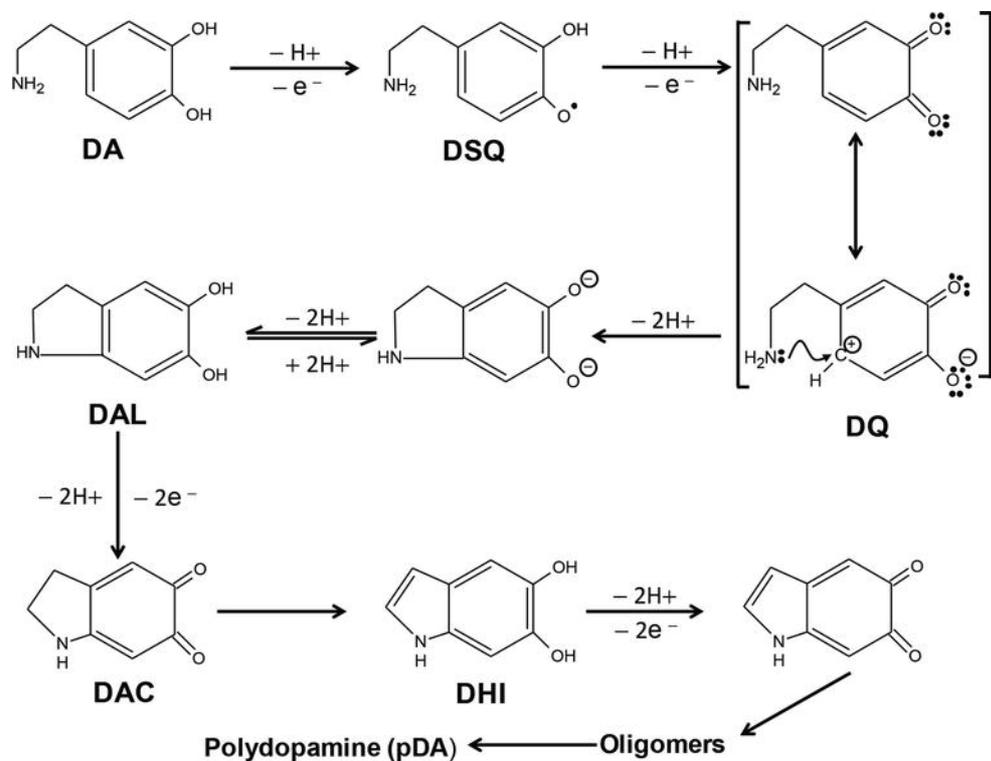


Figura 16: Schema di reazione per ottenere PDA da dopamina-cloridrato

Uno dei problemi però riscontrati durante l'analisi di questo polimero è l'identificazione di una vera e propria struttura della polidopamina, infatti durante il processo di formazione avvengono molte reazioni redox complesse consecutive, inoltre vengono generati molti intermedi. [23]

Durante gli studi riguardanti la polidopamina sono emerse diverse teorie sulla reale struttura di questo polimero, ad esempio:

- a. Struttura in cui le molecole di 5,6-dihydroxyindole (DHI) subiscono ramificazioni in diverse posizioni portando a diversi isomeri e dimeri che in un secondo momento formeranno oligomeri superiori e infine si otterrà la struttura della polidopamina. [24]

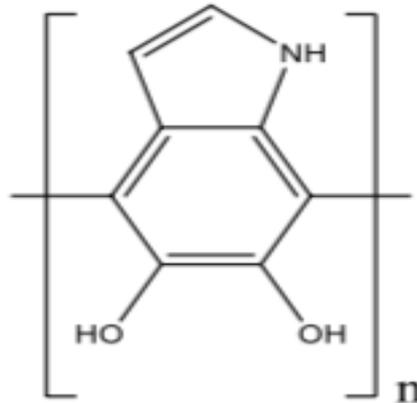


Figura 17: possibile struttura della PDA in cui DHI subisce ramificazioni

- b. Struttura polimerica covalente [25]: composta da una miscela di diversi oligomeri, quali unità diidrossindolo e unità indolo-dione, oltre quello della dopamina uniti tra loro per mezzo degli anelli benzenici e legami covalenti.

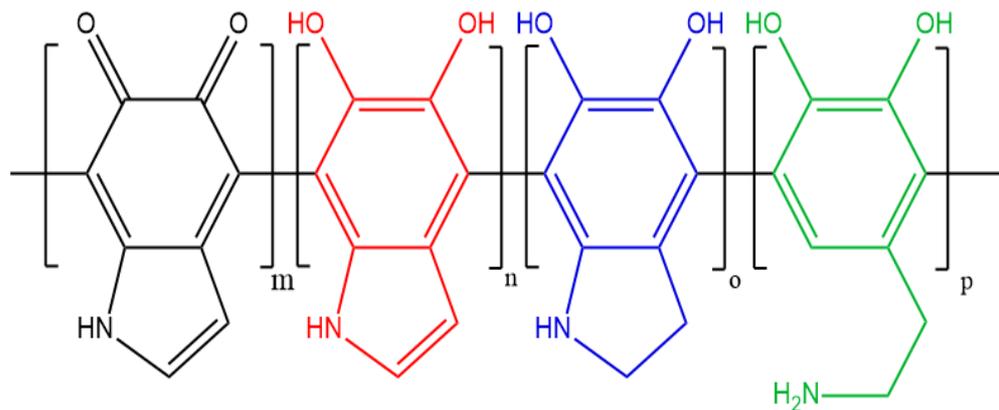


Figura 18: possibile struttura della PDA covalente

- c. Aggregato di monomeri legati da legami idrogeno, interazioni di carica e π -stacking [24];

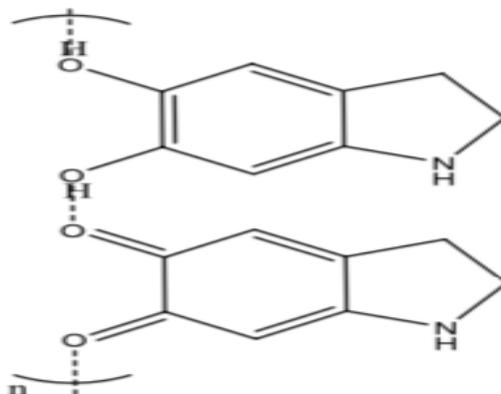


Figura 19: possibile struttura della PDA con legami a idrogeno

- d. Tris di molecole autoassemblate composte di (dopamina)²/DHI [24]

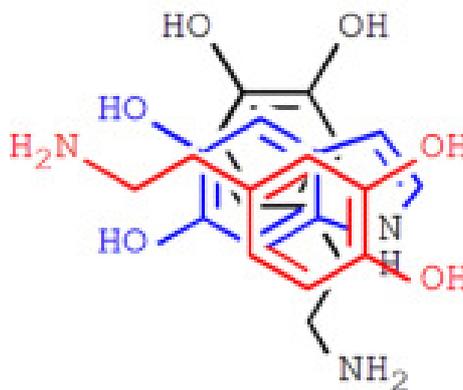


Figura 20: possibile struttura della PDA composta da un tris di molecole

2. SCOPO

Il lavoro sperimentale per la stesura della presente tesi di Laurea Magistrale svolto presso il gruppo di ricerca ISOF del CNR di Bologna, ha avuto come scopo principale la sintesi di copolimeri a blocchi tramite polimerizzazione radicalica controllata RAFT e successiva funzionalizzazione di uno dei due blocchi per garantire la formazione di micelle polimeriche in soluzione.

Grazie alla tecnica di polimerizzazione controllata, un apposito reagente RAFT e il giusto rapporto molare tra i reagenti impiegati è stato possibile sintetizzare il copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA (poliglicidilmetacrilato-b-polimetilmetacrilato) ottenendo un basso valore di polidispersità medio e un peso molecolare controllato delle macromolecole.

Per ottenere le caratteristiche anfifiliche necessarie per la formazione delle micelle polimeriche è stato necessario funzionalizzare, tramite reazione di tipo S_N2 , gli anelli epossidici presenti nelle catene laterali del PGMA tramite un opportuno nucleofilo, nel nostro caso la morfolina.

A seguito all'apertura e alla funzionalizzazione dell'anello epossidico tramite reazione con morfolina si otterranno copolimeri con caratteristiche anfifiliche, composto da una parte lipofila (PMMA) e da una idrofila PHMPMA (poli2-idrossi-3-morfolinopropil metacrilato). Poiché le micelle ottenute verranno utilizzate nell'ambito sanitario, più precisamente come agenti per il drug delivery, necessiteranno di dimensioni specifiche e stabilità molto elevate.

Le dimensioni non devono eccedere i 45nm quindi a seguito della formazione delle micelle polimeriche in soluzione acquosa si procede con un'analisi DLS per confermare la reale dimensione e polidispersità delle particelle ottenute, così da filtrarle se di diametro maggiore a quello di interesse.

Invece per implementare ulteriormente la stabilità delle micelle si è optato per una reticolazione sul guscio esterno (PHMPMA) tramite l'impiego di dopamina.

In particolare questa reazione è stata studiata approfonditamente eseguendo diversi esperimenti variando la concentrazione di dopamina nell'ambiente di reazione per studiarne il grado di reticolazione finale ottenuto in relazione alla quantità iniziale utilizzata.

I set di campioni a diversa concentrazione di PDA sono stati quindi analizzati mediante diverse tecniche analitiche per poi correlare i dati ottenuti e valutare la reale quantità di PDA legata alle micelle.

I campioni sono stati inizialmente analizzati mediante DLS per conoscere la dimensione e

tramite UV-Vis equipaggiato con sfera integratrice per correlare l'assorbimento della polidopamina in correlazione alla concentrazione iniziale di dopamina aggiunta.

A seguito delle analisi UV-Vis, si procede con un processo di liofilizzazione per eliminare l'acqua e proseguire con le successive caratterizzazioni del materiale allo stato solido.

Si sono così effettuate ulteriori due tecniche analitiche, mediante analisi IR-ATR, con cristallo ATR in diamante, e analisi TGA, fondamentale per quantificare la percentuale di PDA residua a 800°C dopo lo studio accurato dei fenomeni di degradazione termica del polimero reticolato. Come standard viene utilizzato il termogramma del copolimero PHMPMA-b-PMMA non reticolato con PDA.

I risultati delle analisi TGA sono stati correlati agli spettri di assorbimento UV-Vis e a quelli IR-ATR confermando la crescita lineare della quantità di PDA presente sulle micelle in relazione alla concentrazione di dopamina inizialmente aggiunta ai campioni.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 sintesi copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA

Per la sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA si è utilizzata la tecnica di polimerizzazione radicalica controllata RAFT, impiegando come monomero il metilmetacrilato, come agente macroRAFT l'omopolimero PGMA (precedentemente sintetizzato presso il gruppo di ricerca CNR) ed infine come iniziatore radicalico l'AIBN.

Il rapporto molare tra i reagenti per ottenere il blocco PGMA del peso molecolare desiderato è di: 1200/1/0,5 (monomero/macroRAFT/iniziatore).

La reazione deve essere condotta in assenza di ossigeno e alla temperatura di 70°C per 5 ore.

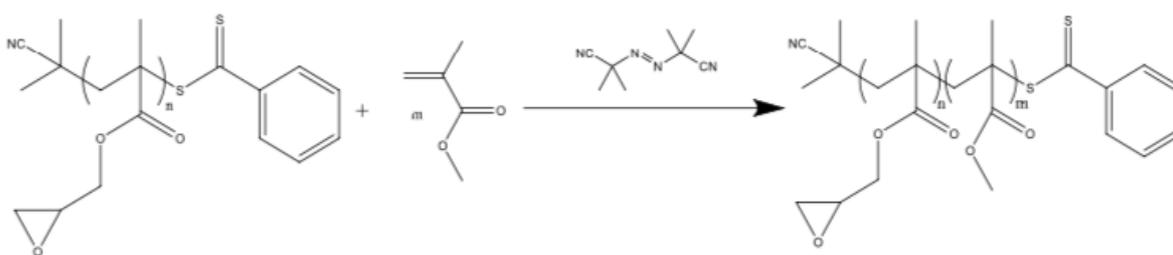


Figura 21: Schema della sintesi del copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA

Campione	t. reazione	Conversione	PM_copol	PM_copol_th	PM_PMMA	PD
FS_Co1	5h	14%	40000	47000	20000	1,09

Tabella 1: Dati relativi al copolimero PGMA-b-PMMA ottenuto

Il valore di conversione della reazione è stato ottenuto mediante l'analisi ^1H NMR rapportando l'integrale dei segnali del monomero (MMA) con quello del copolimero ottenuto.

In figura X sono raffigurati gli spettri del PGMA e del copolimero a blocchi PGMA-b-OPMMA di cui si evidenzia intorno ai 3,6 ppm la presenza dei protoni dell'estere metilico del PMMA.

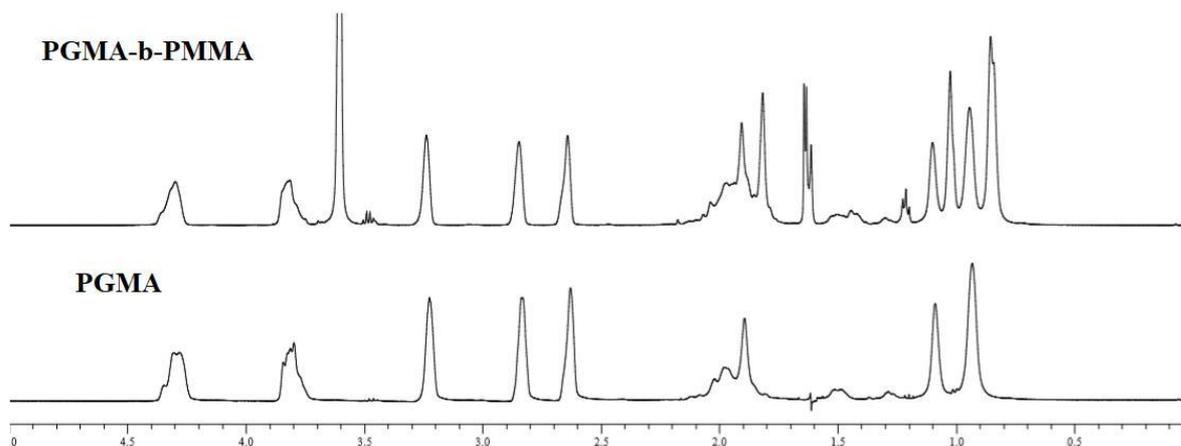


Figura 22: ^1H NMR (400 MHz CDCl_3), spettri NMR del PGMA e del copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA

Per poter calcolare il peso molecolare NMR del copolimero ottenuto, bisogna rapportare i valori degli integrali ottenuti tramite analisi ^1H NMR dei segnali del PMMA con quelli del PGMA di cui si conosce il peso molecolare ottenuto tramite GPC.

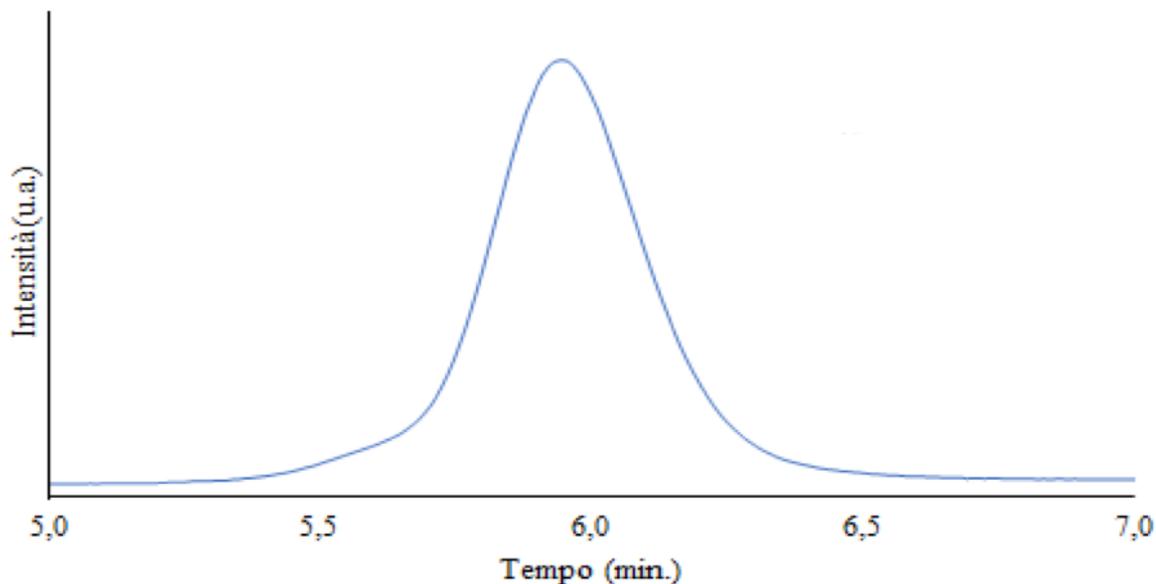


Figura 23: Cromatogramma GPC copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA

Utilizzeremo un altro copolimero già in nostro possesso, perché con caratteristiche migliori, per la funzionalizzazione con morfolina (ST177).

3.2 Trattamento di post-polimerizzazione:

Le micelle polimeriche sono aggregati nanometrici composti da macromolecole anfifiliche, comunemente un copolimero che contenga almeno due blocchi dei quali uno solubile in acqua (idrofilico) ed uno insolubile in acqua (lipofilico).

Il copolimero precedentemente sintetizzato (PGMA-b-PMMA) non possiede già queste caratteristiche anfifiliche poichè entrambi i blocchi sono insolubili in acqua, necessita quindi di un ulteriore trattamento volto a funzionalizzare uno dei blocchi conferendogli caratteristiche idrofiliche così che il copolimero abbia le caratteristiche per auto-assemblarsi in micelle.

Gli anelli epossidici dei sostituenti laterali del PGMA, possono essere trattati utilizzando un opportuno nucleofilo affinché si aprano e conferiscano una natura idrofilica ai blocchi di glicidilmetacrilato.

Nel nostro caso il nucleofilo più adatto, impiegato per aprire gli anelli, è la morfolina; le proprietà idrofiliche del copolimero così ottenuto sono conferite dalla morfolina che si lega alle catene laterali e dai gruppi ossidrilici (-OH) formati in seguito all'apertura degli epossidi.

Il copolimero ottenuto è il PHMPMA-b-PMMA [poli(2-idrossi-3morfolinopropil metacrilato)-b-(poli(metil metacrilato))] e, possedendo caratteristiche anfifiliche, può essere utilizzato per la formazione di micelle polimeriche. Sulla superficie esterna delle micelle saranno presenti gruppi ossidrilici (contenuti nel blocco di PHMPMA) che possono essere sfruttati per realizzare un ulteriore funzionalizzazione volta ad aumentare la stabilità del sistema micellare.

3.3 Funzionalizzazione con morfolina del PGMA-b-PMMA

La funzionalizzazione viene condotta mediante un processo che attraversa due stadi successivi ben distinti: il primo, a temperatura ambiente, necessita di un breve lasso di tempo, circa mezz'ora; mentre il secondo ha condizioni più spinte e tempi più lunghi di reazione.

Nella prima fase la morfolina promuove un'amminolisi sulla funzione ditiocarbossilica del gruppo RAFT ottenendo un gruppo tiolico terminale (-SH) sul polimero e una tioammide uscente (4-tiobenzoil-morfolina). Inoltre dato che la morfolina rende l'ambiente di reazione basico il gruppo tiolico terminale sarà deprotonato in soluzione: ne consegue che lo ione S^- , essendo un ottimo nucleofilo con una spiccata reattività verso i gruppi epossidici, porta alla formazione di ramificazioni intra ed intercatena.

Per ovviare a questo problema si decide di proteggere il gruppo -SH con il 2,2'-dipiridil disolfuro (DPDS), infatti si instaura un equilibrio tra S^- e lo ione disolfuro fortemente spostato verso il prodotto con il gruppo disolfuro (ditio-2-piridina) legato alla parte terminale del copolimero, data la maggior stabilità dell'anione uscente $Py-S^-$ dovuta alla delocalizzazione della carica grazie all'anello aromatico e all'N.

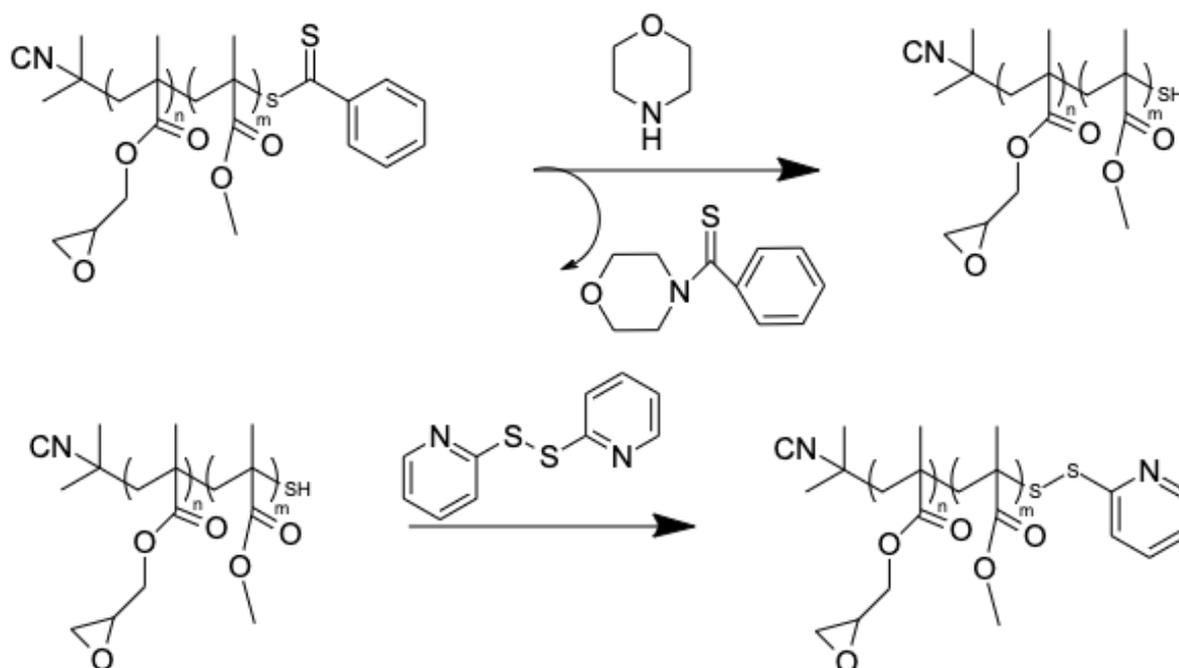


Figura 24: Schema della reazione di protezione del gruppo terminale con disolfuro

Nella seconda fase, invece, avviene una sostituzione nucleofila S_N2 in cui l'N morfolinico attacca l'atomo di C stericamente meno impedito dell'epossido, questo porta alla formazione di un gruppo ossidrilico (-OH) sul C secondario dell'epossido e all'apertura dell'anello.

Questo secondo step viene condotto a temperature maggiori ($T=80^\circ\text{C}$) e per tempi più lunghi (circa 2 ore), inoltre per essere sicuri che la sostituzione sia completa lavoriamo in forte eccesso di morfolina (10 equivalenti).

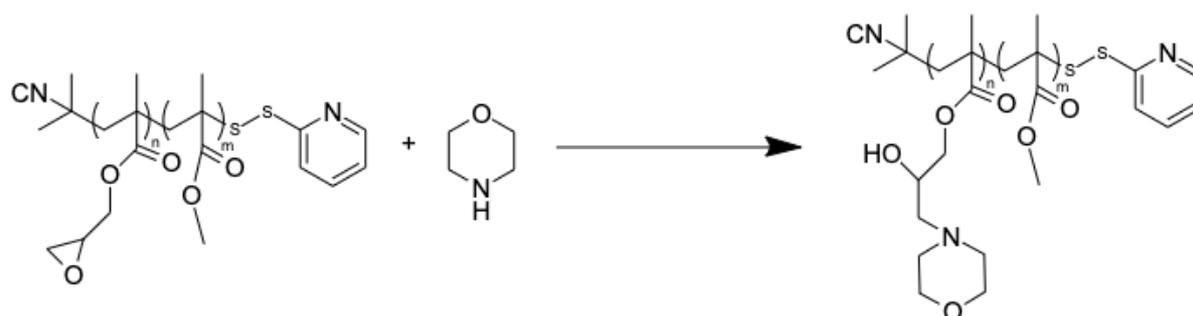


Figura 25: Schema di reazione della funzionalizzazione con morfolina del PGMA-b-PMMA

Campione	t.reazione	PM_copol_th	PMn	PD
FS_Co1	2,5h	52000	50000	1,10

Tabella 2: Dati relativi al copolimero PHMPMA-b-PMMA ottenuto (FS_Co1)

Il seguente confronto dei cromatogrammi, ottenuti tramite GPC, del PGMA-b-PMMA utilizzato per la sintesi, e del copolimero funzionalizzato conferma l'aumento del peso molecolare medio di quest'ultimo dovuto dalla presenza della morfolina reagita.

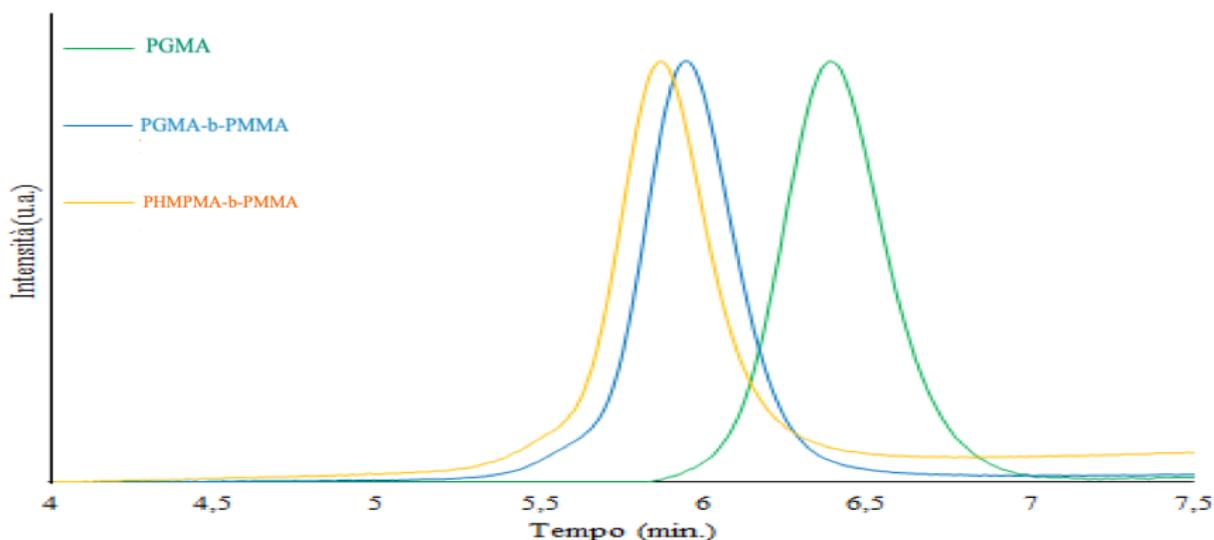


Figura 26: cromatogrammi GPC di PGMA, PGMA-b-PMMA, PHMPMA-b-PMMA

Come ulteriore conferma si sono confrontati gli spettri ^1H NMR dei copolimeri; si osserva chiaramente che la reazione è stata esaustiva. 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 CH_2 adiacenti all'ossigeno della morfolina (3.7 ppm); comparsa dei segnali corrispondenti ai protoni in α all'azoto della morfolina fra i 2.4 e i 2.7 ppm

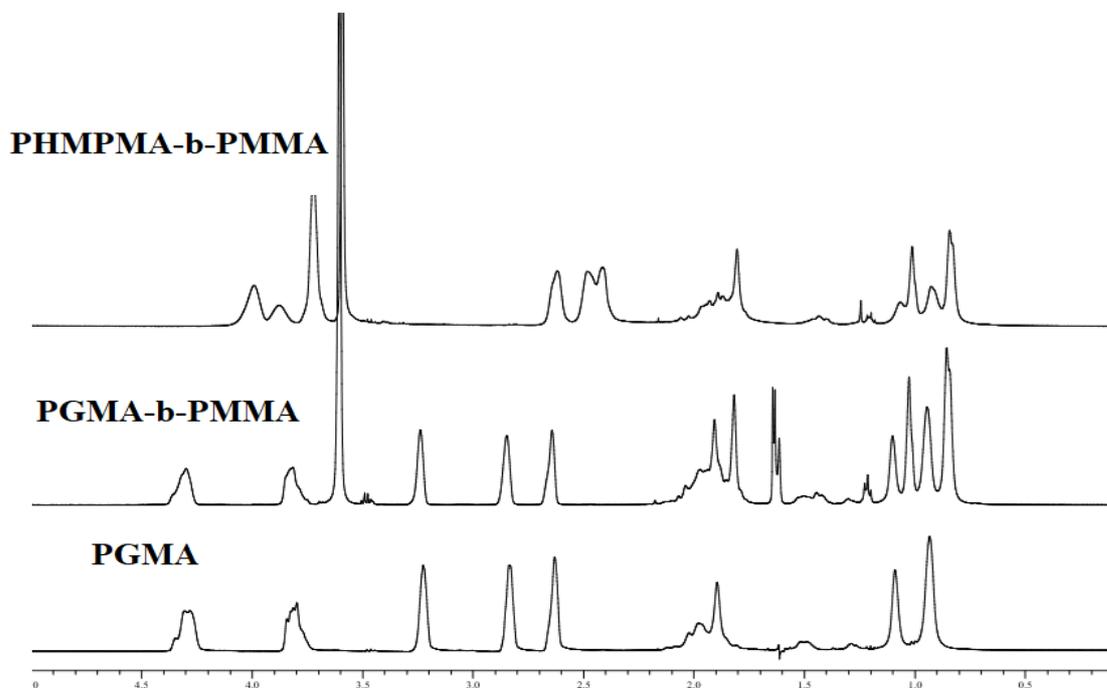


Figura 27: ^1H NMR (400 MHz CDCl_3), spettri NMR dei tre polimeri a confronto

3.4 Formazione micelle polimeriche

Per prima cosa bisogna solubilizzare il copolimero a blocchi funzionalizzato in un opportuno solvente, nel nostro caso il THF, che dissolva efficacemente entrambi i blocchi.

A completa dissoluzione si aggiunge goccia a goccia $H_2O_{mq.}$, mantenendo un'agitazione costante così da disperderla omogeneamente nel sistema, favorendo l'auto-aggregazione del copolimero in micelle. Infatti quando il rapporto tra i solventi (THF e $H_2O_{mq.}$) nel mezzo di solubilizzazione non riesce più a solvatare il blocco idrofobo di PMMA, il copolimero si organizza in micelle concentrando nel nucleo la parte idrofobica e intorno le catene idrofiliche.

La conformazione così ottenuta fornisce un'alta stabilità alla micella che deriva principalmente dalla presenza del nucleo lipofilico di PMMA che fornisce stabilità cinetica e dalla sua efficace separazione e minimizzazione di contatto con l'ambiente acquoso (tramite le catene esterne) che lo stabilizza termodinamicamente.

Per l'allontanamento del THF e conseguente purificazione della soluzione contenente le micelle si impiega la dialisi. Articoliamo questo processo di purificazione in più sottofasi per renderlo maggiormente veloce ed efficace, infatti cambiando a intervalli crescenti di tempo il bagno di dialisi, allontaneremo il THF presente rendendo di nuovo massima la differenza di concentrazione che regola il trasporto attraverso la membrana, aumentando la velocità e l'efficacia del processo.

Successivamente le micelle subiranno un ulteriore trattamento di stabilizzazione tramite polimerizzazione della PDA sulla superficie, reazione questa che viene fortemente influenzata dal pH del sistema. Per questo l'ultimo passaggio nel bagno di dialisi lo faremo in una soluzione tampone a pH controllato così da portare il pH della sospensione micellare a quello di interesse.

Dato che l'obiettivo è quello di ottenere aggregati con diametro minore di 0,45micron, faremo un'analisi DLS per determinare il diametro idrodinamico medio e la polidispersità per poi decidere se è necessaria un'ulteriore filtrazione per rimuovere le particelle troppo grandi.

	Diametro medio	Polidispersità
Micelle prima filtratura	210,33	0,212

Tabella 3: Dati DLS ottenuti previa filtratura delle micelle

3.5 Stabilizzazione con Polidopamina e Analisi

Dato che l'obiettivo finale della ricerca è quello di utilizzare le micelle prodotte per scopi clinici, anche se quelle ottenute mostrano un'alta stabilità, necessitano comunque di un'ulteriore stabilizzazione per mantenere l'integrità delle nanoparticelle nel circolo sistemico.

Per stabilizzare ulteriormente le particelle ottenute, si opta per una reticolazione esterna della struttura sfruttando la reattività dei gruppi ossidrilici (-OH) prodotti dalla rottura degli epossidi del PGMA nella precedente funzionalizzazione con morfolina.

Come reticolante è stata scelta la dopamina che è un neurotrasmettitore naturalmente prodotto dall'organismo che ha la capacità di polimerizzare in ambiente debolmente basico per l'effetto ossidante dell'ossigeno atmosferico. La polidopamina (PDA), che andrà a fissarsi sulla superficie delle micelle è biocompatibile e biodegradabile oltre che non essere un bersaglio del sistema immunitario.

Anche se la struttura della polidopamina è tuttora sconosciuta sappiamo che è composta da unità di dopamina e indolo in diversi stati di ossidazione e grazie all'abbondanza di gruppi catecolici in aggiunta a quelli amminici riesce a legarsi facilmente ai gruppi idrossilici presenti sulle catene esterne della micella.

Come detto in precedenza la polimerizzazione della dopamina è influenzata dal pH della soluzione in cui conduciamo la reazione, infatti l'ossidazione della dopamina che da luogo alla formazione di polidopamina avviene spontaneamente in ambienti leggermente basici senza ulteriori necessità.

Sono state condotte alcune reticolazioni a diversi pH per decidere quale fornisce un maggior controllo della reazione senza però influire negativamente sul grado di polimerizzazione e reticolazione finale.

Si opta di condurre il processo ad un pH di 6,5. Il pH del mezzo è debolmente acido, per cui la polimerizzazione della dopamina avviene in prossimità della superficie micellare dove la presenza delle unità morfoliniche fornisce l'ambiente debolmente basico direzionando la polimerizzazione sulla superficie delle micelle.

I campioni ottenuti mostrano una colorazione grigia, più intensa all'aumentare della concentrazione di dopamina iniziale, infatti la PDA, in soluzione ha un tipico colore grigio scuro, quindi all'aumentare del grado di reticolazione l'intensità cromatica cresce.



Figura 28: Set di campioni trattati con dopamina (da sinistra 10mM, 6mM, 4mM, 2mM) concluse le 16 ore di reazione

La reazione di reticolazione viene condotta contemporaneamente su diversi campioni identici, contenenti le micelle in soluzione acquosa precedentemente prodotte, variando la quantità di soluzione madre di dopamina aggiunta alle sospensioni e mantenendo un tempo di reazione costante, così da poter determinare la reale correlazione tra la concentrazione di dopamina aggiunta con il grado di reticolazione finale ottenuto.

Si opta per dividere la soluzione di micelle in 4 campioni con volumi identici a cui andremo ad aggiungere una quantità di dopamina tale da ottenere rispettivamente una concentrazione finale di 2, 4, 6 e 10 mM; lasceremo poi reagire per 16h in un ambiente buio dato che la reazione di reticolazione è anche sensibile alla luce.

Prima di poter procedere ulteriormente bisogna purificare i campioni ottenuti dal monomero non reagito così da evitare il procedere della polimerizzazione dovuta dall'ossidazione spontanea della dopamina che comprometterebbe i dati delle successive analisi.

Anche in questo caso si opta per una dialisi in H_2O_{mq} , con sostituzione del bagno a intervalli di tempo crescenti per velocizzare l'allontanamento della dopamina non reagita dai campioni.

Si procede quindi con un'analisi DLS per determinare se dopo la reazione di reticolazione si sono formati aggregati di dimensioni superiori ai 0,45micron, in tal caso opereremo un filtraggio per eliminare le particelle troppo grandi.

I risultati di questa ulteriore analisi ci confermano la completa eliminazione delle particelle indesiderate, inoltre fornisce i valori corretti di polidispersità e diametro medio idrodinamico delle particelle per ogni campione.

Concentrazione DA	Diametro medio	Polidispersità
2mM	47,89	0,153
4mM	47,36	0,150
6mM	48,54	0,113
10mM	46,82	0,178

Tabella 4: Caratteristiche delle micelle dopo stabilizzazione con PDA del set di campioni FS01

Come primo passo per poter studiare indirettamente la quantità di polidopamina presente nei campioni ricorriamo alla spettrofotometria UV-Vis, acquisendo spettri nell'area compresa tra 250nm e 850 nm. Con questo tipo di metodo analitico si quantifica l'assorbimento del campione analizzato alle diverse lunghezze d'onda.

Poiché i campioni da analizzare sono costituiti da una sospensione acquosa di nanoparticelle che diffonde la luce in tutte le direzioni si utilizza come rilevatore la sfera di Ulbricht (sfera integratrice) per ridurre l'assorbimento dovuto allo scattering.

La sfera integratrice è un componente ottico che consiste in una cavità sferica internamente ricoperta da uno strato riflettente bianco con due piccoli fori, uno per l'ingresso della radiazione e uno per l'uscita verso il rilevatore dello strumento. L'effetto causato da questa strumentazione è assimilabile a quello di un diffusore, infatti preserva l'energia totale senza farla disperdere ma si perdono informazioni sull'originale direzione dei raggi. Realmente accade che il raggio, dopo aver attraversato il campione, entra nella sfera e viene riflesso dalla superficie riflettente interna, in questo modo viene ridistribuito uniformemente su tutta la superficie fino ad uscire e raggiungere il rilevatore.

Questa operazione permette di integrare globalmente l'intera luce proveniente dal campione compresa quella dovuta allo scattering eliminando quindi il problema di registrare dati di assorbanza sovrastimati e incorretti che invece otterremmo utilizzando un normale UV.

Possiamo quindi, di conseguenza, 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.

$$A = \epsilon bc$$

Dove:

- ϵ 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)

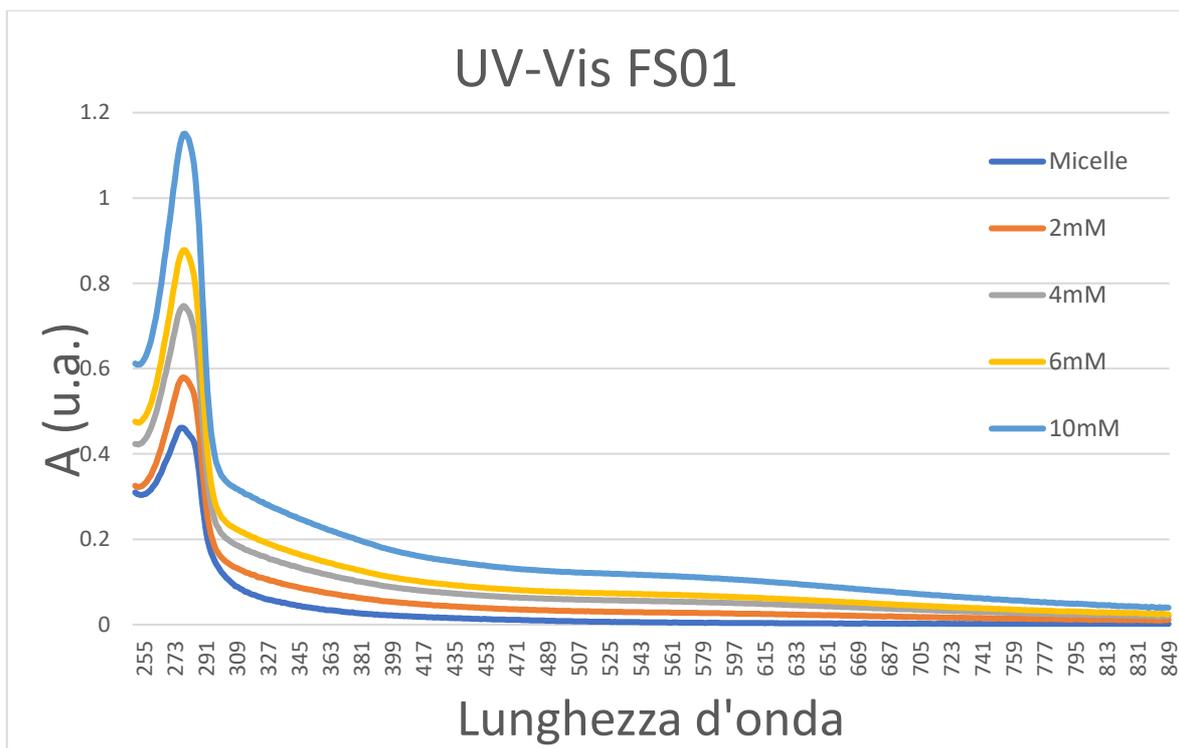


Figura 29: Spettro UV-Vis ottenuti con sfera integratrice dal set di campioni FS01

La frequenza più indicativa, ovvero quella che possiede la maggior assorbanza di PDA e la minor interferenza degli altri gruppi presenti nel polimero è intorno ai 400nm, procederemo quindi con un'analisi più dettagliata a questa lunghezza d'onda.

Studiando i dati ottenuti a 400nm si può notare un'ottimo indice di linearità, si può quindi affermare che tra la concentrazione iniziale di dopamina e quella reagita sul guscio delle micelle vi è una correlazione lineare.

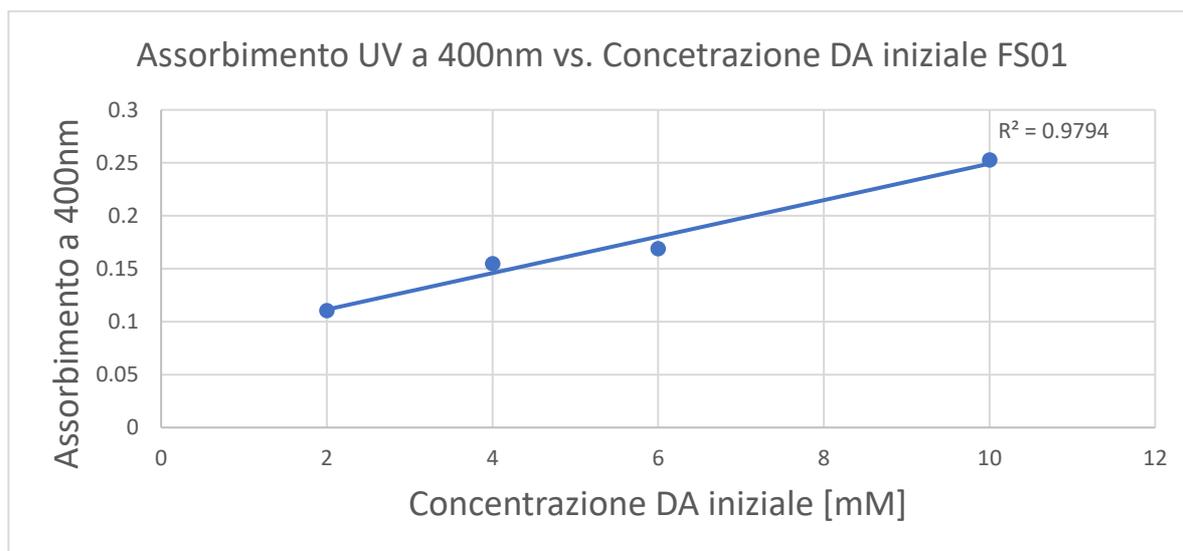


Figura 30: Assorbimento a 400nm del set di campioni FS01

Concentrazione Dopamina	Assorbanza a 400nm
2mM	0,110408
4mM	0,154703
6mM	0,169021
10mM	0,252636

Tabella 5: Valori di assorbanza a 400nm del set di campioni FS1

Ripeteremo le analisi spettrofotometriche nuovamente dopo alcuni giorni confrontando i valori precedentemente ottenuti con i nuovi per determinare se la purificazione tramite dialisi è stata efficace e la reazione di reticolazione è stata definitivamente inibita.

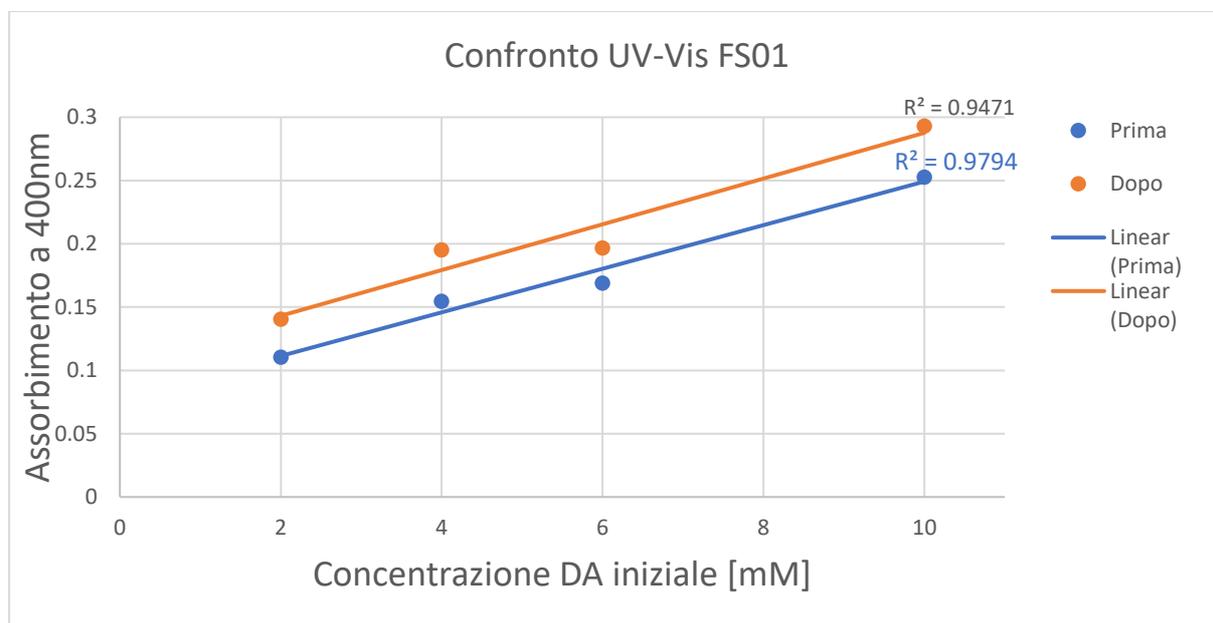


Figura 31: confronto spettri UV-Vis (400nm) del set di campioni FS01 prima e dopo

Concentrazione Dopamina	Assorbanza prima	Assorbanza dopo
2mM	0,110408	0,140455
4mM	0,154703	0,195263
6mM	0,169021	0,196784
10mM	0,252636	0,292970

Tabella 6: Valori da assorbanza a 400nm del set di campioni FS01 prima e dopo

Anche se non vi è una perdita di linearità tra i dati, si può notare come i valori intorno a 400nm aumentino sistematicamente dopo pochi giorni, se ne deduce che la dopamina non reagita non è stata efficacemente eliminata con una semplice dialisi in H_2O_{mq} e che di conseguenza la reazione di formazione di polidopamina è continuata anche durante e dopo la dialisi.

Per cercare di ovviare questo problema si è deciso di procedere immediatamente al processo di liofilizzazione dopo aver eseguito le analisi UV-Vis dei campioni ottenuti.

Le temperature molto basse durante il processo dovrebbero interrompere l'avanzare della reazione di reticolazione (cinetica), inoltre l'allontanamento dell'acqua dai campioni ne impedirà il proseguimento quando la temperatura verrà ristabilita.

Dopo il processo di liofilizzazione, l'acqua è stata completamente rimossa e i campioni risultanti sono solidi spugnosi che mantengono la loro gradazione cromatica grigia, già presente in soluzione e dovuta dalla PDA.



Figura 32: Set di campioni dopo il processo di liofilizzazione

Eliminata l'acqua i campioni solidi possono essere ora impiegati per ulteriori analisi come la spettroscopia infrarossa (IR) e l'analisi termogravimetrica (TGA).

Per prima cosa i campioni vengono caratterizzati tramite analisi IR mediante la tecnica di campionamento ATR (attenuated total reflectance).

La spettroscopia IR sfrutta l'assorbimento da parte di alcune molecole di fotoni nel campo dell'infrarosso, prodotti dalla sorgente dell'apparecchio, che aumentando l'energia interna inducono la molecola in uno stato vibrazionale eccitato a energia maggiore rispetto a quello fondamentale.

Quando la fonte energetica non interagisce più con alla molecola, questa per tornare allo stato vibrazionale fondamentale, ovvero il più stabile, riemetterà questa energia in eccesso tramite vibrazioni molecolari producendo una radiazione che viene rilevata dal rilevatore e trasformata in un segnale elettrico in funzione della concentrazione dell'analita.

La scelta di utilizzare specificatamente il metodo di campionamento ATR è dovuta principalmente per la facilità e velocità con cui è possibile preparare i campioni e compiere analisi IR, infatti rende possibile analizzare sia materiali solidi che soluzioni senza ulteriori trattamenti preparativi.

Per poter usufruire della tecnica ATR si necessita di un cristallo specifico, nel nostro caso diamante, posto tra il campione e la radiazione infrarossa emessa dalla fonte dell'IR sfruttando la sua proprietà di riflessione interna totale per trasformare la radiazione incidente in un'onda evanescente.

Un'onda evanescente è assimilabile a un normale campo elettromagnetico ma a differenza di quest'ultimo non si espande spazialmente dopo essere stato generato, rimanendo concentrato nelle circostanze della fonte.

L'onda evanescente, creata dalla riflessione interna del cristallo, penetra nel campione posto immediatamente sopra per poi essere parzialmente riflessa e immediatamente rilevata all'uscita dal cristallo.

Gli spettri vengono acquisiti in un range tra 600nm e 4000nm con particolare interesse all'area compresa tra 1550nm e 1650nm dove abbiamo il maggior assorbimento della polidopamina rapportato all'interferenza del resto dei gruppi funzionali presenti; inoltre si sceglie di registrare gli spettri in assorbanza, anziché trasmittanza, per avere una risposta quantitativa ed un confronto più immediato con gli esperimenti UV-Vis.

In questo caso la lunghezza d'onda prestabilita per calcolare il fattore correttivo è 1724nm, dato che rappresenta il legame carbonilico (C=O) delle catene esterne delle micelle, infatti il rapporto tra la diminuzione del picco del carbonile e l'aumento di quello riferito alla PDA è proporzionale, quindi a seguito della normalizzazione è possibile confrontare i vari assorbimenti della PDA, intorno ai 1599nm, in funzione della concentrazione iniziale ottenendo così risultati corretti.

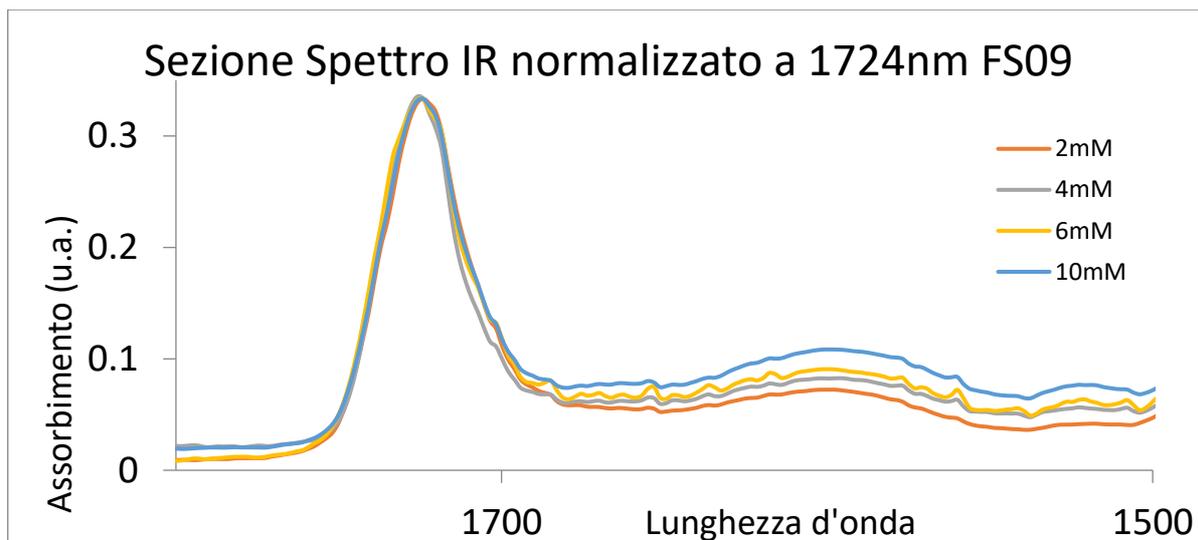


Figura 33: Sezione spettro IR normalizzato del set di campioni FS09

L'analisi dei risultati ottenuti dall'assorbimento intorno ai 1599nm conferma la correlazione lineare riscontrata nelle precedenti analisi UV-Vis tra la concentrazione di dopamina iniziale e la quantità reagita sulla superficie delle micelle.

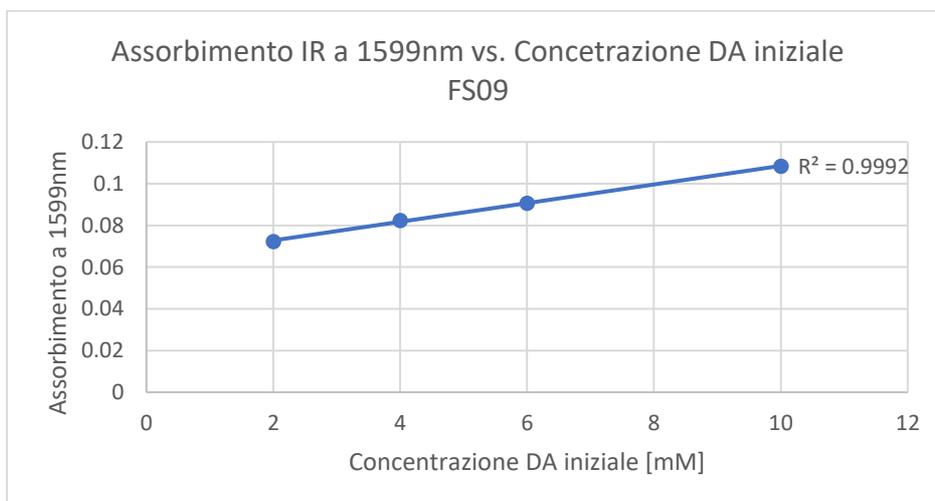


Figura 34: Assorbimento a 1599nm del set di campioni FS09

Concentrazione Dopamina	Assorbanza a 1599nm
2mM	0,072346
4mM	0,082336
6mM	0,090689
10mM	0,108407

Tabella 7: Valori da assorbanza a 1599nm del set di campioni FS09

Come nel caso precedente per determinare se il processo di reticolazione è progredito anche dopo la liofilizzazione si ripete l'analisi IR anche dopo alcuni giorni e si confrontano i dati ottenuti intorno ai 1599nm.

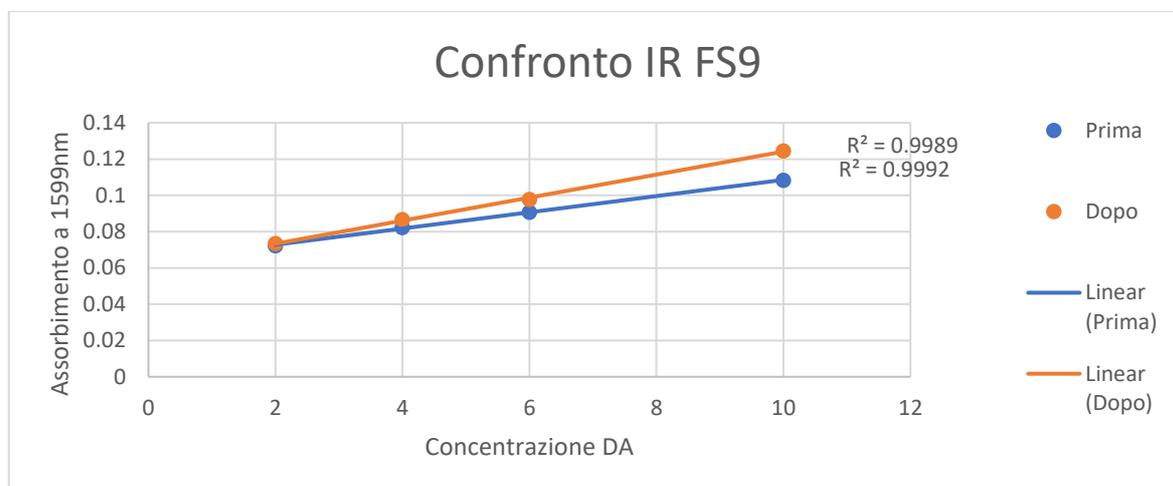


Figura 35: confronto spettri IR (1599nm) del set di campioni FS09 prima e dopo

Concentrazione DA	Assorbanza prima	Assorbanza dopo
2mM	0,072346	0,073504
4mM	0,082336	0,086616
6mM	0,090689	0,097721
10mM	0,108407	0,124560

Tabella 8: Valori da assorbanza a 1599nm del set di campioni FS09 prima e dopo

Sembra che la reazione, anche se in piccola parte, comunque progredisca anche dopo il trattamento di liofilizzazione, probabilmente essendo il materiale solido ottenuto spugnoso e la chiusura dei recipienti non stagna un po' di umidità tende a penetrare riattivando i processi di ossidazione della dopamina non reagita e ancora presente sul materiale. C'è la necessità di trovare una soluzione per aiutare l'inibizione della reticolazione durante il periodo di dialisi. Si opta per fare il primo passaggio in un bagno leggermente acido, questo dovrebbe interrompere l'ossidazione della dopamina che richiede ambienti alcalini per essere spontanea.

In questo modo dovremmo ottenere sia l'allontanamento del monomero non reagito dalle micelle che l'inibizione della sua polimerizzazione prima della completa rimozione.

Come ulteriore metodo analitico per confermare i dati ottenuti fino a questo momento decidiamo di impiegare la termogravimetria (TGA), questa infatti ci permette di quantificare la reale percentuale in peso di PDA presente nei campioni, utilizzando come standard il copolimero impiegato nella produzione delle micelle poichè privo di polidopamina e in forma solida.

Dato che le micelle non reticolate non resistono strutturalmente al processo di liofilizzazione, i relativi campioni non potevano essere analizzati, comunque il copolimero che le costituisce è lo stesso dello standard rendendo superflua questa ulteriore analisi.

I campioni, opportunamente pesati, sono stati sottoposti ad una rampa di riscaldamento di 10°C al minuto da una temperatura di partenza di 40°C fino a raggiungere gli 800°C sempre sotto atmosfera inerte (N₂).

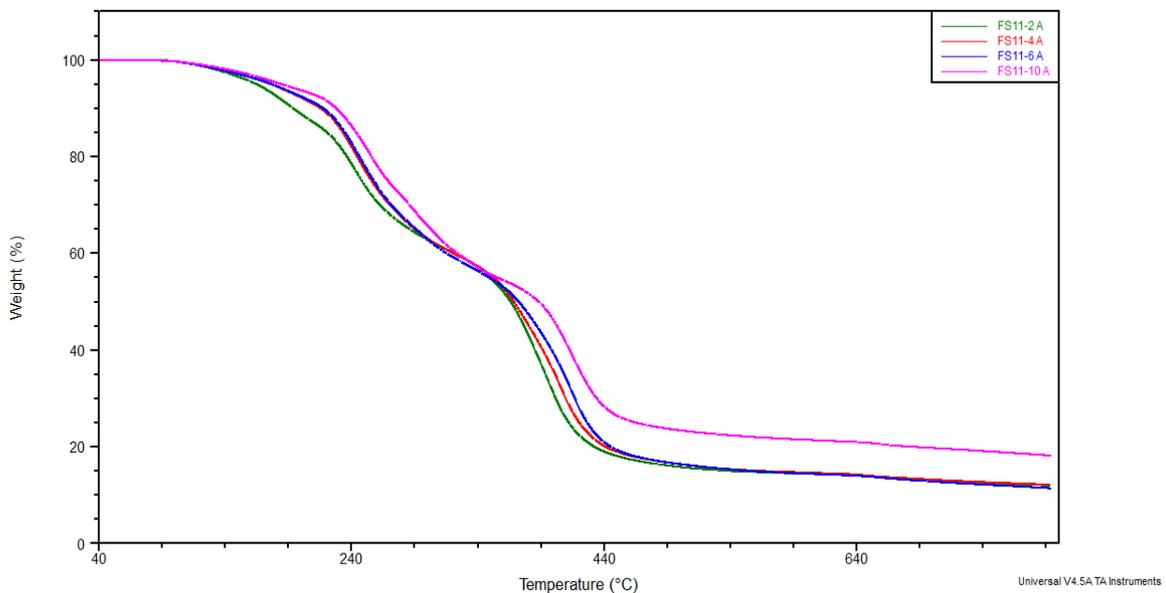


Figura 36: termogramma del set di campioni FS11 (2, 4, 6, 10mM in PDA)

Si può notare come durante la rampa i campioni abbiano diverse perdite di peso dovute alla perdita di gruppi funzionali, ma il dato di reale interesse è il residuo % di polidopamina a 800°C dato che a quelle temperature l'unico residuo rimasto dovrebbe essere proprio quello della PDA.

I termogrammi acquisiti per ogni set sono solamente due, la TGA è un metodo analitico distruttivo e la quantità di campione è minima, quindi non è stato possibile effettuare ulteriori studi.

Derivando i risultati dalla media fra i dati dei due termogrammi, (escludendo il 2mM della seconda analisi che ha dato risultati improbabili) possiamo confermare la linearità precedentemente riscontrata nelle analisi UV-Vis e IR del campione in analisi (FS11).

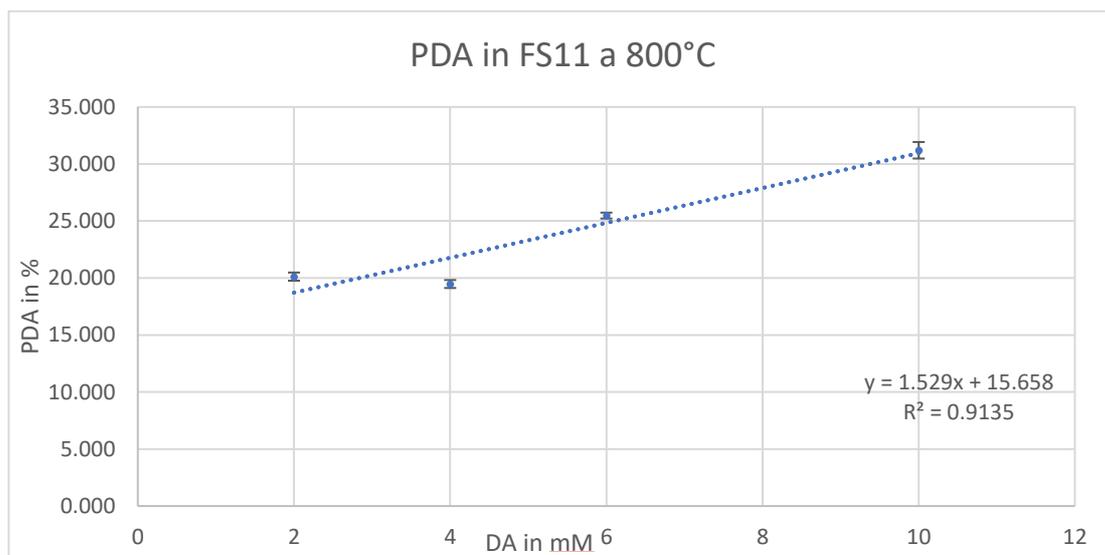


Figura 37: Residuo % di PDA a 800°C in funzione della concentrazione iniziale di DA del set di campioni FS11

Concentrazione DA	Media residuo PDA (%) a 800°C
2mM	20,069
4mM	19,019
6mM	25,266
10mM	31,541

Tabella 9: Percentuale in peso di PDA nei campioni FS 11 al variare della concentrazione iniziale di dopamina

4. CONCLUSIONI

Grazie alla tecnica di polimerizzazione radicalica controllata RAFT è stato possibile sintetizzare il copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA mantenendo un peso molecolare controllato e un basso indice di polidispersità.

In seguito facendo reagire il blocco di poli(glicidil metacrilato) con la morfolina si ottiene un omopolimero il PHMPMA, solubile in acqua, grazie all'alto grado di idratazione che i gruppi ossidrilici e morfolinici garantiscono, rendendo il copolimero precedentemente ottenuto anfifilico.

Questa funzionalizzazione post-polimerizzazione porta a superare lo svantaggio della tecnica RAFT che necessita di ottimizzare le condizioni sintetiche per ogni monomero.

Mediante analisi DLS (Dynamic Light Scattering) è stato dimostrato che le dimensioni delle micelle ottenute sono minori di 45nm, dimensione di interesse per l'utilizzo in ambito sanitario.

Inoltre a seguito della reazione di reticolazione con polidopamina per ottenere una maggiore stabilità e biocompatibilità si è dimostrato che la dopamina riesce a polimerizzare anche a pH leggermente acidi, ma solo in vicinanza dell'azoto morfolinico che fornisce un ambiente debolmente basico, inoltre riesce ad aderire efficacemente alla superficie della micella con l'aiuto dei gruppi idrossilici formati durante la rottura dell'anello epossidico del PGMA.

Infine confrontando i risultati ottenuti dalle analisi UV-Vis con sfera integratrice e IR-ATR è stato possibile confermare la correlazione lineare (con valore di R^2 prossimo a 1) tra l'assorbanza registrata e la quantità di polidopamina presente nelle micelle e come ulteriore conferma è stata eseguita un'analisi TGA per stabilire la relazione tra il contenuto in peso residuo a 800°C di polidopamina e la quantità presente nelle micelle.

Confrontando quindi i risultati ottenuti con le precedenti analisi è stato possibile confermare che il grado di polimerizzazione della polidopamina adesa alle micelle è linearmente correlata alla quantità di dopamina iniziale aggiunta in soluzione.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 Solventi e reagenti:

Il cloruro di metilene (CH_2Cl_2), THF e etere etilico (per precipitazioni) distillato tramite rotavapor per allontanare stabilizzanti e impurezze prima dell'utilizzo.

DPDS (2,2'-dipiridil solfuro) per funzionalizzazione con morfolina non distillato (puro sigma-aldrich), anche solventi per analisi come cloroformio deuterato (CDCl_3).

L'acqua utilizzata invece viene previamente filtrata da apposite membrane per deionizzarla.

I reagenti impiegati nelle funzionalizzazioni e sintesi non subiscono trattamenti preventivi.

L'agente RAFT impiegato per la sintesi è stato precedentemente sintetizzato ed analizzato.

5.2 Strumentazione

5.2.1 Spettrometri NMR

Per le analisi NMR vengono impiegate 2 apparecchiature distinte:

- a. Varian Mercury NMR System 400MHz, i chemical shifts sono stati determinati in ppm dal tetrametilsilano (TMS) utilizzato come riferimento interno.

Gli spettri H-NMR sono stati eseguiti usando i seguenti parametri:

Numero di acquisizioni 32, pulse width 30° e delay 10s

- b. Agilent DD'' NMR System 500MHz: i chemical shifts sono stati determinati in ppm dal tetrametilsilano (TMS) utilizzato come riferimento interno.

Gli spettri H-NMR sono stati eseguiti usando i seguenti parametri:

Numero di acquisizioni 32, pulse width 30° e delay 10s

5.2.2 Gel Permeation Chromatography (GPC)

Le analisi GPC sono state effettuate utilizzando una pompa HPLC Merck Hitachi L7100 collegata a una colonna impaccata Polymer Laboratories 300x7,5mm, 0,3 μm , 200-400000 e un rivelatore ad indice di rifrazione Shodex RI-71. Il solvente impiegato nell'analisi è il THF.

5.2.3 Dynamic Light Scattering (DLS)

Abbiamo impiegato come apparecchiatura un Brookhaven NanoBrook Omni, inoltre le analisi sono state fatte a temperatura costante di 25° e poichè abbiamo utilizzato come solvente solamente l'acqua le cuvette impiegate sono composte di policarbonato

5.2.4 Spettrofotometria UV-Vis:

Abbiamo utilizzato come apparecchiatura per registrare gli spettri il Perkin Elmer LAMBDA 950 con l'aggiunta della sfera integratrice (100 MM Pbs) come rilevatore. Gli spettri sono stati registrati in un range compreso tra 850nm e 250nm impiegando cuvette in quarzo.

5.2.5 IR-ATR

Gli spettri sono stati registrati in un range tra 4000nm e 600nm, utilizzando come cristallo ATR il diamante.

5.2.6 Termogravimetria (TGA)

Le analisi termogravimetriche sono state effettuate per mezzo di un'apparecchiatura della TA Instruments (USA) modello Q600. I campioni, previa pesatura (4/5mg) sono posti in crogioli di allumina ed essiccati in stufa a 80°C per allontanare l'acqua/umidità presente.

La rampa di riscaldamento impiegata è di 10°C/min da temperatura ambiente (25°C) fino a 800°C sotto flusso costante di inerte (azoto); infine abbiamo un ultimo step isoterma in aria.

5.3 Sintesi copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA

In un matraccio da 3mL solubilizzo 0,350g di PGMA macro-RAFT (utilizziamo PGMA precedentemente sintetizzato ED₃_4h) con poco solvente (CH₃CN) infine aggiungo 2,1mL di MMA. Dopo completa solubilizzazione aggiungo circa 0,132mg di iniziatore (AIBN) e porto a volume con acetonitrile (CH₃CN).

Pongo il tutto in un ampolla di reazione che viene sottoposta a 4 cicli sotto alto vuoto di congelamento con azoto liquido e scongelamento con acqua a temperatura ambiente, così da rimuovere efficacemente tutto l'ossigeno presente nel sistema.

La reazione viene quindi condotta e mantenuta alla temperatura di 70°C, grazie a un bagno d'acqua termostata, per 5 ore.

Concluso il tempo necessario si concentra la soluzione al rotavapor, allontanando il solvente e il monomero non reagito.

L'ultimo step è quello della purificazione del prodotto tramite precipitazione e filtrazione. Si ridiscioglie il prodotto in una piccola aliquota di diclorometano distillato (CH₂Cl₂) precipitandolo poi in 400mL di etere etilico distillato sotto agitazione costante. Infine si filtra la soluzione di etere etilico con la sospensione tramite un filtro sottovuoto ottenendo il copolimero solido umido che viene posto in essiccatore sottovuoto per la rimozione dell'etere rimasto.

Il copolimero così ottenuto viene quindi pesato e analizzato tramite GPC, per risalire ai valori di PM e di polidispersità, e HNMR (ottenendo la conversione).

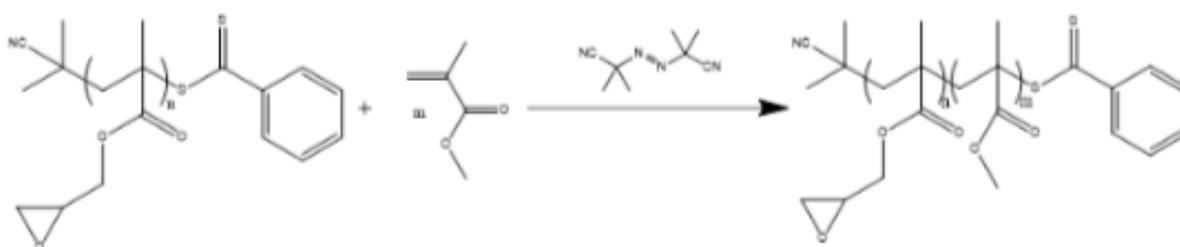


Figura 38: Scema della sintesi del PGMA-b-PMMA

5.4 Reazione di funzionalizzazione con morfolina per ottenere PHMPMA-b-PMMA

La funzionalizzazione della parte glicidica del copolimero PGMA-b-PMMA tramite morfolina viene articolata in 2 fasi consecutive e in presenza di forti eccessi dei reagenti che aiutano la reazione a raggiungere la completezza nei tempi prestabiliti (?3 equivalenti di disolfuro rispetto al polimero e 10 di morfolina rispetto alle unità glicidiche, inoltre la concentrazione di morfolina nell'ambiente di reazione dovrà essere di 2M?):

1. Fase 1: Protezione del gruppo terminale (-S⁻)

Poniamo 100mg di copolimero a blocchi PGMA-b-PMMA in un pallone tarato da 25mL, aggiungiamo quindi 1,70mg di disolfuro e sciogliamo il tutto, sotto agitazione, in 2,5mL di N-metilpirrolidone (NMP).

A completa dissoluzione dei reagenti si aggiungono 0,44mL di morfolina e si lascia reagire a temperatura ambiente (25°C) per 30 minuti.

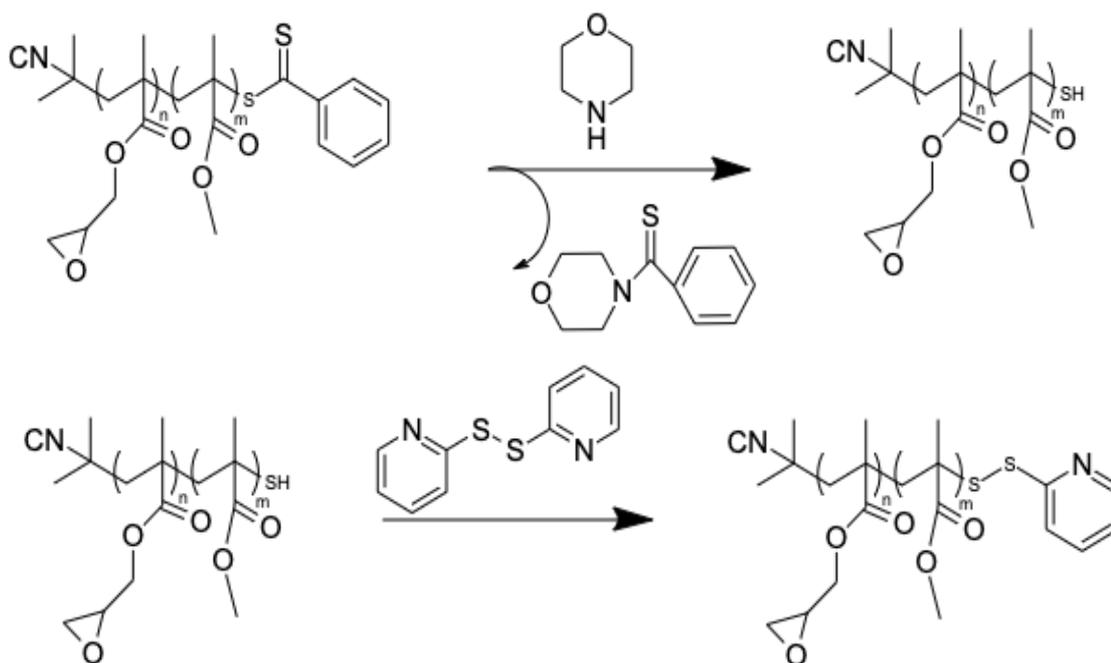


Figura 39: Fase 1, protezione del gruppo terminale

2. Fase 2: Funzionalizzazione parte glicidica da parte della morfolina

Conclusa la prima fase il pallone, contenente la miscela di reazione, viene posto in un bagno d'olio termostato a 80°C per 2 ore.

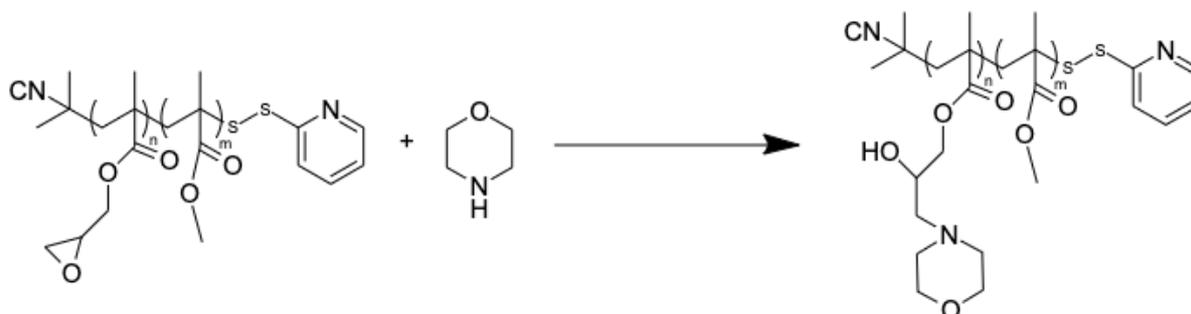


Figura 40: Fase 2, funzionalizzazione da parte della morfolina

Dopo che la soluzione si è raffreddata a temperatura ambiente si procede con una distillazione, per mezzo di un Kugelrohr, volta all'allontanamento del solvente fino ad ottenere un sottile film polimerico gialastro omogeneo distribuito sulle pareti del pallone.

Per purificare il prodotto dalle impurezze rimaste dopo la distillazione si procede sciogliendo il film polimerico in pochissimo dicloro metano distillato (CH₂Cl₂) per poi riprecipitarlo sotto agitazione in 300mL di etere etilico distillato.

Concludendo si filtra tramite filtro sottovuoto la soluzione di etere etilico, ottenendo così il copolimero funzionalizzato PHMPMA-b-PMMA, posto poi in essiccatore sottovuoto fino a completa asciugatura.

Si analizza il prodotto ottenuto tramite HNMR e GPC, per ottenere i valori di polidispersità e PM.

5.5 Formazione micelle

Si opta per preparare rispettivamente 8 batch di micelle identiche.

In un provettone solubilizzo 6mg di copolimero funzionalizzato PHMPMA-b-PMMA in 1mL di THF distillato.

A completa dissoluzione si ottiene una soluzione completamente trasparente alla quale si aggiungono, goccia a goccia, 5mL di acqua deionizzata mantenendo il sistema in agitazione con l'impiego di un agitatore vortex.

Le micelle ottenute sono quindi purificate dal solvente organico rimasto (THF) e dal monomero non reagito tramite un processo di dialisi.

I campioni vengono posti in una membrana semipermeabile, poi sigillata alle estremità, immersa quindi in 2L di acqua deionizzata, si cambia il bagno di dialisi 3 volte a intervalli di tempo crescenti.

Per concludere si effettuano analisi DLS e NMR per la caratterizzazione del prodotto.

5.6 Stabilizzazione micelle con polidopamina

Vengono utilizzati 8 batch di micelle preparate seguendo la procedura riportata nel paragrafo precedente, (? Prima di procedere con la stabilizzazione facciamo un ulteriore passaggio in dialisi con la differenza che in questo caso utilizzeremo una soluzione tampone leggermente acida, composta da 2L di acqua deionizzata e 2,312g di Acetato d'ammonio (15mM) per stabilizzare il pH a 6,5?).

Il volume totale ottenuto dopo l'unione degli 8 batch viene quindi diviso in 4 aliquote identiche. Ad ogni campione viene aggiunta una quantità di soluzione madre di dopamina (?precedentemente preparata sciogliendo 133mg di dopamina cloridrata in un matraccio da 5mL portando poi a volume con acqua deionizzata?) tale da ottenere le concentrazioni desiderate: 2mM, 4mM, 6mM, 10mM portando poi a volume uguale con aggiunta di acqua deionizzata (?soluzione tampone?).

I campioni vengono posti al buio e lasciati reagire per 16 ore.

Concluso il tempo di reazione i campioni vengono sottoposti a una purificazione attraverso dialisi per allontanare il monomero (dopamina) non reagito.

I campioni vengono posti in altrettante membrane semipermeabili e immersi nel bagno di dialisi, che verrà cambiato 3 volte a intervalli di tempo crescenti.

Il primo passaggio di dialisi in questo caso avviene in una soluzione leggermente acida preparata precedentemente aggiungendo 0,11mL di acido acetico a 2L di acqua deionizzata (1mM AcOH).

I seguenti 2 bagni sono interamente composti da 2L di acqua deionizzata.

Si procede, previa filtratura dei campioni con filtro 0,45micron, con le analisi DLS ed UV-Vis (con sfera integratrice) per caratterizzare i prodotti.

Segue un passaggio in liofilizzatore della durata di 24 ore al fine di rimuovere tutta l'acqua e ottenere campioni solidi per analisi IR (ATR) e TGA.

5.7 Sintesi PDA

In un pallone da 100mL si solubilizzano 57mg di dopamina cloridrata in 30mL di acqua deionizzata. (ottenendo una concentrazione di 0,01M in dopamina).

Viene preparata una soluzione madre di NaOH (1M con 0,4g di NaOH in 10mL di acqua deionizzata) da aggiungere in quantità tale da ottenere un rapporto 1:0,8 (DA/NaOH quindi 0,24mL).

Il pallone viene quindi immerso in un bagno d'olio termostato a 50°C per 5 ore.

Terminato il tempo di reazione si lascia raffreddare a temperatura ambiente il pallone, quindi si trasferisce il contenuto e i lavaggi con acqua deionizzata in una membrana semipermeabile posta poi a bagno in 2L di acqua deionizzata per un passaggio di dialisi.

Conclusa la dialisi viene rimossa l'acqua in eccesso tramite un rotavapor e in seguito il campione viene liofilizzato per 24ore.

5.8 Tecniche di analisi

5.8.1 Dynamic Light Scattering (DLS): [26, 27]

Dynamic Light Scattering (DLS) è uno dei metodi di analisi maggiormente impiegati, data la breve durata delle analisi e la completa automazione del processo (?oltre il baso costo?), per determinare le dimensioni di particelle sospese come micelle e nanoparticelle o di aggregati come colloidi o emulsioni.

Questa tecnica analitica si basa essenzialmente su due presupposti:

- Moto Browniano delle particelle,
- Le particelle siano sferiche e di diametro minore rispetto alle dimensioni molecolari

Irraggiando il campione con un fascio di luce a lunghezza d'onda nota il rilevatore misurerà nel tempo le variazioni di intensità di luce deflessa (scattering)(intensità/tempo).

Le particelle più piccole si muovono più velocemente rispetto a quelle di dimensioni maggiori, questo si riflette su variazioni più rapide dell'intensità di scattering.

Grazie a un autocorrelatore la velocità della variazione di intensità viene calcolata e poi tramite la funzione di autocorrelazione si ottiene il coefficiente di diffusione delle particelle.

Tramite la relazione di Stock-Einstein, che lega il coefficiente di diffusione al diametro idrodinamico della particella è possibile ottenere la distribuzione dimensionale del campione.

$$\text{Relazione Stock - Einstein: } D = \frac{k_B T}{3\pi\eta\alpha}$$

Dove:

- D: Coefficiente di diffusione
- k_B : Costante di Boltzman
- T: temperatura in Kelvin
- η : Coefficiente di viscosità del solvente
- α : diametro idrodinamico particella

L'equazione tiene conto della temperatura e del coefficiente di viscosità del solvente perché influenzano direttamente la velocità delle particelle presenti in soluzione.

Il dato finale ottenuto, però, può essere sovrastimato dato che attorno alle particelle possono esserci solvate molecole di solvente che modificano il reale diametro della particella.

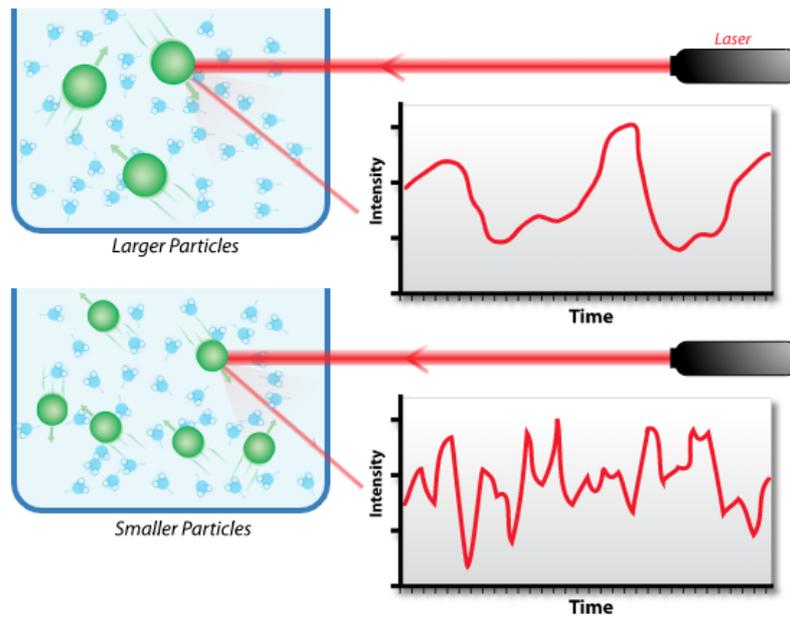


Figura 41: effetto della dimensione delle particelle

5.8.2 Cromatografia a permeazione di gel (GPC) [28, 29]

La cromatografia a permeazione di gel (GPC) è un tipo di cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) che separa gli analiti in base al volume idrodinamico (dimensioni), tipicamente in un flusso di solventi organici.

È il metodo più impiegato attualmente per la separazione e purificazione sia di polimeri naturali che di prodotti complessi, data la velocità di analisi unita a una minima distruzione del campione (basso costo economico e facilità dell'analisi dovuta alla completa automazione dell'apparecchiatura).

Lo strumento della GPC è composto principalmente da:

- Pompa: mantiene il flusso di polimero in soluzione costante e lo immette nel sistema;
- Iniettore: introduce la soluzione da analizzare nella colonna cromatografica (fase mobile)
- Colonna cromatografica impaccata con una resina che funge da fase stazionaria (nel nostro caso stirene-vinilbenzene) dove avviene la separazione dei componenti presenti nel campione
- Rilevatore: monitora l'uscita dei componenti eluiti in colonna
- Computer che traduce ed elabora i dati forniti dal rilevatore riportando i valori numerici di interesse.

Il funzionamento è relativamente semplice: la separazione avviene in base alle dimensioni delle particelle, che generalmente è proporzionale al peso molecolare delle stesse, e alle dimensioni dei pori presenti nella matrice impaccata nella colonna. Si nota infatti che particelle di dimensioni maggiori a quelle dei pori eluiscono più velocemente nella colonna uscendo per prime, mentre quelle di dimensioni minori dato che percorrono le cavità porose della fase stazionaria impiegano maggior tempo ad attraversare la colonna, uscendo in un secondo momento.

Conclusa la prova il computer elabora un cromatogramma partendo dai volumi di eluizione ottenuti durante l'analisi, infine, previa taratura con un composto a peso molecolare noto (polistirene), fornisce il peso molecolare del composto analizzato.

Il volume totale della colonna è dato da:

$$V_t = V_0 + V_i + V_s$$

Con:

- V_0 : volume del solvente interstiziale
- V_i : volume di solvente nei pori
- V_s : volume occupato dalla matrice solida

Il volume di eluizione invece è dato da:

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

Con:

- K_d : costante dimensionale delle particelle che varia da 0, per le particelle grandi, a 1, per quelle più piccole.

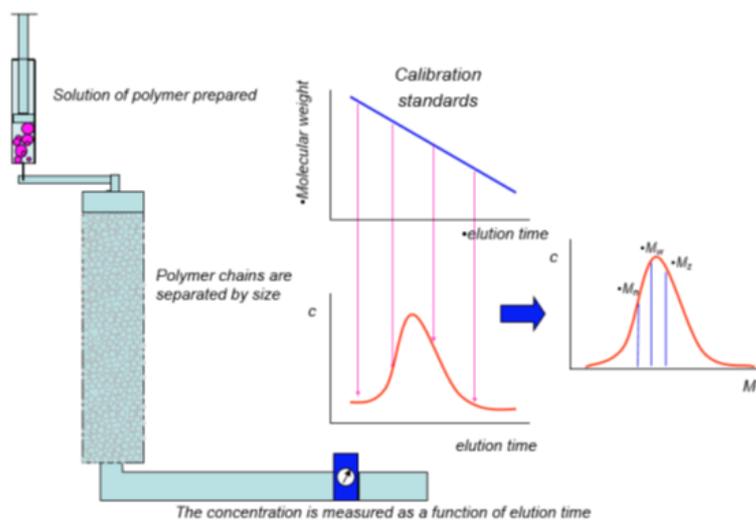


Figura 42: schema di funzionamento di una GPC

5.8.3 Sfera integratrice [30, 31]

La sfera integratrice è un componente ottico, utilizzato anche come accessorio dello spettrofotometro, è costituito da una cavità sferica cava completamente ricoperta da un rivestimento riflettente, con due piccoli fori (porte) per l'ingresso e l'uscita della radiazione elettromagnetica.

Il funzionamento della sfera integratrice si basa su due presupposti:

- La radiazione che colpisce l'interno della sfera viene diffusa in modo diffusivo;
- Solo la radiazione che è stata diffusa all'interno della sfera può colpire la porta d'uscita e quindi il rivelatore;

La radiazione, infatti, dopo l'ingresso nella sfera colpisce le pareti riflettenti subendo numerose riflessioni fino a essere dispersa in modo uniforme su tutta la superficie interna, a questo punto passa nella porta di uscita e può essere analizzata da un rivelatore.

Il vantaggio di impiegare la sfera integratrice come accessorio per lo spettrofotometro è che il livello di radiazione integrato risultante è direttamente proporzionale al livello di radiazione iniziale e può essere facilmente misurato utilizzando un rivelatore.

Per la scelta del materiale riflettente interno si è optato per PTFE solido, infatti presenta una riflettanza diffusa molto elevata nell'intervallo spettrale di 250-2500nm con particolare efficacia (99%) nel range tra 400-1500nm.

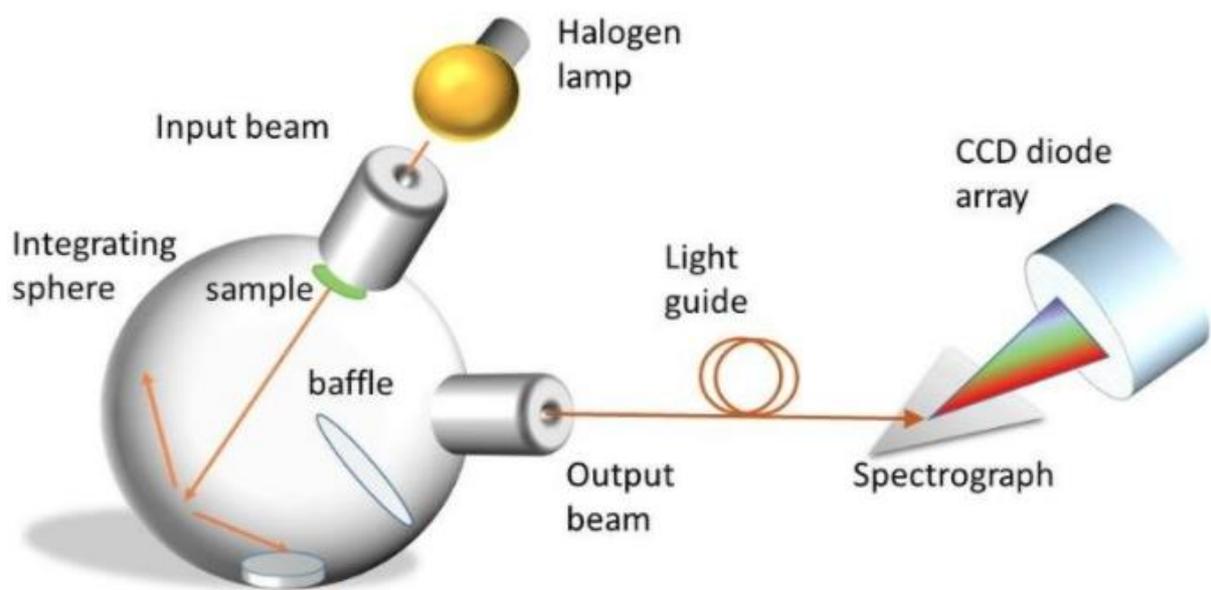


Figura 43: schema di funzionamento di una generica sfera integratrice

5.8.4 Attenuated Total Reflection (ATR) [32]

La riflessione totale attenuata (ATR) è una tecnica analitica associata principalmente alla spettroscopia infrarossa che permette di esaminare campioni solidi o liquidi evitando complicati passaggi di preparazione altrimenti necessari (FT-IR).

Questa tecnica sfrutta il fenomeno della riflessione interna totale ad opera di un'interfaccia (cristallo ATR) per formare un'onda evanescente che penetra nel campione.

Il fenomeno della riflessione totale avviene solamente se la radiazione incidente, colpendo l'interfaccia, forma un angolo minore rispetto a quello critico; in questo caso, infatti, la luce subisce una riflessione interna totale generando un'onda di superficie o evanescente.

Un'onda evanescente è un campo elettromagnetico oscillante che non propaga come le normali onde elettromagnetiche, infatti l'energia è spazialmente concentrata nelle vicinanze della fonte.

Perché sia possibile ottenere questo fenomeno bisogna accoppiare allo spettrometro IR:

- Un cristallo ATR ad elevato indice di rifrazione posto tra il campione e la radiazione IR incidente;
- L'indice di rifrazione del cristallo ATR deve essere maggiore di quello del campione in analisi.

Si possono trovare molti tipi di cristalli ATR differenziati principalmente da forma e composizione ognuno dei quali ha diverse specificità (campioni liquidi, campioni solidi, campioni duri, superficie liscia/segheata).

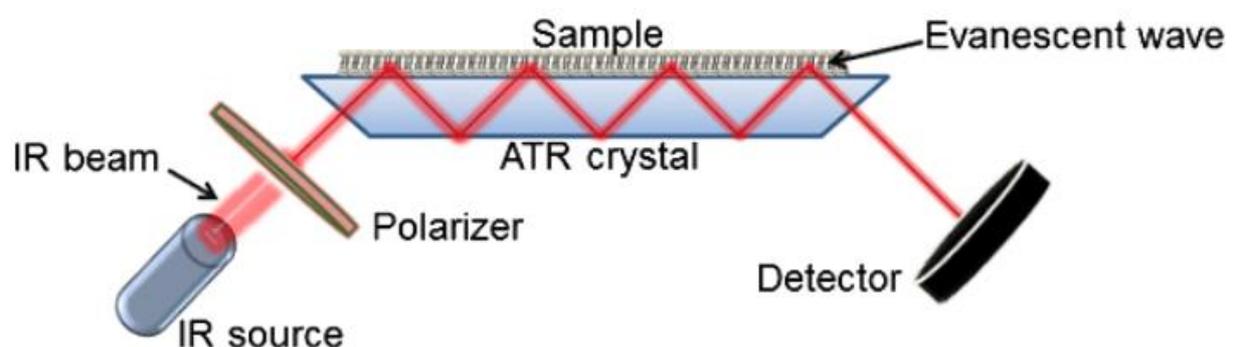


Figura 44: schema di funzionamento di un IR con cristallo ATR

5.8.5 Analisi Termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica appartiene alla famiglia delle analisi termiche e consiste nella misurazione continua nel tempo della variazione di massa di un campione in funzione della temperatura in condizioni di atmosfera controllata.

Grazie alla TGA è possibile determinare diversi parametri come la stabilità termica e quella ossidativa oppure proprietà composizionali dei campioni in analisi.

Le variazioni di massa del campione misurate dalla bilancia possono avvenire per diversi motivi, principalmente avremo:

- Aumento di peso: se avviene un adsorbimento o un'ossidazione;
- Diminuzione di peso: se avviene una decomposizione, una disidratazione o un desorbimento.

La strumentazione utilizzata per fare le analisi termogravimetriche è composta da sei elementi:

- Bilancia Termica: composta da due bracci, uno all'interno della fornace con il campione da analizzare e uno all'esterno con un portacampione vuoto come riferimento. Una perdita di massa produce una deflessione del braccio della bilancia producendo una corrente elettrica che genera un campo magnetico che ristabilisce il braccio nella posizione iniziale.
La corrente viene misurata e tradotta in massa dal sistema di elaborazione.
- Fornace: composta di materiale refrattario garantisce il raggiungimento di temperature elevate senza il rischio di danneggiamento.
- Crogioli: contenitori dove si pone il campione, possono essere di diversi tipi ma generalmente in materiale inerte (acciaio, platino, allumina)
- Sistema di controllo della temperatura
- Sistema di ventilazione e ricircolo dei gas: per condizionare e controllare l'atmosfera all'interno della fornace
- Sistema di registrazione in continuo

Lo strumento prima dell'analisi deve essere opportunamente calibrato, infatti esistono diverse variabili che possono influire sulla sensibilità dell'apparecchiatura.

- Bisogna valutare il campione in analisi, ovvero conoscerne la purezza, la descrizione chimica, la fonte (ecc..)
- Velocità di riscaldamento o raffreddamento e range di temperature;
- Tipo di atmosfera da mantenere all'interno della fornace

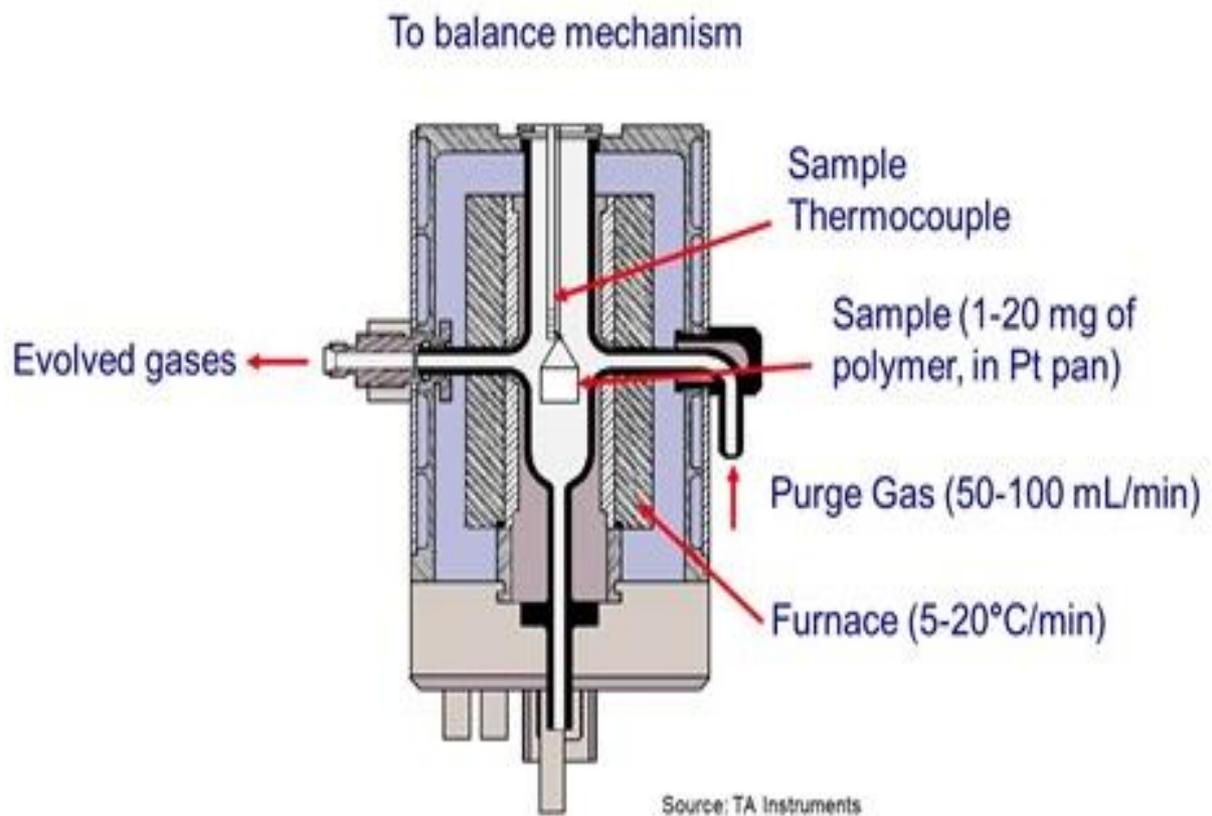


Figura 45: schema di funzionamento di una TGA

6. BIBLIOGRAFIA

[1]: Jenkins AD, Jones RG, Moad G (2009). "Terminology for reversible-deactivation radical polymerization previously called "controlled" radical or "living" radical polymerization (IUPAC Recommendations 2010)". *Pure and Applied Chemistry*. Pag. 488

<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/PAC-REP-08-04-03/html>

[2]: "Controlled/living radical polymerization," Matyjaszewski, K.; Spanswick, J. *Materials Today* 2005, 8, 26-33

[3]: G. Moad; E. Rizzardo (1995). "Alkoxyamine-Initiated Living Radical Polymerization: Factors Affecting Alkoxyamine Homolysis Rates". *Macromolecules*.

<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ma00130a003>

[4]: McCormick, C.; A.B. Lowe (2004). "Aqueous RAFT Polymerization: Recent Developments in Synthesis of Functional Water-soluble (co)Polymers with Controlled Structures". *Accounts of Chemical Research*

<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ar0302484>

[5]: Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living freeradical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfers: The RAFT process. *Macromolecules* 1998, 31, 5559–5562. 12.

[6]: Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living radical polymerization by the RAFT process. *Aust. J. Chem.* 2005, 58, 379–410. 13. Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living radical polymerization by the RAFT processs A first update. *Aust. J. Chem.* 2006, 59, 669–692.

[8]: Göktaş, M. Synthesis and characterization of various block copolymers using PMMA-Br macroinitiator. *Chem. Pap.* 73, 2329–2339 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00785-y>

[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]: Paul DI Fletcher, Self-assembly of micelles and microemulsions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Volume 1, Issue 1, 1996, Pages 101-106, [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(96\)80050-1](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(96)80050-1).

[12]: Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H, Miyamoto M, Kato Y, Sugiyama Y, Nishio K, Matsumura Y and Kataoka K (2003) Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res.* 63: 8977-83.

[13] Kabanov AV, Chekhonin VP, Alakhov VY, Batrakova EV, Lebedev AS, Melik-Nubarov NS, Arzhakov SA, Levashov AV, Morozov GV, Severin ES and Kabanov VA (1989) The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. *Micelles as microcontainers for drug targeting. FEBS Lett.* 258: 343-345

[14]: Torchilin VP (2002) PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Adv Drug Deliv Rev.* 54: 235-52

[15]: Polydopamine a nature-inspired polymer coating for biomedical science; Martin E. Lyngé†^a, Rebecca van der Westen†^a, Almar Postma^b and Brigitte Städler; <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2011/nr/c1nr10969c>

[16]: Zhou P, Deng Y, Lyu B, Zhang R, Zhang H, Ma H, et al. (2014) Rapidly-Deposited Polydopamine Coating via High Temperature and Vigorous Stirring: Formation, Characterization and Biofunctional Evaluation. *PLoS ONE* 9(11): e113087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113087>

[17]: Barclay, T. G. *et al.* Versatile surface modification using polydopamine and related polycatecholamines: Chemistry, structure, and applications. *Adv. Mater. Interfaces* 4(19), 1601192 (2017).

[18]: Gardella LA, Zaroslinski JF, Possley LH. Intropin (dopamine hydrochloride) intravenous admixture compatibility. Part 1: stability with common intravenous fluids. *Am J Hosp Pharm.* 1975 Jun;32(6):575-8.

[19]: Ball V. Polydopamine Nanomaterials: Recent Advances in Synthesis Methods and Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018 Aug 17;6:109. doi: 10.3389/fbioe.2018.00109

[20]: Tapsir Z, Saidin S (2016) Synthesis and characterization of collagen-hydroxyapatite immobilized on polydopamine grafted stainless steel. *Surf Coat Technol* 285:11–16

[21]: Kao CT, Lin CC, Chen YW, Yeh CH, Fang HY, Shie MY (2015) Poly(dopamine) coating of 3D printed poly(lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 56:165–173

[22]: Knorr DB, Tran NT, Gaskell KJ, Orlicki JA, Woicik JC, Jaye C, Fischer DA, Lenhart JL (2016) Synthesis and characterization of aminopropyltriethoxysilane-polydopamine coatings. *Langmuir* 32(17):4370–4381

[23]: Structure of Polydopamine: A Never-Ending Story? Jürgen Liebscher, Radosław Mrówczyński, Holger A. Scheidt, Claudiu Filip, Niculina D. Hădăde, Rodica Turcu, Attila Bende, and Sebastian Beck *Langmuir* 2013 29 (33), 10539-10548 DOI: 10.1021/la4020288

[24]: Mussel-inspired polydopamine for bio-surface functionalization. Y.H.DingaM.FlorenabW.Tan. *Biosurf Biotribol.* 2016 Dec,121-136

[25] 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.

[26]:https://neurophysics.ucsd.edu/courses/physics_173_273/dynamic_light_scattering_03.pdf (pag 2-5);

[27]:. <https://chimica-industriale.unibo.it/it/terza-missione/impresa/consulenze-e-prestazioni/dynamic-light-scattering-dls>

[28]: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pol.1964.100020220>

[29]: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-6969EN%20GPC%20SEC%20Chrom%20Guide.pdf>

[30]: <https://www.newport.com/t/integrating-sphere-fundamentals-and-applications>

[31]: <https://archive.org/details/principlesinstru00dasc>

[32]: Atkins PW, de Paula J (2009). Elements of physical chemistry (5th ed.). Oxford: Oxford U.P. p. 459. ISBN 978-0-19-922672-6.