

**Alma Mater Studiorum - Università degli Studi di Bologna**

---

---

Facoltà Di Chimica Industriale  
*Dipartimento di Chimica Organica "A. Mangini"*

*Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale*

**Sintesi e ricopertura organica di  
maghemiti per intrappolamento in  
polimeri biocompatibili. Applicazioni  
in nanomedicina.**

**Elaborato Finale In Chimica Organica**

Presentato da:  
**Daniele Cortecchia**

Relatore:  
**Prof. Mauro Comes Franchini**

Co-Relatori:  
**Dott.ssa Maria Naddaka  
Erica Locatelli**

---

---

**Prima sessione  
Anno Accademico 2011-2012**



## ACRONIMI UTILIZZATI

**NHS:** N-idrossisuccinimide

**CDI:** Carbonildiimidazolo

**EDC:** 1-etil-3-((3-dimetilamminopropil) carbodiimide

**DCC:** dicicloesilcarbodiimide

**DIPEA:** Diisopropiletilammina

**PCC:** Piridinio clorocromato

**CAN:** Cerio ammonio nitrato

**PEG:** Polietilenglicole

**PLGA-COOH:** Acido poli(lattico-*co*-glicolico)

**EDAO:** etil12-((3,4-diidrossifeniletil)ammino)-12-ossododecanoato

**Magh:** Maghemiti ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

**CAN-Magh:** Maghemiti stabilizzate con cerio ammonio nitrato

**CAN-Magh@EDAO:** CAN-Maghemiti ricoperte con EDAO

**Magh@PP-PNPs-COOH:** Maghemiti racchiuse all'interno di nanoparticelle polimeriche formate dal copolimero PLGA-*b*-PEG-COOH che presentano gruppi carbossilici superficiali.

**Magh@PP-PNPs-NODA:** Maghemiti racchiuse all'interno di nanoparticelle polimeriche formate dal copolimero PLGA-*b*-PEG-COOH funzionalizzate superficialmente con l'agente chelante NODA-GA-Etilendiammina.

**PET:** Positron Emission Tomography

**SPECT:** Single Photon Emission Computed Tomography

**MRI:** Magnetic Resonance Imaging



# INDICE

<b>1.INTRODUZIONE</b>	1
<u>1.1 Il progetto SaveMe</u>	1
<u>1.2 Le nanotecnologie e la nanomedicina</u>	2
<u>1.3 Drug delivery</u>	3
- 1.3.1 Targeting passivo	4
- 1.3.2 Targeting attivo	5
<u>1.4 Tecniche diagnostiche</u>	5
- 1.4.1 PET e SPECT	6
- 1.4.2 Imaging a risonanza magnetica	6
<u>1.5 Superparamagnetismo</u>	9
- 1.5.1 Nanoparticelle magnetiche	10
<b>2. OBIETTIVO DELLA RICERCA</b>	12
<b>3. DISCUSSIONE DEI RISULTATI</b>	14
<u>3.1 Sintesi chimiche</u>	14
- 3.1.1 Sintesi di maghemiti	14
- 3.1.2 Sintesi del legante organico EDAO	16
- 3.1.3 Sintesi del copolimero PLGA- <i>b</i> -PEG-COOH	18
<u>3.2 Nanotecnologie</u>	19
- 3.2.1 Ricopertura delle maghemiti con il legante EDAO	19
- 3.2.2 Preparazione micelle: nanoprecipitazione	22
<u>3.3 Funzionalizzazione</u>	27
- 3.3.1 Sintesi Magh@PP-PNPs-NODA	27
- 3.3.2 Test di citotossicità	29
- 3.3.3 Caratterizzazione magnetica: misure di rilassività per MRI	30
<b>4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</b>	32
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	33
<b>6. PARTE SPERIMENTALE</b>	36
<u>6.1 Note generali</u>	36
- 6.1.1 Tecniche di concentrazione, purificazione e sterilizzazione	37

<u>6.2 Sintesi chimiche</u>	38
- 6.2.1 Sintesi delle magnetiti $Fe_3O_4$	38
- 6.2.2 Sintesi delle CAN-Magh	38
- 6.2.3 Sintesi dell' ethyl 12-hydroxydodecanoate	40
- 6.2.4 Sintesi del 12-ethoxy-12-oxododecanoic acid	41
- 6.2.5 Sintesi del legante EDAO	42
- 6.2.6 Sintesi del PLGA-NHS	44
- 6.2.7 Sintesi del PLGA-b-PEG-COOH	45
<u>6.3 Nanotecnologie</u>	46
- 6.3.1 Ricopertura delle maghemiti con il legante EDAO: CAN-Magh@EDAO.	46
- 6.3.2 Nanoprecipitazione: formazione delle Magh@PP-PNPs-COOH	48
- 6.3.3 Nanoprecipitazione: formazione delle PP-PNPs-COOH	50
<u>6.4 Funzionalizzazione superficiale</u>	52
- 6.4.1 Sintesi delle Magh@PP-PNPs-NODA	52
<b>7. SCHEDE DI SICUREZZA</b>	
- <u>7.1 Scheda di sicurezza del clorocromato di piridinio</u>	54
- <u>7.2 Scheda di sicurezza del cerio ammonio nitrato</u>	61
- <u>7.3 Scheda di sicurezza dell'N-idrossisuccinimide</u>	68
- <u>7.4 Scheda di sicurezza dell' N,N'-Dicicloesilcarbodiimmide</u>	74
<b>8. RINGRAZIAMENTI</b>	81

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Il progetto SaveMe

Il gruppo di ricerca presso il quale è stata svolta questa tesi sperimentale è coinvolto nel progetto SaveMe (Grant Agreement no.: 263307), progetto finanziato dalla comunità europea nell'ambito del settimo programma quadro, iniziato nel marzo 2011.

SaveMe è un acronimo per il titolo “*A modular active nano-platform for advanced cancer management*”. Questo progetto, della durata di 4 anni, è dedicato allo sviluppo e all'ottimizzazione di innovativi sistemi nanostrutturati per la diagnosi e la cura di forme tumorali. Questi sistemi sono basati su un nucleo nanoparticellare centrale (detto *core nanosystem*) funzionalizzato superficialmente con una serie di agenti attivi. Fra questi saranno studiate varie biomolecole (proteine, peptidi e anticorpi monoclonali) in grado di conferire specifiche funzioni alle nanostrutture e la possibilità di interazione con i sistemi biologici in cui dovranno operare. Le applicazioni di questi sistemi nanostrutturati saranno mirate allo sviluppo di agenti di contrasto per imaging, agenti terapeutici e drug delivery per la cura e la diagnosi del tumore al pancreas.

Al progetto, guidato dall'università israeliana di Tel Aviv, partecipano 20 partner, che comprendono sia università che industrie. L'università di Bologna è stata coinvolta nel progetto in virtù delle sue competenze in chimica organica, con l'obiettivo di sviluppare e caratterizzare dei nuovi *core nanosystems* e provvedere alla loro funzionalizzazione superficiale.

## 1.2 Le nanotecnologie e la nanomedicina

La nanotecnologia si occupa della fabbricazione di dispositivi in cui almeno una dimensione è compresa fra 1 e 100 nm, e dell'integrazione delle nano strutture risultanti in sistemi più grandi.<sup>[1,2,3]</sup> A queste dimensioni i materiali esibiscono particolari proprietà, funzionalità e fenomeni che differiscono da quelli degli stessi materiali bulk. Nei nanosistemi infatti si osservano peculiari proprietà magnetiche, e si assiste alla comparsa di fenomeni quantistici che ne modificano le proprietà elettroniche ed ottiche. Con il diminuire delle dimensioni inoltre, l'area superficiale aumenta drasticamente, comportando un profondo effetto sulle proprietà finali del sistema, come ad esempio l'abbassamento del punto di fusione. In definitiva, la nanotecnologia sfrutta gli effetti fisici che si osservano in oggetti su scala nanometrica, al confine fra il mondo molecolare e quello macroscopico.

La nanomedicina può essere definita, partendo dai concetti propri della nanotecnologia, come l'utilizzo in medicina di materiali nanostrutturati, che grazie alla loro struttura hanno peculiari effetti medici, come ad esempio l'abilità di attraversare le barriere biologiche o il targeting passivo dei tessuti. Tali proprietà consentono alla nanomedicina di trovare applicazioni in settori quali il drug delivery, l'imaging in vivo e dei biomateriali, e gli effetti medici richiesti non sono necessariamente limitati a dimensioni inferiori ai 100 nm. Perciò, diversamente dalla definizione di nanotecnologia, nel caso della nano medicina vengono tipicamente comprese strutture e oggetti aventi dimensioni fino a 1000 nm.<sup>[4]</sup>

I risultati più impressionanti ottenuti grazie alla nanomedicina coinvolgono i campi della diagnosi, del targeted drug delivery e del trattamento ipertermico dei tumori, e le più comuni nano-piattaforme attualmente utilizzate includono nanoparticelle polimeriche, metalliche, magnetiche e a base di biossido di silicio, nanoshells, micelle, liposomi, dendrimeri e quantum dots. Specialmente nel caso della ricerca contro il cancro, c'è un grande interesse ad applicare tecniche di nanomedicina per la diagnosi e il trattamento della malattia. Le tecniche convenzionali per affrontare questa patologia sono la chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia, e ciascuna di esse è caratterizzata da vantaggi e svantaggi. La chemioterapia in particolare è un trattamento che coinvolge tutto il corpo, e la distribuzione sistemica dei composti citotossici e chemoterapeutici può comportare effetti collaterali molto gravi. Uno dei principali obiettivi della nanomedicina

è proprio lo sviluppo di terapie mirate basate sullo sviluppo di “smart drugs”: farmaci coniugati a nanoparticelle o nanopiatteforme in grado di localizzarsi selettivamente nel tessuto lesionato, incrementando così l’efficacia terapeutica e diminuendo notevolmente il rischio di effetti collaterali.<sup>[5]</sup> Per raggiungere con successo l’applicazione clinica di questi nanotrasportatori, diversi parametri devono essere ottimizzati: composizione del sistema, carico del farmaco, idrofilicità e carica della superficie, dimensione delle particelle, densità di possibili ligandi per il targeting attivo.<sup>[6]</sup>

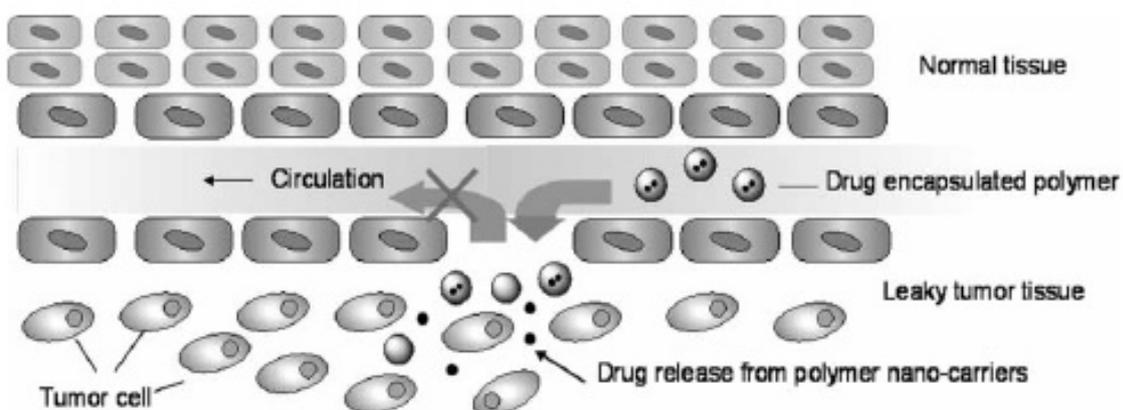
### **1.3 Drug Delivery**

Il targeting in vivo delle cellule tumorali può avvenire mediante un meccanismo attivo e passivo. Per entrambi è importante garantire lunghi tempi di permanenza nel sangue in modo da mantenere più a lungo il livello terapeutico richiesto dell’agente farmaceutico. I nanotrasportatori devono pertanto essere sufficientemente piccoli da non bloccare i vasi sanguigni e avere facile accesso alle regioni più interne del tumore, ma non troppo da essere rapidamente espulsi per effetto della filtrazione renale, avente una dimensione di cut-off di circa 10 nm. Devono inoltre essere in grado di evitare l’azione del sistema immunitario innescata dal sistema reticoloendoteliale (RES), che distrugge qualsiasi materiale esterno attraverso il fenomeno dell’opsonizzazione,<sup>[7]</sup> seguita dalla fagocitosi ad opera dei macrofagi. Le nanoparticelle iniettate per via endovenosa sono per la maggior parte sequestrate dai macrofagi presenti nel fegato e nella milza entro pochi minuti dalla somministrazione. Tuttavia, l’azione del RES dipende fortemente dalle dimensioni delle nanoparticelle, e dalla carica e idrofilicità della superficie; è pertanto possibile agire su questi parametri per evitare il rapido riconoscimento del sistema immunitario e creare dei cosiddetti “sistemi stealth” rispetto al RES. Particelle di circa 100 nm e con superfici idrofiliche sono meno soggette all’opsonizzazione e alla rimozione da parte del RES.<sup>[8]</sup> Da qui deriva l’utilizzo di polimeri idrofilici per il rivestimento dei veicoli per il drug delivery: il polietilenglicole (PEG) è il polimero idrofilico non ionico più utilizzato per conferire queste proprietà stealth. Di grande impiego è anche il copolimero a blocchi anfifilico PLGA-b-PEG-COOH, in cui il polietilenglicole è unito a una catena lipofila di PLGA-COOH, acido poli(lattico-co-glicolico).<sup>[9,10]</sup> Questo copolimero è in grado di formare delle micelle che in ambiente acquoso espongono esternamente le catene di PEG, creando all’interno un dominio

idrofobico di PLGA che può intrappolare farmaci o nanoparticelle con finalità terapeutica o diagnostica.<sup>[11]</sup> In questo modo si ottiene un veicolo in cui il PEG conferisce idrofilicità al sistema e resistenza all'azione del sistema immunitario, mentre il PLGA costituisce una matrice biodegradabile per l'incapsulamento,<sup>[12]</sup> subendo idrolisi enzimatica ad acido lattico e glicolico in grado poi di essere metabolizzati dall'organismo, dal quale vengono espulsi come CO<sub>2</sub> ed H<sub>2</sub>O.<sup>[13]</sup>

### 1.3.1 Targeting passivo

Il targeting passivo trae vantaggio dalla dimensione caratteristica delle nanoparticelle e sfrutta le anomalie anatomiche e patofisiologiche proprie della vascolarizzazione del tumore, come ad esempio l'effetto della migliorata permeabilità e ritenzione (EPR, enhanced permeability and retention).<sup>[9]</sup> I vasi sanguigni tumorali infatti sono caratterizzati da un ampio lumen (lo spazio interno della struttura tubolare dei vasi sanguigni), mentre il tessuto tumorale ha uno scarso drenaggio linfatico. Questo difetto anatomico comporta una fuoriuscita dai vasi sanguigni di componenti del plasma sanguigno come le macromolecole, nanoparticelle e particelle lipidiche, verso il tessuto tumorale, dove permangono a causa del ridotto ricambio linfatico (**Figura 1**). Sfruttando questo effetto EPR dei tumori solidi, è possibile ottenere una localizzazione selettiva, poiché le nanoparticelle tendono ad accumularsi nel tessuto tumorale molto più che nei tessuti sani come conseguenza dell'endotelio più discontinuo e iper-permeabile alle macromolecole circolanti. Particelle con dimensioni inferiori ai 200 nm con superfici idrofiliche tendono a esibire un migliore effetto EPR.



**Figura 1** – Rappresentazione schematica dell'effetto di ritenzione e migliorata permeabilità (EPR)<sup>[9]</sup>

### ***1.3.2 Targeting attivo***

Il targeting attivo si basa sul concetto della bioconiugazione, e consente di aumentare enormemente la specificità e l'efficacia delle nanoparticelle funzionalizzandone la superficie con ligandi opportuni come anticorpi, peptidi, acidi nucleici o altre piccole molecole, specifici per un dato bersaglio e in grado di legarsi ad esso in maniera selettiva. Spesso, le cellule tumorali sovraesprimono alcune proteine di membrana rispetto alle cellule sane, e in alcuni casi presentano degli antigeni differenti che sono caratteristici delle cellule malate. Questi antigeni pertanto rappresentano un possibile specifico bersaglio utilizzabile per la terapia, funzionalizzando le nanoparticelle con molecole che hanno l'abilità di associarsi specificamente con i recettori target.<sup>[14]</sup> In questo modo è possibile veicolare le nanoparticelle direttamente sul tessuto tumorale di interesse minimizzando le interazioni con i tessuti sani. E' pertanto necessario sviluppare un'efficiente chimica di coniugazione per ottenere sistemi multifunzionali.<sup>[15]</sup>

### **1.4 Tecniche diagnostiche**

Il molecular imaging coinvolge lo studio non invasivo dei processi biologici *in vivo* a livello cellulare e molecolare, con l'obiettivo di individuare le anomalie che stanno alla base di una certa malattia consentendone una precoce individuazione, una valutazione immediata e diretta degli effetti dei trattamenti terapeutici e una migliore comprensione dei processi che la caratterizzano. Le tecniche di imaging consentono di ottenere immagini dell'interno del corpo umano, sfruttando l'interazione del sistema biologico con opportuni agenti di contrasto; in questo modo possono aiutare la diagnosi del cancro e di malattie neurodegenerative dando importanti informazioni biologiche fin dagli stadi preclinici.

Anche in questo caso, la nanotecnologia offre numerosi vantaggi rispetto agli approcci più convenzionali: una nanoparticella infatti può essere funzionalizzata con un gran numero di agenti di contrasto sulla sua superficie, portando a una netta amplificazione del segnale, e può sfruttare il concetto della bioconiugazione già introdotto per il drug delivery per avere una localizzazione altamente selettiva nell'organismo, aumentando il segnale e riducendo gli effetti collaterali.

Sono state sviluppate molte tecniche di imaging, che possono adattarsi alla valutazione di diversi tipi di target biologici: la tomografia a raggi X, l'imaging ottico, la positron emission tomography (PET), la single photon emission computed tomography (SPECT), il magnetic resonance imaging (MRI) e tecniche basate sugli ultrasuoni.<sup>[16]</sup> In questa sede tuttavia saranno approfonditi solamente l'imaging basato sui radionuclidi (PET e SPECT) e l'MRI.

#### ***1.4.1 PET e SPECT***

Le tecniche radiodiagnostiche sfruttano una fonte di radiazione interna al paziente, derivante dalla somministrazione di un radionuclide emettitore di radiazione  $\gamma$  o di positroni, con lo scopo di ottenere immagini dalla radiazione uscente dal corpo e individuata per mezzo di una gamma-camera. Queste tecniche sono molto diffuse perché sono molto sensibili, quantitative e non sono soggette a un limite di penetrazione nel tessuto; lo svantaggio principale è la bassa risoluzione (tipicamente superiore a 1 mm) rispetto ad altre tecniche di imaging. Nella SPECT vengono utilizzati radioisotopi emettitori di raggi  $\gamma$ , come  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , e  $^{111}\text{In}$ . La PET utilizza molecole marcate con emettitori di positroni, isotopi soggetti al decadimento radioattivo di tipo  $\beta^+$ ,  $^1_1p \rightarrow ^0_{+1}e + ^0_1n$ . Il positrone emesso, dopo un cammino di pochi millimetri, subisce l'annichilazione con un elettrone, originando due fotoni di 511 keV che si propagano in direzioni opposte formando un angolo di  $180^\circ$ . I radionuclidi di maggior impiego sono  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ .<sup>[17]</sup> Attualmente, attraverso una opportuna rielaborazione digitale, entrambe le tecniche consentono l'ottenimento di immagini tridimensionali.

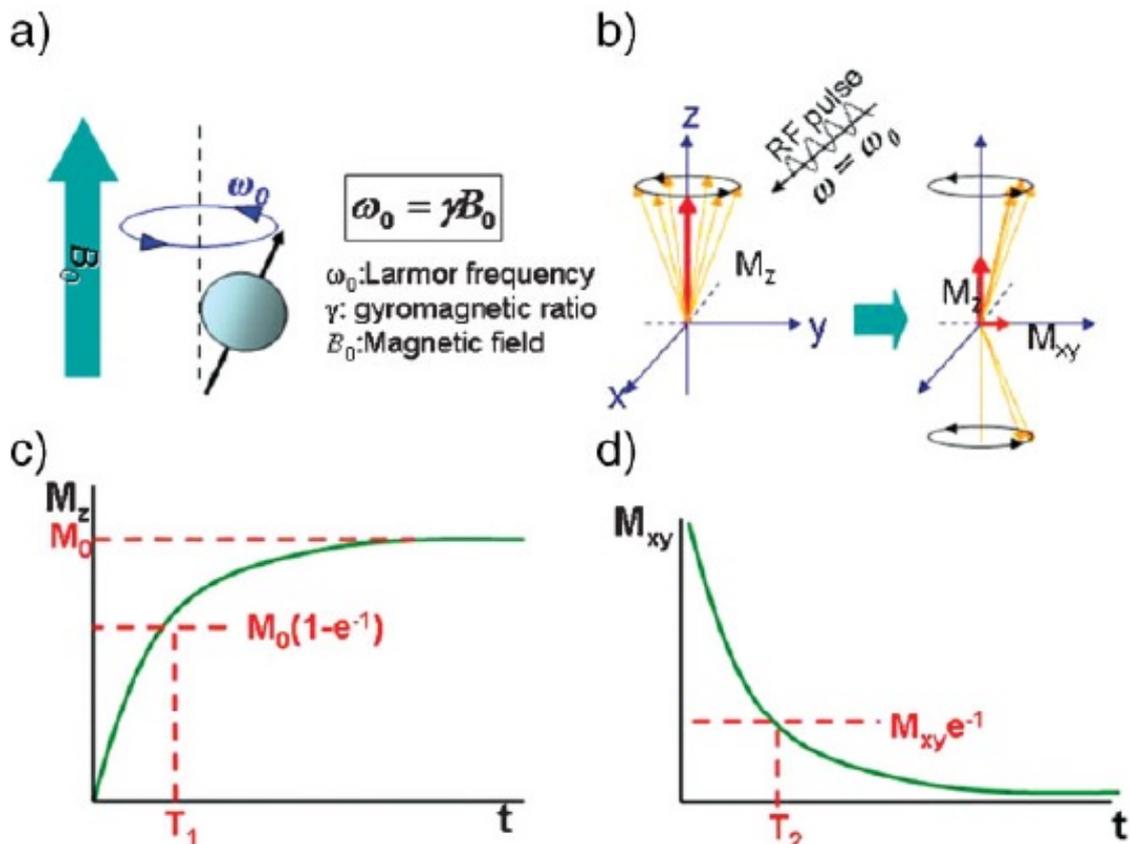
#### ***1.4.2 Imaging a risonanza magnetica***

L'MRI è una tecnica di imaging basata sulla risonanza magnetica nucleare (NMR) e sul rilassamento degli spin protonici in un campo magnetico (**Figura 2**). L'immagine è costruita a partire dai segnali NMR dell'acqua presente nei tessuti. Al fine di conoscere la locazione spaziale di ogni segnale NMR, il paziente viene posto in un gradiente di campo magnetico, così che le molecole di  $\text{H}_2\text{O}$  abbiano una frequenza di risonanza distinta dipendente dalla loro posizione.<sup>[18]</sup> Il rilassamento degli spin protonici, dopo

l'eccitazione da parte di un impulso di radiofrequenza, può avvenire secondo due meccanismi:

- il processo di rilassamento spin-reticolo (longitudinale), indicato dal tempo  $T_1$ , comporta il trasferimento di energia dai protoni eccitati ai protoni circostanti che vibrano con la frequenza appropriata, ed ha come effetto il recupero della magnetizzazione netta sull'asse  $z$  ( $M_z$ ) (**Figura 2 - c**)

- il processo di rilassamento spin-spin (trasversale), indicato dal tempo  $T_2$ , comporta il trasferimento di energia tra i protoni in precessione e ha come effetto la scomparsa della magnetizzazione indotta sul piano perpendicolare ( $M_{xy}$ ) per mezzo della perdita di fase degli spin (**Figura 2 - d**). Questo tipo di rilassamento è fortemente influenzato dalle disomogeneità del campo magnetico derivanti da fattori inerenti al tipo di tessuto o da altre fonti esterne.<sup>[19]</sup>



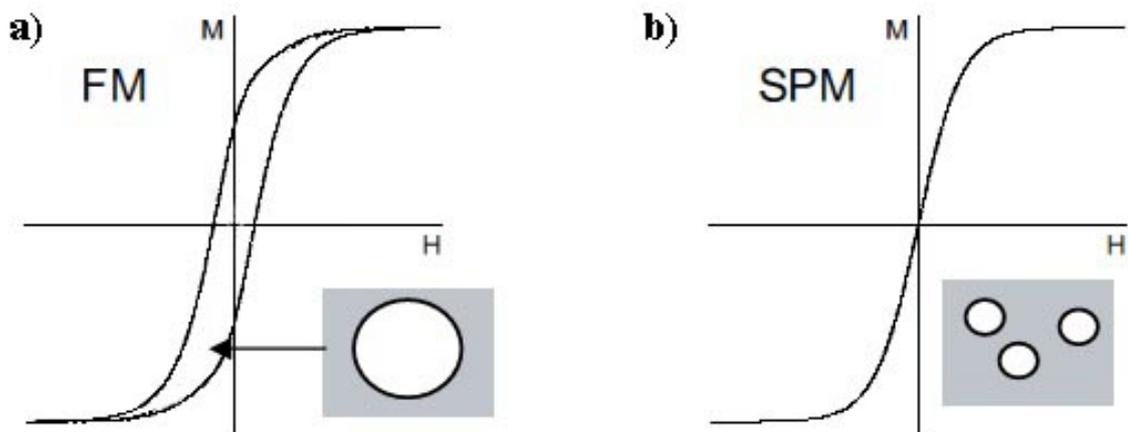
**Figura 2** – Principi per l'imaging per risonanza magnetica. a) Gli spins si allineano parallelamente o antiparallelamente al campo magnetico e precessono con la frequenza di Larmor  $\omega_0$ . b) Dopo l'azione di un impulso di radiofrequenze, la magnetizzazione degli spins cambia. Gli Spins eccitati seguono poi due processi di rilassamento: c) il rilassamento  $T_1$  e d) il rilassamento  $T_2$ .<sup>[21]</sup>

L'intensità in un'immagine di risonanza magnetica dipende dai tempi di rilassamento dei protoni dell'acqua: essa aumenta al diminuire di  $T_1$ , dando segnali più intensi ed immagini più brillanti, mentre la diminuzione di  $T_2$  comporta un abbassamento dell'intensità del segnale e un contrasto negativo nell'immagine.<sup>[20]</sup> Tessuti differenti hanno tempi di rilassamento differenti, che possono risultare in un contrasto endogeno, ma è necessario l'utilizzo di agenti di contrasto per rendere l'immagine utile a livello diagnostico. Questi agenti esogeni aumentano il contrasto accorciando preferenzialmente  $T_1$  o  $T_2$ , e a sua volta l'immagine può essere ottenuta individuando le differenze in uno dei due tempi ( $T_1$  o  $T_2$  weighted) aggiustando i parametri durante l'acquisizione dei dati. Tradizionalmente, vengono usati come agenti di contrasto dei chelati di gadolinio, che sfruttano l'elevato momento magnetico dello ione paramagnetico  $Gd^{3+}$  per accorciare il tempo di rilassamento  $T_1$ . Più recentemente è stata sviluppata una classe differente di agenti di contrasto basata su nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro. Queste perdono la magnetizzazione in assenza di un campo esterno ma, quando viene applicato un campo magnetico, esibiscono una magnetizzazione molto forte che può causare disomogeneità del campo a livello microscopico attivando la perdita di fase degli spin protonici.<sup>[21]</sup> Perciò queste nanoparticelle vengono usate per accorciare il tempo di rilassamento  $T_2$  mediante un meccanismo di interazione dipolare a sfera esterna fra gli spin dei protoni dell'acqua e il momento magnetico delle particelle, producendo una diminuzione dell'intensità del segnale nelle immagini  $T_2$ -weighted. Attualmente sono già commercializzati diversi agenti di contrasto basati su nanoparticelle di ossidi di ferro come Feridex, Resovist e Combidex.

## 1.5 Superparamagnetismo

Il superparamagnetismo è un meccanismo di inversione della magnetizzazione per piccole particelle promosso dall'energia termica.<sup>[22]</sup>

Materiali ferromagnetici e ferrimagnetici di tipo bulk sono divisi in vari domini magnetici, e la magnetizzazione è confinata in specifiche direzioni determinate da vari fattori, fra i quali la forma delle particelle, la struttura cristallina, gli stress reticolari e altri difetti del materiale. Le pareti dei domini magnetici sono bloccate in corrispondenza dei bordi grano o di impurezze, ed è necessario fornire una certa quantità di energia per avere la riorganizzazione dei domini sotto l'effetto del campo magnetico esterno. Questa irreversibilità nel processo di magnetizzazione dà origine ai tipici cicli di isteresi, che contraddistinguono questi materiali, in grafici che mostrano l'andamento della magnetizzazione (M) in funzione dell'intensità del campo magnetico (H) a cui è sottoposto il materiale.



**Figura 3** – a) Curva M-H per un materiale ferromagnetico. La curva sigmoideale è dovuta al raggiungimento di un valore di magnetizzazione di saturazione, e al mantenimento di una certa magnetizzazione residua anche dopo la rimozione del campo magnetico esterno; b) curva M-H per materiali superparamagnetici. Anche in questo caso viene raggiunta una magnetizzazione di saturazione a campi alti, ma la magnetizzazione residua è nulla e non si ha coercitività. Come conseguenza, la curva non presenta isteresi.

Tuttavia, diminuendo le dimensioni fino ad avere particelle con diametro di 10-15 nm, si osserva il suddetto fenomeno del superparamagnetismo.<sup>[23]</sup> In tal caso le nanoparticelle sono costituite da un unico dominio magnetico, e hanno un momento magnetico permanente proporzionale al loro volume. A queste dimensioni, il momento magnetico della particella è però libero di ruotare in risposta all'energia termica a temperatura

ambiente, mentre i momenti atomici individuali mantengono il loro stato ordinato relativamente gli uni agli altri. Sospensioni di nanoparticelle superparamagnetiche sono pertanto ferromagnetiche (o ferrimagnetiche, a seconda del materiale) se considerate sulla scala di una singola particella, ma paramagnetiche se considerate su scala colloidale, con la differenza che i momenti magnetici dei colloidi magnetici sono molto superiori a quelli dei materiali paramagnetici tradizionali. Caratteristica fondamentale che contraddistingue i materiali superparamagnetici è che la curva nei grafici M-H, pur essendo ancora sigmoidale, non presenta isteresi<sup>[24]</sup> : ciò vuol dire che non presentano coercitività (la forza del campo magnetico necessaria per portare a zero la magnetizzazione del materiale) e magnetizzazione residua. Queste proprietà sono di grande importanza poiché sono alla base dell'interesse nell'utilizzo di nanoparticelle magnetiche in campo medico. Infatti le sospensioni colloidali di nanoparticelle magnetiche sono in grado di interagire con un campo magnetico senza mantenere la magnetizzazione dopo la rimozione del campo: in questo modo viene evitata la loro interazione e la formazione di aggregati che potrebbero portare al blocco dei capillari in cui le nanoparticelle si sono accumulate.<sup>[25]</sup>

### ***1.5.1 Nanoparticelle magnetiche***

Gli ossidi di ferro come la magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e la maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) sono decisamente i materiali più impiegati per la produzione di nanoparticelle magnetiche per uso biomedico grazie alle loro proprietà magnetiche e alla loro ben nota biocompatibilità.<sup>[24]</sup> La magnetite ha la struttura dello spinello inverso  $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}})\text{O}_4$ , con gli ossigeni che formano un reticolo fcc in cui metà dei cationi  $\text{Fe}^{3+}$  occupano cavità tetraedriche, mentre l'altra metà occupa cavità ottaedriche assieme ai cationi  $\text{Fe}^{2+}$ . La maghemite ha la stessa struttura della magnetite, ma differisce da questa per il fatto che tutto il ferro è ossidato a  $\text{Fe}^{3+}$ . L'ossidazione dei cationi  $\text{Fe}^{2+}$  è compensata da vacanze cationiche in siti ottaedrici.<sup>[23]</sup> Magnetite e maghemite sono entrambi materiali ferrimagnetici. Oltre a queste, c'è anche interesse a sviluppare materiali caratterizzati da più elevati momenti magnetici, come ad esempio la cobalto ferrite  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .<sup>[26]</sup>

Il metodo di preparazione di questi materiali in forma di nanoparticelle è di fondamentale importanza, in quanto determina la dimensione e la forma delle particelle, la distribuzione delle dimensioni, la chimica superficiale e il grado di cristallinità, e

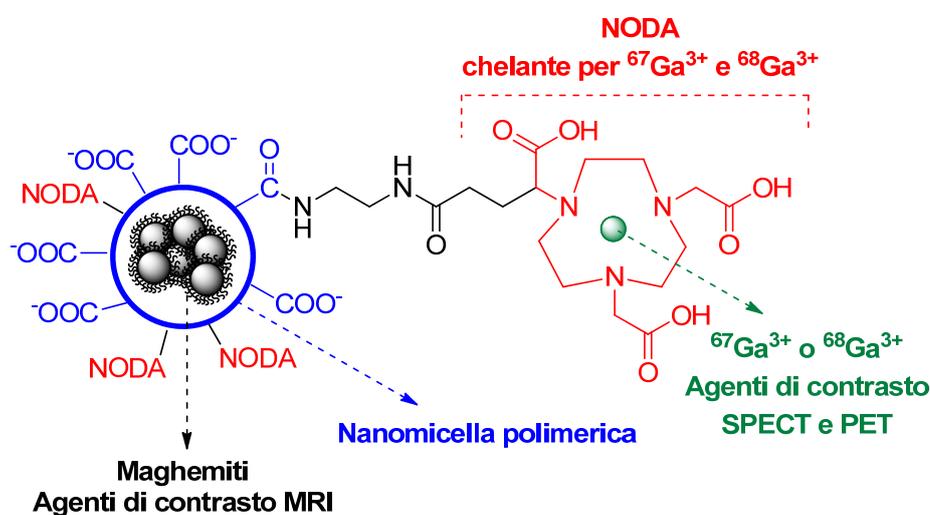
pertanto influenza fortemente anche le proprietà magnetiche finali; il metodo che meglio consente il controllo di questi parametri è la sintesi chimica da soluzioni. Per applicazioni biomediche è necessario che le sospensioni colloidali ottenute siano stabili in acqua a pH neutro e salinità fisiologica, ed è pertanto importante il controllo della chimica superficiale per dare origine a una stabilizzazione sterica e/o elettrostatica.

Le nanoparticelle superparamagnetiche trovano applicazione, come già esposto, in campo diagnostico, come agenti di contrasto MRI.<sup>[27]</sup> Oltre a questo, possono essere impiegate *in vivo* anche per il drug delivery e per la cura ipertermica dei tumori.<sup>[28]</sup> Nel caso del drug delivery può essere sfruttata la loro capacità di interagire con un campo magnetico per localizzarle in una zona ben precisa all'interno dell'organismo, e trattenerle contro le forze esercitate sulle nanoparticelle dal flusso sanguigno. Il trattamento ipertermico invece si basa sul fatto che molte cellule tumorali sono più sensibili a temperature superiori a 41 °C rispetto alle cellule sane, e possono in questo modo essere uccise in maniera selettiva. In tal caso per somministrare calore alle zone lesionate, si sfrutta la capacità di queste nanoparticelle di riscaldarsi, con un'efficienza superiore rispetto a particelle non superparamagnetiche, quando sottoposte a un campo magnetico alternato.

## 2. OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il lavoro di ricerca di questa tesi è stato svolto all'interno del progetto "SaveMe", avente come obiettivo lo sviluppo di un nanosistema multifunzionale con applicazioni diagnostiche e terapeutiche per il trattamento del cancro.

Nello specifico l'attività svolta presso il gruppo di ricerca ha riguardato la sintesi della nanostruttura centrale e la sua funzionalizzazione per l'ottenimento di una nanopiattoforma per imaging multimodale MRI/SPECT e MRI/PET.



Il progetto inizia con la sintesi delle nanoparticelle superparamagnetiche di maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) idrosolubili che costituiscono il nucleo del sistema e agiscono da agente di contrasto MRI. Viene poi sintetizzato un legante organico caratterizzato da un catecolo terminale che conferisce ottima affinità per la ricopertura delle maghemiti. Grazie a questo, viene modificata la solubilità delle maghemiti, e si ottiene il loro trasferimento in fase organica, rendendole disponibili per i processi successivi. Parallelamente, viene eseguita la sintesi del copolimero a blocchi PLGA-*b*-PEG-COOH.

Lo stadio successivo consiste nell'intrappolamento delle maghemiti all'interno di nanomicelle polimeriche formate dal PLGA-*b*-PEG-COOH mediante la tecnica della nanoprecipitazione. In questo modo si ottengono delle nanoparticelle idrosolubili e biocompatibili con dimensioni di circa 140 nm, adatte ad essere impiegate per l'imaging in vivo. Queste vengono funzionalizzate superficialmente, sfruttando i gruppi carbossilici superficiali, con un agente chelante, il NODA-GA-Etilendiammina, in grado di

complessare i radioisotopi  $^{67}\text{Ga}^{3+}$  e  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ , agenti di contrasto rispettivamente per SPECT e PET.

Su questi sistemi vengono infine eseguiti i test di citotossicità e di caratterizzazione magnetica.

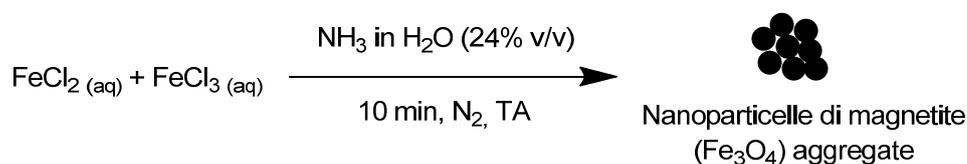
## 3. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

### 3.1 Sintesi chimiche

#### 3.1.1 Sintesi di maghemiti

Le nanoparticelle di maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) sono state sintetizzate secondo una procedura sviluppata all'università di Bar-Ilan, partner del progetto europeo.<sup>[29,30]</sup> Tale procedura consente di ottenere nanoparticelle di maghemite idrofiliche con controllo sul livello di aggregazione senza l'utilizzo di surfattanti o polimeri adsorbiti sulla superficie. La stabilizzazione contro l'aggregazione è di tipo elettrostatico ed ottenuta attraverso il drogaggio della superficie delle particelle colloidali con atomi di cerio ( $\text{Ce}^{3+}$ ) che conferiscono ad esse una carica fortemente positiva.

Il primo stadio di reazione (**Figura 4**) consiste nel metodo di Massart,<sup>[31]</sup> tipicamente usato per la sintesi di particelle di magnetiti ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) a singolo dominio magnetico con diametro compreso tra 10-15 nanometri, comunemente impiegate per la fabbricazione di ferrofluidi. Questo metodo si basa su una miscelazione di sali di  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  in soluzione acquosa e sulla corrispondente coprecipitazione dei due idrossidi [ $\text{Fe}(\text{OH})_2$  e  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ] in seguito all'aggiunta di ammoniaca come base,<sup>[32]</sup> e porta alla formazione di una sospensione color nero brillante, formata da nanoparticelle di magnetite sotto forma di aggregati poiché non ancora stabilizzate da alcuna carica elettrostatica o altro agente.

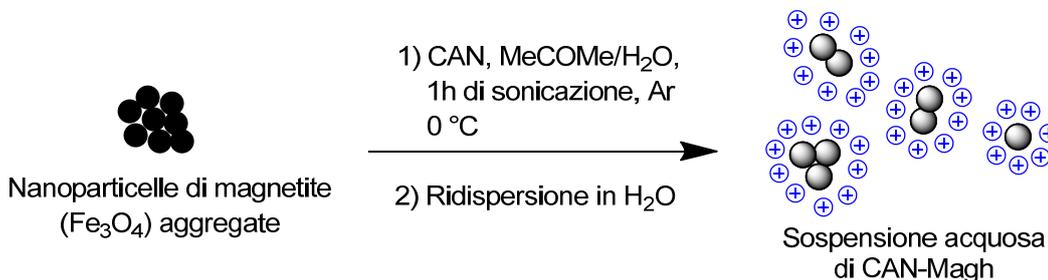


**Figura 4** – Primo stadio, sintesi delle nanoparticelle di magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).

Questa prima reazione è stata condotta per 10 minuti a temperatura ambiente e in atmosfera inerte di azoto, mantenendo il sistema agitato mediante sonicazione in un bagno a ultrasuoni.

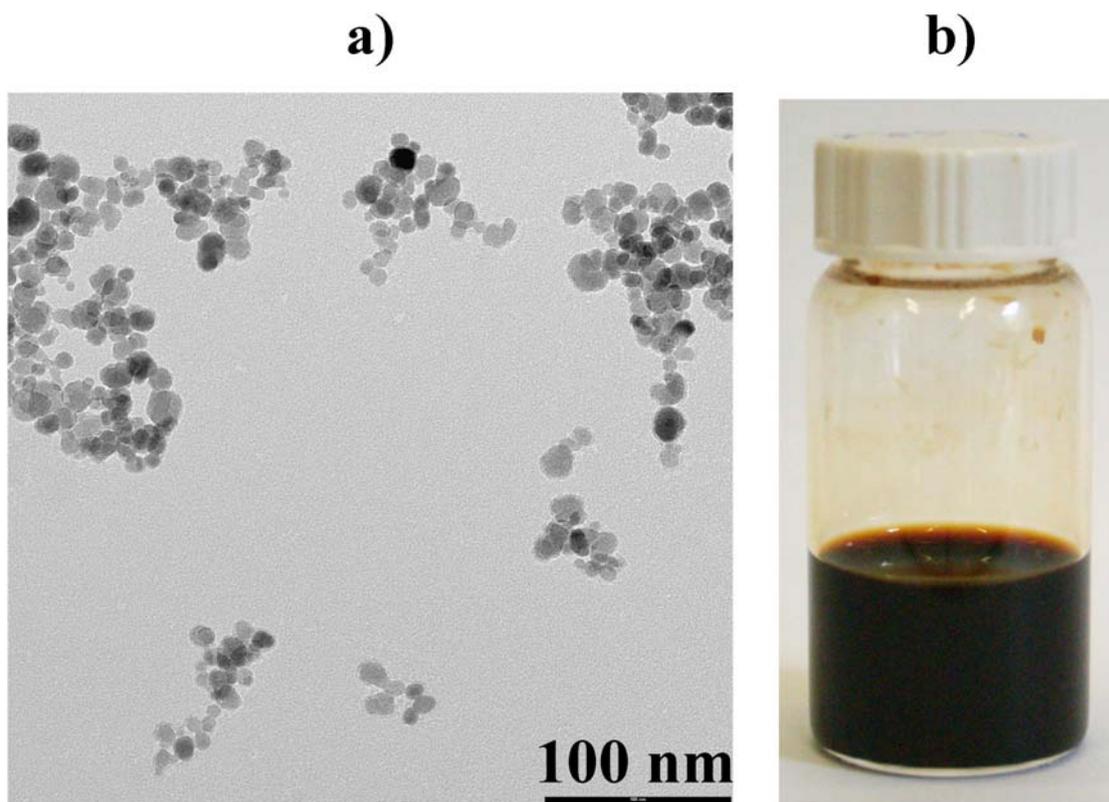
Il secondo stadio (**Figura 5**) prevede l'ottenimento delle maghemiti attraverso l'ossidazione delle magnetiti sintetizzate utilizzando un forte ossidante monoelettronico:

cerio ammonio nitrato (CAN). Le magnetiti precedentemente ottenute sono state quindi sospese in una miscela acetone/acqua in rapporto 1:1 v/v e ultrasonicate per 1 ora in atmosfera di Ar e mantenendo la temperatura a 0 °C con un bagno di ghiaccio. Gli ultrasuoni si propagano nella soluzione attraverso onde di compressione e rarefazione indotte nelle molecole del mezzo attraverso il quale passano. Questo causa la formazione di bolle di vapore che si accrescono fino a raggiungere una dimensione critica oltre alla quale collassano dando origine al fenomeno della cavitazione. Il grande e istantaneo rilascio di energia che ne consegue genera degli *hot spots* nella soluzione che agiscono come microreattori localizzati che possono generare temperature di migliaia di gradi e pressioni di migliaia di atmosfere.<sup>[33]</sup> Questo ha due effetti sulla reazione: il primo è di tipo meccanico, poiché le onde di pressione generate causano un forte stress meccanico che separa le nanoparticelle di magnetite che si erano aggregate durante il primo stadio di reazione; il secondo effetto è di tipo chimico, in quanto la cavitazione promuove una serie di reazioni radicaliche che coinvolgono l'ossidazione delle magnetiti con CAN, favorendo il drogaggio superficiale delle maghemiti risultanti con ioni  $Ce^{3+}$ , responsabili della stabilizzazione elettrostatica della sospensione colloidale.



**Figura 5** – Secondo stadio, sintesi delle nanoparticelle di maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) stabilizzate con cerio ammonio nitrato, CAN-Magh.

La caratterizzazione al microscopio a trasmissione elettronica (TEM) delle CAN-Maghemiti conferma l'ottenimento di cluster di alcune nanoparticelle con dimensioni di 50-60 nm, in cui le particelle elementari di CAN-maghemiti mantengono le dimensioni originarie di 10-15 nm (**Figura 6 - a**).



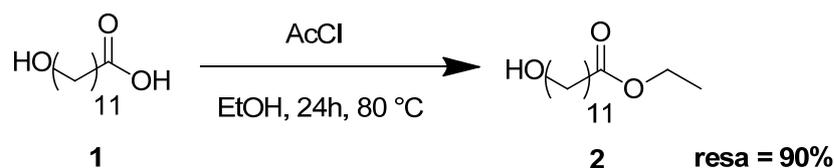
**Figura 6** – a) Immagine TEM delle CAN-Magh ; b) Fotografia della sospensione acquosa di CAN-Magh.

In accordo con i risultati del TEM, il diametro idrodinamico medio delle CAN-Maghemiti misurato con il DLS (Dynamic Light Scattering) è stato di  $57,61 \pm 0,06$  nm, con un indice di polidispersità di  $0.238 \pm 0.006$ . A pH 4.40 il potenziale  $\zeta$  era di +50.5 mV, ed essendo molto positivo conferma l'avvenuta stabilizzazione superficiale con  $\text{Ce}^{3+}$ . La sospensione acquosa ottenuta si presentava marrone molto scura e senza la formazione di precipitato (**Figura 6 - b**).

### ***3.1.2 Sintesi del legante organico EDAO***

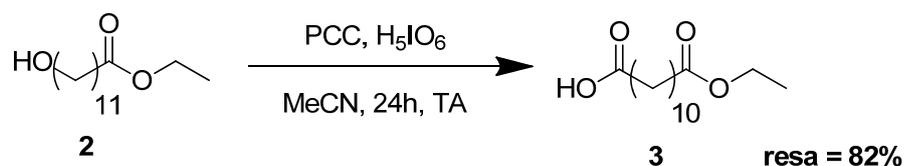
Al fine di modificare la solubilità delle maghemiti e renderle lipofile, cosa che servirà per le reazioni successive, è stata sintetizzata una molecola in grado di legarsi alle nanoparticelle ricoprendone la superficie e stabilizzarle in solvente organico.

Nel primo stadio di sintesi è stata eseguita l'esterificazione acido catalizzata dell'acido 12-idrossidodecanoico, commercialmente disponibile, in presenza di etanolo e acetil cloruro per 24 ore a riflusso (**Figura 7**). La resa è risultata del 90%.



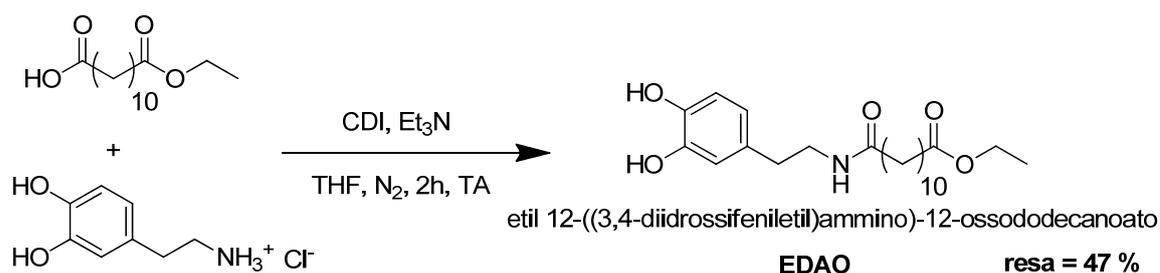
**Figura 7 - Esterificazione**

L'alcol primario presente in **2** è poi stato ossidato ad acido carbossilico con piridinio clorocromato (PCC) in quantità catalitiche e acido periodico in acetonitrile (**Figura 8**).<sup>[34,35]</sup>



**Figura 8 - Ossidazione**

L'intermedio **3** è stato isolato (resa = 82%) e coniugato con dopamina cloridrato tramite formazione di un legame ammidico: l'acido carbossilico è stato dunque attivato con carbonil diimidazolo (CDI)<sup>[36]</sup> per dare la specie attivata acilimidazolo; la reazione è stata condotta facendo reagire il prodotto **3** e il CDI in THF anidro per 1.30 h a temperatura ambiente e sotto flusso di azoto. Questa soluzione è poi stata sgocciolata in una soluzione di dopamina cloridrato e trietilammina in THF, e la reazione lasciata in agitazione magnetica sotto flusso di azoto per due ore (**Figura 9**).



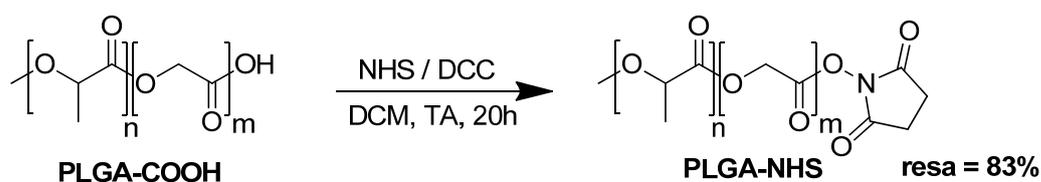
**Figura 9 - Sintesi del legante EDAO**

Il prodotto desiderato, etil 12-((3,4-diidrossifenilettil)ammino)-12-ossododecanoato (**EDAO**), è stato ottenuto con una resa del 47%.

### 3.1.3 Sintesi del copolimero PLGA-*b*-PEG-COOH

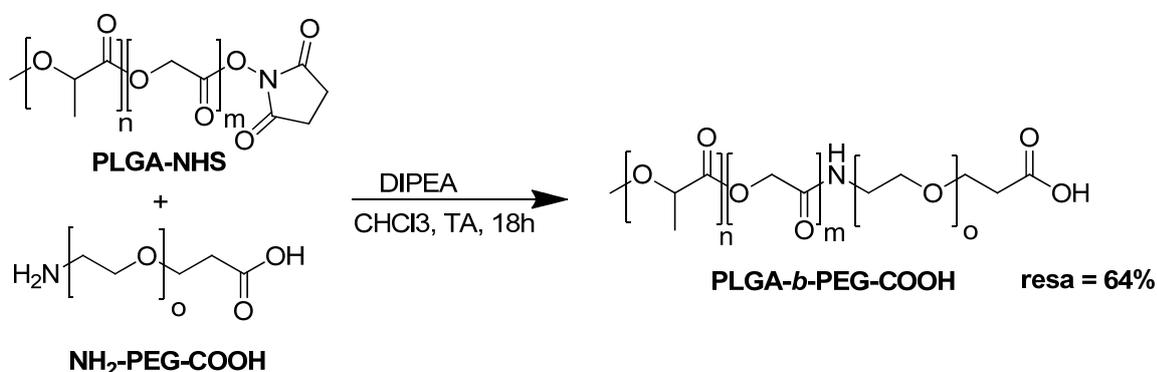
La sintesi del copolimero a blocchi PLGA-*b*-PEG-COOH è stata eseguita seguendo una procedura già nota presso il gruppo di ricerca in cui ho svolta la tesi. Essa parte da due polimeri disponibili commercialmente: l'acido poli(lattico-*co*-glicolico) indicato con PLGA-COOH, e il polietilenglicole terminante alle estremità con una funzionalità amminica e carbossilica, H<sub>2</sub>N-PEG-COOH.

Al fine di ottenere la formazione di un legame ammidico per la coniugazione dei due polimeri è stato eseguito un primo stadio di reazione consistente nell'attivazione dell'acido carbossilico del PLGA-COOH con N-idrossisuccinimide (NHS) in presenza di dicicloesilcarbodiimmide (DCC)<sup>[37,38]</sup> in DCM a temperatura ambiente per 20 ore (**Figura 10**). Il prodotto PLGA-NHS è stato ottenuto con una resa dell' 83%.



**Figura 10** – Attivazione del PLGA-COOH

Nel secondo stadio di reazione è stato fatto avvenire l'attacco nucleofilo del gruppo amminico di H<sub>2</sub>N-PEG-COOH sull'acido carbossilico attivato del PLGA-NHS. Tale reazione di sostituzione è stata fatta in presenza di diisopropiletilammina (DIPEA) in CHCl<sub>3</sub> per 18 ore a temperatura ambiente, ed ha consentito l'ottenimento del copolimero desiderato PLGA-*b*-PEG-COOH (**Figura 11**) con resa del 64%.



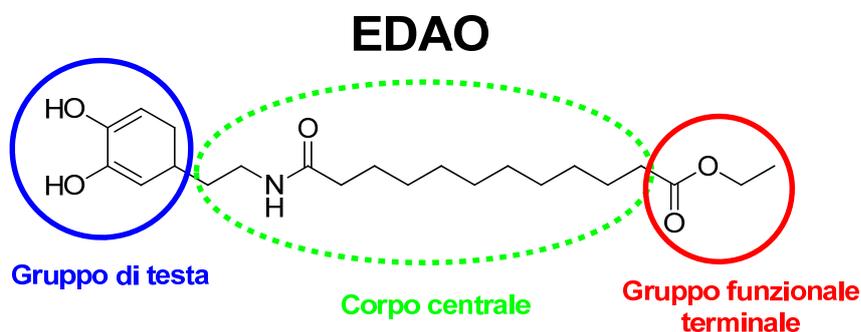
**Figura 11** – Sintesi del copolimero PLGA-*b*-PEG-COOH

Il PLGA-b-PEG-COOH è una macromolecola anfifilica, poiché possiede una parte idrofilica (PEG) e una idrofobica (PLGA); è dunque in grado di autoassemblarsi per costituire delle micelle, in un processo in cui la forza trainante è data da un aumento complessivo di entropia<sup>[39]</sup>; essendo poi il gruppo carbossilico situato in posizione terminale del blocco idrofilico di PEG, la sua esposizione superficiale in ambiente acquoso è favorita dopo la formazione delle nanoparticelle polimeriche, e rimane disponibile per ulteriori funzionalizzazioni superficiali.

### 3.2 Nanotecnologie

#### *3.2.1 Ricopertura delle maghemiti con il legante EDAO*

Per poter impiegare negli stadi successivi le nanoparticelle magnetiche sintetizzate, è stato necessario modificarle in modo da renderle solubili in solventi organici, dal momento che quelle ottenute inizialmente sono idrosolubili. Per ottenere questo trasferimento dalla fase acquosa a quella organica è stata eseguita la funzionalizzazione delle nanoparticelle con il legante idrofobico precedentemente preparato EDAO, che va a ricoprire la superficie con formazione di un SAM (Self Assembled Monolayer)<sup>[40]</sup>. Il legante sintetizzato a tale scopo può essere suddiviso in tre parti: un gruppo di testa, con forte affinità per il substrato, un corpo centrale e un gruppo funzionale terminale (**Figura 12**).

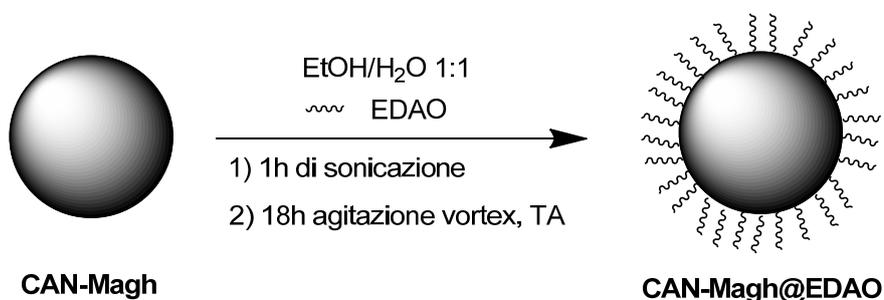


**Figura 12** - Struttura del legante EDAO

Il gruppo di testa consiste nel catecolo derivante dalla dopamina, legante hard all'ossigeno con grande affinità per l'acido di lewis hard Fe(III), con cui forma complessi estremamente stabili anche grazie alla sua capacità chelante. Questa proprietà è sfruttata

anche in natura, ad esempio, nei siderofori, molecole specifiche per il sequestro di ferro dall'ambiente rilasciate da alcuni microorganismi. Il catecolo si lega pertanto al Fe(III) presente sulla superficie della particella attraverso un forte legame covalente dove l'ossigeno agisce da  $\sigma$  e  $\pi$  donatore.<sup>[41,42]</sup> Il corpo centrale è costituito da una catena alchilica e da un gruppo ammidico e la sua funzione è quella di conferire stabilità allo strato auto-assemblato attraverso la formazione di legami a idrogeno intermolecolari; l'impaccamento ordinato delle molecole del legante è favorito inoltre dalla presenza del gruppo aromatico del catecolo responsabile delle interazioni di tipo  $\pi$ - $\pi$  stacking fra le catene. Infine, il gruppo terminale è un estere etilico, che contribuisce a migliorare la solubilità nei solventi organici di interesse.

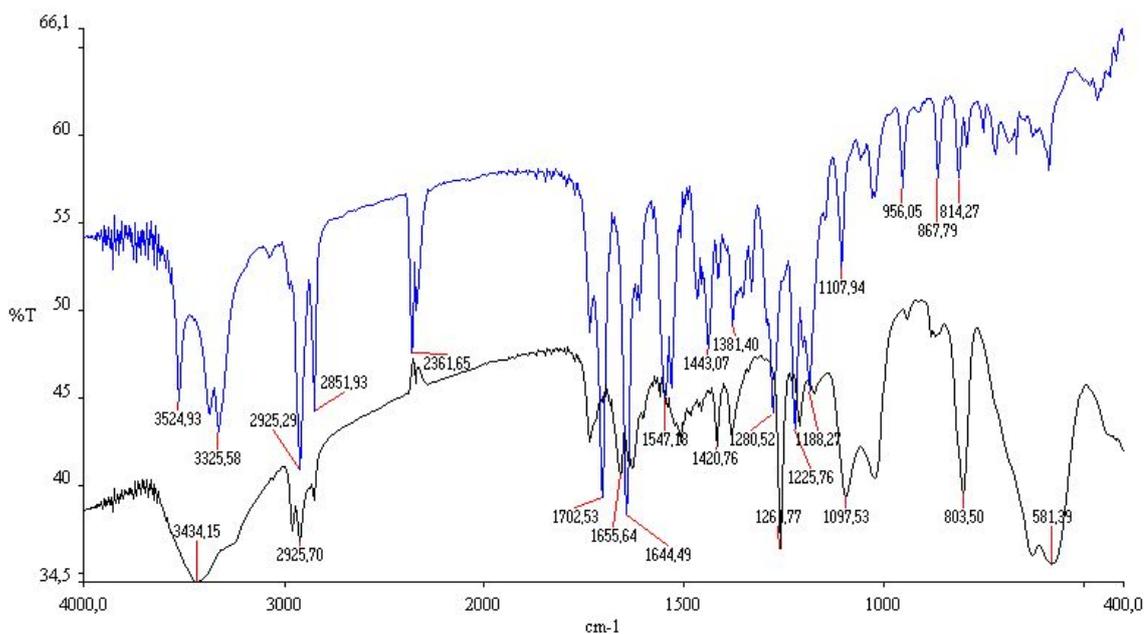
Per la ricopertura, il legante è stato solubilizzato in una soluzione alcolica, e ad essa è stato aggiunto un egual volume di soluzione acquosa contenente le nanoparticelle di maghemite. La miscela è stata fatta reagire per la prima ora sotto sonicazione, poi per altre 18 ore in agitazione al vortex per consentire la lenta riorganizzazione del legante, equivalente a una cristallizzazione superficiale, con conseguente formazione di un SAM compatto sulla superficie delle nanoparticelle (**Figura 13**). Infine le nanoparticelle sono state separate per decantazione magnetica, lavate con etanolo per rimuovere il legante non reagito, e disperse in acetone.



**Figura 13** – Ricopertura delle CAN-Maghemiti con il legante EDAO

La caratterizzazione al DLS ha mostrato che le nanoparticelle poste in solvente organico hanno la tendenza ad aggregarsi: il diametro idrodinamico medio è risultato di  $195 \pm 8$  nm con PDI di  $0.41 \pm 0.02$ .

Per confermare l'avvenuto ancoraggio del legante sulle maghemiti, polveri seccate sotto vuoto di maghemiti ricoperte, CAN-Magh@EDA0, sono state caratterizzate all'IR, così come il legante EDAO prima della funzionalizzazione.

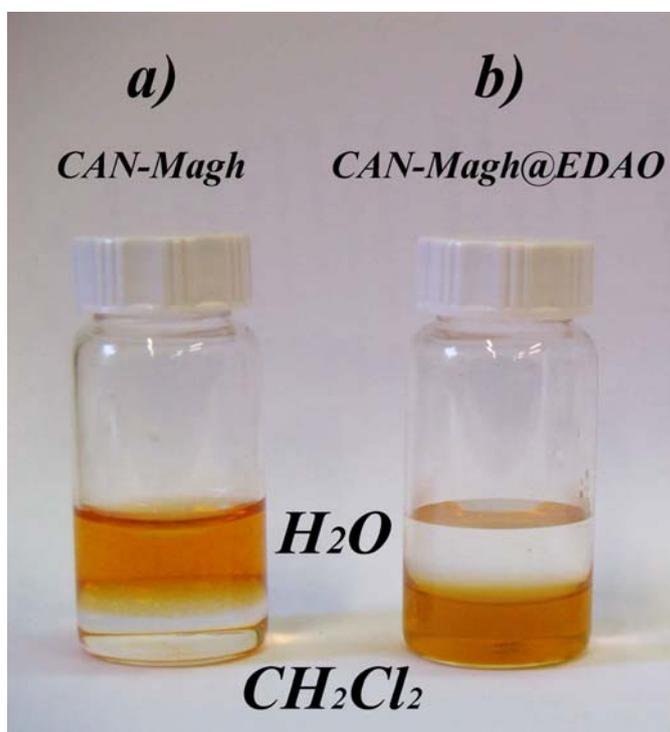


**Figura 14** – Caratterizzazione IR di: a) EDAO, curva blu; b) CAN-Magh@EDAO, curva nera

Nello spettro ottenuto per le CAN-Magh@EDAO (**Figura 14 – curva nera**) si nota una banda molto ampia a  $3400\text{ cm}^{-1}$  dovuta allo stretching degli OH delle molecole di acqua adsorbite sulla superficie delle maghemiti formando un guscio di idratazione di idrossido di ferro. Questa banda si sovrappone ai segnali derivanti dagli stretching degli OH del catecolo e dell'NH dell'ammide del legante rispettivamente a  $3300$  e  $3500\text{ cm}^{-1}$ , rendendo difficile identificare l'avvenuto ancoraggio attraverso queste bande. Gli altri segnali dovuti alla maghemite sono il picco a  $1260\text{ cm}^{-1}$  attribuibile ai bending degli OH dell'acqua assorbita superficialmente e una doppia banda a circa  $580\text{ cm}^{-1}$  dovuta allo stretching del legame Fe-O. A questi segnali si sovrappongono chiaramente quelli provenienti dal legante (**Figura 14 – curva blu**). Fra quelli più diagnostici si individuano i picchi fra  $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  degli stretching CH alifatici, a  $1700$  e  $1640\text{ cm}^{-1}$  gli stretching dei C=O rispettivamente esterei ed ammidici, alcuni picchi a circa  $1500\text{ cm}^{-1}$  degli stretching dell'anello aromatico. Il picco nello spettro dell'EDAO a  $1280\text{ cm}^{-1}$  è attribuibile agli stretching C-O arilici, e potrebbe aver subito un red-shift in seguito alla formazione del legame fra il catecolo e il substrato, dando origine alla banda a  $1100\text{ cm}^{-1}$  nello spettro del CAN-Magh@EDAO. Il red-shift di questa banda è stato riportato in altri casi in letteratura.<sup>[43,44,45]</sup>

Sebbene sia difficile stabilire dagli spettri la reale natura del legame fra maghemiti ed EDAO, essi evidenziano inequivocabilmente la presenza del legante e l'avvenuta ricopertura delle nanoparticelle.

L'avvenuta funzionalizzazione è stata ulteriormente confermata dall'ottima solubilità in acqua e diclorometano rispettivamente prima e dopo la ricopertura con il legante. L'immagine mostra il successo nel trasferimento di fase dovuto alla funzionalizzazione (**Figura 15**).



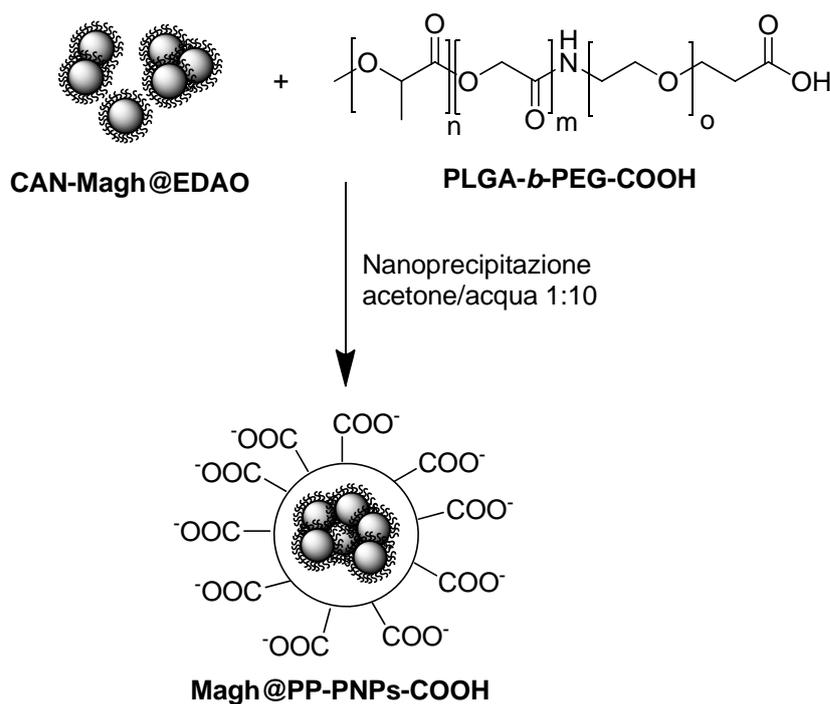
**Figura 15** – Test di solubilità: a) CAN-Magh solubili in H<sub>2</sub>O; b) CAN-Magh@EDAO solubili in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

### **3.2.2 Preparazione micelle: nanoprecipitazione.**

L'incapsulamento delle maghemitici in nanoparticelle polimeriche è stato eseguito mediante la tecnica della nanoprecipitazione,<sup>[46]</sup> anche nota col nome di “solvent displacement”.<sup>[47]</sup> Questa offre molti vantaggi essendo una tecnica immediata, rapida e di semplice esecuzione in cui le nanoparticelle vengono formate istantaneamente e l'intera procedura viene completata in un solo passaggio.

La nanoprecipitazione richiede l'uso di due solventi miscibili, tipicamente acqua e un solvente organico. L'acqua viene utilizzata in quantità maggiore, e va a costituire il mezzo disperdente delle nanoparticelle formate al termine del processo. Il polimero (PLGA-*b*-PEG-COOH) e le maghemitici da incapsulare (CAN-Magh@EDAO) devono essere solubili nel solvente organico e insolubili in acqua. La nanoprecipitazione infatti avviene in seguito alla rapida desolvatazione del polimero quando la soluzione organica

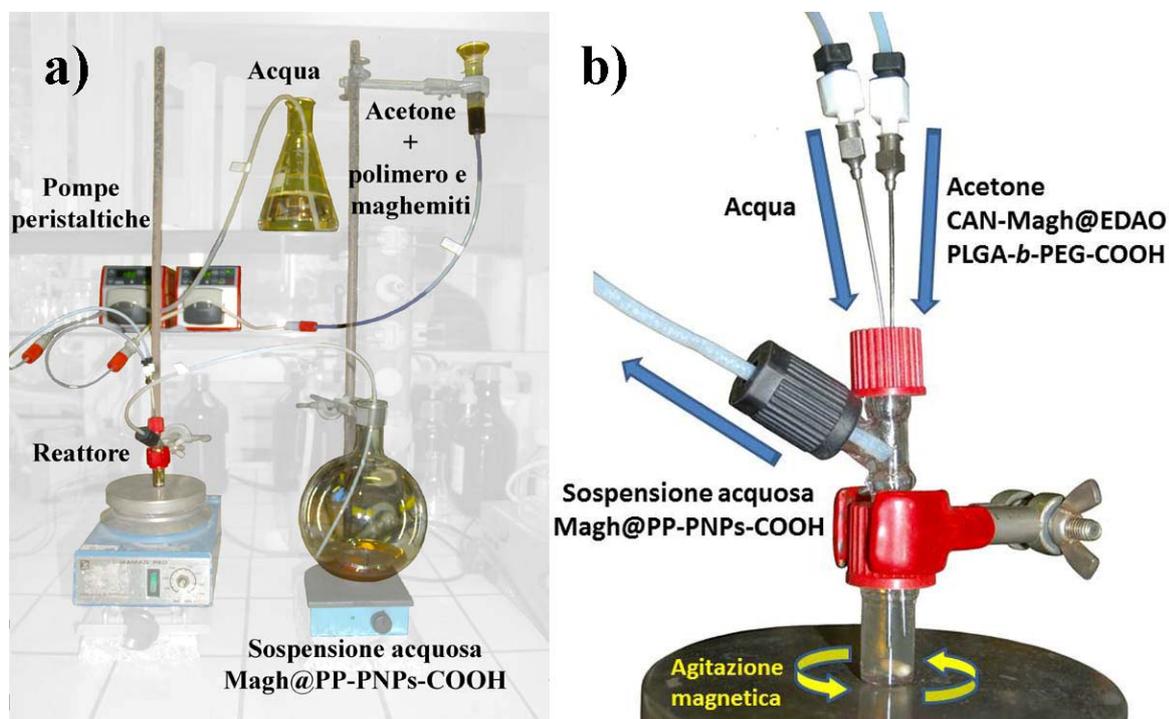
viene introdotta nel non solvente (H<sub>2</sub>O). Quando il solvente organico è diffuso nel mezzo disperdente, il polimero precipita formando delle micelle che espongono esternamente le catene idrofiliche (PEG) e internamente quelle idrofobiche (PLGA): durante la loro formazione, le micelle intrappolano al loro interno le maghemiti, rese lipofiliche grazie alla ricopertura con EDAO. La rapida formazione delle nanoparticelle è governata dall'effetto Marangoni, che consiste nel trasferimento di massa lungo l'interfaccia fra due fluidi dovuto al gradiente di tensione superficiale. Questo, unito al flusso del solvente dovuto all'agitazione meccanica, causa una elevata turbolenza interfacciale responsabile della formazione di piccole gocce contenenti il polimero e le maghemiti: successivamente il solvente organico diffonde fuori da queste e il polimero precipita per effetto del non-solvente.<sup>[48,49]</sup> La dimensione delle particelle è determinata dal tipo di solvente organico impiegato, dalla concentrazione del polimero e dal rapporto solvente organico/acqua.<sup>[50,51]</sup> In questo caso, sono stati impiegati acetone e acqua in rapporto 1:10, con una concentrazione di polimero in acetone di 10 mg/ml (**Figura 16**).



**Figura 16** – Intrappolamento delle CAN-Magh@EDAO in nanoparticelle polimeriche mediante la tecnica della nanoprecipitazione e ottenimento delle Magh@PP-PNPs-COOH. I gruppi carbossilato rappresentati nello schema sono esemplificativi della loro presenza sulla superficie della particella polimerica.

Il co-polimero PLGA-*b*-PEG-COOH e le maghemiti ricoperte con EDAO sono state solubilizzate in acetone, che è stato successivamente miscelato con l'acqua. La miscelazione è stata fatta avvenire in un reattore al quale erano alimentate in continuo le

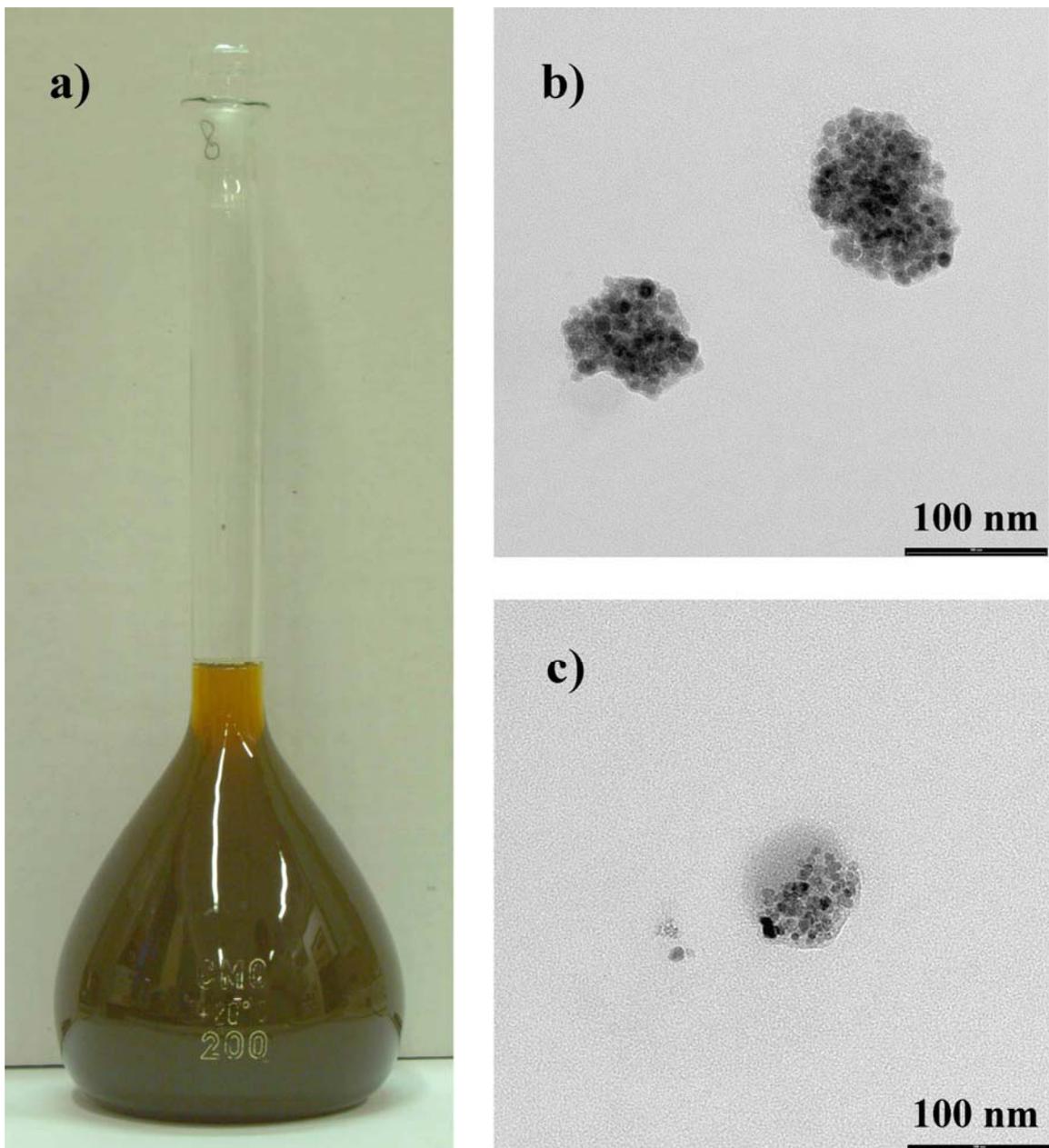
due correnti attraverso due pompe peristaltiche (**Figura 17 - a**). Nel reattore è stato mantenuto il solvente in moto turbolento attraverso una forte agitazione magnetica (**Figura 17 - b**). Completata la nanoprecipitazione, l'acetone è stato rimosso per evaporazione a bassa pressione.



**Figura 17** – a) Sistema per la nanoprecipitazione ; b) particolare del reattore in cui avviene la miscelazione della corrente acquosa e di acetone contenente il polimero e le CAN-Magh@EDAO, con conseguente formazione delle micelle polimeriche e incapsulamento delle maghemiti.

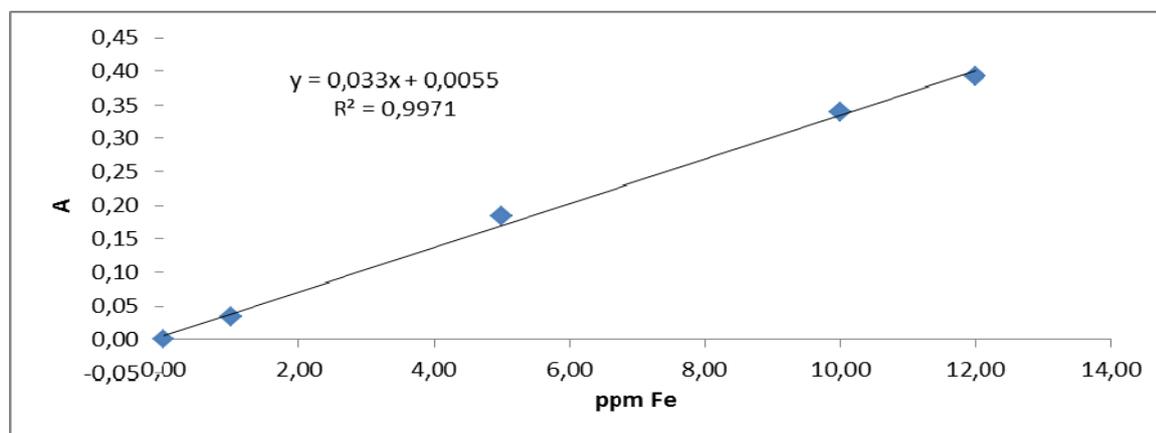
Al termine è stata ottenuta una sospensione acquosa marrone che appare lattiginosa per effetto dello scattering dovuto alla presenza delle micelle; questa non presentava inoltre la formazione di precipitato (**Figura 18 – a**). Le particelle ottenute con questo processo risultano idrosolubili e sono stabilizzate sia stericamente grazie alla presenza del PEG, sia elettrostaticamente: la carica superficiale di queste particelle polimeriche deriva dalla deprotonazione dei gruppi carbossilici superficiali, ed è pertanto fortemente dipendente dal pH del mezzo disperdente. A pH 6.30, il potenziale  $\zeta$  è risultato -35.2 mV, valore che conferma l'elevata stabilizzazione elettrostatica. La caratterizzazione al DLS ha fornito per le particelle un diametro idrodinamico medio di  $143 \pm 2$  nm con un indice di polidispersità (PDI) di  $0.15 \pm 0.02$ . Questo diametro può essere comparato con quello di micelle polimeriche vuote preparate mediante nanoprecipitazione mantenendo le stesse condizioni (concentrazione di polimero e rapporto fra i solventi), ma senza disperdere in acetone le CAN-Magh@EDAO. In tal caso si ottiene una sospensione acquosa bianca

lattiginosa: caratterizzata al DLS fornisce un diametro idrodinamico delle particelle di  $102.5 \pm 0.4$  nm con un PDI di  $0.108 \pm 0.006$  nm. L'incapsulamento delle maghemiti causa pertanto un aumento del diametro delle particelle di circa 40 nm. L'avvenuto intrappolamento è stato confermato dalle immagini ottenute al microscopio a trasmissione elettronica (TEM), dove sono chiaramente visibili le nanoparticelle di maghemite all'interno delle particelle polimeriche (**Figura 18 – b, c**). Inoltre, le dimensioni delle particelle caratterizzate al TEM sono in perfetto accordo con il valore del diametro ottenuto al DLS per le Magh@PP-PNPs-COOH.



**Figura 18** – a) Fotografia della sospensione acquosa di Magh@PP-PNPs-COOH; b) e c) Immagini TEM delle Magh@PP-PNPs-COOH

Per determinare la concentrazione di ferro, la sospensione è stata caratterizzata mediante assorbimento atomico. La retta di taratura è stata ottenuta misurando l'assorbanza di 5 campioni standard a diversa concentrazione di Fe: 0.0 ppm, 1.0 ppm, 5.0 ppm, 10.0 ppm, 12.0 ppm. La retta di interpolazione lineare di questi dati è riportata in **Figura 19**.



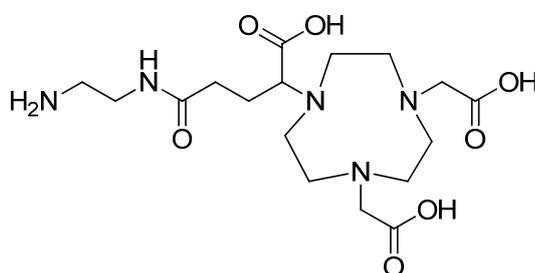
**Figura 19** – Retta di taratura per la misura della concentrazione di ferro mediante assorbimento atomico

500  $\mu$ l del campione originario sono stati diluiti a 10 ml con H<sub>2</sub>O, e per questa soluzione è stato ottenuto un valore di assorbanza di 0.2513, corrispondente a 7.4 ppm di Fe. Tenendo conto della diluizione, è stata calcolata la concentrazione di 149 ppm di Fe nel campione originario. Mediante questo valore è stato possibile stimare una resa in Fe del 76% dopo il trasferimento di fase delle maghemiti e lo stadio della nanoprecipitazione.

### 3.3 Funzionalizzazione

#### 3.3.1 Sintesi Magh@PP-PNPs-NODA.

Come ultimo passaggio, la superficie delle nanoparticelle polimeriche contenenti le nanoparticelle di maghemite è stata funzionalizzata con un agente chelante, il NODA-GA-Etilendiammina (**Figura 20**), specifico per la complessazione di  $^{67}\text{Ga}^{3+}$  e  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ , agenti di contrasto rispettivamente per SPECT e PET.

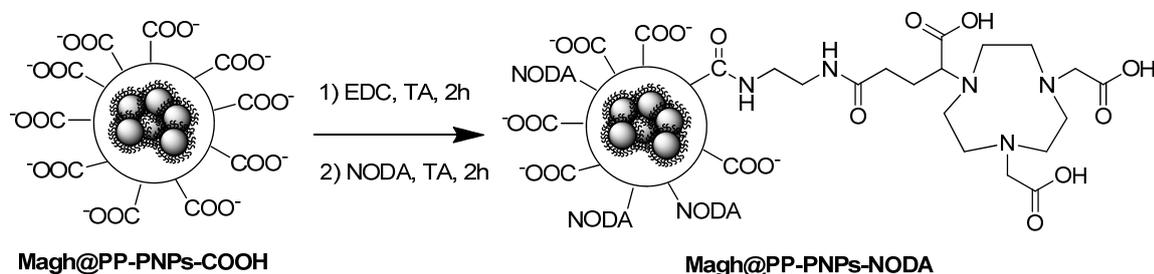


**Figura 20** – Struttura dell'agente chelante NODA-GA-Etilendiammina (commerciale)

Il triazamacrociclo mostra altissima selettività per la dimensione dei cationi, e la grande stabilità del complesso con il  $\text{Ga}^{3+}$  deriva dal perfetto accomodamento di questo catione metallico (raggio=0.76Å) nella cavità del triazaciclononano. In questo modo si ha un'interazione ottimale fra il metallo e gli atomi donatori (3 atomi di azoto del macrociclo e 3 di ossigeno dei gruppi carbossilici), e si crea una tasca per azione dei gruppi carbossilici che incapsulano il catione isolandolo efficacemente da altri leganti che possono competere per la sua complessazione in ambiente biologico.<sup>[52,53]</sup> Dall'altra estremità dell'agente chelante è presente una ammina primaria, che può essere sfruttata per l'aggancio sulla superficie della micella polimerica.

La reazione è stata condotta in soluzione acquosa e svolta in due stadi: nel primo i gruppi carbossilici presenti sulla superficie delle nanoparticelle polimeriche contenenti le maghemiti sono stati attivati con 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide (EDC).<sup>[54,55]</sup> L'EDC reagisce con gli acidi carbossilici formando come intermedio attivo un'O-acilisourea, che è facilmente sostituita dall'attacco nucleofilo dell'ammina primaria del NODA-GA-Etilendiammina, con formazione di un legame ammidico ed eliminazione di un derivato ureico come sottoprodotto dell'EDC. Dopo due ore di attivazione a temperatura ambiente, è stato aggiunto il NODA-GA-Etilendiammina, e la reazione è

stata fatta avvenire per altre 2 ore sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente (**Figura 21**). In questo modo sono state ottenute le micelle parzialmente funzionalizzate con il NODA, indicate col nome Magh@PP-PNPs-NODA.



**Figura 21** – Funzionalizzazione superficiale delle Magh@PP-PNPs-COOH con NODA-GA-Etilendiammina, e ottenimento delle Magh@PP-PNPs-NODA.

La caratterizzazione successiva ha mostrato che le particelle risultano stabili dopo la funzionalizzazione, avendo mantenuto le dimensioni originarie. Al DLS è stato ricavato il diametro idrodinamico medio di  $142 \pm 1$  nm con PDI di  $0.15 \pm 0.02$  nm. Il potenziale  $\zeta$  è risultato -38.4 mV a pH 6.00.

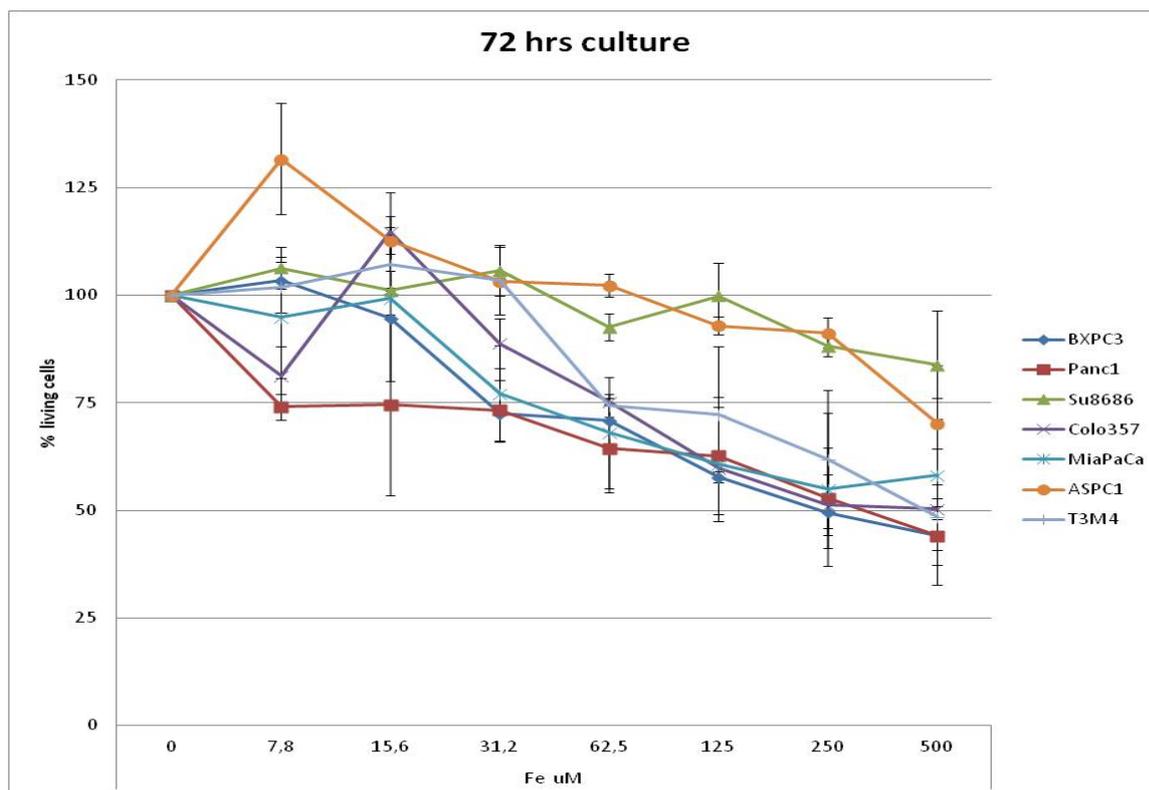
Al fine di poter impiegare le nanoparticelle ottenute per i test di imaging e di viabilità cellulare, è stata determinata la concentrazione di Fe nella sospensione mediante assorbimento atomico. Analogamente a quanto descritto nel precedente paragrafo, 500  $\mu$ l del campione originario sono stati diluiti a 10 ml con H<sub>2</sub>O. Per questa sospensione è stato misurato il valore di assorbanza di 0.2269, corrispondente a 6.7 ppm di Fe. Tenendo conto della diluizione, è stata calcolata la concentrazione di 134 ppm di Fe nel campione originario. Questo ha permesso di ricavare anche la resa globale in Fe, risultata del 69%, comprendente gli stadi di trasferimento di fase delle maghemiti, nanoprecipitazione e funzionalizzazione.

### **3.3.2 Test di citotossicità.**

I test in vitro di viabilità cellulare sono stati eseguiti da Filarete Servizi, uno dei partner coinvolti nel progetto “SaveMe” con sede a Milano. Questi sono stati eseguiti su campioni di Magh@PP-PNPs-NODA in modo da trovare la massima concentrazione di ferro tollerabile dalle cellule e verificare che questa sia superiore alla concentrazione necessaria per poter agire come agente di contrasto MRI.

La citotossicità delle Magh@PP-PNPs-NODA è stata determinata mediante MTT test. Questo è un saggio colorimetrico che sfrutta la metabolizzazione della molecola MTT, un sale di tetrazolio di colore giallo, che avviene nelle cellule vive a livello mitocondriale da parte degli enzimi deidrogenasi dipendenti da NADH. Al termine del processo, si ha la riduzione dell'MTT a formazano, che in soluzione acquosa forma un precipitato di colore viola, in quantità proporzionale al numero di cellule vive presenti nel pozzetto. Questo viene solubilizzato in DMSO, e la concentrazione misurata con uno spettrofotometro. La quantità di formazano prodotto in presenza dell'agente da testare viene infine confrontata con quella prodotta in una cella di controllo non trattata, per ottenere la mortalità cellulare.

Nel caso in esame, sono state eseguite prove a diversa concentrazione in ferro (incapsulato nelle Magh@PP-PNPs-NODA) sulle linee cellulari derivate dall'adenocarcinoma pancreatico Panc-1, ASPC-1, MiaPaCa, Su86.86, T3M4, BxPC3, Colo-357 ottenendo le relative curve dose-risposta, in cui è mostrata graficamente per ogni linea cellulare la vitalità percentuale in funzione della concentrazione di Fe (**Figura 19**). Il test MTT è stato eseguito dopo 72 ore dall'aggiunta delle nanoparticelle da testare alle varie linee cellulari. I risultati sono presentati come valori medi ottenuti da due test MTT indipendenti, ognuno dei quali è stato eseguito in triplicato.



**Figura 19** – Grafico della percentuale di cellule vive in funzione della concentrazione di ferro contenuto nelle Magh@PP-PNPs-NODA. Sono riportate le curve ottenute dal test MTT per ogni linea cellulare esaminata.

Sulla base dei risultati ottenuti, è possibile distinguere le linee cellulari in due gruppi: uno, costituito ASPC1 e Su86.86 si è rivelato molto resistente alle Magh@PP-PNPs-NODA mentre il secondo gruppo, comprendente le Panc-1, MiaPaCa, T3M4, BxPC3, Colo-357 si è mostrato più sensibile al trattamento. Da questi è stato ricavato il valore di concentrazione inibente ( $IC_{50}$ ) di ferro per le Magh@PP-PNPs-NODA, compresa fra 250 – 500  $\mu M$ . Questo valore di concentrazione elevato rassicura sulla possibilità di poter applicare il nanosistema sviluppato come agente di contrasto MRI.

### 3.3.3 Caratterizzazione magnetica: misure di rilassività per MRI

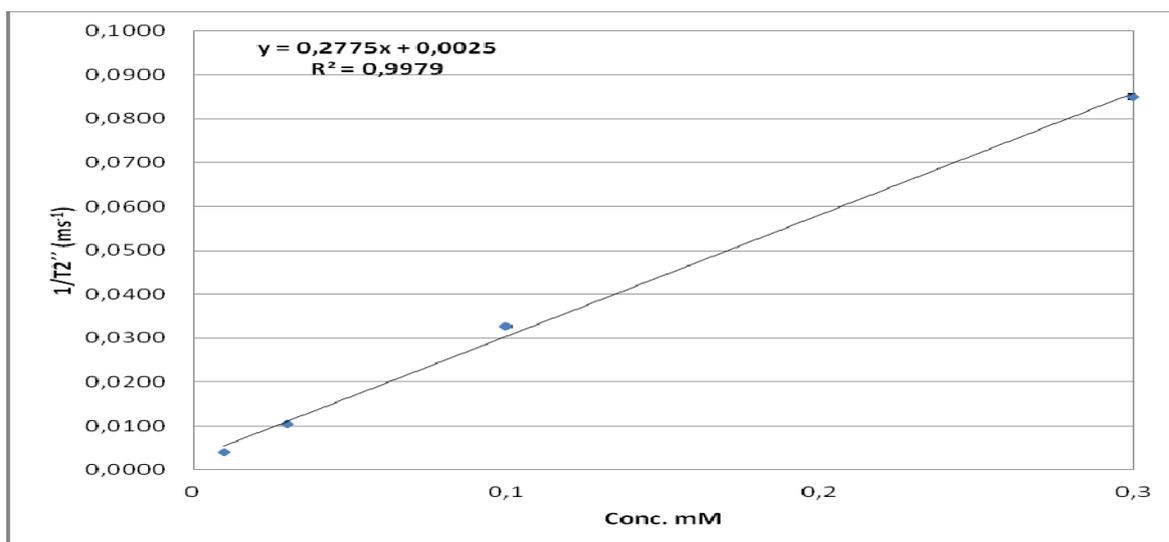
Per la caratterizzazione magnetica, un campione di sospensione acquosa di Magh@PP-PNPs-NODA è stato spedito all'Unità di Imaging Molecolare – CIC biomaGUNE presso il parco tecnologico di San Sebastian, dove sono state eseguiti i test.

L'efficacia di un agente di rilassamento per MRI viene valutata sulla base della sua rilassività  $R_i$ , avente come unità di misura  $mM^{-1}s^{-1}$ . Questa è definita dall'equazione:

$$(1/T_i)_{\text{osservato}} = (1/T_i)_{\text{diamagnetico}} + r_i[M] \quad ; \quad i = 1,2$$

dove [M] è la concentrazione dell'agente di rilassamento, e  $i = 1,2$  si riferisce ai tempi di rilassamento longitudinale ( $T_1$ ) e trasversale ( $T_2$ ) di  $H_2O$ . Un grafico di  $(1/T_i)_{\text{osservato}}$  contro [M] fornisce una retta con intercetta  $(1/T_i)_{\text{diamagnetico}}$  e pendenza  $r_i$ ; la pendenza  $r_i$  moltiplicata per  $10^3$  fornisce la relassività  $R_i$ .

Al fine di determinare la relassività delle maghemiti intrappolate nelle Magh@PP-PNPs-NODA, sono state preparate delle soluzioni di Magh@PP-PNPs-NODA in  $H_2O/D_2O$  1:1 con differenti concentrazioni in Fe: 0.01mM, 0.03mM, 0.1mM, 0.3mM. Sono stati dunque misurati i tempi di rilassamento  $T_1$  e  $T_2$  per ogni valore concentrazione, e i dati sono stati riportati in grafici che mostrano l'andamento di  $1/T_i$  rispetto alla concentrazione in Fe (**Figura 20**); dalle rette di interpolazione di questi dati sono stati quindi ricavati i valori di relassività:  $R_1 = 0.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  e  $R_2 = 277.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ .



**Figura 20** –  $1/T_2$  in funzione della concentrazione di Fe. I risultati per  $1/T_1$  non sono mostrati.

Come atteso, le maghemiti non mostrano effetto su  $T_1$  ( $R_1$  è circa uguale a 0), ma accorciano notevolmente  $T_2$ , come dimostrato dal valore molto alto di  $R_2$ .

Dato che è stato verificato mediante i test di viabilità cellulare, come esposto in precedenza, che i nanosistemi sviluppati non risultano citotossici entro il limite di concentrazione di ferro di 0.25 mM, e che entro questo limite di concentrazione presentano un valore di relassività  $R_2$  molto elevato, si può concludere che questi possono essere efficacemente impiegati come agenti di contrasto negativo per MRI.

## 4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Questo progetto di tesi è stato svolto all'interno del progetto europeo con acronimo SaveMe, avente come scopo lo sviluppo di nano-piattaforme innovative per la cura e la diagnosi di forme tumorali.

Durante il periodo di tirocinio presso il Dipartimento di Chimica Organica "A. Mangini", sono stati raggiunti due obiettivi fondamentali per la buona riuscita del progetto:

- è stato sintetizzato e caratterizzato con successo il *core nanosystem* principale, costituito da nanoparticelle di maghemite intrappolate in micelle polimeriche
- il core nanosystem ottenuto è stato funzionalizzato sulla superficie con un agente chelante per i radioisotopi  $^{67}\text{Ga}^{3+}$  e  $^{68}\text{Ga}^{3+}$

Nel complesso, è stata ottenuta una piattaforma per imaging multimodale MRI/PET o MRI/SPECT. Questa, grazie ai test di citotossicità e di caratterizzazione magnetica è risultata idonea ad essere applicata come agente di contrasto per MRI. Si stanno attendendo ulteriori risultati di caratterizzazione per le tecniche radiodiagnostiche PET e SPECT.

I successivi sviluppi di questa nano-piattaforma riguarderanno l'ottenimento di micelle miste provviste di funzionalità amminiche e carbossiliche in superficie per aumentarne le possibilità di funzionalizzazione. Queste saranno poi decorate superficialmente con biomolecole opportune (proteine, peptidi e anticorpi monoclonali) per il riconoscimento dei target biologici, ottenendo quindi dei sistemi per il targeted molecular imaging. Parallelamente, potranno poi essere sviluppate nano-piattaforme analoghe predisposte per il drug delivery.

## 5. Bibliografia

- 
- <sup>1</sup> G. L. Hornyak, J. Dutta, H. F. Tibbals, A. K. Rao, "Introduction to Nanoscience", CRC Press **2008**;
- <sup>2</sup> J. J. Gooding, "Alkanethiol Self-Assembled Monolayers", Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Volume 1, p. 17-49, Edited by H. S. Nalwa;
- <sup>3</sup> G. M. Whitesides, "Nanoscience, Nanotechnology, and Chemistry", *Small*, **2005**, *1*, 2, 172-179;
- <sup>4</sup> V. Wagner, A. Dullaart, A. K. Bock, A. Zweck, "The emerging nano medicine landscape", *Nat. Biotechnol.*, **2006**, *24*, 1211-1217;
- <sup>5</sup> D. K. Kim, J. Dobson, "Nanomedicine for targeted drug delivery", *J. Mater. Chem*, **19**, **2009**, 6294-6307;
- <sup>6</sup> O. C. Farokhzad, R. Langer, "Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities", *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2006**, *58*, 1456-1459;
- <sup>7</sup> G. Storm, S. O. Belliot, T. Daemen, D.D. Lasic, "Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system", *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1995**, *17*, 31-48;
- <sup>8</sup> S. Acharya, S. K. Sahoo, "PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR Effect", *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2011**, *63*, 170-183;
- <sup>9</sup> R. Tong, J. Cheng, "Anticancer polymeric nanomedicines", *Polym. Rev.*, **2007**, *47*, 345-381;
- <sup>10</sup> O. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherify, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, R. Langer, "Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo", *PNAS*, **2006**, *103*, 16, 6315-6320;
- <sup>11</sup> D. Gentili, G. Ori, M. Comes Franchini, "Double phase transfer of gold nanorods for surface functionalisation and entrapment into PEG-based nanocarriers", *Chem. Commun.*, **2009**, 5874-5876;
- <sup>12</sup> F. Gu, L. Zhang, B. A. Teply, N. Mann, A. Wang, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad, "Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers", *PNAS*, **2008**, *105*, 7, 2586-2591;
- <sup>13</sup> M. S. Muthu, "Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview", *Asian J. Pharm.*, **2009**, *3*, 266-273;
- <sup>14</sup> D. Vance, J. Martin, S. Patke, R. S. Kane, "The design of polyvalent scaffolds for targeted delivery", *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2009**, *61*, 931-939;
- <sup>15</sup> S. Santra, C. Kaitanis, J. M. Perez, "Aliphatic hyperbranched polyester: a new building block in the construction of multifunctional nanoparticles and nanocomposites", *Langmuir*, **2010**, *26*, 8, 5364, 5373;
- <sup>16</sup> W. Cai, X. Chen, "Nanoplatforms for targeted molecular imaging in living subjects", *Small*, **2007**, *3*, 11, 1840-1854;
- <sup>17</sup> S. Liu, "Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides", *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2008**, *60*, 1347-1370;
- <sup>18</sup> H. C. Aspinall, "Chemistry of the f-block elements", Taylor & Francis, **2001**;
- <sup>19</sup> R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, "Identificazione spettrometrica di composti organici", Casa Editrice Ambrosiana, **2006**;

- 
- <sup>20</sup> A. Bjornerud, L. Johansson, "The utility of superparamagnetic contrast agents in MRI: theoretical consideration and application in the cardiovascular system", *NMR Biomed.*, **2004**, *17*, 465-477,;
- <sup>21</sup> H. B. Na, I. C. Song, T. Hyeon, "Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast agents", *Adv. Mater.*, **2009**, *21*, 2133-2148;
- <sup>22</sup> M. A. Willard, L. K. Kurihara, E.E. Carpenter, S. Calvin, V. G. Harris "Chemically prepared magnetic nanoparticles", *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Volume 1, p. 815-848, Edited by H. S. Nalwa;
- <sup>23</sup> P. Tartaj, M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. González-Carreno, C. J. Serna, "The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2003**, *36*, R182-R197;
- <sup>24</sup> Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2003**, *36*, R167-R181;
- <sup>25</sup> F. X. Hu, K. G. Neoh, E. T. Kang, "Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles", *Biomaterials*, **2006**, *27*, 5725-5733;
- <sup>26</sup> G. Baldi, D. Bonacchi, M. Comes Franchini, D. Gentili, G. Lorenzi, A. Ricci, C. Ravagli, "Synthesis and coating of cobalt ferrite nanoparticles: a first step toward the obtainment of new magnetic nanocarriers", *Langmuir*, **2007**, *23*, 4026-4028;
- <sup>27</sup> M. Comes Franchini, G. Baldi, D. Bonacchi, D. Gentili, G. Giudetti, A. Lascafari, M. Corti, P. Marmorato, J. Ponti, E. Micotti, U. Guerrini, L. Sironi, P. Gelosa, C. Ravagli, A. Ricci, "Bovine serum albumin-based nanocarrier for MRI diagnosis and hyperthermic therapy: a potential theranostic approach against cancer", *Small*, **2010**, *6*, 3, 366-370;
- <sup>28</sup> C. C. Berry, A. S. G. Curtis, "Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2003**, *36*, R198-R206;
- <sup>29</sup> A. H. Haviv, J.M. Grenèche, J.P. Lellouche, "Aggregation control of hydrophilic maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) nanoparticles by surface doping using cerium atoms", *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 12519-12521;
- <sup>30</sup> N. Esman, A. Haviv, J. P. Lellouche, "Magnetically responsive polypyrrole nanotubes using Ce(III)-stabilized maghemite nanoparticles", *Nanotechnology*, **2011**, *22*, 28, 285604 (8pp);
- <sup>31</sup> R. Massart, "Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media", *IEEE Trans. Magn.*, **1981**, *17*, 2, 1247-1248;
- <sup>32</sup> F. Vereda, J. Vicente, R. H. Alvarez, "Influence of a magnetic field on the formation of magnetite particles via two precipitation methods", *Langmuir*, **2007**, *23*, 3581-3589;
- <sup>33</sup> T. J. Mason, "Ultrasound in synthetic organic chemistry", *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, *26*, 443-451;
- <sup>34</sup> M. Hunsen, "Carboxylic acids from primary alcohols and aldehydes by a pyridinium chlorochromate catalyzed oxidation", *Synthesis*, **2005**, *15*, 2487-2490;
- <sup>35</sup> M. Hunsen, "Pyridinium chlorochromate catalyzed oxidation of alcohols to aldehydes and ketones with periodic acid", *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 1651;
- <sup>36</sup> C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, "Amide bond formation and peptide coupling", *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10827-10852;
- <sup>37</sup> E. Valeur, M. Bradley, "Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents", *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 606-631;
- <sup>38</sup> S. Thompson, "Small-molecule-protein conjugation procedures", *Methods in Molecular Medicine*, 94: Molecular diagnosis of infectious diseases, Supplied by the British Library;

- 
- <sup>39</sup> B. McCaughey, J. E. Hampsey, D. Wang, Y. Lu, "Self-assembled organic/inorganic nanocomposites", *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Volume 9, p. 529-559, Edited by H. S. Nalwa;
- <sup>40</sup> J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, "Self-assembled monolayers of thiolates on metal surfaces as a form of nanotechnology", *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1103-1169;
- <sup>41</sup> A. K. L. Yuen, G. A. Hutton, A. F. Masters, T. Maschmeyer, "The interplay of catechol ligands with nanoparticulate iron oxides", *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 2545;
- <sup>42</sup> E. Amstad, T. Gillich, I. Bilecka, M. Textor, E. Reimhult, "Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol-derived anchor groups", *Nano Lett.*, **2009**, *9*, 12, 4042-4048;
- <sup>43</sup> H. Basti, L. B. Tahar, L. S. Smiri, F. Herbst, M.-J. Vaulay, F. Chau, S. Ammar, S. Benderbous, "Catechol derivatives -coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and g-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles as potential MRI contrast agents", *J. Colloid Interface Sci.*, **2010**, *341*, 248-254;
- <sup>44</sup> M. D. Shultz, J. U. Rveles, S. N. Khanna, E. E. Carpenter, "Reactive nature of dopamine as a surface functionalization agent in iron oxide nanoparticles", *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 2482-2487;
- <sup>45</sup> T. Rajh, L. X. Chen, K. Lukas, T. Liu, M. C. Thurnauer, D. M. Tiede, "Surface restructuring of nanoparticles: an efficient route for ligand-metal oxide crosstalk", *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106*, 10543-10552;
- <sup>46</sup> H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, "Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanocapsules", US Patent, **1987**, Patent Number: 5,049,322;
- <sup>47</sup> D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, E. Doelker, "Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers", *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **1998**, *24*, 12, 1113-1128;
- <sup>48</sup> U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, "Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles", *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2005**, *24*, 67-75;
- <sup>49</sup> H. Xie, J. Smith, "Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system", *J. Nanobiotechnology*, **2010**, *8*, 18;
- <sup>50</sup> J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F. X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad, "Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery", *Biomaterials*, **2007**, *28*, 869-876;
- <sup>51</sup> M. Chorny, I. Fishbein, H. D. Danenberg, G. Golomb, "Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics", *J. Control. Release*, **2002**, *83*, 389-400;
- <sup>52</sup> I. Velikyan, H. Maecke, B. Langstrom, "Convenient preparation of <sup>68</sup>Ga-based PET-radiopharmaceuticals at room temperature", *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 569-573;
- <sup>53</sup> M. I. M. Prata, A. C. Santos, C. F. G. C. Geraldes, J. J. P. de Lima, "Characterisation of <sup>67</sup>Ga<sup>3+</sup> complexes of triaza macrocyclic ligands: biodistribution and clearance studies", *Nucl. Med. Biol.*, **1999**, *26*, 6, 707-710;
- <sup>54</sup> R. A. Sperling, W. J. Parak, "Surface modification, functionalisation and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles", *Phil. Trans. R. Soc. A*, **2010**, *368*, 1333-1383;
- <sup>55</sup> A. Taylor, Y. Krupskaya, S. Costa, S. Oswald, K. Krämer, S. Füssel, R. Klingeler, B. Büchner, E. Borowiak-Palen, M. P. Wirth, "Functionalization of carbon encapsulated iron nanoparticles", *J. Nanopart. Res.*, **2010**, *12*, 313-519;

## 6. Parte sperimentale

### 6.1 Note generali

Tutti i reattivi sono stati reperiti dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) ed usati tal quali. L'acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) (50/50) (PLGA-COOH, MW ~7 kDa) è stato reperito dalla Lactel Absorbable Polymers (Birmingham, AL, USA). Il polietilen glicole terminante alle estremità con una funzionalità amminica e una carbossilica (NH<sub>2</sub>-PEG-COOH, MW~3 kDa) è stato reperito dalla Rapp Polymere GmbH (Tübingen, Germany). Tutte le soluzioni acquose sono state preparate con acqua deionizzata, proveniente da un sistema di ultrafiltrazione (Milli-Q, Millipore) con una resistività misurata di circa 18 MW. Il THF è stato distillato da sodio/benzofenone prima di ogni utilizzo e conservato sotto Ar. Il CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ed il CHCl<sub>3</sub> sono stati passati su allumina basica prima dell'uso. Tutte le reazioni che richiedono condizioni anidre sono state condotte in flusso o in pressione di gas inerte (N<sub>2</sub>) seccato per passaggio successivo attraverso CaCl<sub>2</sub> e silica gel con indicatore. Le reazioni sono state controllate tramite TLC su fogli di gel di silice (Bakerflex IB2-F), mentre le colonne cromatografiche sono state utilizzate con Merck silica gel 60 (70-230 mesh). Per la sintesi delle maghemiti è stato utilizzato il sonicatore ad alta potenza Sonics, Vibra Cell, 750 W equipaggiato con punta in titanio. Per la decantazione magnetica delle maghemiti è stato utilizzato un supermagnete 50x50x30 mm in NdFeB, magnetizzazione N52. I punti di fusione sono stati determinati con un apparato Büchi SMP-20. Gli spettri <sup>1</sup>H NMR e <sup>13</sup>C NMR sono stati registrati utilizzando soluzioni in CDCl<sub>3</sub> a 300, 400 MHz per <sup>1</sup>H e 600 MHz per <sup>13</sup>C. Tutti gli spettri IR sono stati ottenuti con lo strumento Perkin Elmer FT-IR Spectrometer Spectrum 2000 in pasticca di KBr. Gli spettri di massa sono stati registrati dal Sig. L. Zuppiroli con uno spettrometro MICROMASS ZQ 4000 in *Electron Spray Ionisation (ESI)*. La *microscopia a trasmissione elettronica ad alta risoluzione (HRTEM)* è stata condotta su di un Jeol JEM 2010 a 200 keV presso il Centro di Spettroscopia Elettronica di Trieste (CSPA). I campioni sono stati preparati immergendo una griglia di rame da 200 mesh ricoperta da un sottile film carbone-Formvar (200C-FC) direttamente nelle soluzioni di PNPs. Le misurazioni DLS sono state eseguite tramite un Malvern Zetasizer nano-S operante con

raggio laser a 532 nm. Le centrifugazioni sono avvenute in una centrifuga Rotofix 32 A, Hettich Zentrifugen.

### ***6.1.1 Tecniche di concentrazione, purificazione e sterilizzazione***

Dopo la sintesi, le sospensioni colloidali ottenute sono state trattate con vari sistemi di filtrazione.

#### Concentrazione e purificazione:

- Dispositivo per filtrazione centrifuga Amicon<sup>®</sup> Ultra-15, Millipore, provvisto di membrana Ultracel -100K in cellulosa rigenerata, 100000 NMWL (dimensione di cut-off di 8 nm)
- Dispositivo per filtrazione a flusso tangenziale Pellicon<sup>®</sup> XL, Millipore, provvisto di membrana Biomax – 500K in polietersulfone, 500000 NMWL (dimensione di cut-off di 10 nm). Utilizzato in combinazione con una pompa peristaltica per alimentare la sospensione.

Entrambi i dispositivi consentono la concentrazione del campione e la purificazione, eliminando le molecole presenti nella miscela di reazione e trattenendo le particelle con dimensione superiore a quella di cut-off. Possono anche consentire il trasferimento in una diversa soluzione tampone. Il Pellicon<sup>®</sup> XL viene impiegato quando si devono trattare grandi quantità di sospensione. L'NMWL indica il Nominal Molecular Weight Limit, parametro che utilizza il peso molecolare per definire le caratteristiche di ritenzione della membrana.

#### Sterilizzazione:

- Unità per filtrazione Sterivex<sup>™</sup>-GP, Millipore, membrana in polietersulfone con dimensione dei pori di 0.22 µm. Viene utilizzata in combinazione con una siringa e permette di sterilizzare la sospensione. Rimuove infatti microorganismi, particelle, precipitati e polveri non solubilizzate con dimensioni maggiori di 0.22 µm.

La sterilizzazione del campione risulta fondamentale quando bisogna eseguire dei test biologici.

## 6.2 Sintesi Chimiche

### 6.2.1 Sintesi delle magnetiti $Fe_3O_4$



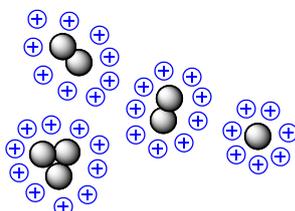
Nanoparticelle di magnetite  
( $Fe_3O_4$ ) aggregate

Le nanoparticelle di magnetite sono state ottenute mediante la sintesi di Massart.

In un pllone da 50 ml posto sotto flusso di  $N_2$  viene introdotto il cloruro ferrico esaidrato  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (240 mg, 0.888 mmol, solido giallo-arancione), il cloruro ferroso tetraidrato  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  (98 mg, 0.49 mmol, solido verde chiaro) e 9 ml di  $H_2O$ . Questa viene preventivamente deossigenata in un pallone a parte facendovi gorgogliare un flusso di  $N_2$ . Dopo 10 minuti di sonicazione nel bagno a ultrasuoni, vengono aggiunti 0.75 ml di una soluzione acquosa di  $NH_4OH$  24% v/v, anch'essa preventivamente deossigenata. Immediatamente si osserva la formazione di un precipitato nero. La sospensione viene sonicata per altri 10 minuti mantenendo l'atmosfera inerte di  $N_2$ .

Al termine, si eseguono dei lavaggi con  $H_2O$  (3 x 10 ml) decantando magneticamente ogni volta le nanoparticelle per separarle dal surnatante. Ogni decantazione richiede 2-3 giorni per avere una buona separazione.

### 6.2.2 Sintesi delle CAN-Magh



Sospensione acquosa  
di CAN-Magh

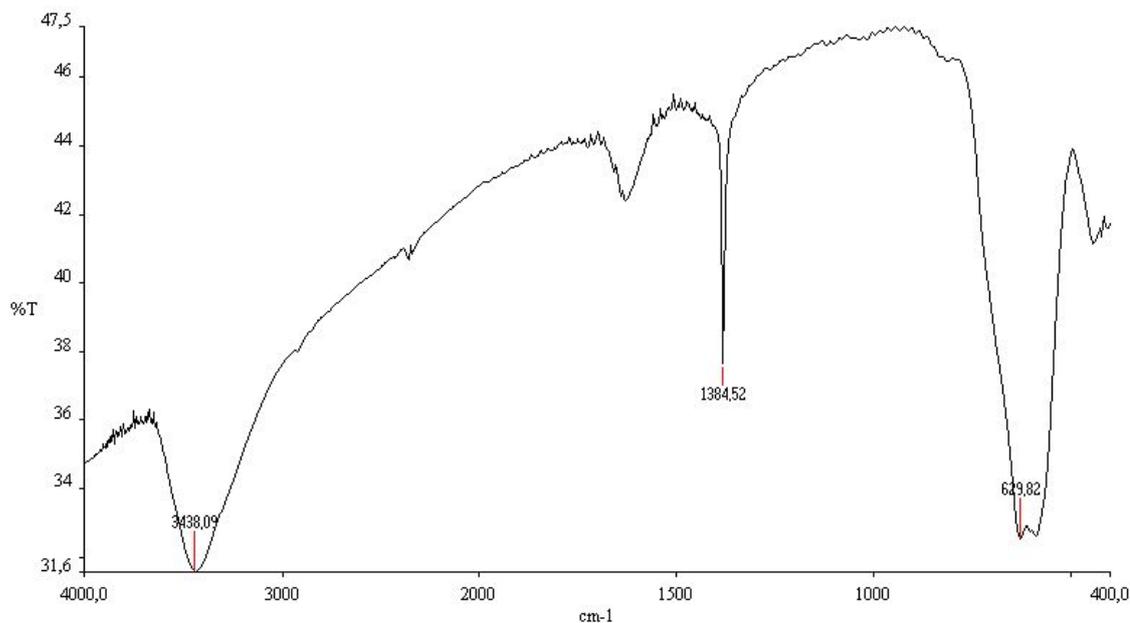
Tutti i solventi impiegati (acqua e acetone) sono stati preventivamente deossigenati ponendoli a parte in dei palloni e facendovi gorgogliare un flusso di argon per 1 ora

Dopo aver rimosso l'acqua dei lavaggi dalle magnetiti, si aggiungono a queste 6 ml di una soluzione di 30 mg (0.055 mmol) di cerio ammonio nitrato (CAN) in acetone e 6 ml di H<sub>2</sub>O. La procedura viene fatta in atmosfera di argon. La sospensione viene poi introdotta in un pallone a 3 colli posto sotto flusso di argon, appositamente progettato per l'inserimento della punta del sonicatore attraverso il collo centrale, provvisto di guarnizione in gomma per mantenere l'atmosfera inerte all'interno del pallone durante tutta la reazione. Viene impiegato un sonicatore ad alta potenza (Sonics, Vibra Cell, 750 Watt, operante al 25% della potenza massima) equipaggiato con una punta in titanio, che viene immersa direttamente nella miscela di reazione. La sonicazione viene mantenuta per 1 ora mantenendo il pallone in atmosfera di Ar e raffreddato con un bagno di ghiaccio.

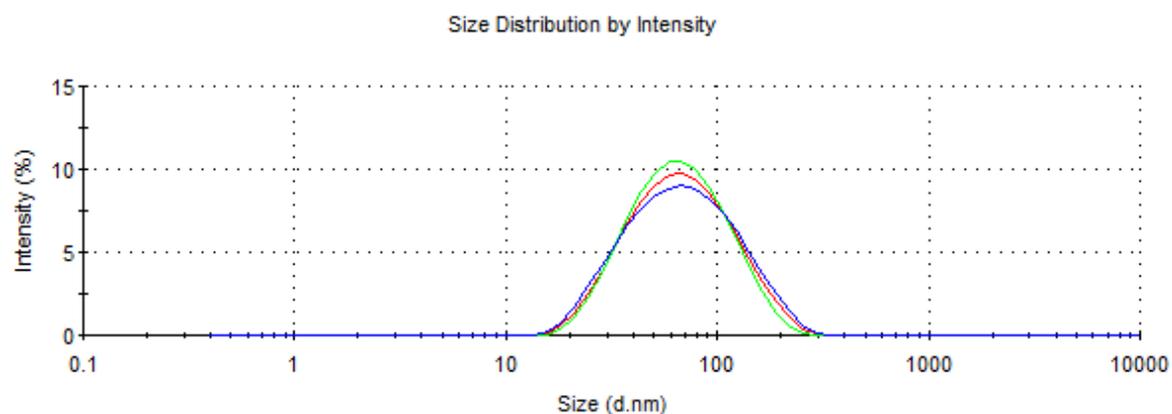
Al termine, le magnetiti vengono lavate con H<sub>2</sub>O (2 x 10 ml) decantandole magneticamente all'interno di una beuta da 100 ml. La decantazione è molto lenta, ed è necessaria una settimana per ottenere una buona separazione. Infine, le magnetiti vengono ridisperse in 10 ml di H<sub>2</sub>O.

### Caratterizzazione :

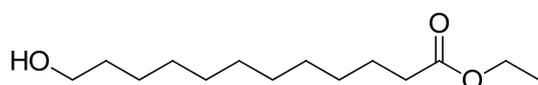
#### **IR:**



**DLS:**  $d = 57.61 \pm 0.06$  nm ; PDI =  $0.238 \pm 0.006$  ;  $\zeta_{pot} = +50.5$  mV ; pH = 4.40



### 6.2.3 Sintesi dell' ethyl 12-hydroxydodecanoate



Un pallone a 4 colli da 50 ml viene attrezzato con un refrigerante e connesso alla linea di N<sub>2</sub>: il flusso di N<sub>2</sub> viene mantenuto fino a fine reazione.

Nel pallone vengono introdotti l'acido 12-idrossidodecanoico (1.00 g, 4.63 mmol, solido bianco) e 40 ml di etanolo. Mantenendo il sistema in agitazione magnetica, vengono poi aggiunti 20  $\mu$ l (0.28 mmol) di acetil cloruro, e si osserva la formazione di una soluzione color giallo chiaro. La soluzione viene poi portata a 80 °C mediante un bagno d'olio e il sistema lasciato a riflusso per 24 ore.

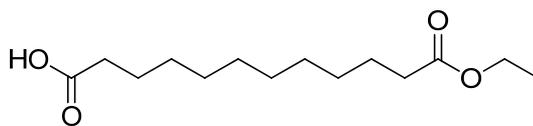
La soluzione viene quindi posta al rotavapor per 1 ora e seccata alla pompa da vuoto per 1 giorno ottenendo 1.02 g di prodotto sotto forma di olio giallo (resa del 90%).

#### Caratterizzazione :

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 4.09$  (q, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.59 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.23 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.58 (bs, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.25 (bs, 15H, CH<sub>2</sub> + CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 174.023$  (C=O), 61.835 (CH<sub>2</sub>), 60.170 (CH<sub>2</sub>), 34.035 (CH<sub>2</sub>), 32.578 (CH<sub>2</sub>), 29.560 (CH<sub>2</sub>), 29.477 (CH<sub>2</sub>), 29.385 (2CH<sub>2</sub>), 29.210 (CH<sub>2</sub>), 29.047 (CH<sub>2</sub>), 25.583 (CH<sub>2</sub>), 24.913 (CH<sub>2</sub>), 14.200 (CH<sub>3</sub>).

### 6.2.4 Sintesi del 12-ethoxy-12-oxododecanoic acid



Un pallone a 4 colli da 100 ml viene attrezzato con un imbuto sgocciolatore da 50 ml e connesso alla linea di N<sub>2</sub>. Vengono quindi introdotti l'acido periodico H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub> (2.13 g, 9.33 mmol) e 40 ml di acetonitrile: mantenendo una vigorosa agitazione magnetica si ottiene una sospensione bianca, e dopo 20 minuti viene sgocciolata nel pallone una soluzione di ethyl 12-hydroxydodecanoate (1.02 g, 4.16 mmol) e piridinio cloro cromato (PCC, 20 mg, 0.091 mmol) in 10 ml di acetonitrile; la temperatura viene mantenuta a 0 °C raffreddando il pallone con un bagno di ghiaccio. Al termine dell'aggiunta il sistema viene riportato a temperatura ambiente e lasciato sotto agitazione per 24 ore.

La reazione viene bloccata per aggiunta di 40 ml di etil acetato e la miscela di reazione lavata con H<sub>2</sub>O (3 x 40 ml). Durante i lavaggi la fase organica si decolora progressivamente, mentre le acque di lavaggio diventano arancioni. La fase organica viene ulteriormente lavata con una soluzione acquosa di idrogeno solfito di sodio 40% m/V (3 x 40 ml) e infine nuovamente con H<sub>2</sub>O (2 x 40 ml). La fase organica è stata recuperata, anidrificata con solfato di sodio anidro e filtrata sotto vuoto con Buchner. Il solvente è stato rimosso al rotavapor (2 ore) e il prodotto seccato alla pompa da vuoto per 1 giorno, ottenendo infine 0.88 g di prodotto che si presenta come un solido bianco (resa = 82%).

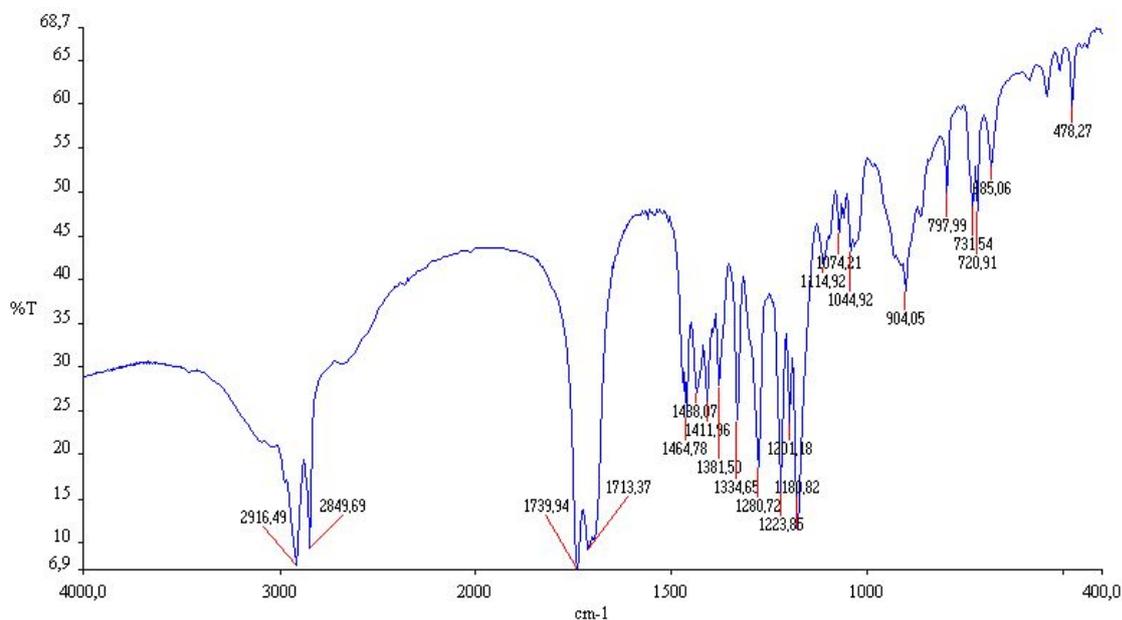
#### Caratterizzazione :

**p.f.:** 51-53 °C;

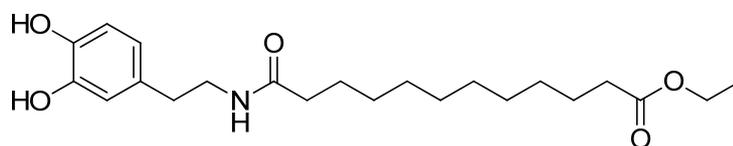
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 4.12 (q, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.37 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.29 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.61 (bs, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.26 (bs, 15H, CH<sub>2</sub> + CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 180.046 (C=O), 174.003 (C=O), 60.169 (CH<sub>2</sub>), 34.342 (CH<sub>2</sub>), 34.041 (CH<sub>2</sub>), 29.441 (CH<sub>2</sub>), 29.295 (CH<sub>2</sub>), 29.156 (2CH<sub>2</sub>), 29.060 (CH<sub>2</sub>), 28.987 (CH<sub>2</sub>), 24.918 (CH<sub>2</sub>), 24.625 (CH<sub>2</sub>), 14.198 (CH<sub>3</sub>).

## IR



### 6.2.5 Sintesi del legante EDAO



ethyl 12-((3,4-dihydroxyphenethyl)amino)-12-oxododecanoate

#### EDAO

In un pallone a 2 colli da 100 ml si introducono il carbonildiimidazolo (CDI, 642 mg, 3.96 mmol) e il 12-ethoxy-12-oxododecanoic acid (681 g, 2.64 mmol) assieme a 20 ml di THF anidro. La reazione viene fatta avvenire per 1.30 ore a temperatura ambiente, sotto agitazione magnetica e flusso di N<sub>2</sub>. La soluzione, dopo l'attivazione, viene messa in un imbuto sgocciolatore, e sgocciolata in 1 ora in un pallone a due colli contenente una soluzione di dopamina idrocloruro (500 mg, 2.64 mmol) e trietil ammina (440 µl, 3.17 mmol) in 10 ml di THF anidro. Terminata l'aggiunta, la reazione viene fatta avvenire per altre due ore sotto flusso di N<sub>2</sub>. Al termine, il solvente viene rimosso al rotavapor ottenendo un olio color marrone chiaro.

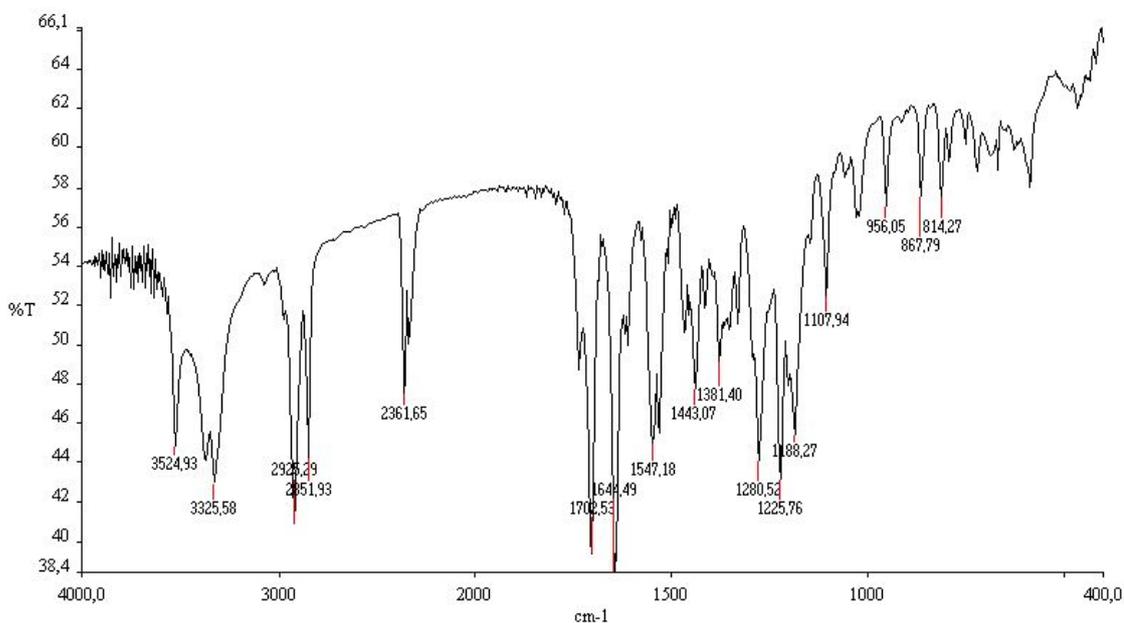
Il prodotto viene solubilizzato in 50 ml di etil acetato e la soluzione purificata mediante estrazione acida (1 x 50 ml) e ulteriori lavaggi con acqua (3 x 50 ml). Al termine la

soluzione di etil acetato viene anidrificata con magnesio solfato, filtrata sotto vuoto su imbuto con setto poroso e il solvente rimosso al rotavapor. Il prodotto viene ulteriormente purificato mediante colonna cromatografica con miscela eluente etil acetato / etere di petrolio 3:1. Dopo essiccazione alla pompa, si ottengono 0.49 g di EDAO, che si presenta come un solido bianco (resa = 47%).

Caratterizzazione :

**p.f.:** 60 - 62 °C;

**IR:**

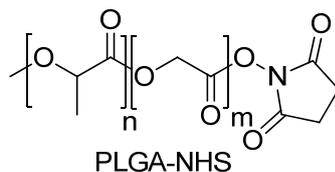


**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 6.81 (d, 1H, Ar), 6.78 (m, 1H, Ar), 6.59 (d, 1H, Ar), 5.65 (bs, 1H, NH), 4.15 (q, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.45 (q, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.70 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.30 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.18 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.60 (bs, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.22 (bs, 15H, CH<sub>2</sub> + CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 174.538 (C=O), 174.373 (C=O), 144.518 (C), 143.225 (C), 130.490 (C), 120.373 (CH), 115.479 (CH), 155.183 (CH), 60.373 (CH<sub>2</sub>), 41.000 (CH<sub>2</sub>), 36.777 (CH<sub>2</sub>), 34.898 (CH<sub>2</sub>), 34.404 (CH<sub>2</sub>), 29.309 (CH<sub>2</sub>), 29.294 (CH<sub>2</sub>), 29.180 (CH<sub>2</sub>), 29.115 (2CH<sub>2</sub>), 29.067 (CH<sub>2</sub>), 25.730 (CH<sub>2</sub>), 24.950 (CH<sub>2</sub>), 14.251 (CH<sub>3</sub>).

**GC-MS ES+ :** 416 (M + Na).

### 6.2.6 Sintesi del PLGA-NHS



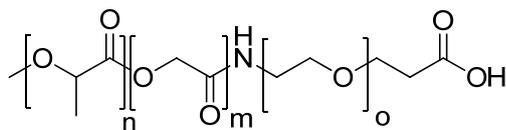
In un pallone a due colli da 100 ml, posto preventivamente in stufa per 1 ora, sotto flusso di N<sub>2</sub> si introducono il PLGA-COOH (1.50 g, 0.214 mmol) e circa 15 ml di diclorometano. Si attende fino a completo scioglimento del polimero. Si aggiunge poi la N-idrossisuccinimide (NHS) (99 mg, 0.85 mmol). Raffreddando il pallone con un bagno di ghiaccio, viene introdotta la dicicloesilcarbodiimmide (DCC) (190 mg, 0.990 mmol). Si riporta il sistema a temperatura ambiente, e la reazione viene lasciata andare per 18 ore in agitazione magnetica.

Terminata la reazione, si aggiungono 10 ml di diclorometano e si filtra su celite. La soluzione filtrata viene recuperata in un pallone da 100 ml e viene aggiunto etere etilico freddo. Questo causa la precipitazione del polimero, che forma un solido bianco. La soluzione viene lasciata 10 minuti in un bagno di ghiaccio, poi viene rimosso il surnatante e il polimero lavato per tre volte con circa 50 ml di etere etilico. Questo viene infine rimosso al rotavapor e alla pompa ad alto vuoto. Il prodotto recuperato (1.25 g, 0.178 mmol, resa = 83%) si presenta come un solido bianco spugnoso.

#### Dati spettroscopici:

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 5.29-5.12 (m, (OCH(CH<sub>3</sub>)C(O))<sub>n</sub>), 4.92-4.62 (m, (OCH<sub>2</sub>C(O))<sub>m</sub>), 2.85 (s, (ON(C(O)CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1.61-1.52 (m, (OCH(CH<sub>3</sub>)C(O))<sub>n</sub>).

### 6.2.7 Sintesi del PLGA-*b*-PEG-COOH



In un pallone da 100 ml ad un collo, sotto agitazione magnetica e flusso di azoto, viene sciolto il PLGA-NHS (1.25 g, 0.178 mmol) in 20 ml di cloroformio anidro e ad esso viene addizionato l'H<sub>2</sub>N-PEG-COOH (534 mg, 0.178 mmol) e l'*N,N*-diisopropiletilammina (DIPEA) (85.6  $\mu$ l, 0.502 mmol). La reazione viene lasciata andare a temperatura ambiente per 18 h in agitazione magnetica e sotto un leggero flusso di azoto.

Terminata la reazione, vengono aggiunti nel pallone 50 ml di etere etilico freddo, che causa la precipitazione del polimero in un solido bianco. Il solido viene decantato per 15 minuti in un bagno di ghiaccio. La soluzione, che rimane torbida, viene rimossa e centrifugata in tubi da centrifuga (6000 rpm x 1 min) per recuperare tutto il polimero, che viene riunito a quello rimasto nel pallone. Vengono ripetuti i lavaggi con etere etilico (2 x 50 ml), ogni volta centrifugando il surnatante. L'etere etilico viene rimosso al rotavapor e alla pompa ad alto vuoto. Il polimero viene lavato ulteriormente con H<sub>2</sub>O (3 x 30 ml), centrifugando ogni volta le acque di lavaggio. Dopo essiccamento alla pompa ad alto vuoto, si ottiene un polimero bianco (1.13 g, resa = 64%) che viene conservato in congelatore a -20 °C.

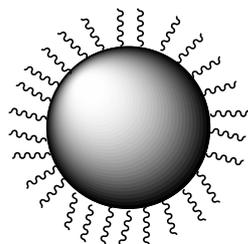
#### Dati spettroscopici:

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5.28-5.10 (m, (OCH(CH<sub>3</sub>)C(O))<sub>n</sub>), 4.92-4.70 (m, (OCH<sub>2</sub>C(O))<sub>m</sub>), 3.64 (s, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>o</sub>), 1.62-1.50 (d, (OCH(CH<sub>3</sub>)C(O))<sub>n</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 170 (C=O), 166 (C=O), 71 (CH), 69 (CH<sub>2</sub>), 61 (CH<sub>3</sub>), 17 (CH<sub>2</sub>).

## 6.3 Nanotecnologie

### *6.3.1 Ricopertura delle maghemiti con il legante EDAO: CAN-Magh@EDAO.*



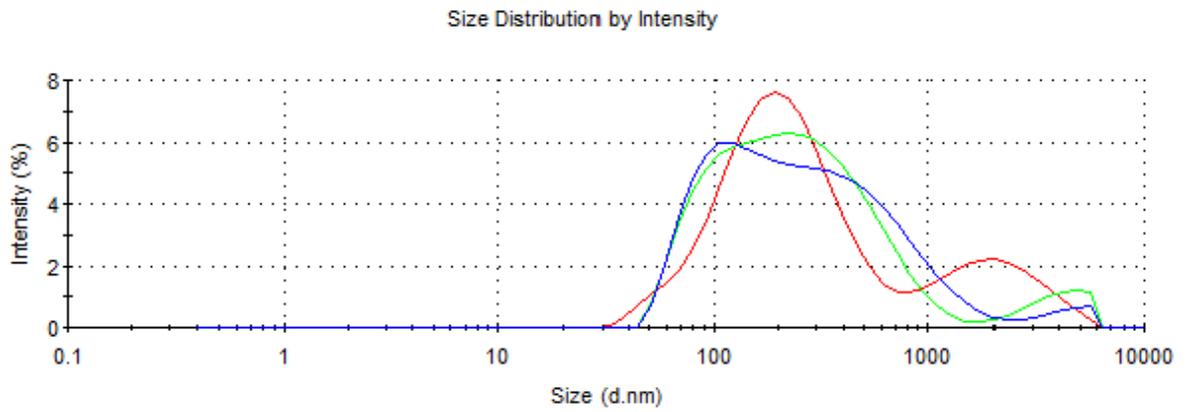
**CAN-Magh@EDAO**

10 ml delle CAN-Magh originarie (concentrazione in Fe di 2.45 mg/ml) sono state diluite con H<sub>2</sub>O fino a 30 ml. Questi sono stati aggiunti a una soluzione di 300 mg (0.762 mmol) di EDAO in 30 ml di etanolo, e la miscela risultante è stata introdotta in due tubi da centrifuga, agitata per un'ora nel bagno ad ultrasuoni e poi lasciata overnight su vortex.

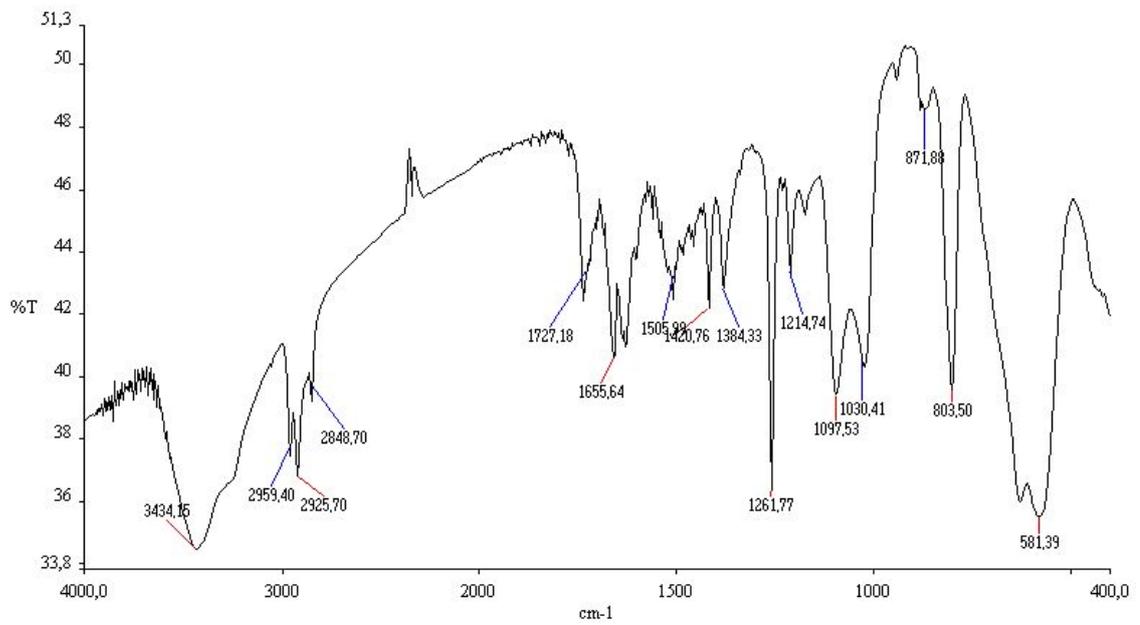
Il giorno seguente la soluzione viene raccolta in una beuta da 100 ml e decantata magneticamente. Vengono poi eseguiti dei lavaggi con etanolo (2 x 30 ml), ogni volta decantando magneticamente la sospensione per 45 minuti. Dopo aver rimosso il surnatante, le nanoparticelle vengono disperse in 70 ml d acetone e la soluzione sonicata per 30 minuti. Al termine, la sospensione deve essere rapidamente impiegata nello stadio successivo (la nanoprecipitazione), in quanto le nanoparticelle non risultano stabili per lungo tempo in solvente organico e tendono ad aggregarsi, come osservato mediante caratterizzazione al DLS dopo 2 ore dal termine della sonicazione.

Caratterizzazione :

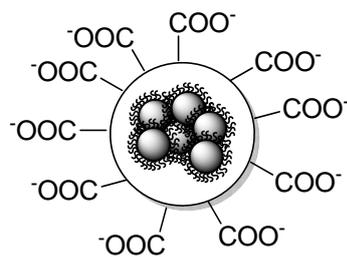
**DLS:**



**IR:**



### 6.3.2 Nanoprecipitazione: formazione delle Magh@PP-PNPs-COOH

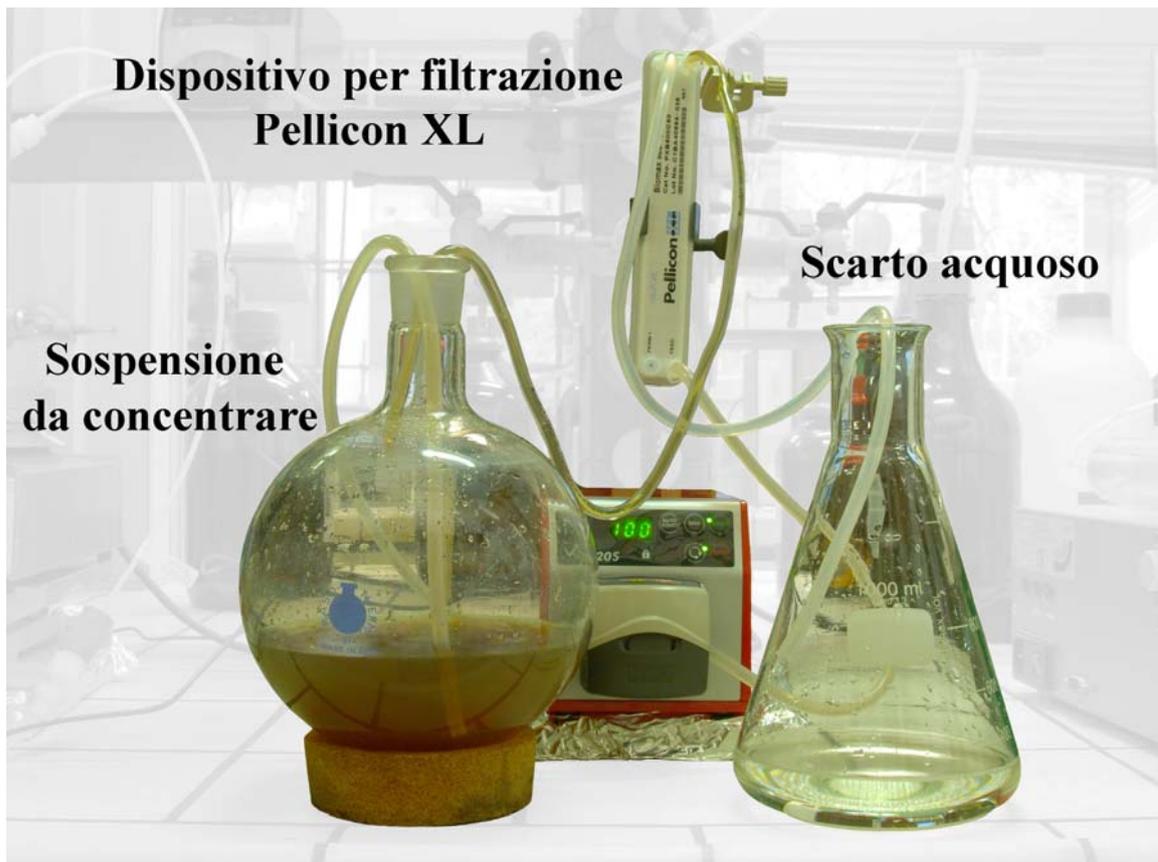


**Magh@PP-PNPs-COOH**

Per l'incapsulamento delle CAN-Magh@EDAO all'interno di micelle polimeriche, formate dal copolimero PLGA-*b*-PEG-COOH, è stato impiegato il metodo della nanoprecipitazione.

Nella sospensione di CAN-Magh@EDAO (56 ml) in acetone preparata al momento, si aggiungono 560 mg di polimero PLGA-*b*-PEG-COOH (10 mg/ml). Questa viene alimentata all'interno di un vial, utilizzato come reattore, assieme a una corrente di H<sub>2</sub>O mediante due pompe peristaltiche differenti. Queste girano a velocità diverse, in modo da mantenere un rapporto acetone / acqua di 1:10. Complessivamente vengono utilizzati circa 560 ml di H<sub>2</sub>O. Durante il processo, nel reattore in cui avviene la miscelazione delle due correnti si mantiene un moto turbolento mediante vigorosa agitazione magnetica. La sospensione derivante viene raccolta in continuo dal vial e introdotta in un pallone, dove viene lasciata sotto agitazione per 30 minuti. Il solvente organico rimanente viene poi rimosso al rotavapor a pressione ridotta per 30 minuti.

La sospensione acquosa ottenuta, contenente le nanoparticelle di maghemite incapsulate nelle nanomicelle polimeriche (Magh@PP-PNPs-COOH), viene concentrata mediante filtro a flusso tangenziale (dispositivo per filtrazione Pellicon XL, cut-off di 10 nm) e lavata con ulteriori 300 ml di H<sub>2</sub>O. La sospensione ridotta a piccolo volume viene poi filtrata su filtro Sterivex<sup>TM</sup>-GP (membrana con cut-off di 0.22 μm, Millipore). Infine la sospensione viene diluita con H<sub>2</sub>O fino a 100 ml di volume e conservata in frigorifero a +4 °C.

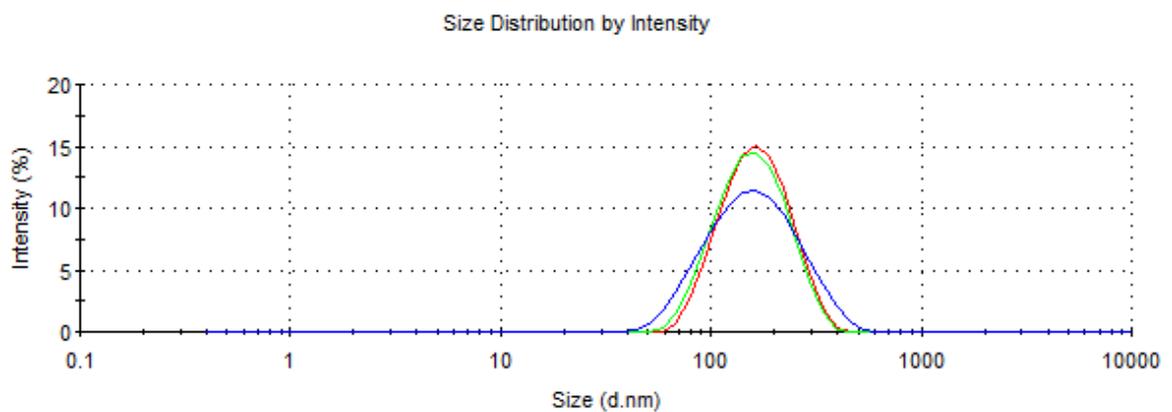


Caratterizzazione :

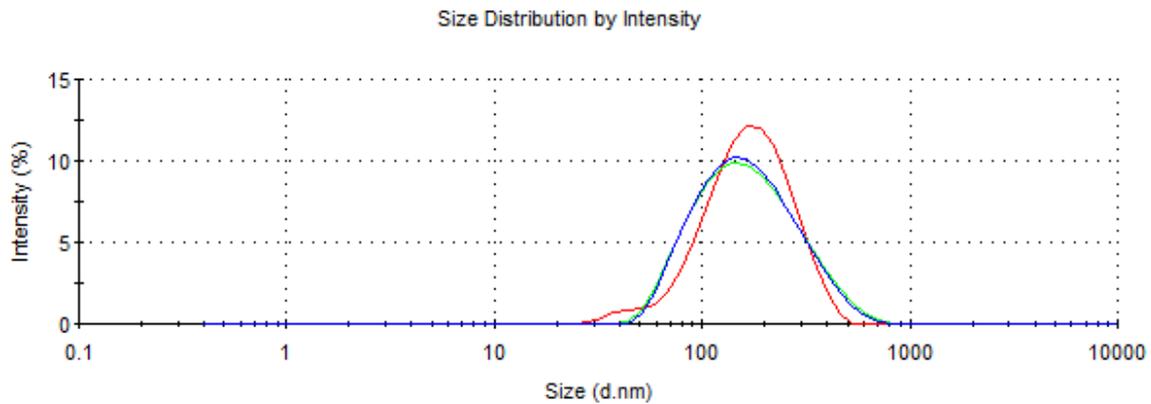
**DLS:**

- Risultati ottenuti subito dopo la preparazione

$d = 143 \pm 1 \text{ nm}$  ;  $\text{PDI} = 0.15 \pm 0.02$  ;  $\zeta_{\text{pot}} = -35.2 \text{ mV}$  ;  $\text{pH} = 6.30$

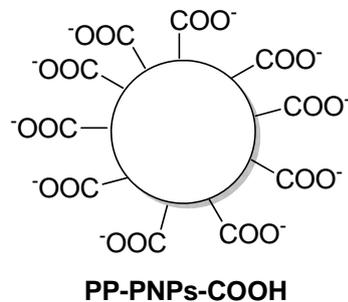


- Risultati ottenuti a due mesi di tempo dalla preparazione  
 $d = 144 \pm 1 \text{ nm}$  ;  $\text{PDI} = 0.20 \pm 0.02$  ;  $\zeta_{\text{pot}} = -23.4 \text{ mV}$  ;  $\text{pH} = 6.20$



La sospensione è stata caratterizzata al DLS subito dopo la preparazione e dopo 2 mesi. Le dimensioni iniziali sono risultate ottimali, e sono state mantenute anche a distanza di tempo, confermando la buona stabilizzazione sterica ed elettrostatica che evita la formazione di aggregati più grandi.

### 6.3.3 Nanoprecipitazione: formazione delle PP-PNPs-COOH



Per la formazione delle nanoparticelle polimeriche vuote PP-PNPs-COOH è stata usata una procedura analoga a quella per le Magh@PP-PNPs-COOH, ma senza disperdere le CAN-Magh@EDAO in acetone.

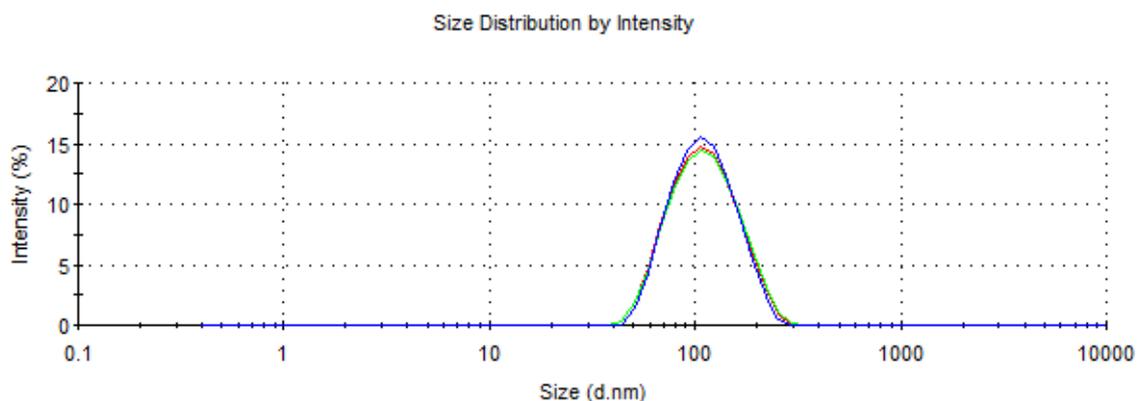
Viene preparata una soluzione di 200 mg di copolimero PLGA-b-PEG-COOH in 20 ml di acetone, e viene poi eseguita la nanoprecipitazione con 200 ml di H<sub>2</sub>O. Acqua e acetone vengono alimentate mediante due pompe peristaltiche all'interno di un reattore in cui viene mantenuto un moto turbolento mediante vigorosa agitazione magnetica. La sospensione ottenuta viene raccolta in un pallone e mantenuta in agitazione per 30

minuti. Al termine, l'acetone viene rimosso al rotavapor a pressione ridotta per 30 minuti.

La sospensione acquosa di nanoparticelle polimeriche vuote PP-PNPs-COOH, che si presenta bianca lattiginosa, viene filtrata con il dispositivo Pellicon XL (membrana con cut-off di 10 nm) e lavata con ulteriori 100 ml di H<sub>2</sub>O. La sospensione ridotta a piccolo volume viene poi filtrata su filtro Sterivex<sup>TM</sup>-GP (membrana con cut-off di 0.22 μm, Millipore). Infine la sospensione viene diluita con H<sub>2</sub>O fino a 100 ml di volume e conservata in frigorifero a +4 °C.

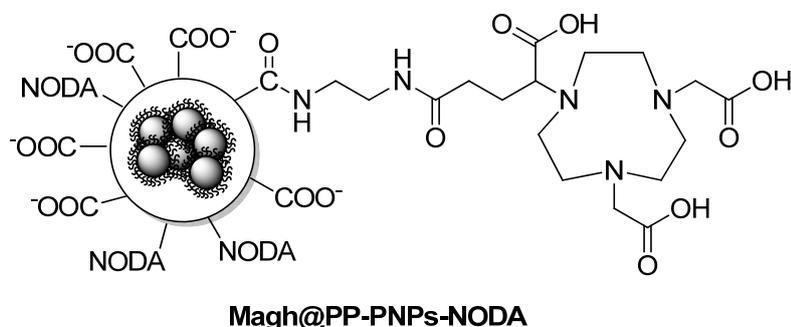
#### Caratterizzazione:

**DLS:**  $d = 102.5 \pm 0.4$  nm ;  $PDI = 0.108 \pm 0.006$  ;  $\zeta_{pot} = -55.6$  mV ; pH = 6.30



## 6.4 Funzionalizzazione superficiale

### 6.4.1 Sintesi Delle Magh@PP-PNPs-NODA

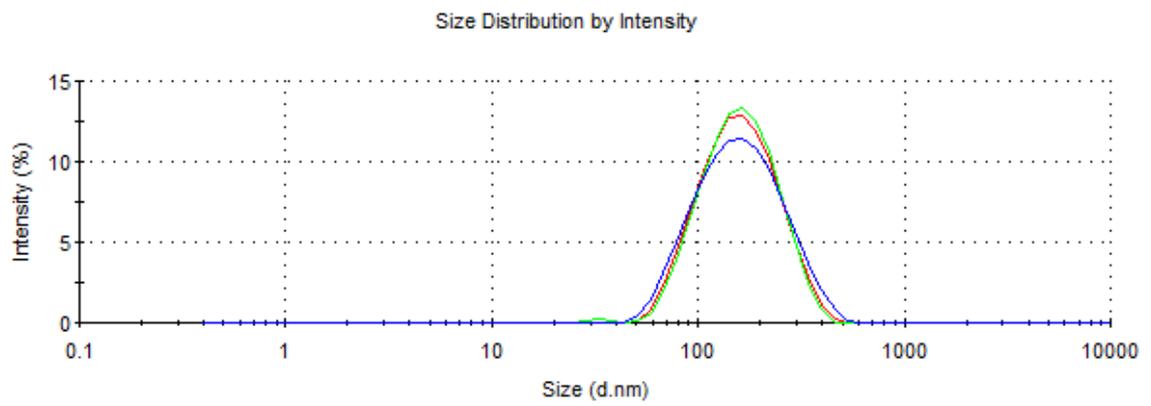


In un pallone da 100 ml vengono introdotti 35 ml della sospensione acquosa di Magh@PP-PNPs-COOH (0.0098 mmol di copolimero PLGA-b-PEG-COOH). A questi viene aggiunto 1 equivalente di 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide (EDC) (1,7 ml di una soluzione 5.7 mM, preparata sciogliendo 10  $\mu$ l di EDC in 10 ml di H<sub>2</sub>O). Prima dell'aggiunta, la soluzione di EDC viene neutralizzata fino a pH 7.50 con HCl 0.01 M. Dopo due ore di attivazione, viene aggiunto 1 equivalente di NODA-GA-Etilendiammina (6.1 ml di una soluzione 1.6 mM, preparata sciogliendo 10 mg di NODA-GA-Etilendiammina in 15 ml di H<sub>2</sub>O, precedentemente neutralizzata fino a pH 7.50 con NaOH 0.01 M). La reazione viene fatta avvenire per 2 ore sotto agitazione magnetica.

Al termine, la sospensione viene concentrata mediante filtrazione in centrifuga (filtro Amicon Ultra, membrana con cut-off di 8 nm, Millipore) e lavata con H<sub>2</sub>O (5 x 10 ml, 10 minuti, 3000 rpm). Dopo filtrazione con filtro Sterivex<sup>TM</sup>-GP (membrana con cut-off di 0.22  $\mu$ m, Millipore), la sospensione viene diluita con H<sub>2</sub>O fino a 35 ml e conservata in frigorifero a +4 °C.

Caratterizzazione:

**DLS:**  $d = 143 \pm 1 \text{ nm}$  ;  $\text{PDI} = 0.16 \pm 0.02$  ;  $\zeta_{\text{pot}} = -38.4 \text{ mV}$  ;  $\text{pH} = 6.20$



# 7. SCHEDE DI SICUREZZA

## 7.1 Scheda di sicurezza del clorocromato di piridinio

### SIGMA-ALDRICH

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

### SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA

secondo il Regolamento (CE) Num. 1907/2006

Versione 4.3 Data di revisione 28.02.2012

Data di stampa 20.06.2012

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

##### 1.1 Identificatori del prodotto

Nome del prodotto : Clorocromato di piridinio

Codice del prodotto : 190144

Marca : Aldrich

N. CAS : 26299-14-9

##### 1.2 Usi pertinenti identificati della sostanza o miscela e usi sconsigliati

Usi identificati : Chimici di laboratorio, Produzione di sostanze chimiche

##### 1.3 Informazioni sul fornitore della scheda di dati di sicurezza

Società : Sigma-Aldrich S.r.l.  
Via Gallarate 154  
I-20151 MILANO

Telefono : +39 02-3341-7310

Fax : +39 02-3801-0737

Indirizzo e-mail : [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

##### 1.4 Numero telefonico di emergenza

Telefono per le emergenze : +39 02-6610-1029 (Centro Antiveleni Niguarda  
Ca' Granda - Milano)

#### 2. IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI

##### 2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

**Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 [EU-GHS/CLP]**

Solidi comburenti (Categoria 2)

Sensibilizzazione cutanea (Categoria 1)

Cancerogenicità, Inalazione (Categoria 1B)

Tossicità acuto per l'ambiente acquatico (Categoria 1)

Tossicità cronica per l'ambiente acquatico (Categoria 1)

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

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

##### 2.2 Elementi dell'etichetta

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

Pittogramma



Avvertenza

Pericolo

Indicazioni di pericolo

H272

H317

H350i

H410

Può aggravare un incendio; comburente.

Può provocare una reazione allergica cutanea.

Può provocare il cancro se inalato.

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

Consigli di prudenza

P201

Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.

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

Descrizioni supplementari del rischio nessuno(a)

Unicamente ad uso di utilizzatori professionali.

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

Simbolo/i di pericolo



Fraasi "R"

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

Fraasi "S"

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

Unicamente ad uso di utilizzatori professionali.

### 2.3 Altri pericoli - nessuno(a)

## 3. COMPOSIZIONE/ INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI

### 3.1 Sostanze

Sinonimi : PCC

Formula :  $C_5H_5N \cdot ClCrO_3H$

Peso Molecolare : 215,56 g/mol

Component	Concentrazione
<b>Pyridinium chlorochromate</b>	
N. CAS	26299-14-9
N. CE	247-595-5
	-

## 4. MISURE DI PRIMO SOCCORSO

### 4.1 Descrizione delle misure di primo soccorso

#### Informazione generale

Consultare un medico. Mostrare questa scheda di sicurezza al medico curante.

#### Se inalato

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. Se non respira, somministrare respirazione artificiale. Consultare un medico.

#### In caso di contatto con la pelle

Lavare con sapone e molta acqua. Consultare un medico.

**In caso di contatto con gli occhi**

Come precauzione sciacquare gli occhi con acqua.

**Se ingerito**

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

**4.2 Principali sintomi ed effetti, sia acuti e che ritardati**

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

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

nessun dato disponibile

---

**5. MISURE ANTINCENDIO****5.1 Mezzi di estinzione****Mezzi di estinzione idonei**

Utilizzare acqua nebulizzata, schiuma alcool resistente, prodotti chimici asciutti o anidride carbonica.

**5.2 Pericoli speciali derivanti dalla sostanza o dalla miscela**

Ossidi di carbonio, ossidi di azoto (NOx), Gas di acido cloridrico, Ossido di cromo

**5.3 Raccomandazioni per gli addetti all'estinzione degli incendi**

Indossare in caso di incendio, se necessario, dispositivi di protezione delle vie respiratorie con apporto d'aria indipendente.

**5.4 Ulteriori informazioni**

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

---

**6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE****6.1 Precauzioni personali, dispositivi di protezione e procedure in caso di emergenza**

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

**6.2 Precauzioni ambientali**

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

**6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica**

Spazzare e spalare. Contenere e raccogliere quanto riversato accidentalmente con un aspirapolvere protetto dalle scariche elettriche o con una spazzola bagnata e porlo in un recipiente rispettando le direttive locali (riferirsi alla sezione 13). Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

**6.4 Riferimenti ad altre sezioni**

Per lo smaltimento riferirsi alla sezione 13.

---

**7. MANIPOLAZIONE E IMMAGAZZINAMENTO****7.1 Precauzioni per la manipolazione sicura**

Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Evitare la formazione di polvere e la dispersione del prodotto nell'aria. Evitare l'esposizione - procurarsi speciali istruzioni prima dell'uso. Adottare un'adeguata ventilazione nei luoghi dove si sviluppano le polveri. Conservare lontano da fiamme e scintille - Non fumare. Tenere lontano da fonti di calore e altre cause d'incendio.

**7.2 Condizioni per l'immagazzinamento sicuro, comprese eventuali incompatibilità**

Immagazzinare in luogo fresco. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato.

**7.3 Usi finali specifici**

nessun dato disponibile

---

## 8. CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE/PROTEZIONE INDIVIDUALE

### 8.1 Parametri di controllo

#### Componenti con limiti di esposizione

Non contiene sostanze con valore limite di esposizione professionale.

### 8.2 Controlli dell'esposizione

#### Controlli tecnici idonei

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

#### Protezione individuale

##### Protezioni per occhi/volto

Visiera e occhiali di protezione. Utilizzare dispositivi per la protezione oculare testati e approvati secondo i requisiti di adeguate norme tecniche come NIOSH (USA) o EN 166 (EU)

##### Protezione della pelle

Manipolare con guanti. I guanti devono essere controllati prima di essere usati. Usare una tecnica adeguata per la rimozione dei guanti (senza toccare la superficie esterna del guanto) per evitare il contatto della pelle con questo prodotto. Smaltire i guanti contaminati dopo l'uso in accordo con la normativa vigente e le buone pratiche di laboratorio. Lavare e asciugare le mani.

I guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano.

##### Protezione fisica

Indumenti protettivi completi resistenti alle sostanze chimiche, Il tipo di attrezzatura di protezione deve essere selezionato in funzione della concentrazione e la quantità di sostanza pericolosa al posto di lavoro.

##### Protezione respiratoria

Qualora la valutazione del rischio preveda la necessità di respiratori ad aria purificata, utilizzare un facciale filtrante con filtri di tipo P3 (EN 143) come supporto alle misure tecniche. Se il respiratore costituisce il solo mezzo di protezione, utilizzare un sistema ventilato a pieno facciale. Utilizzare respiratori e componenti testati e approvati dai competenti organismi di normazione, quali il NIOSH (USA) il CEN (UE).

---

## 9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE

### 9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali

- |   |   |
|---|---|
| a) Aspetto  | Stato fisico: cristallino, polvere<br>Colore: arancione |
| b) Odore  | nessun dato disponibile                                 |
| c) Soglia olfattiva   | nessun dato disponibile                                 |
| d) pH   | nessun dato disponibile                                 |
| e) Punto di fusione/punto di congelamento                     | Punto/intervallo di fusione: 205 - 208 °C - lit.        |
| f) Punto di ebollizione iniziale e intervallo di ebollizione. | nessun dato disponibile                                 |
| g) Punto di infiammabilità.                                   | nessun dato disponibile                                 |
| h) Tasso di evaporazione                                      | nessun dato disponibile                                 |
| i) Infiammabilità (solidi, gas)                               | nessun dato disponibile                                 |
| j) Infiammabilità superiore/inferiore o limiti di esplosività | nessun dato disponibile                                 |

k)	Tensione di vapore	nessun dato disponibile
l)	Densità di vapore	nessun dato disponibile
m)	Densità relativa	nessun dato disponibile
n)	Idrosolubilità	nessun dato disponibile
o)	Coefficiente di ripartizione: n-ottanolo/acqua	nessun dato disponibile
p)	Temperatura di autoaccensione	nessun dato disponibile
q)	Temperatura di decomposizione	nessun dato disponibile
r)	Viscosità	nessun dato disponibile
s)	Proprietà esplosive	nessun dato disponibile
t)	Proprietà ossidanti	La sostanza o la miscela è classificata come ossidante con la categoria 2.

#### 9.2 Altre informazioni sulla sicurezza

nessun dato disponibile

---

### 10. STABILITÀ E REATTIVITÀ

#### 10.1 Reattività

nessun dato disponibile

#### 10.2 Stabilità chimica

nessun dato disponibile

#### 10.3 Possibilità di reazioni pericolose

nessun dato disponibile

#### 10.4 Condizioni da evitare

nessun dato disponibile

#### 10.5 Materiali incompatibili

Alcoli, Acetone, Metanolo

#### 10.6 Prodotti di decomposizione pericolosi

Altre prodotti di decomposizione pericolosi - nessun dato disponibile

---

### 11. INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE

#### 11.1 Informazioni sugli effetti tossicologici

##### Tossicità acuta

nessun dato disponibile

##### Corrosione/irritazione cutanea

nessun dato disponibile

##### Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi

nessun dato disponibile

##### Sensibilizzazione respiratoria o cutanea

Può causare una reazione allergica sulla pelle.

##### Mutagenicità delle cellule germinali

nessun dato disponibile

##### Cancerogenicità

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

IARC: Nessun componente di questo prodotto presente a livelli maggiori o uguali allo 0.1% è

identificato come cancerogeno conosciuto o previsto dallo IARC.

**Tossicità riproduttiva**

nessun dato disponibile

**Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola**

nessun dato disponibile

**Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione ripetuta**

nessun dato disponibile

**Pericolo in caso di aspirazione**

nessun dato disponibile

**Potenziali conseguenze sulla salute**

<b>Inalazione</b>	Può essere nocivo se inalato. Può provocare irritazione delle vie respiratorie.
<b>Ingestione</b>	Può essere pericoloso se ingerito.
<b>Pelle</b>	Può essere dannoso se assorbito attraverso la pelle. Può provocare irritazione della pelle.
<b>Occhi</b>	Può provocare irritazione agli occhi.

**Segni e sintomi di esposizione**

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

**ulteriori informazioni**

RTECS: nessun dato disponibile

---

**12. INFORMAZIONI ECOLOGICHE**

**12.1 Tossicità**

nessun dato disponibile

**12.2 Persistenza e degradabilità**

nessun dato disponibile

**12.3 Potenziale di bioaccumulo**

nessun dato disponibile

**12.4 Mobilità nel suolo**

nessun dato disponibile

**12.5 Risultati della valutazione PBT e vPvB**

nessun dato disponibile

**12.6 Altri effetti avversi**

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

---

**13. CONSIDERAZIONI SULLO SMALTIMENTO**

**13.1 Metodi di trattamento dei rifiuti**

**Prodotto**

Brucciare in un inceneritore per prodotti chimici dotato di sistema di postcombustione e di abbattitore. Esercitare tuttavia estrema cautela all'atto dell'accensione, poichè il presente prodotto è estremamente infiammabile. Conferire le soluzioni non riciclabili e le eccedenze ad una società di smaltimento rifiuti autorizzata.

**Contenitori contaminati**

Smaltire come prodotto inutilizzato.

---

**14. INFORMAZIONI SUL TRASPORTO**

**14.1 Numero ONU**

ADR/RID: 1479

IMDG: 1479

IATA: 1479



## 7.2 Scheda di sicurezza del cerio ammonio nitrato

# SIGMA-ALDRICH

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

## SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA

secondo il Regolamento (CE) Num. 1907/2006

Versione 4.2 Data di revisione 22.12.2011

Data di stampa 20.06.2012

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

#### 1.1 Identificatori del prodotto

Nome del prodotto : Ammonium cerium(IV) nitrate

Codice del prodotto : C3654

Marca : Sigma-Aldrich

N. CAS : 16774-21-3

#### 1.2 Usi pertinenti identificati della sostanza o miscela e usi sconsigliati

Usi identificati : Chimici di laboratorio, Produzione di sostanze chimiche

#### 1.3 Informazioni sul fornitore della scheda di dati di sicurezza

Società : Sigma-Aldrich S.r.l.  
Via Gallarate 154  
I-20151 MILANO

Telefono : +39 02-3341-7310

Fax : +39 02-3801-0737

Indirizzo e-mail : [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

#### 1.4 Numero telefonico di emergenza

Telefono per le emergenze : +39 02-6610-1029 (Centro Antiveleni Niguarda  
Ca' Granda - Milano)

### 2. IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI

#### 2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

**Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 [EU-GHS/CLP]**

Solidi comburenti (Categoria 2)

Tossicità acuta, Orale (Categoria 4)

Irritazione cutanea (Categoria 2)

Irritazione oculare (Categoria 2)

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

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

Può provocare l'accensione di materie combustibili. Nocivo per ingestione. Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle.

#### 2.2 Elementi dell'etichetta

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

Pittogramma



Avvertenza

Pericolo

Indicazioni di pericolo

H272

Può aggravare un incendio; comburente.

H302

Nocivo se ingerito.

H315

Provoca irritazione cutanea.

H319

Provoca grave irritazione oculare.

H335

Può irritare le vie respiratorie.

Consigli di prudenza

P220

Tenere/conservare lontano da indumenti/materiali combustibili.

P261 Evitare di respirare la polvere.  
P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

Descrizioni supplementari del rischio nessuno(a)

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

Simbolo/i di pericolo



Frase "R"

R 8

R22

R36/37/38

Può provocare l'accensione di materie combustibili.

Nocivo per ingestione.

Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle.

Frase "S"

S17

S26

Tenere lontano da sostanze combustibili.

In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S36

Usare indumenti protettivi adatti.

### 2.3 Altri pericoli - nessuno(a)

## 3. COMPOSIZIONE/ INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI

### 3.1 Sostanze

Sinonimi : Ceric ammonium nitrate

Formula :  $H_8CeN_8O_{18}$

Peso Molecolare : 548,22 g/mol

Component	Concentrazione
<b>Diammonium hexanitratocerate</b>	
N. CAS	16774-21-3
N. CE	240-827-6

## 4. MISURE DI PRIMO SOCCORSO

### 4.1 Descrizione delle misure di primo soccorso

#### Informazione generale

Consultare un medico. Mostrare questa scheda di sicurezza al medico curante.

#### Se inalato

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. Se non respira, somministrare respirazione artificiale. Consultare un medico.

#### In caso di contatto con la pelle

Lavare con sapone e molta acqua. Consultare un medico.

#### In caso di contatto con gli occhi

Sciacquare accuratamente ed abbondantemente con acqua per almeno 15 minuti e rivolgersi ad un medico.

#### Se ingerito

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

### 4.2 Principali sintomi ed effetti, sia acuti e che ritardati

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

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

nessun dato disponibile

---

## 5. MISURE ANTINCENDIO

### 5.1 Mezzi di estinzione

#### Mezzi di estinzione idonei

Utilizzare acqua nebulizzata, schiuma alcool resistente, prodotti chimici asciutti o anidride carbonica.

### 5.2 Pericoli speciali derivanti dalla sostanza o dalla miscela

ossidi di azoto (NOx), ossidi di cerio

### 5.3 Raccomandazioni per gli addetti all'estinzione degli incendi

Indossare in caso di incendio, se necessario, dispositivi di protezione delle vie respiratorie con apporto d'aria indipendente.

### 5.4 Ulteriori informazioni

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

---

## 6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE

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

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

### 6.2 Precauzioni ambientali

Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

### 6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica

Spazzare e spalare. Contenere e raccogliere quanto riversato accidentalmente con un aspirapolvere protetto dalle scariche elettriche o con una spazzola bagnata e porlo in un recipiente rispettando le direttive locali (riferirsi alla sezione 13). Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

### 6.4 Riferimenti ad altre sezioni

Per lo smaltimento riferirsi alla sezione 13.

---

## 7. MANIPOLAZIONE E IMMAGAZZINAMENTO

### 7.1 Precauzioni per la manipolazione sicura

Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Evitare la formazione di polvere e la dispersione del prodotto nell'aria.

Adottare un'adeguata ventilazione nei luoghi dove si sviluppano le polveri. Conservare lontano da fiamme e scintille - Non fumare. Tenere lontano da fonti di calore e altre cause d'incendio.

### 7.2 Condizioni per l'immagazzinamento sicuro, comprese eventuali incompatibilità

Immagazzinare in luogo fresco. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato.

Conservare in atmosfera inerte. igroscopico

### 7.3 Usi finali specifici

nessun dato disponibile

---

## 8. CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE/PROTEZIONE INDIVIDUALE

### 8.1 Parametri di controllo

#### Componenti con limiti di esposizione

Non contiene sostanze con valore limite di esposizione professionale.

### 8.2 Controlli dell'esposizione

#### Controlli tecnici idonei

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

## Protezione individuale

### Protezioni per occhi/volto

Occhiali di sicurezza con protezione laterale conformemente alla norma EN166 Utilizzare dispositivi per la protezione oculare testati e approvati secondo i requisiti di adeguate norme tecniche come NIOSH (USA) o EN 166 (EU)

### Protezione della pelle

Manipolare con guanti. I guanti devono essere controllati prima di essere usati. Usare una tecnica adeguata per la rimozione dei guanti (senza toccare la superficie esterna del guanto) per evitare il contatto della pelle con questo prodotto Smaltire i guanti contaminati dopo l'uso in accordo con la normativa vigente e le buone pratiche di laboratorio. Lavare e asciugare le mani.

I guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano.

### Protezione fisica

Indumenti protettivi completi resistenti alle sostanze chimiche, Il tipo di attrezzatura di protezione deve essere selezionato in funzione della concentrazione e la quantità di sostanza pericolosa al posto di lavoro.

### Protezione respiratoria

Qualora la valutazione del rischio preveda la necessità di respiratori ad aria purificata, utilizzare un facciale filtrante con filtri di tipo P3 (EN 143) come supporto alle misure tecniche. Se il respiratore costituisce il solo mezzo di protezione, utilizzare un sistema ventilato a pieno facciale. Utilizzare respiratori e componenti testati e approvati dai competenti organismi di normazione, quali il NIOSH (USA) il CEN (UE).

---

## 9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE

### 9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali

a) Aspetto	Stato fisico: cristallino Colore: arancione chiaro, giallo
b) Odore	acre
c) Soglia olfattiva	nessun dato disponibile
d) pH	nessun dato disponibile
e) Punto di fusione/punto di congelamento	nessun dato disponibile
f) Punto di ebollizione iniziale e intervallo di ebollizione.	nessun dato disponibile
g) Punto di infiammabilità.	non applicabile
h) Tasso di evaporazione	nessun dato disponibile
i) Infiammabilità (solidi, gas)	nessun dato disponibile
j) Infiammabilità superiore/inferiore o limiti di esplosività	nessun dato disponibile
k) Tensione di vapore	nessun dato disponibile
l) Densità di vapore	nessun dato disponibile
m) Densità relativa	nessun dato disponibile
n) Idrosolubilità	solubile
o) Coefficiente di ripartizione: n-ottanolo/acqua	nessun dato disponibile
p) Temperatura di	nessun dato disponibile

- autoaccensione
- q) Temperatura di decomposizione      nessun dato disponibile
- r) Viscosità      nessun dato disponibile
- s) Proprietà esplosive      nessun dato disponibile
- t) Proprietà ossidanti      La sostanza o la miscela è classificata come ossidante con la categoria 2.

**9.2 Altre informazioni sulla sicurezza**  
nessun dato disponibile

---

**10. STABILITÀ E REATTIVITÀ**

**10.1 Reattività**

nessun dato disponibile

**10.2 Stabilità chimica**

nessun dato disponibile

**10.3 Possibilità di reazioni pericolose**

nessun dato disponibile

**10.4 Condizioni da evitare**

Evitare l'umidità.

**10.5 Materiali incompatibili**

Agenti fortemente riducenti, Materie organiche, Metalli in polvere

**10.6 Prodotti di decomposizione pericolosi**

Altre prodotti di decomposizione pericolosi - nessun dato disponibile

---

**11. INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE**

**11.1 Informazioni sugli effetti tossicologici**

**Tossicità acuta**

DL50 Orale - ratto - > 300 - 2.000 mg/kg

**Corrosione/irritazione cutanea**

nessun dato disponibile

**Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi**

nessun dato disponibile

**Sensibilizzazione respiratoria o cutanea**

nessun dato disponibile

**Mutagenicità delle cellule germinali**

nessun dato disponibile

**Cancerogenicità**

IARC: Nessun componente di questo prodotto presente a livelli maggiori o uguali allo 0.1% è identificato come cancerogeno conosciuto o previsto dallo IARC.

**Tossicità riproduttiva**

nessun dato disponibile

**Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola**

Inalazione - Può irritare le vie respiratorie.

Tossicità acuta per via orale - Irritazione locale, Disordini intestinali

**Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione ripetuta**

nessun dato disponibile

**Pericolo in caso di aspirazione**

nessun dato disponibile

**Potenziali conseguenze sulla salute**



---

**15. INFORMAZIONI SULLA REGOLAMENTAZIONE**

Questa scheda di sicurezza rispetta le prescrizioni del Regolamento (CE) Num. 1907/2006

**15.1 Norme e legislazione su salute, sicurezza e ambiente specifiche per la sostanza o la miscela**

nessun dato disponibile

**15.2 Valutazione della sicurezza chimica**

nessun dato disponibile

---

**16. ALTRE INFORMAZIONI****Ulteriori informazioni**

Diritti d'autore 2011 Sigma-Aldrich. Si autorizza la stampa di un numero illimitato di copie per esclusivo uso interno.

Le informazioni di cui sopra sono ritenute corrette, tuttavia non possono essere esaurienti e dovranno pertanto essere considerate puramente indicative. La società Sigma-Aldrich, non potrà essere ritenuta responsabile per qualsiasi danno derivante dall'impiego o dal contatto con il prodotto di cui sopra. Per ulteriori termini e condizioni di vendita fare riferimento al retro della fattura o della bolla di accompagnamento.

---

## 7.3 Scheda di sicurezza dell'*N*-idrossisuccinimide

# SIGMA-ALDRICH

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

## SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA

secondo il Regolamento (CE) Num. 1907/2006

Versione 5.0 Data di revisione 23.04.2012

Data di stampa 20.06.2012

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

#### 1.1 Identificatori del prodotto

Nome del prodotto : *N*-Idrossisuccinimide

Codice del prodotto : 130672

Marca : Aldrich

N. CAS : 6066-82-6

#### 1.2 Usi pertinenti identificati della sostanza o miscela e usi sconsigliati

Usi identificati : Chimici di laboratorio, Produzione di sostanze chimiche

#### 1.3 Informazioni sul fornitore della scheda di dati di sicurezza

Società : Sigma-Aldrich S.r.l.  
Via Gallarate 154  
I-20151 MILANO

Telefono : +39 02-3341-7310

Fax : +39 02-3801-0737

Indirizzo e-mail : [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

#### 1.4 Numero telefonico di emergenza

Telefono per le emergenze : +39 02-6610-1029 (Centro Antiveleni Niguarda  
Ca' Granda - Milano)

### 2. IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI

#### 2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Sostanza o miscela non pericolosa secondo la regolamentazione (CE) N. 1272/2008.  
Questa sostanza non è classificata come pericolosa secondo la Direttiva 67/548/CEE.

#### 2.2 Elementi dell'etichetta

Il prodotto non è soggetto ad etichettatura secondo le direttive CE o le corrispondenti normative nazionali.

#### 2.3 Altri pericoli - nessuno(a)

### 3. COMPOSIZIONE/ INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI

#### 3.1 Sostanze

Sinonimi : HOSu  
1-Hydroxy-2,5-pyrrolidinedione

Formula : C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>

Peso Molecolare : 115,09 g/mol

### 4. MISURE DI PRIMO SOCCORSO

#### 4.1 Descrizione delle misure di primo soccorso

##### Se inalato

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. Se non respira, somministrare respirazione artificiale.

##### In caso di contatto con la pelle

Lavare con sapone e molta acqua.

**In caso di contatto con gli occhi**

Come precauzione sciacquare gli occhi con acqua.

**Se ingerito**

Non somministrare alcunchè a persone svenute. Sciacquare la bocca con acqua.

**4.2 Principali sintomi ed effetti, sia acuti e che ritardati**

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

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

nessun dato disponibile

---

**5. MISURE ANTINCENDIO****5.1 Mezzi di estinzione****Mezzi di estinzione idonei**

Utilizzare acqua nebulizzata, schiuma alcool resistente, prodotti chimici asciutti o anidride carbonica.

**5.2 Pericoli speciali derivanti dalla sostanza o dalla miscela**

Ossidi di carbonio, ossidi di azoto (NOx)

**5.3 Raccomandazioni per gli addetti all'estinzione degli incendi**

Indossare in caso di incendio, se necessario, dispositivi di protezione delle vie respiratorie con apporto d'aria indipendente.

**5.4 Ulteriori informazioni**

nessun dato disponibile

---

**6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE****6.1 Precauzioni personali, dispositivi di protezione e procedure in caso di emergenza**

Evitare la formazione di polvere. Evitare di respirare vapori/nebbia/gas.

**6.2 Precauzioni ambientali**

Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

**6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica**

Spazzare e spalare. Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

**6.4 Riferimenti ad altre sezioni**

Per lo smaltimento riferirsi alla sezione 13.

---

**7. MANIPOLAZIONE E IMMAGAZZINAMENTO****7.1 Precauzioni per la manipolazione sicura**

Adottare un'adeguata ventilazione nei luoghi dove si sviluppano le polveri. Normali misure di prevenzione antincendio.

**7.2 Condizioni per l'immagazzinamento sicuro, comprese eventuali incompatibilità**

Immagazzinare in luogo fresco. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato.

Sensibile all'umidità.

**7.3 Usi finali specifici**

nessun dato disponibile

---

**8. CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE/PROTEZIONE INDIVIDUALE****8.1 Parametri di controllo****Componenti con limiti di esposizione**

Non contiene sostanze con valore limite di esposizione professionale.

## 8.2 Controlli dell'esposizione

### Controlli tecnici idonei

Prassi generale di igiene industriale.

### Protezione individuale

#### Protezioni per occhi/volto

Utilizzare dispositivi per la protezione oculare testati e approvati secondo i requisiti di adeguate norme tecniche come NIOSH (USA) o EN 166 (EU)

#### Protezione della pelle

Manipolare con guanti. I guanti devono essere controllati prima di essere usati. Usare una tecnica adeguata per la rimozione dei guanti (senza toccare la superficie esterna del guanto) per evitare il contatto della pelle con questo prodotto. Smaltire i guanti contaminati dopo l'uso in accordo con la normativa vigente e le buone pratiche di laboratorio. Lavare e asciugare le mani.

I guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano.

#### Protezione dall'immersione

Materiale: Gomma nitrilica

spessore minimo: 0,11 mm

Tempo di penetrazione: > 480 min

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

#### Protezione dagli schizzi

Materiale: Gomma nitrilica

spessore minimo: 0,11 mm

Tempo di penetrazione: > 30 min

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

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

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

#### Protezione fisica

Scegliere una protezione fisica secondo le sue caratteristiche, alla concentrazione, alla quantità di sostanze pericolose e al tipo di posto di lavoro. Il tipo di attrezzatura di protezione deve essere selezionato in funzione della concentrazione e la quantità di sostanza pericolosa al posto di lavoro.

#### Protezione respiratoria

Non è richiesta la protezione delle vie respiratorie. Se si desidera la protezione dai livelli di polveri, utilizzare maschere antipolvere con filtri di tipo P1 (EN 143). Utilizzare respiratori e componenti testati e approvati dai competenti organismi di normazione, quali il NIOSH (USA) il CEN (UE).

---

## 9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE

### 9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali

- |  |   |
|--|---|
| a) Aspetto                                       | Stato fisico: solido<br>Colore: bianco  |
| b) Odore   | nessun dato disponibile                 |
| c) Soglia olfattiva                              | nessun dato disponibile                 |
| d) pH  | nessun dato disponibile                 |
| e) Punto di fusione/punto di congelamento        | Punto/intervallo di fusione: 95 - 98 °C |
| f) Punto di ebollizione iniziale e intervallo di | nessun dato disponibile                 |

ebollizione.

- |   |                         |
|---|-------------------------|
| g) Punto di infiammabilità.                                   | nessun dato disponibile |
| h) Tasso di evaporazione                                      | nessun dato disponibile |
| i) Infiammabilità (solidi, gas)                               | nessun dato disponibile |
| j) Infiammabilità superiore/inferiore o limiti di esplosività | nessun dato disponibile |
| k) Tensione di vapore   | nessun dato disponibile |
| l) Densità di vapore  | nessun dato disponibile |
| m) Densità relativa   | nessun dato disponibile |
| n) Idrosolubilità   | nessun dato disponibile |
| o) Coefficiente di ripartizione: n-ottanolo/acqua             | nessun dato disponibile |
| p) Temperatura di autoaccensione                              | nessun dato disponibile |
| q) Temperatura di decomposizione                              | nessun dato disponibile |
| r) Viscosità  | nessun dato disponibile |
| s) Proprietà esplosive  | nessun dato disponibile |
| t) Proprietà ossidanti  | nessun dato disponibile |

**9.2 Altre informazioni sulla sicurezza**

nessun dato disponibile

---

**10. STABILITÀ E REATTIVITÀ**

**10.1 Reattività**

nessun dato disponibile

**10.2 Stabilità chimica**

nessun dato disponibile

**10.3 Possibilità di reazioni pericolose**

nessun dato disponibile

**10.4 Condizioni da evitare**

Esposizione all'umidità.

**10.5 Materiali incompatibili**

Agenti ossidanti forti, Cloruri acidi, Anidridi di acido, Basi forti

**10.6 Prodotti di decomposizione pericolosi**

Altre prodotti di decomposizione pericolosi - nessun dato disponibile

---

**11. INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE**

**11.1 Informazioni sugli effetti tossicologici**

**Tossicità acuta**

nessun dato disponibile

**Corrosione/irritazione cutanea**

nessun dato disponibile

**Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi**

nessun dato disponibile

**Sensibilizzazione respiratoria o cutanea**

nessun dato disponibile

**Mutagenicità delle cellule germinali**

nessun dato disponibile

**Cancerogenicità**

IARC: Nessun componente di questo prodotto presente a livelli maggiori o uguali allo 0.1% è identificato come cancerogeno conosciuto o previsto dallo IARC.

**Tossicità riproduttiva**

nessun dato disponibile

**Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola**

nessun dato disponibile

**Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione ripetuta**

nessun dato disponibile

**Pericolo in caso di aspirazione**

nessun dato disponibile

**Potenziali conseguenze sulla salute**

<b>Inalazione</b>	Può essere nocivo se inalato. Può provocare irritazione delle vie respiratorie.
<b>Ingestione</b>	Può essere pericoloso se ingerito.
<b>Pelle</b>	Può essere dannoso se assorbito attraverso la pelle. Può provocare irritazione della pelle.
<b>Occhi</b>	Può provocare irritazione agli occhi.

**Segni e sintomi di esposizione**

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

**ulteriori informazioni**

RTECS: nessun dato disponibile

---

**12. INFORMAZIONI ECOLOGICHE****12.1 Tossicità**

nessun dato disponibile

**12.2 Persistenza e degradabilità**

nessun dato disponibile

**12.3 Potenziale di bioaccumulo**

nessun dato disponibile

**12.4 Mobilità nel suolo**

nessun dato disponibile

**12.5 Risultati della valutazione PBT e vPvB**

nessun dato disponibile

**12.6 Altri effetti avversi**

nessun dato disponibile

---

**13. CONSIDERAZIONI SULLO SMALTIMENTO****13.1 Metodi di trattamento dei rifiuti****Prodotto**

Conferire le soluzioni non riciclabili e le eccedenze ad una società di smaltimento rifiuti autorizzata.

**Contenitori contaminati**

Smaltire come prodotto inutilizzato.



## 7.4 Scheda di sicurezza dell' N,N'-Dicicloesilcarbodiimide

**SIGMA-ALDRICH**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

### SCHEDA DI DATI DI SICUREZZA

secondo il Regolamento (CE) Num. 1907/2006

Versione 5.0 Data di revisione 26.04.2012

Data di stampa 20.06.2012

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

##### 1.1 Identificatori del prodotto

Nome del prodotto : N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide

Codice del prodotto : D3128  
Marca : Sigma  
N. INDICE : 615-019-00-5  
N. CAS : 538-75-0

##### 1.2 Usi pertinenti identificati della sostanza o miscela e usi sconsigliati

Usi identificati : Chimici di laboratorio, Produzione di sostanze chimiche

##### 1.3 Informazioni sul fornitore della scheda di dati di sicurezza

Società : Sigma-Aldrich S.r.l.  
Via Gallarate 154  
I-20151 MILANO  
  
Telefono : +39 02-3341-7310  
Fax : +39 02-3801-0737  
Indirizzo e-mail : [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

##### 1.4 Numero telefonico di emergenza

Telefono per le emergenze : +39 02-6610-1029 (Centro Antiveleni Niguarda Ca' Granda - Milano)

#### 2. IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI

##### 2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

###### Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 [EU-GHS/CLP]

Tossicità acuta, Dermico (Categoria 3)

Tossicità acuta, Orale (Categoria 4)

Lesioni oculari gravi (Categoria 1)

Sensibilizzazione cutanea (Categoria 1)

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

Tossico a contatto con la pelle. Nocivo per ingestione. Rischio di gravi lesioni oculari. Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.

##### 2.2 Elementi dell'etichetta

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

Pittogramma



Avvertenza

Pericolo

Indicazioni di pericolo

H302

Nocivo se ingerito.

H311

Tossico per contatto con la pelle.

H317

Può provocare una reazione allergica cutanea.

H318

Provoca gravi lesioni oculari.

Consigli di prudenza

P280

Indossare guanti/ proteggere gli occhi/ il viso.

P305 + P351 + P338

IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente

P312 per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.  
In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Descrizioni supplementari del rischio : nessuno(a)

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

Simbolo/i di pericolo



Frase "R"

R22

Nocivo per ingestione.

R24

Tossico a contatto con la pelle.

R41

Rischio di gravi lesioni oculari.

R43

Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.

Frase "S"

S24

Evitare il contatto con la pelle.

S26

In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

S37/39

Usare guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S45

In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

**2.3 Altri pericoli - nessuno(a)**

---

**3. COMPOSIZIONE/ INFORMAZIONI SUGLI INGREDIENTI**

**3.1 Sostanze**

Sinonimi : DCC

Formula : C13H22N2

Peso Molecolare : 206,33 g/mol

Component	Concentrazione
<b>Dicyclohexylcarbodiimide</b>	
N. CAS	538-75-0
N. CE	208-704-1
N. INDICE	615-019-00-5

---

**4. MISURE DI PRIMO SOCCORSO**

**4.1 Descrizione delle misure di primo soccorso**

**Informazione generale**

Consultare un medico. Mostrare questa scheda di sicurezza al medico curante.

**Se inalato**

Se viene respirato, trasportare la persona all'aria fresca. Se non respira, somministrare respirazione artificiale. Consultare un medico.

**In caso di contatto con la pelle**

Togliere immediatamente gli indumenti e le scarpe contaminate. Lavare con sapone e molta acqua. Portare subito l'infortunato in ospedale. Consultare un medico.

**In caso di contatto con gli occhi**

Sciacquare accuratamente ed abbondantemente con acqua per almeno 15 minuti e rivolgersi ad un medico.

**Se ingerito**

NON indurre il vomito. Non somministrare alcunché a persone svenute. Sciacquare la bocca con acqua. Consultare un medico.

#### 4.2 Principali sintomi ed effetti, sia acuti e che ritardati

Gli effetti possono variare da una leggera irritazione a una grave distruzione dei tessuti in relazione all'intensità e alla durata dell'esposizione., Può causare cecità., I sintomi possono essere ritardati., Al meglio della nostra conoscenza, le proprietà chimiche, fisiche e tossicologiche non sono state oggetto di studi approfonditi.

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

nessun dato disponibile

---

### 5. MISURE ANTINCENDIO

#### 5.1 Mezzi di estinzione

##### Mezzi di estinzione idonei

Utilizzare acqua nebulizzata, schiuma alcool resistente, prodotti chimici asciutti o anidride carbonica.

#### 5.2 Pericoli speciali derivanti dalla sostanza o dalla miscela

Ossidi di carbonio, ossidi di azoto (NOx)

#### 5.3 Raccomandazioni per gli addetti all'estinzione degli incendi

Indossare in caso di incendio, se necessario, dispositivi di protezione delle vie respiratorie con apporto d'aria indipendente.

#### 5.4 Ulteriori informazioni

nessun dato disponibile

---

### 6. MISURE IN CASO DI RILASCIO ACCIDENTALE

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

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

#### 6.2 Precauzioni ambientali

Evitare sversamenti o perdite supplementari, se questo può essere fatto senza pericolo. Non lasciar penetrare il prodotto negli scarichi.

#### 6.3 Metodi e materiali per il contenimento e per la bonifica

Ritirare e provvedere allo smaltimento senza creare polvere. Spazzare e spalare. Conservare in contenitori adatti e chiusi per lo smaltimento.

#### 6.4 Riferimenti ad altre sezioni

Per lo smaltimento riferirsi alla sezione 13.

---

### 7. MANIPOLAZIONE E IMMAGAZZINAMENTO

#### 7.1 Precauzioni per la manipolazione sicura

Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Evitare la formazione di polvere e la dispersione del prodotto nell'aria.

Adottare un'adeguata ventilazione nei luoghi dove si sviluppano le polveri.

#### 7.2 Condizioni per l'immagazzinamento sicuro, comprese eventuali incompatibilità

Immagazzinare in luogo fresco. Tenere il contenitore ermeticamente chiuso in un ambiente secco e ben ventilato.

Sensibile all'umidità.

#### 7.3 Usi finali specifici

nessun dato disponibile

---

### 8. CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE/PROTEZIONE INDIVIDUALE

#### 8.1 Parametri di controllo

##### Componenti con limiti di esposizione

Non contiene sostanze con valore limite di esposizione professionale.

## 8.2 Controlli dell'esposizione

### Controlli tecnici idonei

Evitare il contatto con la pelle, con gli occhi e con gli indumenti. Lavarsi le mani prima delle pause e subito dopo aver maneggiato il prodotto.

### Protezione individuale

#### Protezioni per occhi/volto

Visiera e occhiali di protezione. Utilizzare dispositivi per la protezione oculare testati e approvati secondo i requisiti di adeguate norme tecniche come NIOSH (USA) o EN 166 (EU)

#### Protezione della pelle

Manipolare con guanti. I guanti devono essere controllati prima di essere usati. Usare una tecnica adeguata per la rimozione dei guanti (senza toccare la superficie esterna del guanto) per evitare il contatto della pelle con questo prodotto. Smaltire i guanti contaminati dopo l'uso in accordo con la normativa vigente e le buone pratiche di laboratorio. Lavare e asciugare le mani.

I guanti di protezione selezionati devono soddisfare le esigenze della direttiva UE 89/686/CEE e gli standard EN 374 che ne derivano.

#### Protezione fisica

Indumenti protettivi completi resistenti alle sostanze chimiche, Il tipo di attrezzatura di protezione deve essere selezionato in funzione della concentrazione e la quantità di sostanza pericolosa al posto di lavoro.

#### Protezione respiratoria

Qualora la valutazione del rischio preveda la necessità di respiratori ad aria purificata, utilizzare un facciale filtrante con filtri di tipo P3 (EN 143) come supporto alle misure tecniche. Se il respiratore costituisce il solo mezzo di protezione, utilizzare un sistema ventilato a pieno facciale. Utilizzare respiratori e componenti testati e approvati dai competenti organismi di normazione, quali il NIOSH (USA) il CEN (UE).

---

## 9. PROPRIETÀ FISICHE E CHIMICHE

### 9.1 Informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche fondamentali

a) Aspetto	Stato fisico: solido Colore: incolore
b) Odore	nessun dato disponibile
c) Soglia olfattiva	nessun dato disponibile
d) pH	nessun dato disponibile
e) Punto di fusione/punto di congelamento	34 - 35 °C
f) Punto di ebollizione iniziale e intervallo di ebollizione.	122 - 124 °C a 8 hPa 148 - 152 °C a 20 hPa
g) Punto di infiammabilità.	113 °C - vaso chiuso
h) Tasso di evaporazione	nessun dato disponibile
i) Infiammabilità (solidi, gas)	nessun dato disponibile
j) Infiammabilità superiore/inferiore o limiti di esplosività	nessun dato disponibile
k) Tensione di vapore	nessun dato disponibile
l) Densità di vapore	nessun dato disponibile
m) Densità relativa	nessun dato disponibile
n) Idrosolubilità	nessun dato disponibile
o) Coefficiente di	nessun dato disponibile

	ripartizione: n-ottanolo/acqua	
p)	Temperatura di autoaccensione	nessun dato disponibile
q)	Temperatura di decomposizione	nessun dato disponibile
r)	Viscosità	nessun dato disponibile
s)	Proprietà esplosive	nessun dato disponibile
t)	Proprietà ossidanti	nessun dato disponibile

## 9.2 Altre informazioni sulla sicurezza

nessun dato disponibile

---

## 10. STABILITÀ E REATTIVITÀ

### 10.1 Reattività

nessun dato disponibile

### 10.2 Stabilità chimica

nessun dato disponibile

### 10.3 Possibilità di reazioni pericolose

nessun dato disponibile

### 10.4 Condizioni da evitare

nessun dato disponibile

### 10.5 Materiali incompatibili

Agenti ossidanti forti

### 10.6 Prodotti di decomposizione pericolosi

Altre prodotti di decomposizione pericolosi - nessun dato disponibile

---

## 11. INFORMAZIONI TOSSICOLOGICHE

### 11.1 Informazioni sugli effetti tossicologici

#### Tossicità acuta

DL50 Orale - ratto - 1.499 mg/kg

CL50 Inalazione - ratto - 6 h - 159 mg/m<sup>3</sup>

Osservazioni: Organi di senso: vista: lacrimazione Sistema vascolare: dilatazione localizzata o generale di arteriole o vene Cute ed annessi: altro: capelli

DL50 Dermico - su coniglio - 79,1 mg/kg

#### Corrosione/irritazione cutanea

Pelle - su coniglio - Gravemente corrosivo e necrotizzante i tessuti. - 4 h

#### Lesioni oculari gravi/irritazioni oculari gravi

nessun dato disponibile

#### Sensibilizzazione respiratoria o cutanea

Può causare una reazione allergica sulla pelle.

#### Mutagenicità delle cellule germinali

nessun dato disponibile

#### Cancerogenicità

IARC: Nessun componente di questo prodotto presente a livelli maggiori o uguali allo 0.1% è identificato come cancerogeno conosciuto o previsto dallo IARC.

#### Tossicità riproduttiva

nessun dato disponibile

**Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione singola**  
nessun dato disponibile

**Tossicità specifica per organi bersaglio - esposizione ripetuta**  
nessun dato disponibile

**Pericolo in caso di aspirazione**  
nessun dato disponibile

**Potenziali conseguenze sulla salute**

<b>Inalazione</b>	Può essere fatale se inalato. Il presente prodotto provoca lacerazioni del tessuto delle mucose e delle vie respiratorie alte.
<b>Ingestione</b>	Nocivo per ingestione. Provoca ustioni.
<b>Pelle</b>	Può essere fatale se assorbito tramite la pelle. Provoca ustioni alla pelle.
<b>Occhi</b>	Provoca ustioni agli occhi.

**Segni e sintomi di esposizione**

Gli effetti possono variare da una leggera irritazione a una grave distruzione dei tessuti in relazione all'intensità e alla durata dell'esposizione., Può causare cecità., I sintomi possono essere ritardati., Al meglio della nostra conoscenza, le proprietà chimiche, fisiche e tossicologiche non sono state oggetto di studi approfonditi.

**ulteriori informazioni**  
RTECS: FF2160000

---

**12. INFORMAZIONI ECOLOGICHE**

**12.1 Tossicità**  
nessun dato disponibile

**12.2 Persistenza e degradabilità**  
nessun dato disponibile

**12.3 Potenziale di bioaccumulo**  
nessun dato disponibile

**12.4 Mobilità nel suolo**  
nessun dato disponibile

**12.5 Risultati della valutazione PBT e vPvB**  
nessun dato disponibile

**12.6 Altri effetti avversi**  
nessun dato disponibile

---

**13. CONSIDERAZIONI SULLO SMALTIMENTO**

**13.1 Metodi di trattamento dei rifiuti**

**Prodotto**

Conferire le soluzioni non riciclabili e le eccedenze ad una società di smaltimento rifiuti autorizzata. Solubilizzare o miscelare il prodotto con un solvente combustibile, quindi bruciare in un inceneritore per prodotti chimici dotato di sistema di postcombustione e di abbattitore.

**Contenitori contaminati**

Smaltire come prodotto inutilizzato.

---

**14. INFORMAZIONI SUL TRASPORTO**

**14.1 Numero ONU**

ADR/RID: 2811

IMDG: 2811

IATA: 2811

**14.2 Nome di spedizione dell'ONU**

ADR/RID: SOLIDO ORGANICO TOSSICO, N.A.S. (Dicyclohexylcarbodiimide)

IMDG: TOXIC SOLID, ORGANIC, N.O.S. (Dicyclohexylcarbodiimide)

IATA: Toxic solid, organic, n.o.s. (Dicyclohexylcarbodiimide)

<b>14.3</b>	<b>Classi di pericolo connesso al trasporto</b>		
	ADR/RID: 6.1	IMDG: 6.1	IATA: 6.1
<b>14.4</b>	<b>Gruppo d'imballaggio</b>		
	ADR/RID: II	IMDG: II	IATA: II
<b>14.5</b>	<b>Pericoli per l'ambiente</b>		
	ADR/RID: no	IMDG Marine pollutant: no	IATA: no
<b>14.6</b>	<b>Precauzioni speciali per gli utilizzatori</b>		
	nessun dato disponibile		

---

## 15. INFORMAZIONI SULLA REGOLAMENTAZIONE

Questa scheda di sicurezza rispetta le prescrizioni del Regolamento (CE) Num. 1907/2006

- 15.1 Norme e legislazione su salute, sicurezza e ambiente specifiche per la sostanza o la miscela**  
nessun dato disponibile
- 15.2 Valutazione della sicurezza chimica**  
nessun dato disponibile

---

## 16. ALTRE INFORMAZIONI

### Ulteriori informazioni

Diritti d'autore 2012 Sigma-Aldrich Co. LLC. Si autorizza la stampa di un numero illimitato di copie per esclusivo uso interno.

Le informazioni di cui sopra sono ritenute corrette, tuttavia non possono essere esaurienti e dovranno pertanto essere considerate puramente indicative. La Sigma-Aldrich Corporation e le suo filiali non potranno essere ritenute responsabili per qualsiasi danno derivante dall'impiego o dal contatto con il prodotto di cui sopra. Per ulteriori termini e condizioni di vendita fare riferimento al sito [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com) e/o al retro della fattura o della bolla di accompagnamento.

---

## 8. RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto ringrazio tutto lo staff del Dipartimento di Chimica Organica A. Mangini, presso il quale è stata svolta questa esperienza di tirocinio.

Sentiti ringraziamenti vanno al Prof. Mauro Comes Franchini, per avermi dato la possibilità di lavorare nel suo gruppo di ricerca, e per avermi guidato e sostenuto durante questo percorso.

Un ringraziamento speciale va anche alla Dott.ssa Maria Naddaka e a Erica Locatelli per tutti gli insegnamenti che mi hanno fornito, e per l'aiuto e la pazienza con la quale mi hanno dedicato il loro tempo. La vostra presenza è stata impagabile e fondamentale!

Desidero ringraziare inoltre anche i partner esterni che hanno collaborato direttamente in questo progetto: l'Università israeliana di Bar-Ilan, Filarete Servizi di Milano e CIC biomaGUNE del parco tecnologico di San Sebastian.

Importanti ringraziamenti vanno anche alla Dott.ssa Mariafrancesca Fochi, al Dott. Luca Bernardi, e a tutti gli altri colleghi e amici che mi hanno accompagnato in questa esperienza. In particolare voglio ricordare "Il Dottorando" Lorenzo e "Il Tesista Milli", ma anche Andrea, Valerio, Federico, Claudio, Riccardo, Jay e Pedro.

Grazie a tutti gli amici che mi sono stati vicini in questi anni. Non posso nominarli tutti, ma a ognuno di loro va il mio pensiero. Non posso però fare a meno di citare almeno Rita, in qualità di compagna di studi ufficiale.

Infine, il mio ringraziamento più grande va alla mia famiglia, che sempre ha creduto in me e mi ha consentito con il suo appoggio e i suoi sacrifici di arrivare fino a questo punto: questo lavoro è dedicato a lei.