

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

SCUOLA DI SCIENZE
Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Determinazione della concentrazione
micellare critica di micelle ottenute tramite
copolimeri a blocchi

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Luca Turrini

RELATORE

Prof. Loris Giorgini

CORRELATORE

Dott. Massimo Benaglia

Dott.ssa Tiziana Benelli

Sessione I

Anno Accademico 2013-2014

A Eleonora

Sommario:

1.Introduzione	5
1.1 Polimerizzazione radicalica controllata	5
1.2 Polimeri termoresponsivi	9
1.3 Agente RAFT (CTA)	10
1.4 Definizione di surfatanti	11
1.5 Definizione e proprietà delle micelle	12
1.6 Teoria e definizione della CMC (Concentrazione Micellare Critica)	14
1.7.1 Dynamic light scattering(DLS).....	15
1.7.2 Fluorimetria	17
1.8 Teoria ed applicazioni dell'effetto FRET	18
2. Scopo	20
3. Risultati e discussioni	21
3.1 Post-funzionalizzazione del PGMA con morfolina	21
3.2 Sostituzione del gruppo terminale piridilsolfuro del polimero con la cisteammina	22
3.3 Post-funzionalizzazione del polimero con 4-cloro,7-nitrobenzofurazano	24
3.4 Caratterizzazione GPC, UV-Vis e fluorimetrica dell'omopolimero e del copolimero funzionalizzati e delle micelle ottenute	25
3.5 Determinazione della CMC mediante DLS	28
3.6 Determinazione della CMC mediante misure fluorimetriche	31
4.Conclusioni	35
5. Parte sperimentale	36
5.1 Solventi e reagenti utilizzati	36
5.2 Strumentazione	36
5.3 Post-funzionalizzazione del PGMA	38
5.4 Funzionalizzazione del gruppo terminale	39
5.5 Attacco nucleofilo del gruppo terminale al 4-cloro,7-nitrobenzofurazano ...	40
5.6 Sostituzione del gruppo piridilsolfuro con la cisteammina e attacco nucleofilo sul nitrobenzofurazano col copolimero a blocchi PHMPMA-b-PMMA	41
5.7 Preparazione tampone acetato 10mM avente pH 5,08	41
5.8 Preparazione delle micelle e dei campioni per le analisi al DLS e al fluorimetro	41

6. Bibliografia 43

1.Introduzione

1.1 Polimerizzazione radicalica controllata

La polimerizzazione radicalica si è rivelata essere la tecnica di polimerizzazione più utilizzata sia in ambito della sintesi di laboratorio che in ambito della produzione industriale¹. Ciò è dovuto ai bassi costi, alla capacità di poter essere utilizzata con molte tipologie di monomeri come gli acrilati, metacrilati, stirene ed altri; ed infine per il fatto che tollera varie condizioni di reazione, come il solvente o la temperatura.

Tuttavia presenta varie problematiche, come ad esempio alto indice di polidispersità o l'impossibilità di far ripartire la polimerizzazione una volta che il monomero si è esaurito¹.

Queste problematiche sono legate alla reazione di terminazione del macroradicale, che può avvenire o per disproporzione o per accoppiamento, e anche a fenomeni di trasferimento di catena da parte di impurezze dei reagenti, del solvente stesso o del monomero non ancora reagito, che portano anch'esse alla terminazione della catena macromolecolare.

Per questo motivo l'indice di polidispersità di catene macromolecolari ottenute mediante polimerizzazione radicalica risulta solitamente intorno a 2,0-1,5².

Per risolvere queste problematiche sono state sviluppate tecniche di polimerizzazione radicaliche viventi che prevedono l'utilizzo di un reagente in grado di legarsi reversibilmente con il radicale in accrescimento ($P_n\bullet$) mantenendo così la maggior parte delle catene in una forma dormiente (P_n-X). L'instaurarsi di un rapido equilibrio tra queste due forme permette alle catene di crescere in modo simultaneo, assicurando un aumento lineare del peso molecolare con la conversione e mantenendo quindi la polidispersità molto bassa^{1,2,3}.

Queste tecniche possono essere utilizzate per polimerizzare una grande varietà di monomeri, garantendo un migliore controllo del peso molecolare e della composizione nonché della struttura del copolimero.

Esse possono essere divise in tre categorie:

1. Polimerizzazioni con radicali liberi stabili, come la Nitroxide Mediated Polymerization (NMP);
2. Polimerizzazioni degenerative di trasferimento, come la Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer (RAFT) polymerization;

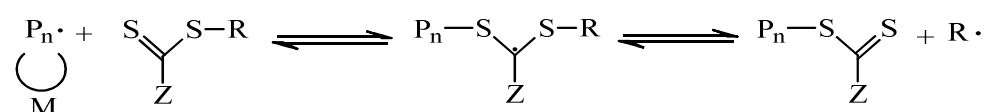
3. Polimerizzazioni mediate da catalizzatori metallici, come la Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)^{2,3,4}.

Il metodo RAFT può essere idealmente applicato semplicemente aggiungendo la giusta quantità di un appropriato agente RAFT (Chain Transfer Agent, CTA) a una polimerizzazione radicalica convenzionale. Si sfruttano infatti gli stessi monomeri, iniziatori, solventi e temperature.

Inizio:



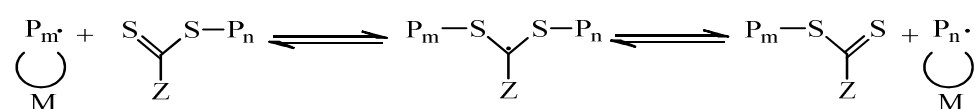
Trasferimento reversibile di catena:



Reinizio:



Equilibrizzazione di catena:



Terminazione:



Schema 1: schema della polimerizzazione RAFT

Nelle fasi iniziali della polimerizzazione, il radicale propagante ($P_n \cdot$) si lega all'agente RAFT per formare un intermedio radicalico il quale è poi in grado di scindersi dando un ditiocarbonil derivato polimerico (macro-RAFT) e un nuovo radicale ($R \cdot$). Questo, reagendo con il monomero, è successivamente capace di formare una nuova catena propagante ($P_m \cdot$). Il gruppo R dell'agente RAFT deve quindi essere un buon gruppo uscente e deve essere in grado di re-iniziare efficacemente la polimerizzazione, facendo così in modo che la maggior parte delle catene propaganti siano iniziate da $R \cdot$ e in parte minore dall'iniziatore. A questo punto un rapido equilibrio tra i radicali propaganti e il macro-RAFT assicura una uguale probabilità di accrescimento a tutte le catene, permettendo così di ottenere polimeri con indici di polidispersità bassi, tendenti a 1.

Quando la polimerizzazione è completata la maggior parte delle catene mantiene la forma "vivente", sono cioè legate al gruppo ditio-carbonilico terminale o macro-RAFT. Per evitare reazioni di terminazione irreversibile è conveniente fermare la reazione a valori di conversione più bassi².

Affinché la reazione avvenga, è necessario che sia presente un iniziatore in grado di fornire radicali che facciano partire e che sostengano la reazione, come nelle polimerizzazioni convenzionali. Un elevato numero di agenti RAFT può essere attivato da una modesta concentrazione di frammenti di iniziatore, poiché all'interazione di ogni specie radicalica con un agente RAFT corrisponde il rilascio di un nuovo R·.

Per questo motivo la concentrazione di iniziatore è generalmente bassa rispetto a quella dell'agente RAFT (rapporto $[CTA]/[I]>1$). A un aumento della concentrazione di agente RAFT corrisponde la formazione di polimeri a peso molecolare più basso ma caratterizzati da una polidispersità minore, inoltre la velocità di conversione risulta diminuita poiché diminuisce la concentrazione istantanea di radicali; all'aumento di concentrazione dell'iniziatore, corrisponde contrariamente una maggiore velocità di conversione ma un peggiore controllo del peso molecolare.

La velocità di conversione cresce perché è maggiore la concentrazione istantanea di radicali, ma ciò aumenta le possibilità che avvengano reazioni di terminazione irreversibili prima dello step di addizione-frammentazione.

Il peso molecolare di un polimero ottenibile in un processo RAFT, quindi, dipende dalla concentrazione del CTA rispetto a quella del monomero, dai loro rispettivi pesi molecolari e dalla conversione che si vuole ottenere:

$$\overline{M}_n = \frac{[M]_0 \times PM_{\text{monomero}} \times conv}{[CTA]_0} + PM_{CTA}$$

dove $[M]_0$ e $[CTA]_0$ sono le concentrazioni iniziali del monomero e dell'agente RAFT, rispettivamente; PM_{monomero} e PM_{CTA} sono i loro pesi molecolari e conv è la conversione del processo. Da questa formula si deduce la possibilità di arrestare la reazione ad un determinato tempo e ad una determinata conversione permettendo così di ottenere il peso molecolare polimerico (\overline{M}_n) desiderato. Questa capacità di controllo è facilmente sfruttabile per ottenere omopolimeri o copolimeri a blocchi di dimensioni prestabilite. Si possono inoltre sintetizzare, mediante metodo RAFT, copolimeri a blocchi multipli, a stella, graft, statistici, alternati e a gradiente (figura 1)^{2,5}.

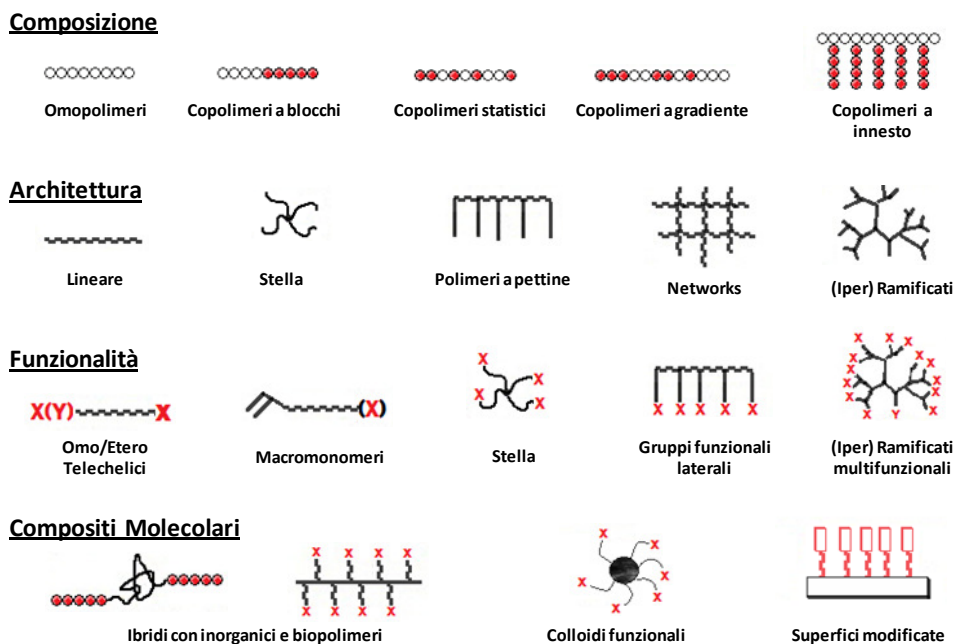
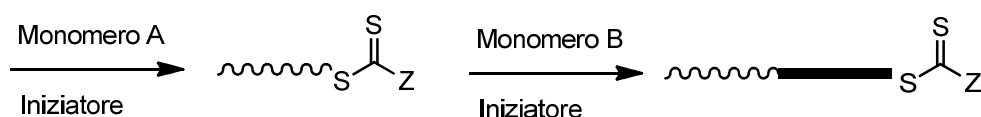


Figura 1: polimeri e strutture ottenibili con la tecnica RAFT

Per poter ottenere un copolimero a blocchi la metodologia di reazione è la seguente:

Al termine di una polimerizzazione effettuata utilizzando il metodo RAFT, la maggior parte delle catene polimeriche mantiene il gruppo ditiocarbonilico terminale del CTA. Queste catene risultano quindi ancora viventi e possono essere utilizzate come macro-RAFT per andare a polimerizzare un secondo monomero, quindi si può ottenere un copolimero a blocchi con peso molecolare controllato e bassa polidispersità (Schema 2).



Schema 2: sintesi di copolimeri a blocchi AB

Polimeri a blocchi di ordini superiori (ABA, ABC, ecc.) possono anch'essi essere formati per addizioni sequenziali di ulteriori monomeri.

Nella sintesi di un copolimero AB di questo tipo è molto importante l'ordine con il quale vengono formati i due blocchi. Il radicale propagante del primo blocco formato (A) deve essere un buon gruppo omolitico uscente rispetto a quello del secondo blocco (B), se così non fosse la polimerizzazione risulterebbe rallentata e la polidispersità maggiore..

Di considerabile interesse è la possibilità di produrre copolimeri anfifilici come surfattanti per la produzione di micelle e polimeri termoreponsivi^{3,4}.

1.2 Polimeri termoresponsivi

I polimeri termoresponsivi appartengono ad una classe di composti macromolecolari che esibiscono drastici cambiamenti di proprietà fisiche come ad esempio la temperatura^{3,4}.

Questo termine viene usato quando ci si riferisce a cambiamenti della solubilità del materiale in determinati solventi, mostrando quindi delle lacune di miscibilità nel loro diagramma temperatura/composizione (vedi figura 2).

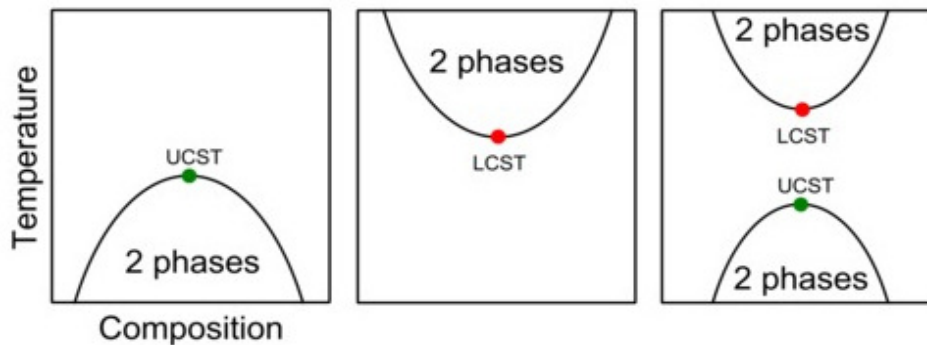


Figura 2: Andamenti temperatura/composizione

A seconda che la modifica della miscela avvenga ad alta o a bassa temperatura si avrà rispettivamente una temperatura critica di solubilità inferiore (Lower Critical Solubilisation Temperature o LCST) o una temperatura critica di solubilità superiore (Upper Critical Solubilisation Temperature o UCST) .

Di particolare interesse in ambito biomedicale sono i polimeri aventi una LCST molto bassa in soluzioni acquose.

A temperature inferiori rispetto a quella critica le macromolecole presentano una conformazione elicoidale e formano legami a idrogeno con le molecole d'acqua presenti nella soluzione, ciò dimostra che il polimero presenta un carattere idrofilico. Ad alte temperature i legami ad idrogeno con le molecole d'acqua si rompono e le molecole del polimero tendono a formare legami tra di loro ottenendo così delle configurazioni sferiche o simili; ciò rende il polimero altamente idrofobico e questo ne favorisce la precipitazione.

Termodinamicamente parlando si instaura un equilibrio tra la dissoluzione del polimero in acqua, entropicamente favorita, e le interazioni tra le catene macromolecolari, entalpicamente favorite^{3,4}.

Questa caratteristica è di grande interesse per quanto riguarda le applicazioni di questi polimeri in ambiti biomedicali, come ad esempio per il controllo dell'aggregazione dei batteri, assorbimento e rilascio di proteine, drug delivery, etc.

Tra di essi il poli(N-isopropilacrilammide) (NIPAM) risulta interessante poiché presenta una temperatura di 32-33°C ed è fra quelli più studiati^{3,4}.

1.3 Agente RAFT (CTA)

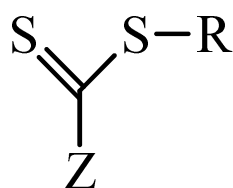


Figura 3: agente RAFT (CTA)

L'efficacia di un generico agente RAFT (Figura 3), oltre che dal monomero che viene polimerizzato, è fortemente influenzata dal gruppo radicalico uscente R e dal gruppo Z che conferisce stabilità al radicale intermedio. Un buon reagente RAFT dovrebbe avere un doppio legame C=S reattivo, questo dipende molto dal sostituente Z ad esso legato, il quale deve essere in grado di attivare l'addizione radicalica stabilizzando il radicale intermedio; il sostituente R dovrebbe essere un buon gruppo uscente capace di scindersi omoliticamente dando un radicale R· in grado di re-iniziare la polimerizzazione. La stabilità di questo radicale è influenzata da fattori sterici, termodinamici e polari che ne condizionano anche la reattività verso il monomero. Se il radicale R· non è sufficientemente stabilizzato o se la sua reattività verso il monomero è bassa, la velocità della polimerizzazione può risultare rallentata.

Il sostituente Z ha una notevole influenza sulla velocità di addizione del monomero al CTA: se Z è un gruppo in grado di dare coniugazione con il doppio legame C=S, per esempio un fenile, il radicale intermedio risulta stabilizzato perché l'elettrone è delocalizzato, però si ha anche un effetto di rallentamento della polimerizzazione; se Z è un gruppo avente una coppia elettronica delocalizzabile, la stabilità risulta diminuita poiché il doppietto viene delocalizzato. Per una guida semplificata ai sostituenti R e Z opportuni, a seconda del monomero utilizzato, si può fare riferimento alla figura 4^{5,6}.

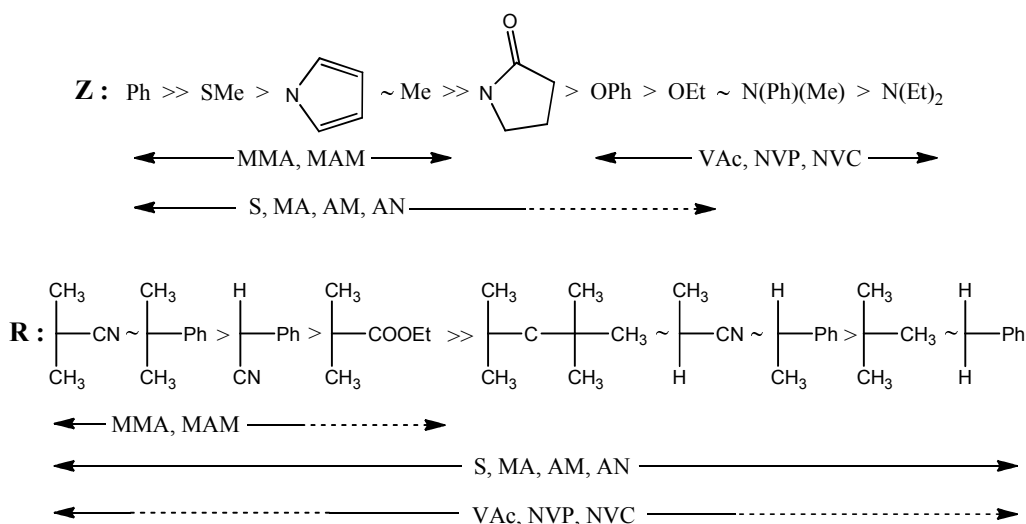


Figura 4: guida alla scelta dei sostituenti R e Z del CTA a seconda del monomero utilizzato.

1.4 Definizione di surfatanti

Per molecole surfatanti si intende principalmente molecole anfifiliche, note anche come tensioattivi.

Esse sono presenti nella vita di tutti i giorni e in molti processi industriali.

Il termine anfifilico indica che una parte della molecola è in grado di interagire con una determinata tipologia di solvente, mentre l'altra parte è affine ad un'altra e le due tipologie di solventi non sono miscibili tra di loro, come ad esempio l'acqua e l'etere etilico⁷.

Possiamo dividere questi surfatanti in quattro principali categorie:

- **Anionica:** Il surfatante presenta un gruppo idrofilico che possiede una carica negativa netta, come ad esempio gruppi solfati, sulfonati o carbossilati. L'esempio più studiato di questa tipologia di tensioattivi è il sodio dodecilsolfato (SDS), $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_3\text{Na}$.
- **Cationici:** I surfattanti cationici, a differenza di quelli anionici, presentano una carica netta positiva nella parte idrofilica della molecola. Esempi tipici di questa tipologia di tensioattivi sono il dodecil trimetilammonio bromuro ($\text{C}_{12}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$) e l'esadecil trimetilammonio bromuro ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$).
- **Non ionici:** Questi tensioattivi non presentano alcuna carica e la parte idrofilica è dovuta a gruppi altamente polari come l'ossido di polietilene o zuccheri. Un esempio di surfatanti che appartengono a questa categoria sono polimeri a blocchi ottenuti mediante tecniche di polimerizzazione radicaliche viventi, come ad esempio la RAFT o l'ATRP.

- **Anfoteri o zwitterioni:** Questi tensioattivi hanno all'interno cariche sia positive che negative, in modo che la molecola risulti avere complessivamente carica neutra. Un esempio sono alcune tipologie di lipidi, che tuttavia, non presentando solubilità parziale in acqua, non possono essere reputati come surfatanti nel senso stretto del termine.

I tensioattivi più utilizzati sono quelli anionici e quelli non ionici. I cationici, infatti, presentano dei problemi di impatto ambientale notevole, visto che non sono biodegradabili e gli zwitterionici, invece, sono altamente dispendiosi da produrre e si utilizzano solo in particolari applicazioni.

1.5 Definizione e proprietà delle micelle

I vari tensioattivi possono formare agglomerati di dimensioni intorno a qualche decina di nanometri, noti per lo più col nome di vescicole o micelle.

Per micelle si intendono solitamente aggregati solidi dispersi in ambiente acquoso, formati grazie all'associazione spontanea delle molecole che presentano caratteristiche anfifiliche^{7,8}. Esse presentano, se disperse in mezzo acquoso, un core idrofobico e un guscio esterno idrofilico.

Le vescicole invece presentano sia un core che un guscio esterno idrofilico, come mostrato in figura 5.

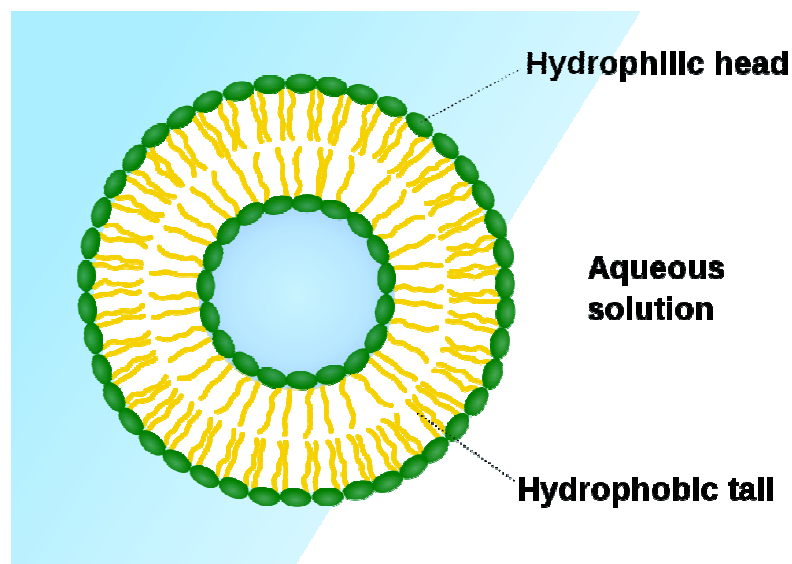


Figura 5: Struttura di una vescicola

A differenza di strutture macromolecolari rigide come ad esempio virus, DNA o proteine globulari, micelle e vescicole hanno un comportamento molto più simile ad un fluido.

Ciò è dovuto alla diversa tipologia di legami che tengono stabili le strutture: covalenti e ionici nel caso di DNA o proteine; ponti a idrogeno, interazioni elettrostatiche o di Van der Waals nel caso delle micelle.

Inoltre modificando le condizioni della soluzione, come ad esempio il pH o la concentrazione di un elettrolita, si riesce a modificare non solo l'interazione tra i singoli unimeri, ma anche le interazioni tra le micelle, modificando così dimensioni e forma degli aggregati⁹.

Uno dei sistemi più studiati per la produzione di micelle consiste nella sintesi di copolimeri a blocchi anfifilici in grado di autoassemblarsi in micelle ad una certa concentrazione e temperatura. Queste micelle possono essere variamente funzionalizzate ed utilizzate come "drug carriers": possono intrappolare fisicamente nel loro blocco interno degli agenti terapeutici idrofobici, mentre il guscio idrofilico favorisce la solubilità del carrier in ambiente fisiologico e ne aumenta il tempo di permanenza⁵.

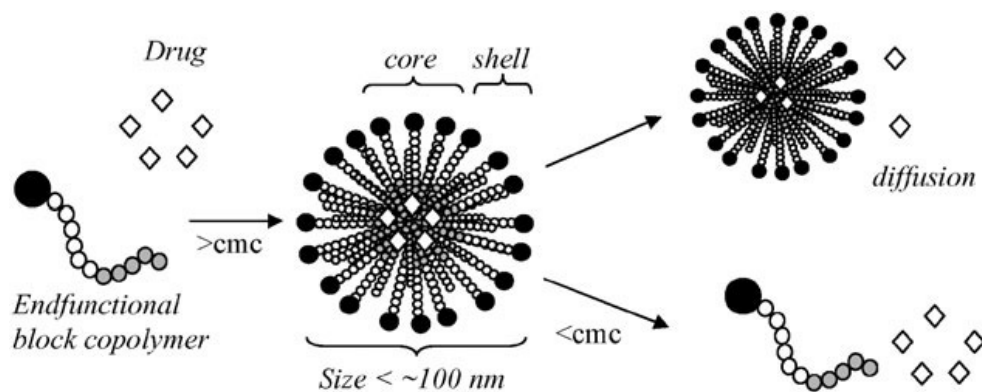


Figura 6: autoassemblaggio di copolimeri a blocchi in micelle

La stabilità di queste micelle è dettata da parametri quali la concentrazione micellare critica o CMC.

1.6 Teoria e definizione della CMC (Concentrazione Micellare Critica)

Per concentrazione micellare critica si intende la concentrazione minima degli unimeri in soluzione al di sopra della quale si ottiene la formazione degli aggregati micellari.

Per avere il valore teorico della concentrazione micellare critica occorre applicare le seguenti formule:

- $X_N = N \{ X_1 \exp[\alpha(1-1/(N^p))] \}^N \approx N [X_1 e^\alpha]^N$
- $C = \sum X_N$

Dove X_N è la concentrazione degli aggregati formati da N unimeri, α e p sono delle costanti che dipendono rispettivamente dalle forze intermolecolari e dalla forma e dimensione degli aggregati e C corrisponde alla concentrazione totale del soluto.

Per bassi valori di concentrazione del monomero, in modo che $X_1 = e^{-\alpha}$ o $N \{ X_1 \exp[\alpha(1-1/(N^p))] \}^N$ sia molto meno dell'unità, otteniamo che X_1 è maggiore degli altri valori di concentrazione, tanto che può arrivare ad eguagliare il valore di C , a valori di concentrazione molto bassi.

Siccome però nessun valore di X_N può superare l'unità, ciò significa che il valore massimo ottenibile da X_1 è $e^{-\alpha}$ o $N \{ X_1 \exp[\alpha(1-1/(N^p))] \}^N$.

Questo valore di concentrazione corrisponde alla concentrazione micellare critica, altrimenti detta CMC^{7,9}.

Queste equazioni definiscono la concentrazione al di sopra della quale l'aggiunta di ulteriore unimero porta alla formazione di aggregati, mentre una perdita di soluto non comporta nessun cambiamento in ambito dello stato della sospensione⁸.

Esiste poi un'altra teoria secondo la quale vi è più di una concentrazione micellare critica.

La prima concentrazione micellare critica, abbreviata in inglese come FCMC (First Critical Micelle Concentration), corrisponde alla concentrazione critica già descritta; un'altra è la concentrazione premicellare critica, abbreviata CPMC, che viene definita come la concentrazione limite superata la quale si ha la formazione di aggregati premicellari, che però non si possono ancora definire micelle perché non hanno forme sferoidali, ma strutture non ben definite. Il valore di questa concentrazione è di due o tre ordini di grandezza inferiore rispetto alla FCMC¹⁰.

Infine vi è anche la seconda concentrazione micellare critica, detta SCMC; questa concentrazione è sempre maggiore rispetto alla prima concentrazione micellare critica.

A questo valore di concentrazione SCMC le micelle sferiche tendono ad aggregarsi formando aggregati micellari di varie forme, lamellare, elissoidi ed altre ancora⁹.

Esistono studi di determinazione della CMC eseguiti su surfatanti quali il sodio dodecil solfato (SDS)¹⁰.

Per quanto riguarda la determinazione della CMC esistono molte tecniche sviluppate nel corso degli ultimi 20 anni¹¹, tra queste : Dynamic light scattering (DLS)^{10,11,12}, tensiometria^{10,17}, fluorimetria^{10,13-16,18,22,23} indice di rifrazione¹⁰, conduttimetria^{10,19}, NMR in 2D¹⁰, microcalorimetria^{10,24} ed altre ancora^{10,19,20,25}. Tutte queste tecniche si possono classificare come invasive, nel caso il campione viene modificato in maniera irreversibile, o non invasive.

Esse sono collegate tra loro dal fatto che ciascuna sfrutta una variazione delle proprietà fisiche che avviene quando vi è formazione di micelle¹⁰.

1.7.1 Dynamic light scattering(DLS)

La tecnica del Dynamic light scattering (DLS) è nuova come metodologia di analisi per la determinazione della CMC^{11,12}. Il DLS è una tecnica molto comune nella determinazione delle dimensioni delle dispersioni colloidali, sfruttando proprio le interazioni tra le nanoparticelle e la luce incidente, le quali fungeranno da sorgente di radiazione una volta eccitate.

Quando la luce viene diffusa dalle particelle, il moto Browniano di esse causa delle fluttuazioni statistiche dell'intensità della luce diffusa dipendenti nel tempo. Queste fluttuazioni possono essere analizzate tramite un opportuno correlatore e trasformate in una funzione di autocorrelazione del secondo ordine, che può essere espressa così:

$$g_2(t) = G_2(t)/\langle I \rangle^2$$

Dove $G_2(t)$ corrisponde alla funzione di correlazione temporale, t è il tempo di correlazione e $\langle I \rangle$ è l'intensità media. Questa funzione è inoltre dipendente da funzioni di correlazione del primo ordine, che corrisponde ad un decadimento esponenziale nel caso in cui si abbiano delle sospensioni monodisperse, come nel seguente caso:

$$g_1(t) = \exp(-\Gamma' t)$$

dove Γ' corrisponde al valore medio di intensità della luce diffusa, il quale a sua volta può essere descritto con questa formula:

$$\Gamma = Dq^2.$$

Dove q è il modulo del vettore di scattering della luce e D è il coefficiente di diffusione trasazionale.

Il vettore di scattering q può essere espresso come:

$$q = (2\pi n/\lambda) \sin(\theta/2)$$

Dove n è l'indice di rifrazione della soluzione, λ è la lunghezza d'onda della radiazione e θ è l'angolo di scattering della luce. Se assumiamo che le nostre particelle presentano le seguenti caratteristiche, cioè che siano monodisperse, non interagiscano e abbiano dimensioni sferiche, allora il raggio idrodinamico si può determinare mediante la seguente formula:

$$R = kT/6\pi\eta D$$

Dove k è la costante di Boltzmann, T la temperatura assoluta e η è la viscosità del solvente. In questo modo si riesce a determinare il valore delle dimensioni delle nanoparticelle^{11,12}.

Per la determinazione della CMC si mette in relazione il valore dell'intensità della luce diffusa con quello della concentrazione del surfatante, come mostrato in Figura 6: al diminuire della concentrazione di soluto si avrà una diminuzione lineare dell'intensità, fino a che il valore non si stabilizza, oppure si ha una improvvisa modifica nell'andamento dell'intensità, dovuta alla rottura delle micelle.

Il raggiungimento della CMC viene confermato dal valore del raggio idrodinamico, il quale cambia repentinamente tra prima e dopo la concentrazione micellare critica, a causa del fatto che non ho più micelle presenti nella sospensione, ma unimeri.¹¹

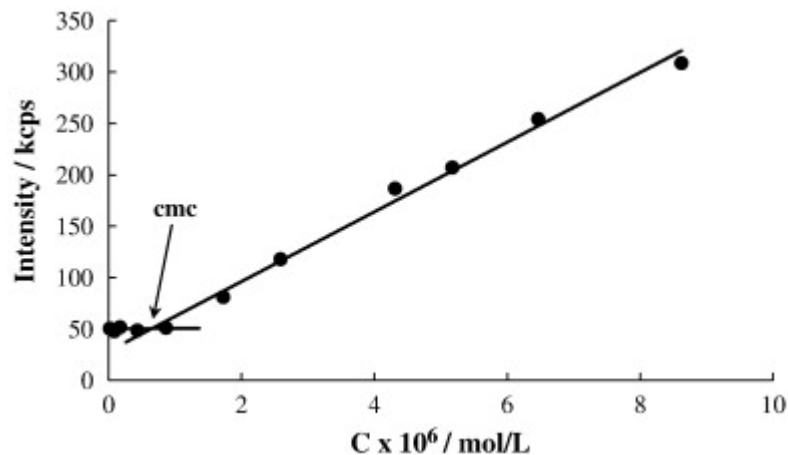


Figura 7: Andamento di intensità misurata dal DLS in funzione della concentrazione.

1.7.2 Fluorimetria

A differenza dello scattering della luce, che è una tecnica nuova nello studio della determinazione della CMC, le tecniche basate sulla fluorescenza sono invece molto più conosciute e studiate^{10-13,16}.

Esse si basano prevalentemente nell'introdurre all'interno della micella una molecola in grado di emettere luce se irraggiata e misurandone le proprietà come: intensità, picchi di emissione dello spettro o anche la sua struttura vibrazionale^{13,14}.

Una variazione improvvisa di queste proprietà può essere considerata a tutti gli effetti un indicatore tangibile e visibile della rottura delle micelle.

Esistono già varie metodologie fluorimetriche per la determinazione della CMC, ognuna di esse utilizza una diversa molecola ed un diverso parametro fisico per determinarla. In Figura 8 sono riportati esempi di molecole che possono essere utilizzate a questo scopo: il dietil 1,2,3,6-tetraidro-1,2,3-trifenilpirimidina-4,5-dicarbossilato (THP-1)¹⁴, la cumarina 153, un derivato della 7-aminocumarina avente un gruppo trifluorometil in posizione 4¹⁵ ed il pirene^{10,11,13,17,22}.

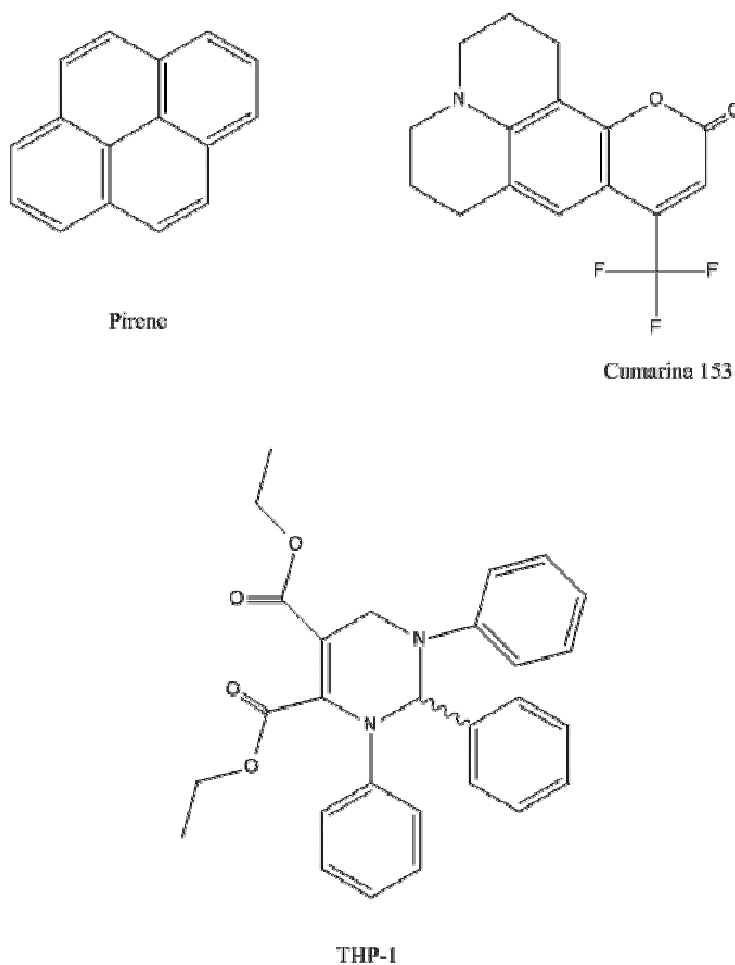


Figura 8: Cromofori tipici usati per la misura della concentrazione micellare critica

Tra le varie molecole citate, il pirene è quella con un maggior numero di studi e pubblicazioni^{11,14}. La metodologia di analisi si basa sull'irraggiare il pirene a 340 nm e misurarne lo spettro di emissione tra 350 e 470 nm¹⁴.

Dallo spettro si misurano le intensità dei picchi a 373 e a 383 nm. Il valore del rapporto di intensità viene messo in grafico in funzione della concentrazione.

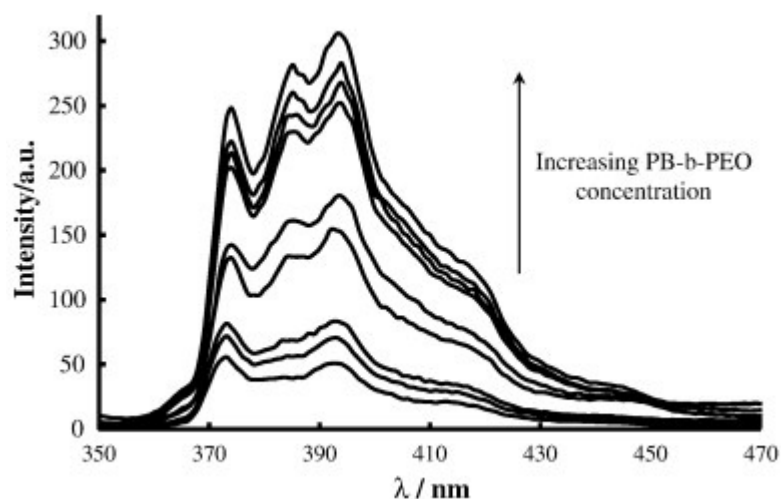


Figura 9: Esempi di spettri in emissione del pirene dentro le micelle: l'intensità diminuisce al ridursi della concentrazione del surfatante.

1.8 Teoria ed applicazioni dell'effetto FRET

La Foster Resonance Energy Transfer (FRET) è una tecnica di analisi basata sulla fluorescenza usata molto in analisi farmacologiche e batteriologiche.

È una tecnica radiativa che non prevede il passaggio di fotoni tra due molecole e si basa sulla presenza di due fluorofori, un donatore ed un accettore (o quencher), distanti tra di loro al massimo 10 nm. Il meccanismo della tecnica si basa sul fatto che l'emissione del donatore venga completamente assorbita dall'accettore (figura 10).

Irraggiando quindi il campione alla lunghezza d'onda di eccitazione del donatore si misura solo l'emissione dell'accettore; mentre quella del donatore non è rilevabile.

Quando però il donatore e l'accettore si trovano a distanze maggiori di 10 nm, si misurano sia l'emissione dell'accettore che quella del donatore.

Affinché l'effetto FRET possa avvenire, quindi, è necessario che la distanza tra il donatore e l'accettore sia minima e che vi sia almeno una parziale sovrapposizione tra lo spettro in emissione del donatore e lo spettro di assorbimento del "quencher" o accettore²⁶.

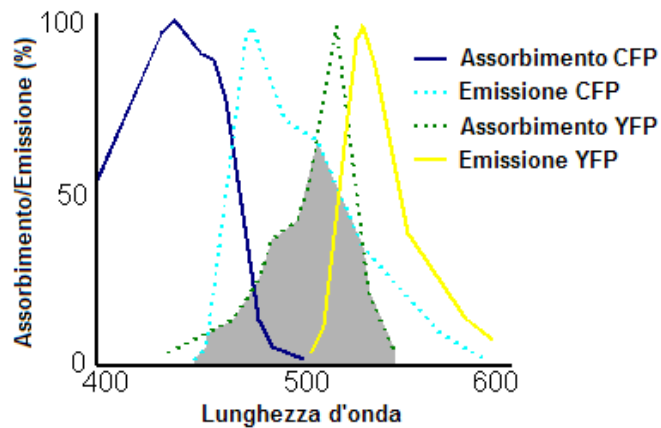


Figura 10: Spettri in assorbimento e in emissione di una coppia fluoroforo (Cyan Fluorescent Protein, CFP)-quencher (Yellow Fluorescent Protein, YFP) adatti per l'effetto FRET.

La dipendenza di questi due parametri è dimostrabile grazie all'equazione dell'efficienza dell'effetto FRET:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \text{ ed } R_0^6 = [8,8 * 10^{23} k^2 * n^{-4} * \Phi * J] \text{ in } \text{Å}^6$$

dove R è la distanza tra i due fluorofori, k è una costante che varia tra 0 e 4, n varia tra 1,33 ed 1,44, Φ è l'efficienza del donatore ed infine J è l'integrale di sovrapposizione dei due spettri.

Questa tecnica presenta varie applicazioni in ambito biologico come ad esempio:

- Cambiamento di conformazioni di proteine;
- Interazioni tra proteine;
- Dosaggio attività enzimatiche;
- Studio della concentrazione intracellulare di macromolecole come il glucosio²⁶;
- Interazione tra filamenti di DNA.

2. Scopo

Le polimerizzazioni radicaliche controllate/viventi hanno suscitato un grande interesse presso la comunità scientifica nel corso degli ultimi anni¹.

La capacità di poter controllare il peso molecolare del polimero e il suo grado di polidispersità permette l'applicazione di queste tecniche in un'ampia varietà di campi, come il biomedicale¹. Copolimeri a blocchi ottenuti con queste tecniche permettono infatti la formazione di micelle in soluzioni acquose, le quali possono essere utilizzate per nuove terapie sperimentali o migliorare terapie già note in modo tale da accrescerne efficacia e precisione (ad esempio la chemioterapia), miglioramenti che comunque sono ancora in fase altamente sperimentale.

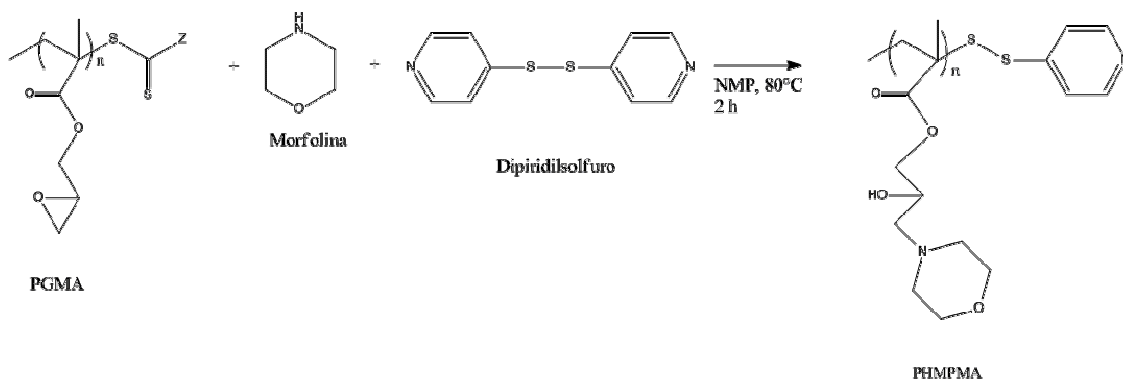
La prima parte di questo elaborato consiste nella preparazione e funzionalizzazione di copolimeri a blocchi capaci di autoassemblarsi in micelle in modo tale da renderli fluorescenti e per ottenere effetto FRET²⁶ in presenza del Nile red quando si trova sotto forma di micelle.

La fase successiva e scopo finale di questo elaborato consiste nel determinare la concentrazione micellare critica (CMC) di micelle ottenute da un surfatante polimerico non ionico in acqua e in tampone acetato. In particolare è stato preso in esame un copolimero a blocchi di particolare interesse ottenuto mediante tecnica di polimerizzazione radicalica controllata di tipo RAFT. Per la determinazione della concentrazione micellare critica (CMC) sono state utilizzate tecniche DLS, usate anche per determinare il raggio idrodinamico e l'indice di polidispersità delle micelle, e tecniche fluorimetriche che usano il pirene come fluoroforo.

3. Risultati e discussioni

3.1 Post-funzionalizzazione del PGMA con morfolina

L'omopolimero PGMA, precedentemente ottenuto²⁷, è stato funzionalizzato con morfolina allo scopo di ottenere il Poli-idrossimorfolinpropilmetacrilato (PHMPMA) (Schema 3).



Schema 3: reazione di post-funzionalizzazione del PGMA con morfolina

La reazione è stata condotta in eccesso di morfolina (10 equivalenti rispetto all'unità ripetente di GMA) in presenza di dipiridilsolfuro al fine di evitare che i tioli terminali che si formano dalla reazione tra il tiocarbonile e la morfolina possano reagire con le unità epossidiche facendo reticolare il polimero.

L'avvenuta funzionalizzazione è stata confermata dall'analisi ¹H-NMR (Figura 11). Nello spettro ¹H-NMR del PHMPMA, infatti, si nota lo spostamento dei segnali dei protoni appartenenti all'anello epossidico a chemical shift più alti (da 3.2 ppm a 4 ppm) che si vengono a sovrapporre ai segnali appartenenti ai protoni in α all'ossigeno della morfolina. Inoltre si nota la comparsa dei segnali corrispondenti ai protoni in α all'azoto morfolinico (nel range 2,3-2,5 ppm) e di quelli appartenenti al gruppo idrossilico formatosi in seguito all'apertura dell'anello.

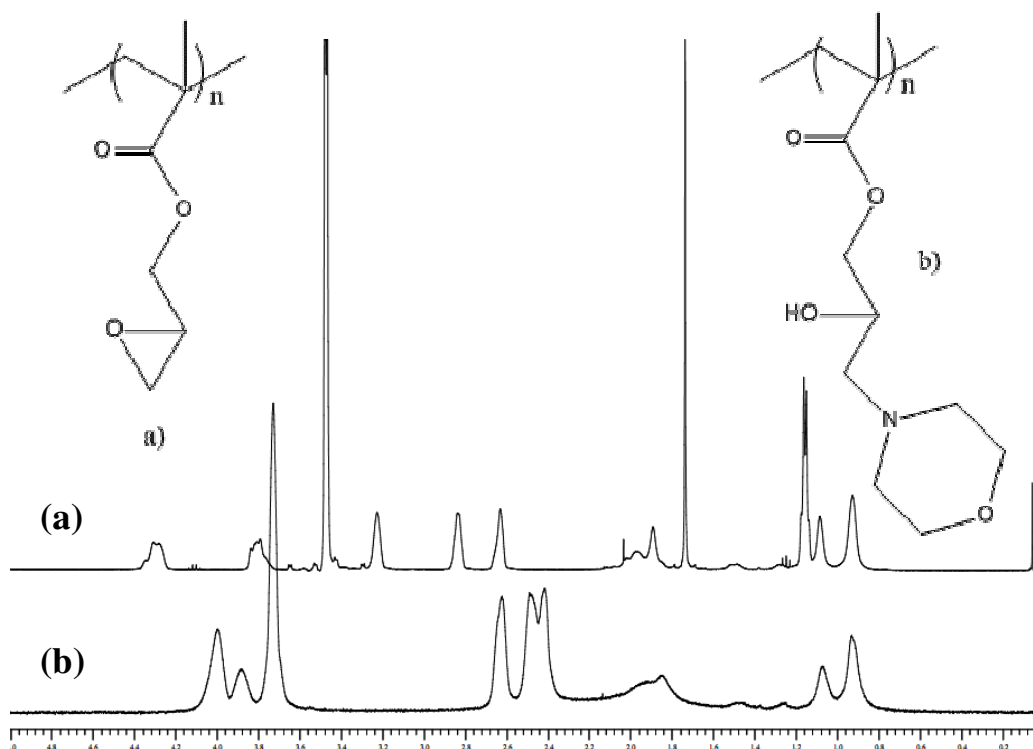
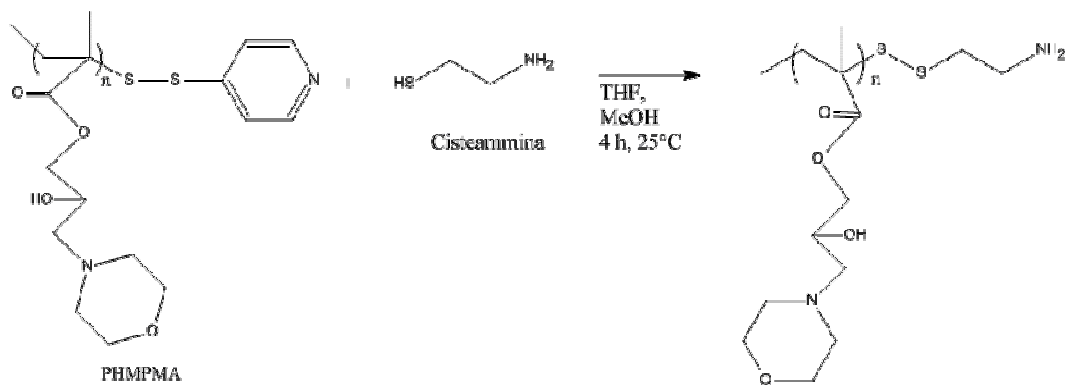


Figura 11: Spettri $^1\text{H-NMR}$ del PGMA (a) e PHMPMA (b) a confronto.

3.2 Sostituzione del gruppo terminale piridilsolfuro del polimero con la cisteamina

L'omopolimero PHMPMA ottenuto dalla reazione precedente ed il copolimero a blocchi poliidrossimorfolinpropilmetacrilato-polimetilmetacrilato (PHMPMA-b-PMMA), sintetizzato precedentemente²⁷ sono stati fatti reagire con cisteamina (Schema 4) per sostituire il gruppo piridile terminale e permettere la successiva funzionalizzazione con 4-cloro,7-nitrobenzofurazano che conferirà al polimero proprietà fluorescenti.

Per far ciò è stato necessario utilizzare un'ammina (la cisteamina) che avesse un tiolo terminale per mantenere il legame disolfuro col resto della catena macromolecolare e che avesse inoltre ottime caratteristiche nucleofile.



Schema 4: Sostituzione del gruppo piridilsolfuro terminale dell'omopolimero con la cisteammina.

La reazione è stata condotta in eccesso di ammina (4 equivalenti). L'omopolimero così ottenuto è stato poi caratterizzato tramite GPC con rivelatore a indice di rifrazione (RI) per determinarne il peso molecolare.

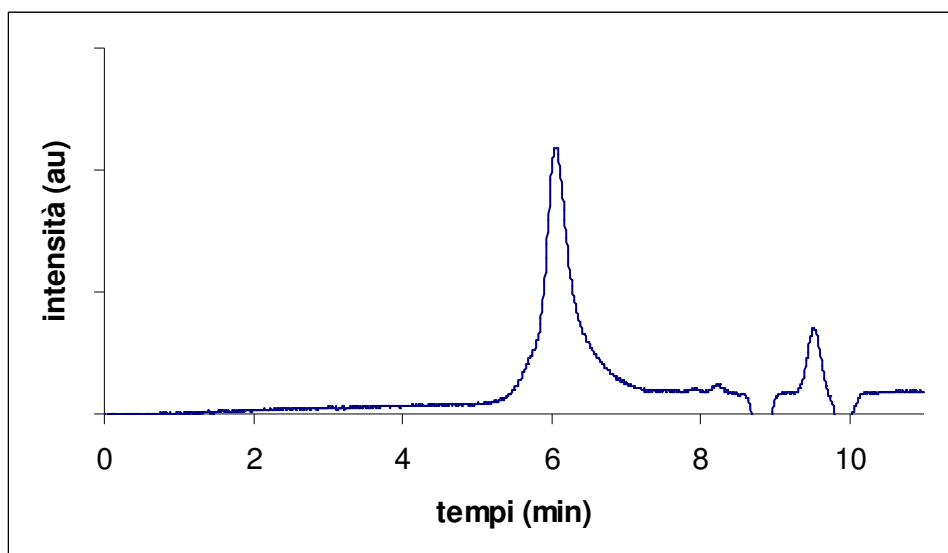
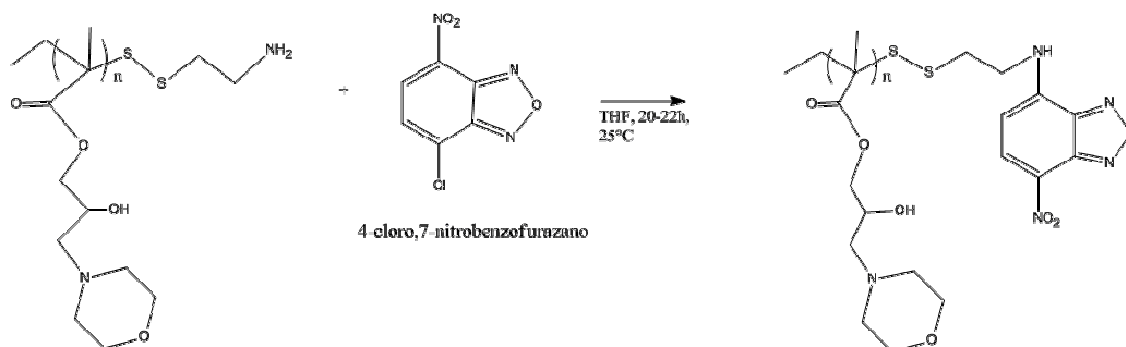


Figura 12: Distribuzione dei pesi molecolari registrata mediante GPC (rivelatore RI) in THF dell'omopolimero funzionalizzato con la cisteammina.

3.3 Post-funzionalizzazione del polimero con 4-cloro,7-nitrobenzofurazano

La funzionalizzazione dei polimeri con 4-cloro,7-nitrobenzofurazano è avvenuta sfruttando le caratteristiche nucleofile del gruppo amminico terminale del polimero.



Schema 5: Reazione col benzofurazano.

I polimeri ottenuti sono stati caratterizzati mediante GPC. In Figura 13 è riportato il cromatogramma della miscela di reazione del prodotto polimerico ottenuto usando un rivelatore UV alla lunghezza d'onda di 350 nm. Si può notare la presenza del polimero marcato e di un secondo segnale che corrisponde ai derivati benzofurazanicici liberi che non hanno reagito col polimero.

Questo cromatogramma GPC è inoltre dimostrazione del fatto che la funzionalizzazione con la cisteamina è avvenuta, poiché l'omopolimero di partenza non è rilevabile tramite GPC con rivelatore UV se non funzionalizzato con un cromoforo.

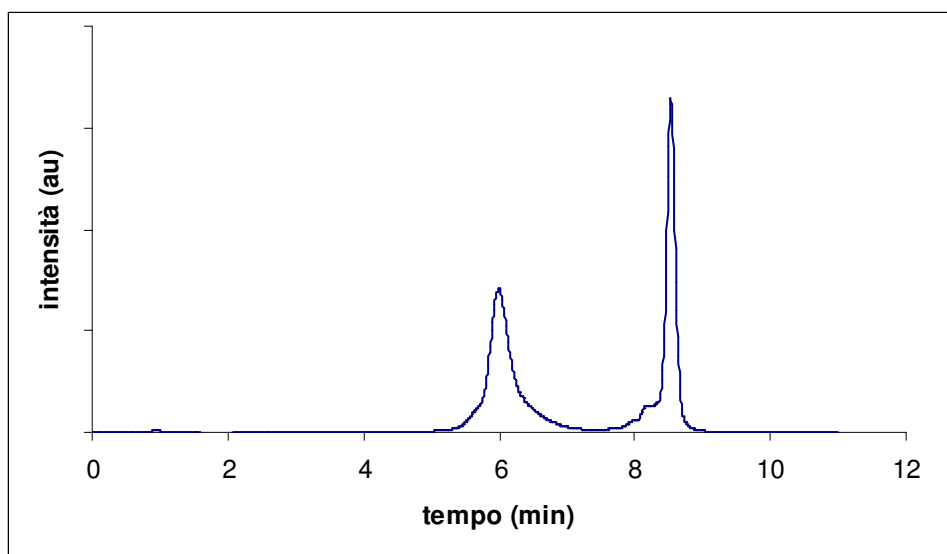


Figura 13: Cromatogramma GPC (rivelatore UV) della miscela di reazione dell'omopolimero funzionalizzato con cisteamina e benzofurazano

I polimeri sono stati quindi purificati mediante colonna ad esclusione dimensionale avente come fase stazionaria una resina stirene-divinilbenzene con range di esclusione 600-14000 g/mol e dimensione dei pori tra 40 ed 80 μ m.

Ad ulteriore dimostrazione che la reazione è avvenuta si nota una variazione di colore della miscela di reazione, che è passata dal bianco torbido ad un arancione-scuro, e dalla separazione eseguita tramite colonna cromatografia ad esclusione sterica (vedi figure 14 e 15).



Figura 14 e 15: Copolimero (figura 14) ed omopolimero (figura 15) purificati mediante colonna cromatografica, la presenza di due macchie dimostra che la funzionalizzazione dei polimeri ha avuto successo. Le macchie gialle corrispondono al benzofurazano non reagito, mentre le macchie scure corrispondono al copolimero e all'omopolimero funzionalizzati.

3.4 Caratterizzazione GPC, UV-Vis e fluorimetrica dell'omopolimero e del copolimero funzionalizzati e delle micelle ottenute

I due polimeri ottenuti sono stati caratterizzati mediante le più comuni tecniche spettroscopiche.

Il loro peso molecolare è stato determinato mediante GPC (Tabella 1) ed i cromatogrammi ottenuti sono riportati in Figura 16.

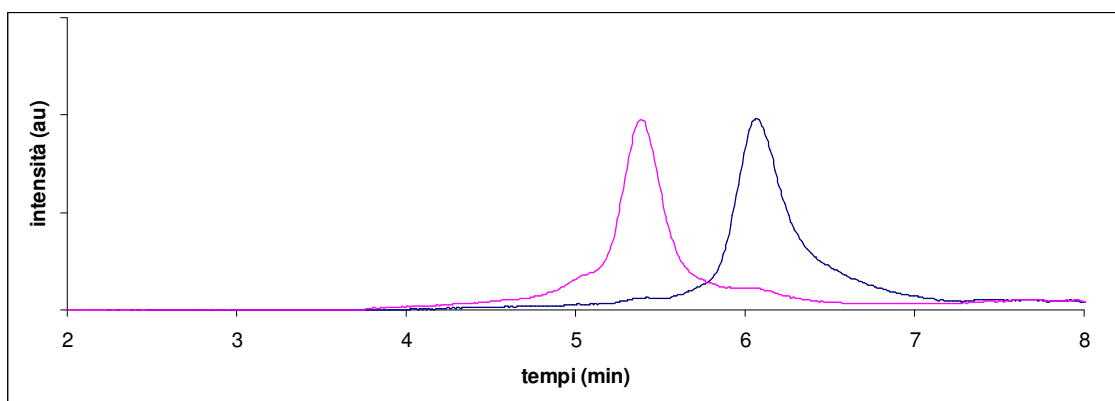


Figura 16 : Distribuzione dei pesi molecolari registrata mediante GPC (rivelatore RI) in THF dell'omopolimero (curva blu) e del copolimero (curva viola) funzionalizzati,

Tabella 1: Pesì molecolari numerali dei polimeri ed indici di polidispersità

polimero funzionalizzato	\bar{M}_n	PDI*
PHMPMA-cyst-benzfurazane	14489	1,39
PHMPMA-b-PMMA-cyst-benzfurazane	55998	1,43

*PDI: indice di polidispersità

Tabella 2: Assorbività molarì dei polimeri funzionalizzati con benzofurazano

polimero	Massimo di assorbimento	
	λ (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
PHMPMA-cyst-benz	456	5,51E+03
PHMPMA-b-PMMA-cyst-benz	462	6,28E+03

Si sono poi registrati lo spettro in emissione del copolimero PHMPMA-b-PMMA-cyst-benz in soluzione col Nile Red in THF e quelli delle micelle ottenute col copolimero tal quale e additivato col Nile Red.

L'uso del Nile Red è necessario al fine di verificare la presenza dell'effetto FRET tra la molecola organica ed il copolimero funzionalizzato quando quest'ultimo è presente sotto forma di micelle contenenti Nile Red.

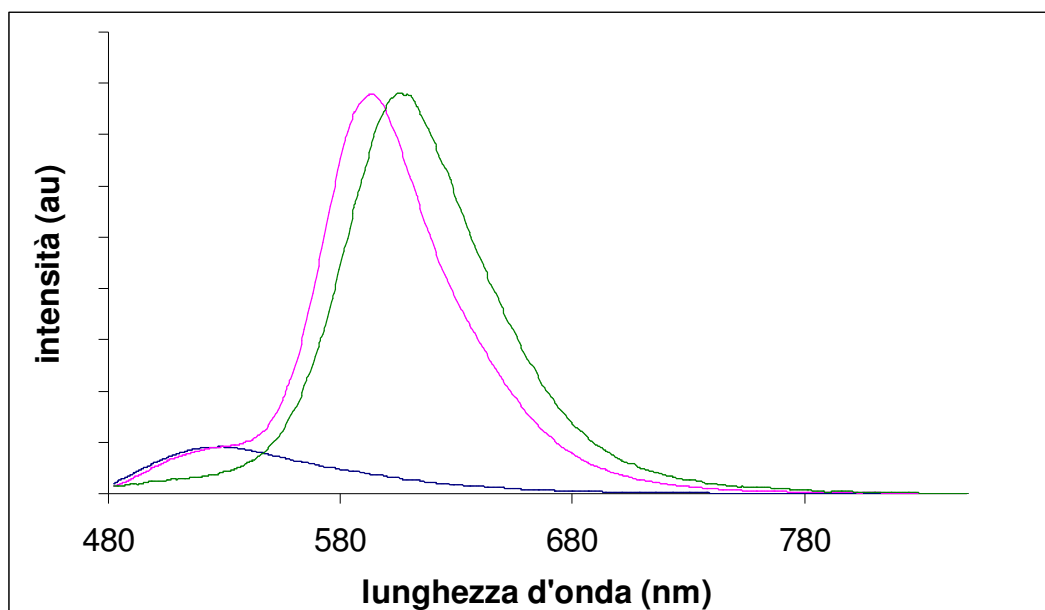


Figura 17: Confronto tra gli spettri in emissione del copolimero funzionalizzato senza Nile red (curva blu), disciolto col Nile red in THF (curva viola) e le sue micelle addittivate col Nile red (curva verde), i campioni sono stati irraggiati a 462 nm.

Come si può notare dagli spettri di emissione riportati in Figura 17, il copolimero PHMPMA-b-PMMA-cyst-benzofurazane in soluzione con Nile red (in viola) presenta due bande di emissione: una intensa intorno ai 595 nm dovuta alla presenza del Nile red e l'altra di lieve intensità intorno ai 528 nm dovuta al gruppo benzofurazano terminale. Quest'ultima banda, infatti, risulta essere presente anche nello spettro di emissione del copolimero tal quale (in blu). Essa risulta però assente nello spettro di emissione delle micelle di questo copolimero che presenta un'unica banda molto intensa a circa 600 nm dovuta al Nile red. Ciò dimostra che si è ottenuto il voluto effetto FRET grazie alla vicinanza, nel core delle micelle, tra il Nile red ed il benzofurazano.

In Figura 18 è riportato il confronto tra gli spettri in emissione del copolimero funzionalizzato con il benzofurazano in soluzione di cloroformio e sotto forma di micelle in acqua.

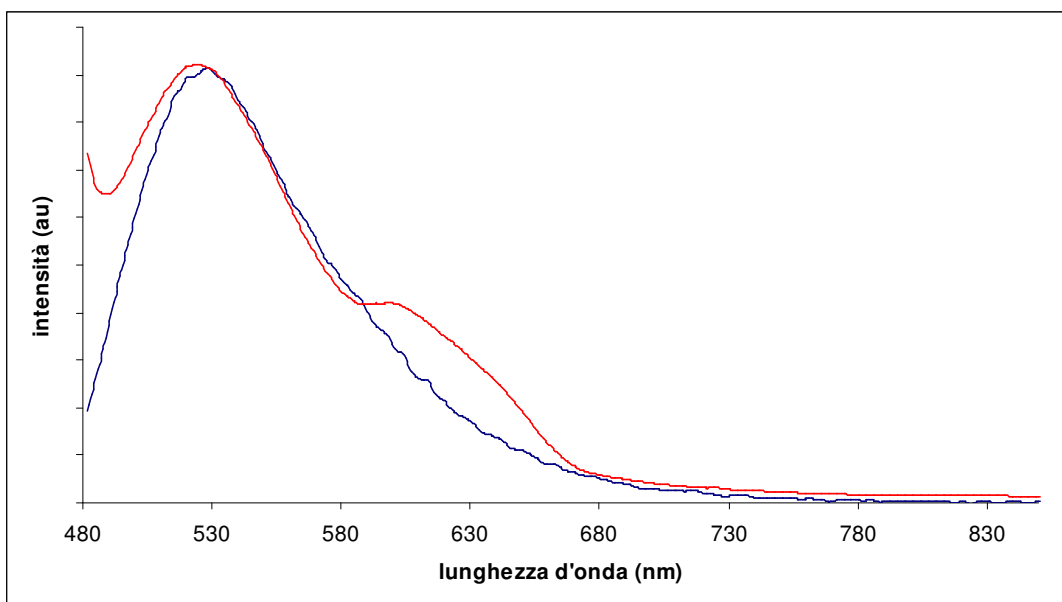


Figura 18: Confronto tra gli spettri in emissione del copolimero funzionalizzato in soluzione di cloroformio (curva blu) e sotto forma di micelle in acqua (curva rossa); entrambi i campioni sono stati irraggiati a 462 nm.

Si può notare che entrambi gli spettri mostrano un massimo di emissione a 528 nm, ma le micelle presentano una seconda banda di emissione intorno ai 600 nm.

Quest'ultima è probabilmente dovuta all'interazione di due o più fluorofori vicini e quindi interagenti fra loro (eccimeri) all'interno del core delle micelle.

3.5 Determinazione della CMC mediante DLS.

In un mezzo acquoso, i copolimeri anfifilici a blocchi tendono a formare spontaneamente micelle polimeriche con struttura core-shell, grazie alla diversa solubilità dei segmenti idrofilici e di quelli idrofobici. Come mostrato in Figura 19, quindi, un core interno idrofobico viene circondato da uno shell idrofilico

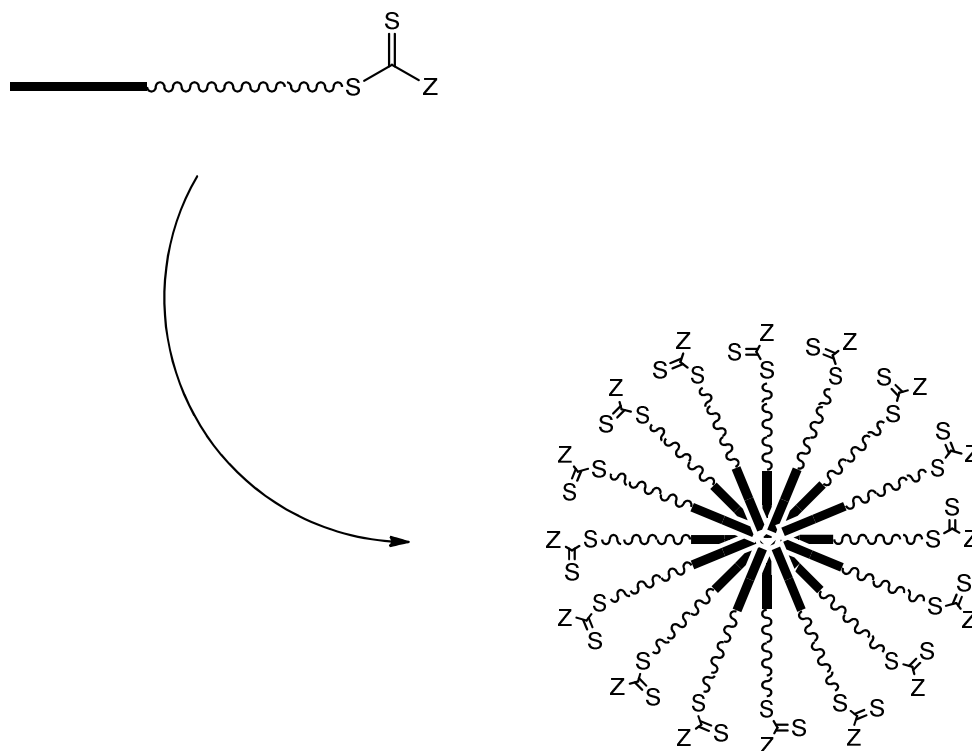


Figura 19: Schema di autoassemblaggio dei copolimeri a blocchi in micelle.

Allo scopo di determinare la concentrazione micellare critica (CMC) del copolimero a blocchi non funzionalizzato PHMPMA-b-PMMA, sono state preparate sospensioni micellari in acqua milliQ e in tampone acetato (pH 5,08) a diversa concentrazione e queste sono state caratterizzate mediante DLS. I dati ottenuti sono riportati in Tabella 3 e 4.

Tabella 3: risultati delle misure DLS in acqua

diluizione	Concentrazione micellare (mg/ml)	intensità (Kcps)	Dimensioni (nm)	PDI
0	1,000	3365	31,1	0,20
1	0,500	1955	33,7	0,21
2	0,250	1266	35,9	0,17
3	0,125	731	36,9	0,21
4	0,063	502	37,7	0,29
5	0,031	248	44,6	0,33
6	0,016	99	35,6	0,29

Tabella 4: risultati delle misure DLS in tampone acetato a pH 5,08

diluizione	Concentrazione micellare (mg/ml)	Intensità (Kcps)	dimensioni (nm)	PDI
0	1,000	8688	72,0	0,06
1	0,500	5307	77,5	0,08
2	0,250	2941	75,3	0,07
3	0,125	1478	78,0	0,07
4	0,063	848	77,2	0,06
5	0,031	489	91,8	0,16
6	0,016	296	89,3	0,30
7	0,008	161	91,9	0,33

Mettendo in grafico i valori delle intensità misurate in funzione della concentrazione di polimero si può notare che queste diminuiscono gradualmente all'aumentare della diluizione delle sospensioni micellari (Figura 20 e 21). L'andamento ottenuto potrebbe suggerire che la CMC del copolimero in esame non rientri nel range di concentrazioni preso in considerazione, ma sia quindi più bassa.

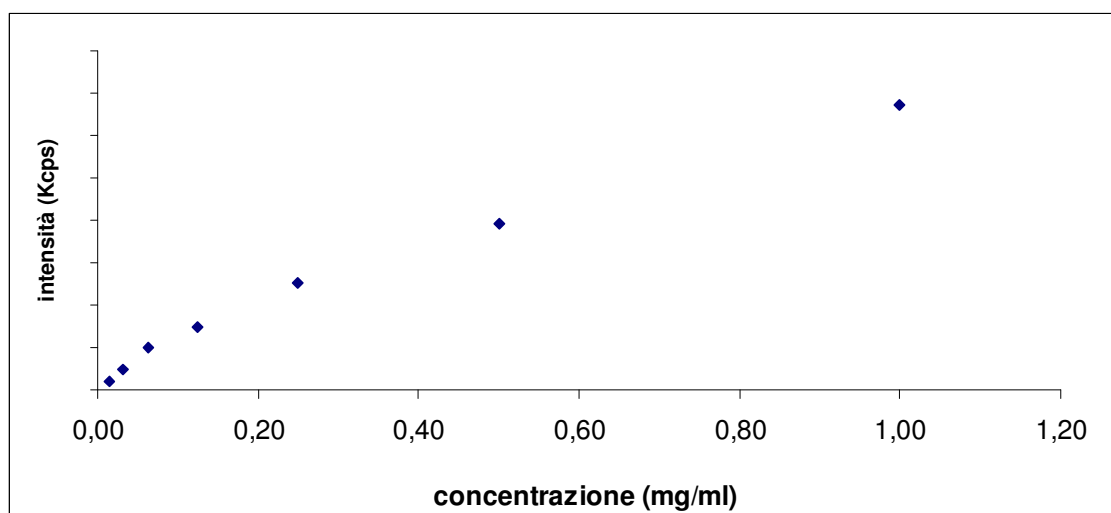


Figura 20: Andamento dell'intensità in funzione della concentrazione delle micelle in acqua.

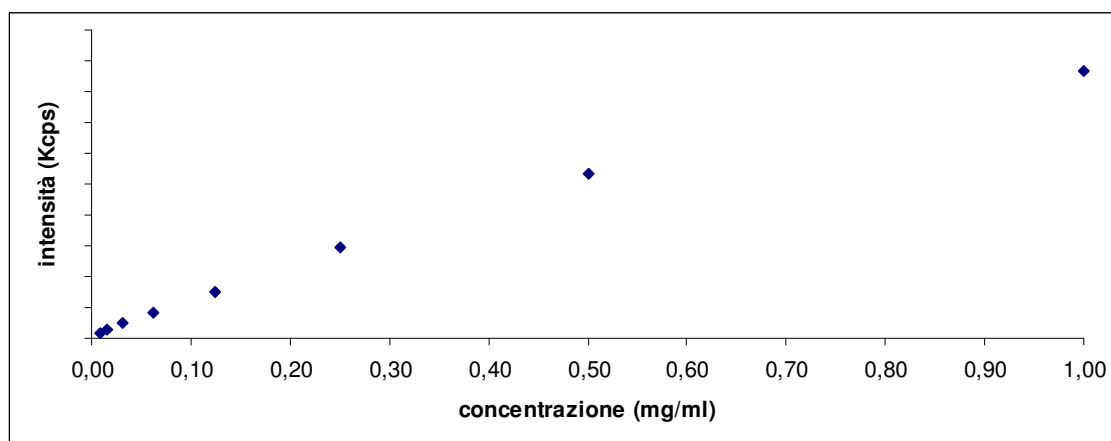


Figura 21: Andamento delle intensità in funzione della concentrazione delle micelle in tampone acetato a pH 5,08.

Ciò sembra confermato anche dalle dimensioni misurate delle micelle (Tabella 3 e 4) che risultano costanti intorno ai 35-40 nm in acqua milliQ e a 70-90 nm in tampone acetato, e non arrivano mai a valori inferiori ai 10 nm, dimensioni tipiche degli unimeri. È però possibile, anche se oltre al limite di sensibilità strumentale, notare che il campione in tampone acetato al di sotto della concentrazione di 0,063 mg/ml presenta una discontinuità nella dimensione micellare. Questo comportamento potrebbe indicare un punto di instabilità delle micelle.

Non è stato possibile analizzare soluzioni più diluite in quanto queste non rientrano nel limite di rilevabilità dello strumento.

Dai dati riportati in Tabella 3 e 4, si nota inoltre che le micelle in ambiente acido presentano un valore di PDI inferiore e dimensioni maggiori, ciò deve essere dovuto al fatto che la morfolina presente sulla parte idrofilica della catena macromolecolare tende a protonarsi molto più facilmente in ambiente acido e questo rende le catene macromolecolari leggermente più solubili in acqua aumentando quindi le dimensioni degli agglomerati..

Infine, al DLS sono state eseguite anche misure di potenziale zeta, della mobilità e della conducibilità delle sospensioni madri (Tabella 5).

Tabella 5: Risultati delle misure sul potenziale zeta.

fase disperdente	potenziale zeta (mV)	mobilità ($\mu\text{m} \times \text{cm/ms}$)	conducibilità (mS/cm)
acqua milliQ	2,44	0,1923	0,0748
tampone acetato pH 5,08	20,4	2,007	0,808

Dai dati (Tabella 5) si nota che le micelle in ambiente acido presentano una maggiore conducibilità rispetto a quelle in acqua milliQ, ciò è probabilmente dovuto alla maggior concentrazione di ioni H^+ presenti in soluzione; la mobilità è conseguentemente più elevata dato che le micelle risultano più cariche.

3.6 Determinazione della CMC mediante misure fluorimetriche

Allo scopo di determinare la CMC del copolimero a blocchi PHMPMA-b-PMMA mediante misure al fluorimetro, sono state preparate delle sospensioni in acqua milliQ e tampone acetato con concentrazioni analoghe a quelle precedenti aggiungendo una quantità nota di pirene.

Per determinare la CMC del materiale in esame, si è scelto di utilizzare il “Pyrene 1:3 ratio method”^{10,13-16}, che mette in relazione l’andamento del rapporto delle intensità del primo e terzo picco dello spettro di emissione del pirene in funzione della concentrazione della soluzione micellare.

I campioni sono stati quindi eccitati a 340 nm e sono stati registrati gli spettri di emissione tra 360 e 470 nm (Figura 22). Nelle Tabelle 6 e 7 sono riportati i dati ottenuti e in particolare le intensità dei picchi a 373 e 384 nm (rispettivamente, primo e terzo picco) ed il loro rapporto. Il metodo si basa sul fatto che al di sotto della CMC, le micelle si rompono liberando il pirene che non è solubile in ambiente acquoso e quindi il rapporto I_{373}/I_{384} non è più costante.

Inoltre, al diminuire della concentrazione micellare, gli spettri di emissione tendono a diminuire di intensità fino a mostrare un solo picco sui 385-390 nm. Questo comportamento è dovuto alla rottura delle micelle ed è di aiuto nell’individuazione della CMC, come mostrato in figura 22.

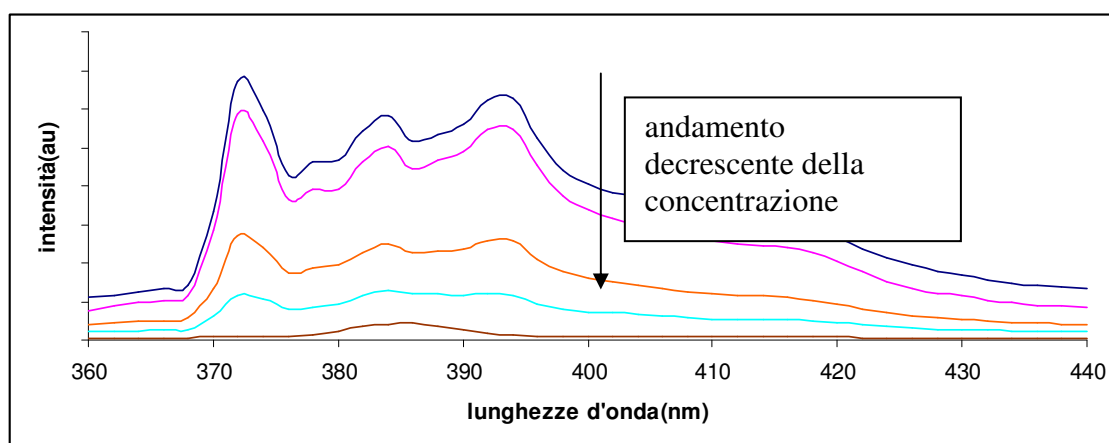


Figura 22: Andamenti degli spettri del pirene nelle varie sospensioni micellari in tampone acetato; da notare che al diminuire della concentrazione diminuisce anche l’intensità del segnale, che cambia completamente una volta che avviene la rottura delle micelle (curva marrone scuro).

Tabella 6: Risultati delle misure al fluorimetro delle sospensioni micellari in acqua milliQ.

diluizione	concentrazione (mg/ml)	I_{373}	I_{384}	I_{373}/I_{384}
0	1	$1,01E*10^5$	$9,73*10^4$	$1,03E+00$
1	0,5	$9,10*10^4$	$8,43*10^4$	$1,08E+00$
2	0,25	$1,16*10^5$	$1,05*10^5$	$1,10E+00$
3	0,125	$6,15*10^4$	$5,87*10^4$	$1,05E+00$
4	0,063	$6,32*10^4$	$6,06*10^4$	$1,04E+00$
5	0,031	$3,97*10^4$	$4,03*10^4$	$9,85E-01$
6	0,016	$3,18*10^3$	$2,17*10^3$	$1,17E+00$

Tabella 7: Risultati delle misure al fluorimetro delle sospensioni micellari in tampone acetato a pH 5,08.

diluizione	concentrazione (mg/ml)	I_{373}	I_{384}	I_{373}/I_{384}
0	1	$1,37 \cdot 10^5$	$1,29 \cdot 10^5$	1,06E+00
1	0,5	$1,27 \cdot 10^5$	$1,17 \cdot 10^5$	1,09E+00
2	0,25	$8,76 \cdot 10^4$	$8,29 \cdot 10^4$	1,06E+00
3	0,125	$1,101 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$	1,10E+00
4	0,063	$8,71 \cdot 10^4$	$8,22 \cdot 10^4$	1,06E+00
5	0,031	$5,10 \cdot 10^4$	$5,00 \cdot 10^4$	1,02E+00
6	0,016	$2,02 \cdot 10^4$	$1,73 \cdot 10^4$	1,17E+00
7	0,008	$5,16 \cdot 10^3$	$4,28 \cdot 10^3$	1,21E+00

Riportando in grafico i valori di I_{373}/I_{384} in funzione della concentrazione è stato possibile determinare la CMC del materiale in esame in tampone acetato (Figura 24) che corrisponde a 0,04 mg/ml.

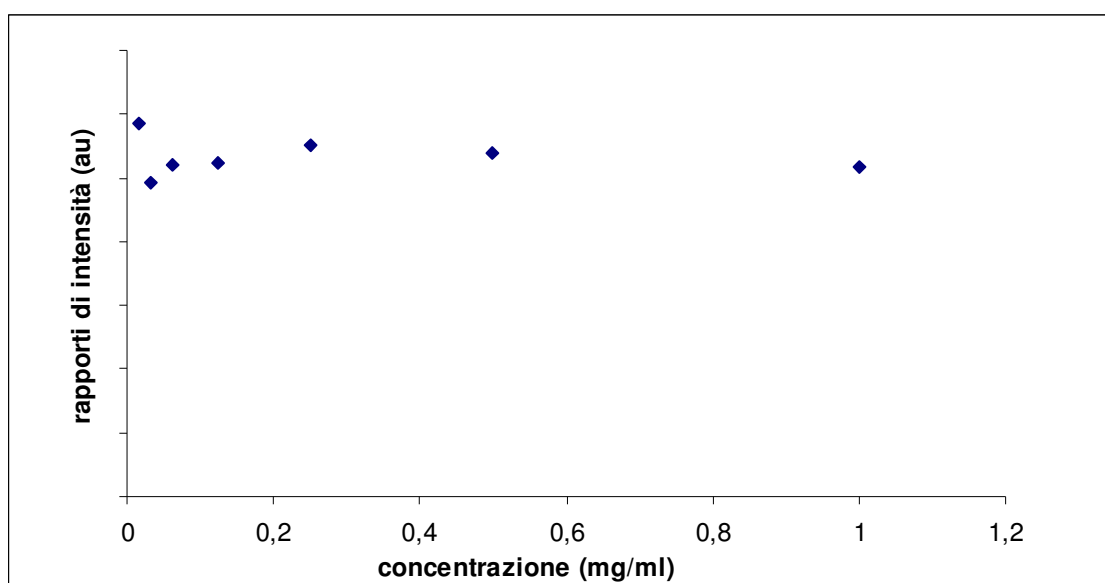


Figura 23: Andamento dei valori dei rapporti di intensità I_{373}/I_{384} in funzione della concentrazione delle micelle in acqua milliQ.

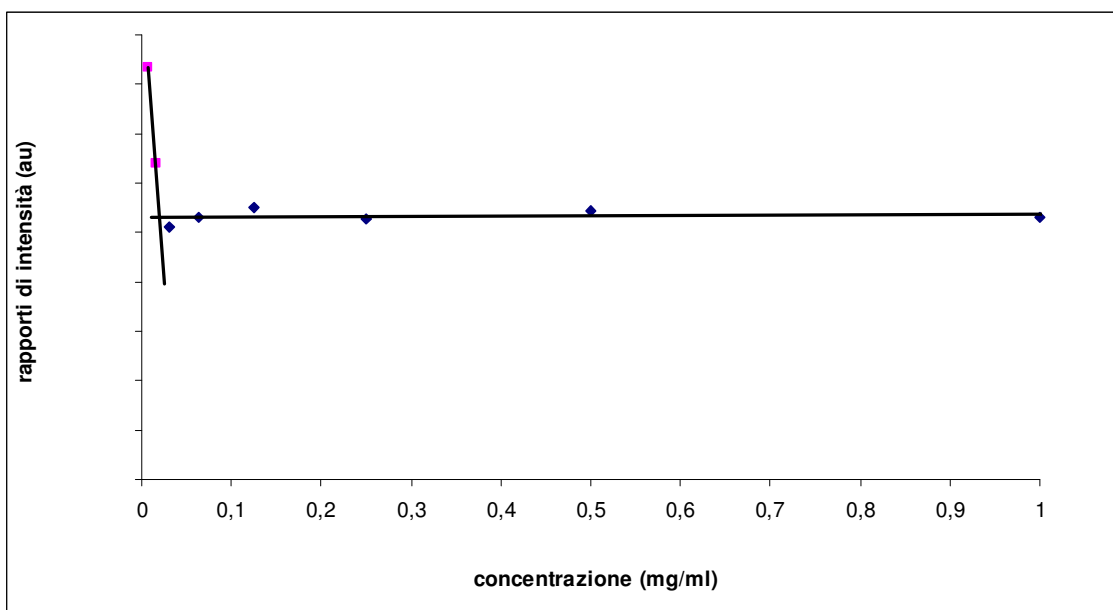


Figura 24: Andamento del valore dei rapporti di intensità I_{373}/I_{384} in funzione della concentrazione delle micelle in tampone acetato a pH 5,08.

Il valore ottenuto potrebbe essere consistente con il risultato ottenuto precedentemente mediante misure DLS, in quanto la CMC dovrebbe anche in quel caso risultare inferiore ai 0.06mg/ml.

Le misure effettuate sulle soluzioni micellari in acqua milliQ, invece, non hanno permesso di determinare un valore della CMC.

I risultati ottenuti permettono comunque si affermare che la CMC delle micelle in tampone acetato è inferiore ai 0.04 mg/ml e che in acqua milliQ questa è sicuramente molto inferiore a quella delle micelle in tampone acetato. Risultato molto promettente per l'utilizzo di questi derivati polimerici in campo biomedicale.

4. Conclusioni

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi si possono riassumere come segue:

- Il copolimero a blocchi PHMPMA-b-PMMA è stato funzionalizzato con 4-cloro,7-nitrobenzofurazano previa sostituzione del gruppo terminale piridilsolfuro con cisteamina, ottenendo così un materiale fluorescente in grado di assemblarsi in micelle in ambiente acquoso.
- Le sospensioni micellari ottenute in presenza di Nile red mostrano effetto FRET.
- È stata inoltre studiata la possibilità di determinare la Concentrazione Micellare Critica (CMC) dei materiali in esame mediante Dynamic Light Scattering (DLS) e tramite fluorimetria secondo il "Pyrene 1:3 ratio method". I risultati ottenuti permettono di affermare che la CMC delle micelle in tampone acetato è inferiore ai 0.04 mg/ml e che in acqua milliQ la CMC è sicuramente molto inferiore a quello delle micelle in tampone acetato. Risultato promettente per l'utilizzo di questi derivati polimerici in campo biomedicale.
- Le micelle ottenute risultano avere dimensioni maggiori in soluzioni a pH acidi che a pH neutri, oltre ad avere un indice di polidispersità molto più basso. Ciò è dovuto al fatto che in ambiente acido la morfolina presente nella parte idrofilica è molto più protonata che in acqua milliQ, favorendo quindi una miglior solubilizzazione del copolimero aumentandone il diametro idrodinamico.

5. Parte sperimentale

5.1 Solventi e reagenti utilizzati

Il tetraidrofurano (THF) è stato anidrificato mediante distillazione su LiAlH_4 e immediatamente filtrato attraverso l'uso di filtri aventi porosità 0,2 μm .

Il cloroformio è stato precedentemente distillato.

L'omopolimero Poliglicidilmetaacrilato (PGMA) e il copolimero a blocchi Poliidrossimofolinpropilmetaacrilato-Polimetilmetacrilato (PHMPMA-b-PMMA) sono stati precedentemente sintetizzati dal gruppo di ricerca del Dott. Benaglia²⁷.

Gli altri reagenti e solventi (Aldrich) sono stati utilizzati tal quali.

5.2 Strumentazione

Gli spettri NMR sono stati ottenuti a temperatura ambiente mediante uno spettrometro Varian Mercury 400. Gli spettri ^1H -NMR sono stati registrati utilizzando i seguenti parametri: pulse width (45°) 5ms; delay 30s; numero di transienti 32. I chemical shifts sono espressi in ppm dal tetrametilsilano (TMS) come riferimento interno.

I pesi molecolari medi e la polidispersità dei campioni polimerici sono stati determinati da soluzioni di THF tramite GPC (Gel Permeation Chromatography) utilizzando un MS Concept PU III, con rilevatore a indice di rifrazione Shodex R1-71 e una colonna Resipore Polymer Laboratories 300x7,5 mm, 0,3 μm , 200-400000 Da.

Le analisi delle dimensioni delle micelle sono state effettuate tramite Dynamic Light Scattering (DLS) utilizzando un Malvern Zetasizer Nano ZS a 25°C.

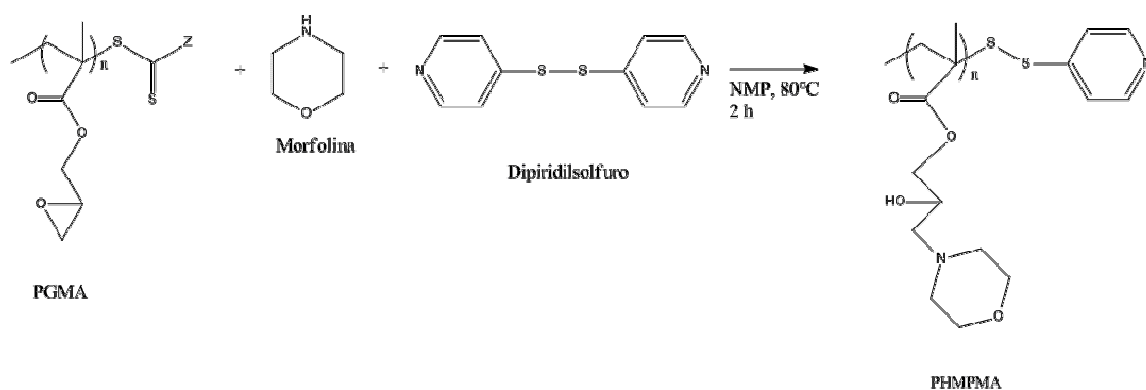
Gli spettri UV-Vis nella regione spettrale 200-800 nm sono stati registrati a 25°C in soluzioni di cloroformio o THF con uno spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 19, utilizzando celle di quarzo da 1 cm.

Gli spettri al fluorimetro sono stati ottenuti mediante lo strumento Edinburgh FLS 920p, presente presso il Dipartimento di Chimica Industriale "Toso Montanari", usando come apertura delle finestre 5 nm per la lunghezza d'onda di eccitazione e 3 nm per l'emissione.

Per la preparazione dei tamponi è stato utilizzato un pHmetro Amel 338 avente un elettrodo a vetro combinato tarato con due tamponi a pH 4,01 e 7,00.

5.3 Post-funzionalizzazione del PGMA

Il PGMA è stato post-funzionalizzato con morfolina dopo aver protetto il gruppo terminale con dipiridilsolfuro.



In uno Schlenk sono stati aggiunti PGMA (100mg), morfolina (10 equivalenti per ogni unità di GMA), dipiridilsolfuro (3 equivalenti per ogni gruppo terminale) e 2 ml di N-metil pirrolidone (NMP). La miscela ottenuta è stata lasciata a temperatura ambiente sotto agitazione per circa 20 minuti, per favorire la reazione di protezione del gruppo RAFT e quindi a 80°C per 2 ore.

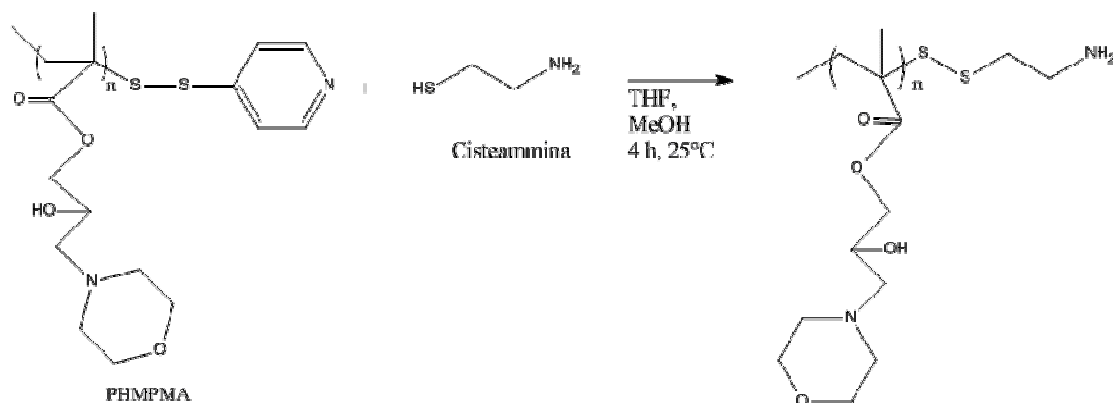
Il prodotto ottenuto è stato purificato mediante successive precipitazioni in etere etilico. La completa funzionalizzazione degli anelli epossidici è stata verificata mediante ¹H-NMR.

$$\overline{M}_n = 14113 \text{ g/mol} \quad \text{PDI} = 1,36$$

¹H-NMR (CDCl₃) (δ in ppm rispetto al TMS) 4.40 (2m, 2H del -CH₂ dell'unità ripetente GMA); 4.30 (m, 1H del -centro chinale dell'unità ripetente); 3.50 (2m, 2H del -CH₂ in posizione β rispetto all'azoto della morfolina); 2.40 (2m, 2H del -CH₂ in posizione β rispetto all'azoto della morfolina); 2.30 (2m, 2H del -CH₂ legato alla morfolina).

5.4 Funzionalizzazione del gruppo terminale

Il gruppo terminale piridilsolfuro della catena polimerica è stato sostituito con cisteammina allo scopo di permettere la successiva funzionalizzazione del gruppo terminale.



Schema 7

In un palloncino da 10 mL sono stati aggiunti il polimero precedentemente ottenuto (35 mg) e cisteammina (4 equivalenti per ogni gruppo terminale).

L'aggiunta della cisteammina è stata eseguita con un leggero flusso di azoto per evitare il suo contatto con l'aria che ne avrebbe causato la degradazione.

I reagenti sono stati disciolti in 1,5 mL di THF e 0,5 mL di metanolo.

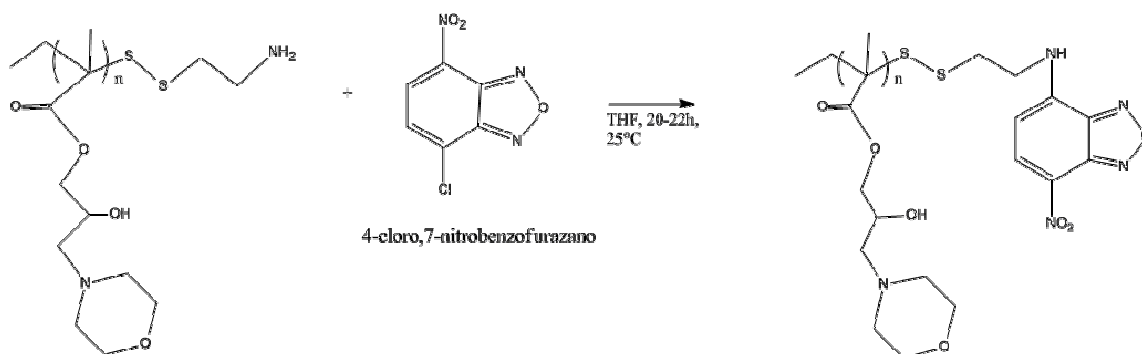
La miscela è stata tenuta sotto agitazione per quattro ore a temperatura ambiente.

Dopo questo tempo la miscela è stata purificata mediante precipitazione in etere etilico ed è stata tenuta in essiccatore sotto alto vuoto ed è stata eseguita l'analisi GPC con rilevatore di indice di rifrazione.

$\overline{M}_n = 13595$ g/mol PDI=1,50

5.5 Attacco nucleofilo del gruppo terminale al 4-cloro,7-nitrobenzofurazano

Il gruppo cisteammिनico terminale del polimero è stato funzionalizzato col 4-cloro,7-nitrobenzofurazano mediante attacco nucleofilo per fornire fluorescenza al polimero.



Schema 8

In un palloncino da 10 mL sono stati aggiunti il polimero ottenuto precedentemente (24 mg) e 4-cloro,7-nitrobenzofurazano (7 equivalenti per ogni gruppo terminale).

Il tutto è stato disciolto in 1,5 mL di THF e messo sotto agitazione per 20-22 ore, coprendo il pallone con fogli di alluminio al fine di evitare la degradazione dei prodotti e dei reagenti per effetto della luce.

La miscela di reazione diventa torbida e a fine reazione si è notata una colorazione arancione scuro della miscela.

La miscela di reazione è stata poi purificata mediante precipitazione con etere etilico e un successivo passaggio su colonna cromatografica ad esclusione sterica usando cloroformio distillato come fase mobile e resina stirene-divinilbenzene come fase fissa.

Dopo la purificazione, il polimero è stato tenuto sotto alto vuoto ed è stata eseguita l'analisi GPC -UV e successivamente analizzato mediante UV-Vis e fluorimetria.

$\overline{M}_n = 14489$ g/mol PDI=1,39

5.6 Sostituzione del gruppo piridilsolfuro con la cisteammina e attacco nucleofilo sul nitrobenzofurazano col copolimero a blocchi PHMPMA-b-PMMA.

Le reazioni di funzionalizzazione del copolimero a blocchi PHMPMA-b-PMMA sono state eseguite nelle stesse condizioni dell'omopolimero PHMPMA usando un copolimero a blocchi precedentemente sintetizzato dal gruppo di ricerca del dott. Benaglia²⁷.

Di questo copolimero è stata eseguita la caratterizzazione GPC, UV-Vis e fluorimetrica in cloroformio.

Dello stesso copolimero è stato poi preparato un campione col Nile Red in THF.

$\overline{M}_n = 55,998 \text{ g/mol}$ PDI=1,43

5.7 Preparazione tampone acetato 10mM avente pH 5,08

Per la preparazione del tampone acetato a pH 5,08 sono state utilizzate soluzioni di acetato di sodio e di acido acetico preparate appositamente, mescolandole tra di loro sotto agitazione costante e monitorando costantemente il pH.

5.8 Preparazione delle micelle e dei campioni per le analisi al DLS e al fluorimetro

Per la preparazione delle micelle sono stati pesati 6 mg di uno dei copolimeri a blocchi presi in esame precedentemente, sono stati disciolti in una provetta in 0,5 mL di THF e riscaldato leggermente con la pistola termica per favorire la dissoluzione del copolimero.

Nel caso delle micelle col copolimero funzionalizzato e contenenti il Nile Red sono stati prima aggiunti 0,05 ml di una soluzione di Nile Red in THF avente titolo 0,4 g/L e poi sono stati aggiunti i restanti 0,45 mL di THF.

Successivamente sono stati aggiunti 5 ml goccia a goccia di acqua milliQ o della soluzione tampone acetato a pH 5,08 10mM precedentemente preparata.

Dopo l'aggiunta della soluzione acquosa, le sospensioni ottenute sono state dializzate tre volte nella stessa soluzione con cui è stata diluita la soluzione di copolimero in THF per eliminare completamente il solvente organico.

Dopo l'ultima dialisi la sospensione è stata filtrata usando una siringa usa e getta da 5 ml ed un filtro in PTFE da 0,45 μm .

Per le diluizioni è stata utilizzata una micropipetta Eppendorf con capacità dai 100 µl ad 1 mL.

Per la preparazione delle varie diluizioni sono stati prelevati 2 mL della sospensione micellare precedente e sono state diluite con 2 mL della soluzione acquosa con cui sono state preparate le micelle.

Dopo che sono state eseguite le diluizioni, le sospensioni sono state lasciate a riposo per almeno 24 ore per garantire la stabilizzazione delle micelle.

Per la preparazione dei campioni per la misura col fluorimetro sono stati prelevati 100µL della soluzione 6×10^{-7} M del pirene disciolto in acetone con micropipetta Eppendorf e sono stati versati in boccettini kartell. A questo punto l'acetone è stato lasciato evaporare.

È stato prelevato 1 mL di una delle sospensioni micellari preparate per le misure al DLS e versato in uno dei boccettini in cui è stata versata la soluzione del pirene.

Si è aspettato almeno 48 ore per poter favorire così l'assorbimento del pirene da parte delle micelle.

Trascorse le 48 ore, sono state eseguite le misure fluorimetriche.

6. Bibliografia

1. Moad, G.; Solomon, D. H. *The Chemistry of Radical Polymerization*, 2nd ed.; Elsevier: Oxford, U.K., 2006; pp 1-9.
2. Moad, G.; Chiefari, J.; Krstina, J.; Postma, A.; Mayadunne, R. T. A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. Living free radical polymerization with reversible addition fragmentation chain transfer (the life of RAFT). *Polym. Int.*, 49, 2000, 993–1001.
3. Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polymer*, 49, 2008, 1079.
4. Chong, Y. K.; Krstina, J.; Le, T. P. T.; Moad, G.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules*, 36, 2003, 2256
5. Boyer, C.; Volga, B.; Davis, T.P.; Ladmiral, V.; Liu, J.; Perrier, S.; *Chem.Rev.*, 109, 2009, 5402-5436.
6. Hans-Jürgen, B.; Karlheinz, G.; Michael, K.; *Physics and Chemistry of Interfaces*, Wiley-VCH, pp 246-247, chapter 12.
7. N. Israelachvili, J.; *Intermolecular and surface force*, Elsevier Inc.; pp 512-513, chapter 19.
8. N. Israelachvili, J.; *Intermolecular and surface force*, Elsevier Inc.; pp 519, chapter 19.
9. Shi, Y.; Qun Luo, H.; Bing Li, N.; *Spectrochimica Acta Part A*, 78, 2011, 1403–1407.
10. Natalini, B.;Sardella, R.; Gioiello, A.;Ianni, F.; Di Michele, A.;Marinozzi, M.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 2014, 62– 81.
11. Zdziennicka, A.; Szymczyk, K.; Krawczyk, J.; Janczuk, B.; *Fluid Phase Equilibria*, 322– 323, 2012, 126– 134.
12. <http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/default.aspx>
13. Topel, Ö.; Acar Çakır, B., Budama, L.; Hoda, N.; *Journal of Molecular Liquids*, 177 ,2013, 40–43.
14. Zhu, Q.; Huang, L.; Su, J.; Liu, S.; *Chem. Commun.*, 2014, 50, 1107.
15. Prazeres, T.J.V.; Beija, M.; Fernandes, F.V.; Marcelino, P.G.A.; Farinha, J.P.S.;Martinho, J.M.G.; *Inorganica Chimica Acta*, 381, 2012, 181–187
16. *Journal of Colloid and Interface Science* 258 ,2003, 116–122

17. <http://www.attension.com/applications/measurements/critical-micelle-concentration>.
18. Aguiar, J.; Carpena, P.; Molina-Bolívar, J.A.;Carnero Ruiz, C.; Journal of Colloid and Interface Science, 258, 2003, 116–122
19. Fuguet, E.;R`afols, C.; Ros´es, M.; Bosch, E.; Analytica Chimica Acta, 548, 2005, 95–100.
20. Anand, U.; Jash, C.; Mukherjee, J.; Journal of Colloid and Interface Science, 364, 2011, 400–406.
21. Hua Tan, C.; Jian Huang, Z.; Guang Huang, X.; Analytical Biochemistry, 401, 2010, 144–147.
22. Gao, Q.; Liang, Q.; Yu, F.; Xuc, J.; Zhaoc, Q.; Sun, B.; Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 88, 2011, 741– 748.
23. Dom´ınguez, A.; Fern´andez, A.; Gonz´alez, N.; Iglesias, E.; Montenegro, L.; Journal of Chemical Education, Vol. 74, No. 10, October 1997.
24. Simonovic, B.R.; Momirovic, M.; Mikrochimica acta 127, 1997, 101-104.
25. Nakashima, T.; Anno, T.; Kanda, H.; Sato, Y.; Kuroi, T.; Fujii, H.; Nagadome, S.; Sugihara, G.; Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 24, 2002, 103-110.
26. Universit`a degli studi di Padova; Dipartimento di Ingegneria Industriale; Tesi magistrale in ingegneria chimica e dei processi industriale; *Studio delle dinamiche della concentrazione intracellulare di glucosio mediante nano sensori fret in piattaforme microfluide integrate* ;AA:2011/12; Relatore: Elvassore, N.; Correlatore Zambone, A.; Candidato:Padovan, G.
27. Benaglia, M. ; Alberti,A.; Giorgini,L. ; Magnoni, F.; Tozzi, S.; Polym. Chem., 4,2013, 124