

**Corso di Laurea specialistica  
In Scienze dei materiali**

Tesi di laurea

**STUDIO DI SISTEMI  
A BASE DI SILICE  
PER APPLICAZIONI  
BIOMEDICHE**

**Relatore:**

Alvise Benedetti

**Laureando:**

Matteo Testi

Matricola: 811019

**Anno accademico**

**2011/2012**



# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>4</b>
1.1	Drug delivery . . . . .	6
1.1.1	Imaging . . . . .	10
1.2	Problematiche . . . . .	11
1.3	Scopo della tesi . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Nano Carriers: MSN</b>	<b>16</b>
2.1	Sintesi Stöber templata . . . . .	20
<b>3</b>	<b>PEGylation</b>	<b>26</b>
3.1	Modelli teorici . . . . .	28
3.1.1	Teoria SCMF, Single Chain Mean-Field . . . . .	31
3.1.2	Teoria DLVO . . . . .	33
3.2	PEG . . . . .	35
3.2.1	Degradazione termica . . . . .	36
3.2.2	Chimica di coniugazione del PEG . . . . .	36
3.3	PEGylation su MSN . . . . .	38
3.3.1	La densità superficiale di catene . . . . .	39
3.3.2	Spessore dello strato di PEG . . . . .	40
3.3.3	Conformazione dello strato polimerico . . . . .	41
3.4	Processi di PEGylation . . . . .	43
3.4.1	GRAFTING FROM . . . . .	46
3.4.2	GRAFTING TO . . . . .	47
3.4.3	PEGylation diretta, intrappolamento e co-condensazione . . . . .	52
<b>4</b>	<b>Parte sperimentale</b>	<b>54</b>
4.1	Reagenti utilizzati . . . . .	54
4.2	Procedura di sintesi:MSN . . . . .	55
4.3	Procedure di sintesi: PEGylation . . . . .	55
4.3.1	Procedura ONE STEP . . . . .	56
4.3.2	Procedura TWO STEP . . . . .	58
4.3.3	Procedura di CO-CONDENSAZIONE . . . . .	59
4.4	Strumenti di caratterizzazione . . . . .	60

---

<b>5</b>	<b>Risultati e discussione</b>	<b>61</b>
5.1	Caratterizzazione: MSN . . . . .	61
5.2	Caratterizzazione: PEG-Silano . . . . .	65
5.3	Caratterizzazione: ONE STEP . . . . .	67
5.4	Caratterizzazione: TWO STEP . . . . .	76
5.5	Caratterizzazione: Co-condensazione . . . . .	82
5.6	Prove di stabilità . . . . .	88
<b>6</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Appendici</b>	<b>94</b>
7.1	<b>FT-IR</b> . . . . .	94
7.2	<b>DLS</b> . . . . .	97
7.3	<b>Tecnica Adsorbimento-Desorbimento di gas</b> . . . . .	101

# Capitolo 1

## Introduzione

Oggi il prefisso *nano*, è diventato estremamente popolare nel mondo della ricerca scientifica, anche se molto spesso è facile che se ne abusi. Il termine si riferisce alla possibilità di manipolare, studiare e controllare la materia, sia organica che inorganica nella dimensione dei nanometri ( $10^{-9}$  m); ciò che ne consegue è la possibilità di elevare a nuovi livelli il progresso umano in qualsiasi campo tecnologico.

I primi approcci a questa nuova frontiera della scienza, si fanno risalire a *Richard Feynman*, che in una sua celebre lezione *There's plenty of room at the bottom*[1] ( *C'è un sacco di spazio giù in fondo*), tenutasi nel 1959, ha analizzato l'idea di poter manipolare su scala atomica/molecolare la materia, in pratica rovesciando l'ordinario concetto di sintesi *top-down*, in quello *bottom-up* ovvero la progettazione e la costruzione di nuovi tipi di materiale direttamente dalle basi, cioè dagli atomi e dalle molecole.

Negli anni successivi, questo concetto è stato più volte ripreso creando e ridefinendo nuovi settori della scienza moderna: sia della ricerca di base, sui nuovi problemi che emergono alle scale del nanometro, che di quella applicativa, finalizzata agli aspetti di processo e sintesi dei sistemi nanometrici.

Il campo applicativo che sviluppa le applicazioni della *nano-scienza* è la **nanotecnologia**, che raccoglie le innovazioni e le ricerche apportate dalla miniaturizzazione nei vari campi in cui si divide la scienza: biologia, chimica, fisica, scienza dei materiali, . . .

I nanomateriali, sono quell'insieme di sistemi non necessariamente di dimensioni nano, ma costruiti o sintetizzati con un controllo della struttura al livello del nanometro. Seguendo questa definizione entrano a far parte di tale insieme vari tipi di materiali nano-strutturali, come alcuni tipi di fibre, materiali ibridi o nanoparticelle, la loro peculiarità sta nel manifestare proprietà, sia fisiche che chimiche, che non possiedono nelle loro forme

macroscopiche; ciò, è dovuto principalmente:

- al confinamento spaziale degli elettroni e alla conseguente discretizzazione delle loro energie;
- all'elevata area superficiale di questi materiali, e quindi al maggior peso delle interazioni di superficie rispetto a quelle di *bulk*.

Questi sistemi sono sicuramente conosciuti da tempi più antichi rispetto al celebre discorso di *Feynman*, basti pensare alle soluzioni metalliche colloidali che preparava Michael Faraday nel lontano 1857 [2], che non erano altro che nanoparticelle metalliche (di oro e argento) di dimensioni nanometriche le quali sviluppavano proprietà ottiche differenti dalla forma *bulk* del metallo. Tuttavia non si era compreso completamente il problema, tanto che tutt'ora lo studio su vari tipi di nanoparticelle riveste un ruolo centrale in molti campi: dalla cosmesi ai materiali nanocaricati, dalle vernici ai lubrificanti, dove il loro apporto migliora le caratteristiche meccaniche, fisiche e chimiche del materiale di partenza.

La natura di questi materiali può essere estremamente variegata, infatti i composti utilizzati per questi sistemi spaziano dai metalli, agli ossidi fino alle strutture organiche. Ciò che accomuna questi sistemi è la loro grande versatilità d'applicazione che dimostrano, supportata dalla possibilità di modificare le loro caratteristiche chimico-fisiche direttamente nella fase di sintesi. Inoltre, esiste una vasta letteratura che tratta la possibilità di funzionalizzare chimicamente la superficie di questi materiali per svilupparne o variarne vari tipi di comportamento, in particolare, quelli legati alle interazioni con altre nano strutture e la compatibilità con diversi sistemi macroscopici.

Negli ultimi anni, parallelamente alla ricerca sulle proprietà di queste strutture, si è assistito a un forte sviluppo di nuove tecniche di sintesi, che tutt'oggi permettono d'ottenere sistemi nanometrici garantendo un ottimo controllo della loro struttura in differenti condizioni.

La scienza medica non poteva essere esclusa dalle innovazioni portate dalla nano tecnologia, grazie a cui è possibile produrre sistemi nanometrici compatibili con il corpo umano e di dimensioni comparabile, se non addirittura più piccole delle stesse cellule; tali strutture hanno aperto la strada a nuove e più efficaci terapie per la cura di diverse malattie. Pertanto, è facile comprendere perché importanti istituti di ricerca sponsorizzino generosamente diversi programmi di studio sull'applicazione bio-mediche delle nanotecnologie, in particolare sullo sviluppo di sistemi nano particellari [3]; inoltre, si può facilmente verificare come questa tematica sia sempre più d'interesse globale dal numero di nuove riviste specializzate che negli ultimi anni sono nate sull'argomento [4].

La branca della scienza medica che si occupa di questi studi è chiamata **nano-medicina**, e tratta lo sviluppo di sistemi nanometrici per la strategie di **diagnosi, trattamento e prevenzione** delle malattie.

Il potenziale medico di queste applicazioni è rivoluzionario; diventa possibile combattere malattie, prima poco trattabili, agendo con nuove strategie di cura, come il rilascio mirato di medicinali, o mediante nuovi tipi di diagnostica eseguita con nanosistemi, che reagiscono selettivamente con il tessuto malato e generano maggior contrasto grazie alle tecniche di *imaging* (le quali verranno descritte successivamente), oppure con l'innesto di una nuova generazione di protesi con caratteristiche meccaniche superiori, unite ad una maggior compatibilità con il corpo umano.

I possibili sviluppi futuri, comunque, sono ancora più incredibili: teoricamente è possibile creare delle nano-macchine capaci di muoversi liberamente nel flusso sanguineo, monitorando e riparando lesioni direttamente dall'interno del corpo umano [5]; la realizzazione di

questi sistemi sarà sicuramente lunga e laboriosa, richiederà un approccio multidisciplinare al problema e di certo appartiene a un tempo futuro, che però, pare non molto lontano dal nostro.

In linea generale, la ricerca che si sta sviluppando, è focalizzata sull'applicazione di sistemi esclusivamente nano-particellari, per potenziare due diverse strategie di trattamento e diagnosi: il *drug delivery* e l'*imaging*, che saranno illustrate brevemente nei prossimi capitoli.

## 1.1 Drug delivery

Per *Drug Delivery* si intende l'incapsulazione di un farmaco in un *nano carriers* appositamente studiato, al fine d'aumentarne l'efficacia medica. L'idea di base è che il farmaco, invece di essere somministrato nel paziente in elevata quantità affinché raggiunga la parte malata del corpo a una concentrazione ottimale, venga inserito all'interno di un *carrier*, o vettore farmacologico, che tenderà a concentrarsi nel punto in cui si desidera il rilascio del medicinale. In questo modo la quantità di principio attivo utilizzata è decisamente inferiore, riducendo i possibili effetti collaterali indotti dalla cura nel paziente e abbattendo i costi. Questa strategia permette di somministrare anche farmaci, come quelli proteici, che non possono essere ingeriti a causa della denaturazione che subiscono nell'ambiente acido dello stomaco, o anche, in generale per via *parenterale* dove possono subire una veloce metabolizzazione ed eliminazione. La farmacocinetica di questo tipo di medicinali può essere incrementata dall'incapsulazione in adeguati vettori farmacologici, che ne controllano il rilascio, mantenendo contemporaneamente la stabilità chimica del farmaco.[6]

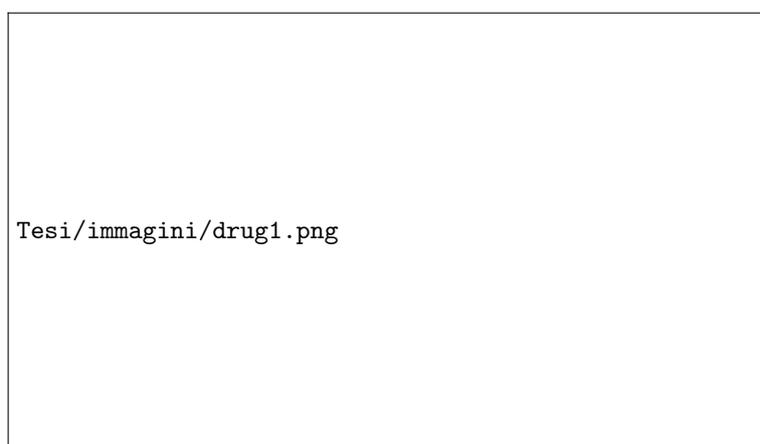


Figura 1.1: Esempio di nanoparticelle con funzione di *Drug Delivery*

In genere, i sistemi usati per il *drug delivery* possono essere schematizzati dall'esempio riportato in fig. 1.1, dove un farmaco viene caricato all'interno di un vettore farmacologico; tale vettore è funzionalizzato superficialmente con vari tipi di biomolecole allo scopo di implementare proprietà *stealth* o di *targeting* all'intero sistema.

I *carrier* sono costituiti da vari tipi di sistemi. I più diffusi sono:

**LIPOSOMI** Sono nanostrutture vescicolari di natura organica, costituiti da fosfolipidi e molecole di colesterolo. La loro particolarità è di mantenere all'interno un ambiente idrofilico in cui possono essere disciolti/dispersi vari *drug*. Data l'alta affinità che questo tipo di strutture possiedono con le membrane cellulari, rappresentano un efficiente veicolo per l'inserimento di composti chimici direttamente nell'ambiente cellulare, inferiore solo alle nanoparticelle di tipo virale; inoltre, sono dei vettori capaci d'evitare l'interazione con organi particolarmente sensibili (come fegato, cervello, cuore, . . .).[7]

Le limitazioni di questi sistemi sono dovute all'estrema fragilità delle strutture liposomiche e alla bassa capacità di trasporto nel caso di farmaci poco solubili in ambienti acquosi, che stazionano se pur in minima quantità nel doppio strato del liposoma.[8] Nonostante ciò, sono i primi sistemi ad aver superato i test clinici e sono già presenti in commercio dato sono stati i primi ad essere studiati fin dagli anni 70'.

**DENDRIMERI** I dendrimeri sono strutture polimeriche iper-ramificate, di dimensione perfettamente controllabile grazie al particolare processo di sintesi con cui vengono generate. Variando il monomero o usandone di diversi tipi, è possibile modificare i gruppi terminali del dendrimero e influenzare in tal modo il suo comportamento idrofilo/idrofobo e le sue possibili funzionalizzazioni. Inoltre è possibile intrappolare nella loro struttura varie molecole.[9]

**MSN, Mesoporous silica nanoparticles** L'uso di questi sistemi è relativamente nuovo rispetto ai precedenti. Le nanoparticelle, di natura inorganica sono semplici sfere di silice prodotte mediante una sintesi templata; una volta eliminato il composto-stampo per calcinazione o estrazione chimica, si ottiene una struttura altamente porosa capace di trattenere vari tipi di composti chimici e con svariate tipologie di funzionalizzazione.

Questo tipo di strutture sono diventate oggetto di notevole interesse dato che è possibile controllare molto bene la morfologia della particella finale e non presentano tossicità cellulare.[10]

**Nanoparticelle virali** Si tratta di virus ingegnerizzati in modo tale che attacchino solo le cellule malate del corpo, replicandosi in queste e provocando la morte della cellula, in genere si parla di *virus oncolitico*.

Questi sistemi possono trasportare al loro interno varie molecole, esplicando funzioni di puro *drug delivery* ma anche di terapia genica (nel caso vi sia trasporto di materiale genetico).[7]

Ognuno di questi sistemi presenta pregi e difetti che vanno presi in debita considerazione una volta applicati negli ambienti fisiologici.

Oltre al tipo di struttura, vi è anche la possibilità di regolare il rilascio del farmaco dal sistema di *drug delivery* mediante stimolazione esterna o in presenza di un adeguato ambiente (come una variazione di pH). In questo caso si usano particolari polimeri detti *smart* capaci di modificare il loro comportamento idrofobo/idrofilo a valori regolabili di  $pK_a$ ; in tal modo si varia la capacità di diffusione del principio attivo dal nano vettore all'ambiente esterno.[7]

I vari vettori farmacologici studiati fino a oggi, possono essere catalogati in tre principali gruppi a seconda delle loro funzioni e delle diverse implementazioni che si sviluppano per superare particolari problematiche.

La cosiddetta prima generazione è la più semplice e intuitiva; raccoglie tutti i nano sistemi con funzione di *carrier* più semplici, senza nessun'altra funzionalità. Questi, si concentrano nei siti malati a causa della differenza tra la vascolarizzazione di queste zone rispetto a

quelle sane.

La seconda generazione, è costituita da quei sistemi con alcune funzionalità in più rispetto alla precedente categoria. Queste funzionalità addizionali possono servire a guidare le nanoparticelle verso particolari tessuti del corpo, a introdurre un controllo esterno sul rilascio del medicinale trasportato oppure a contribuire al contrasto nelle immagini di alcune procedure di *imaging*.

Con la terza generazione si cerca di costruire un sistema *multi-stage*, detto LEV (*Logic Embedded Vectors*), dove all'interno di un vettore vi siano altri vettori più piccoli. Con un sistema di questo tipo si può operare in modo tale che il *BUS-vettore* attacchi dei siti vascolari prossimi ai tessuti malati, mediante una sua funzionalizzazione selettiva, per poi riversare in quel punto il proprio contenuto di nano-carrier, i quali come risultato, raggiungono in maggior quantità la zona del corpo malata.[8]

Fin qui sono state descritte brevemente le principali strutture usate per il *drug delivery*; per quanto riguarda invece i farmaci incapsulati in questi *carrier*, rientrano in questa categoria anche composti che non agiscono per via strettamente biologica, o comunque che non sono medicinali nel senso stretto della parola. Tra questi vi sono quei composti che non agiscono direttamente sul metabolismo della cellula o sulle sue funzioni, ma che operano un effetto indiretto quando stimolati da un segnale esterno; fra questi vi sono alcuni composti che rilasciano specie chimiche particolarmente aggressive al fine di uccidere le cellule o una porzione di tessuto malato, oppure altri sistemi, come alcune nanoparticelle metalliche, che inducono un riscaldamento localizzato sempre allo stesso scopo. Nel caso in cui queste specie chimiche siano delle molecole foto-reattive, e che quindi abbiano la possibilità di rispondere a uno stimolo radiativo esterno, si parla di *Photodynamic therapy (PDT)*; in particolare sta ottenendo notevole successo l'incapsulazione di composti foto-attivi che, mediante l'assorbimento di particolari radiazioni elettromagnetiche, producono molecole di ossigeno reattivo (ROS), capaci di danneggiare irreparabilmente le cellule che si trovano vicine.

Veicolando queste molecole con opportune strategie di *drug delivery e imaging*, è possibile sfruttare questo fenomeno per curare tessuti malati di tumore, uccidendone le cellule malate.[11]

Guidare questi nano-sistemi verso un obiettivo preciso, come una cellula malata, resta ancora il *Sacro Graal* per la nano medicina [12], anche se molti importanti passi in avanti sono stati fatti.

**Targeting** Queste nanoparticelle da sole, sono in grado d'esplicare le loro funzioni di *drug delivery e imaging*, ma se utilizzate come tali, non riescono a concentrare le loro funzioni nelle zone malate del corpo umano. La mancanza di una sorta di *guida*, viene risolta mediante una funzionalizzazione superficiale con determinate molecole, o recettori, capaci di fornire alle nanoparticelle un grado più o meno elevato di selettività rispetto a determinati tessuti del corpo, in particolare con quelli malati.[13]

In questo modo, i sistemi di *delivery* presenti nel flusso sanguigno riconoscono i tessuti malati e vi si legano, concentrandosi via via nel tempo.

Si parla pertanto di *targeting attivo*, a differenza del *targeting* di tipo **passivo**.

Il *targeting* passivo corrisponde al fenomeno che prende il nome di *enhanced permeability and retention (EPR)*, tipico in presenza di tessuti malati, in particolar modo, di tumore. In

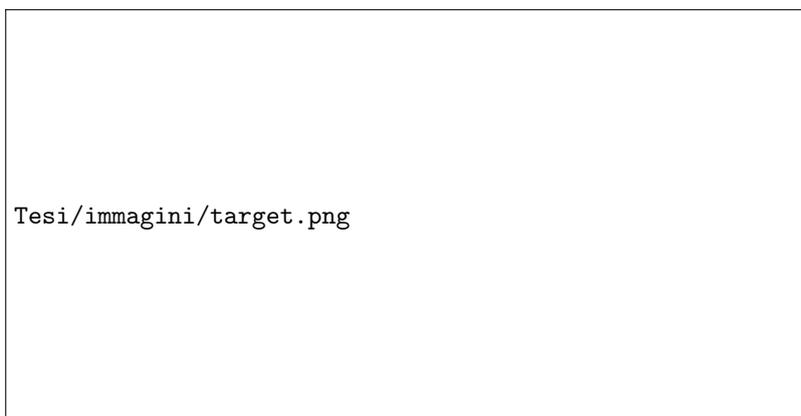


Figura 1.2: Esempio di alcune possibili strategie di *targeting*, in particolare è riportata la differenza che esiste fra *targeting* di tipo attivo e *targeting* di tipo passivo; le prime due immagini rappresentano *targeting attivo*, nel caso riportato nella figura a sinistra si tratta di un *targeting* vascolare, dove i vettori farmacologici si legano selettivamente alle biomolecole espresse dalle cellule che costituiscono la parete vascolare, mentre la figura al centro rappresenta un *targeting* tumorale dove i *carriers* hanno interazione specifica con le cellule di tipo tumorale. L'ultima immagine a destra rappresenta un *targeting* di tipo passivo dove i vettori farmacologici si concentrano all'interno del tumore grazie al fenomeno EPR.

queste zone, la malattia stimola la crescita del sistema vascolare per aumentare la quantità di nutrienti di cui può usufruire. In tal modo, il tessuto malato presenta un'elevata ma allo stesso tempo disordinata vascolarizzazione, caratterizzata da una diversa permeazione dei vasi sanguigni rispetto al resto del corpo. Queste vene e arterie risultano permeabili a diversi tipi di particelle, in particolare ai vettori farmacologici, che possono permeare via via nel tempo all'interno del tessuto malato, come si può vedere nella figura 1.2. Il risultato finale è che si viene a generare un'elevata concentrazione dei sistemi di *delivery* nei pressi della zona interessata dalla malattia, anche senza la presenza di elementi di *targeting* attivo.[7, 14]

Mentre il *targeting* passivo non richiede alcun tipo di modifica del vettore, quello di tipo attivo necessita di una sua funzionalizzazione. Ciò, significa legare sulla superficie della nanoparticella un particolare gruppo funzionale, scelto sulla base del tipo di bersaglio con cui deve essere selettivo.

Questi gruppi possono essere di diversa natura, dal semplice acido folico (selettivo per diverse cellule del cancro) a strutture ben più complesse come anticorpi o proteine.[15]

I lavori scientifici in questo campo non prevedono unicamente la ricerca del gruppo che manifesta la miglior selettività con il *target*, ma trattano anche lo studio dei vari processi di funzionalizzazione superficiale dei nano vettori. Quest'ultimo punto è molto importante a causa della stabilità effimera che possiedono molte di queste molecole; pertanto, la chimica che tratta questi processi deve essere compatibile con questi gruppi, riuscendo ad ancorarli alla superficie delle nanoparticelle ma allo stesso tempo preservandone la loro naturale attività biologica.[8, 16]

Il *targeting* di tipo attivo può essere selettivo per diversi obiettivi nel corpo umano, da vari tipi di tessuto umano (distinguibili secondo l'espressione proteica che manifestano

sulla superficie), a un particolare tipo di cellule nel sangue, come per esempio i macrofagi dove il deposito selettivo (*targeting*) di adeguati vettori farmacologici permette di portare il farmaco nelle zone del corpo dove sono presenti infezioni o malattie, sfruttando i macrofagi come un ulteriore vettore.[4]

### 1.1.1 Imaging

Con il termine *imaging* o *imaging biomedico* si intende l'insieme di tecniche volte al riconoscimento e alla diagnostica di tumori e altre malattie umane attraverso la rilevazione delle variazioni dei parametri fisici dei tessuti malati rispetto a quelli sani. Grazie a queste tecniche è possibile eseguire controlli non invasivi, veloci e con un alto livello di dettaglio.

Le principali tecniche di *imaging* sono:

- Scintigraphic Imaging,
- Magnetic Resonance Imaging,
- Positron Emission Tomography,
- Single Photon Emission Computed Tomography,
- Computed Tomography,
- Ultrasonography[17]

Le tecniche di *imaging* vengono condotte mediante l'uso di agenti di contrasto. Questi composti sono diventati molto importanti nella moderna medicina e sono oggetto di svariate studi nel campo biomedico.

Un agente di contrasto è definito come un composto chimico che fa risaltare un segnale (solitamente si tratta di una variazione d'intensità della grandezza fisica legata alla tecnica di *imaging* utilizzata) della zona interessata alla tecnica di *imaging*, differenziando in modo evidente la struttura d'interesse rispetto ai tessuti che la circondano; in tal modo è possibile evidenziare eventuali anomalie, che in assenza del mezzo di contrasto non sarebbero rilevabili.

Le principali specie chimiche che migliorano il contrasto sono di diversa natura e dipendono dal tipo di tecnica di *imaging* presa in considerazione; per esempio, le tecniche di risonanza magnetica utilizzano agenti di contrasto con spiccate proprietà magnetiche, altre sfruttano particolari emissioni o assorbimenti di fotoni o addirittura, decadimenti radioattivi.

L'*imaging* è un'altra tecnica utilizzata in medicina che può giovare delle nanotecnologie.

In genere, la principale nano-applicazione in questo campo riguardano la sintesi di nanoparticelle capaci di fornire un elevato contrasto nelle tecniche spettroscopiche o di risonanza nucleare.

La struttura di questi nano-sistemi è molto simile a quella vista in fig. 1.1; la differenza significativa sta nel tipo di composto o struttura contenuta all'interno del sistema, si veda la fig. 1.3, che deve essere funzionale al tipo di tecnica d'*imaging* utilizzata. In genere,



Figura 1.3: Esempio della struttura di una nanoparticella con funzione di *imaging*.

sono composti da elementi a elevato peso molecolare, come Iodio e Bario, oppure da specie esotiche come diversi tipi di isotopi, fino ai più recenti composti con caratteristiche nano, come quantum dot (caratterizzati dal fenomeno della risonanza plasmonica di superficie (SPR), controllabile in fase di sintesi di questi sistemi), nano shell o semplici nanoparticelle di metallo o d'ossidi di metallo. [13]

Questi composti non possiedono l'abilità di accumularsi selettivamente nella zona da analizzare perciò richiedono l'accoppiamento con strategie di drug delivery, associato a una specifica funzionalizzazione (*targeting*).

Al momento, esistono vari articoli che trattano l'incapsulazione di diversi agenti di contrasto in altrettante tipologie di nano vettore. Si va dai già citati liposomi alle nanoparticelle polimeriche e dendrimeri. [17]. Negli ultimi anni si è affacciata la possibilità di usare come vettore di agenti di contrasto anche delle nanoparticelle di silice mesoporose, con ottimi risultati dal punto di vista di controllo della struttura e della stabilità.[15, 18]

Recenti sviluppi hanno riguardato la possibilità di rendere queste nanoparticelle multifunzionali, ovvero, di sintetizzare nano vettori con funzione non solo di *drug delivery* ma capaci anche d'esprimere funzioni di *imaging* e *targeting*. Quest'approccio prende il nome di **Teranostica**, derivante dall'unione delle parole terapia e diagnostica.

Le strutture come le MSN, sono potenzialmente delle ottime candidate per questo approccio, grazie all'elevata porosità che le contraddistingue e alle svariate funzionalizzazioni che vi si possono applicare.[9, 15, 19]

## 1.2 Problematiche

Al di là delle conseguenze sulla salute dell'uomo dovute alle specifiche dimensioni utilizzate, le nanotecnologie presentano diversi problemi di tipo tecnologico, tutt'ora oggetto d'intenso studio. Nello specifico, lavorare con nano-sistemi a scopo bio-medico significa operare molto spesso con sospensioni ed emulsioni in soluzioni fisiologiche. Queste soluzioni sono caratterizzate da elevata forza ionica (a causa della presenza di ioni disciolti)

e dalla presenza di proteine, che compromettono la stabilità colloidale di diversi tipi di nanoparticelle.

La presenza di ioni determina un aumento della forza ionica del mezzo in cui sono disperse le nanoparticelle, riducendo o addirittura azzerando la stabilità di tipo elettrostatico tipico di alcune strutture come la silice; la presenza di proteine invece, determina un assorbimento, sia selettivo che non, sulla superficie di questi sistemi, favorendone aggregazione e riconoscimento da parte di cellule specializzate nelle sperimentazioni *in vivo*. [20]

In particolare, il corpo umano riconosce immediatamente la presenza di agenti estranei all'interno del flusso sanguigno.

Questo significa che tutte le tipologie di nano sistemi devono sviluppare un certo grado di bio-compatibilità, altrimenti risulterebbero velocemente eliminate dal corpo senza poter esprimere la loro funzione. Il parametro che più è influenzato dalla stabilità fisica dei sistemi nano-particellari è il tempo di vita medio che queste manifestano prima di venire espulse o distrutte dal sistema immunitario del corpo ospite.

Se un nano-carrier manifesta dei bassi tempi di vita, significa che i farmaci o gli agenti di contrasto che trasporta non riescono a concentrarsi nelle zone malate nella minima quantità richiesta, fallendo così il loro compito.

Sviluppare questo aspetto, permette d'aumentare l'efficienza delle strategie di *drug delivery* anche solo mediante *targeting* passivo, senza ricorrere a specifici tipi di *targeting* attivo, più complicanti e costosi da usare. Lo stesso fenomeno dell'EPR richiede che i nano-vettori garantiscano un minimo tempo di vita all'interno del corpo umano. [12]

Nell'ambito biomedico, i principali fenomeni che limitano il tempo di vita di questi nano-sistemi sono legati al sistema immunitario del corpo in cui vengono iniettate le nanoparticelle: l'assorbimento superficiale e non specifico delle proteine del siero umano (HSA), il processo di fagocitosi che ne consegue (da parte del RES, *reticuloendothelial system*) e l'emolisi causata dalle cellule del sangue. [21] Questi processi vengono raccolti sotto uno stesso fenomeno chiamato *opsonizzazione*. [22]

Le componenti del sangue capaci d'eliminare le nanoparticelle sono i macrofagi, cellule incaricate d'inglobare nel loro ambiente interno i corpi estranei e di distruggerli. Queste cellule non hanno la capacità d'identificare direttamente i corpi estranei, ma sfruttano un altro fenomeno in maniera molto intelligente. Se una qualsiasi particella estranea entra nel flusso sanguigno, viene immediatamente ricoperta da alcune proteine, dette *opsonine*, che si trovano libere nel sangue; questo adsorbimento è di tipo fisico, non richiede un vero e proprio legame chimico, ma è sufficiente affinché la proteina non si stacchi dalla superficie della particella. Successivamente, i macrofagi presenti nell'ambiente, riconoscono le proteine legate alla particella e di conseguenza attaccano il corpo estraneo inglobandolo al proprio interno al fine di distruggerlo. Il riconoscimento, da parte dei macrofagi, delle opsonine assorbite è conseguenza della variazione della loro struttura tra la forma libera e quella legata; quest'ultima risulta essere attivata e selettiva con le funzionalizzazioni superficiali dei macrofagi. [22]

I fattori che determinano la bio-stabilità delle nanoparticelle nel corpo umano sono diversi e vanno dalle loro caratteristiche chimiche superficiali, alla loro forma e dimensione,

Il fattore determinante risulta senz'altro essere la composizione chimica della superficie delle nanoparticelle. A seconda dei gruppi funzionali presenti, è possibile che queste presentino una certa carica elettrostatica, originata dagli scambi ionici che avvengono lun-

go l'interfaccia particella-ambiente e un carattere idrofobico/idrofilo a seconda del tipo di struttura chimica presente in superficie.

Tali fenomeni determinano l'effettiva stabilità colloidale e biologica delle nano particelle.

La dimensione rappresenta per importanza il secondo parametro critico di questi sistemi, dato che influisce sulla diffusione nel sistema circolatorio delle particelle, sulla probabilità d'incorrere in fenomeni di cattura ed eliminazione e sulla facilità di permeare attraverso le pareti di vene e arterie. Oltre a ciò, la dimensione delle particelle discrimina su quale sarà il principale meccanismo d'eliminazione che dovranno subire le stesse nanoparticelle. Così per particelle di dimensioni inferiori ai 20 nm, la maggior parte dei *carriers* viene eliminata attraverso la filtrazione operata dai reni, mentre particelle più grandi, fino a 150 nm, possono concentrarsi in modo significativo in diversi organi come cuore, midollo osseo . . . . Particelle ancora più grandi fino ai 300 nm stazionano a lungo in fegato e milza, venendo eliminate esclusivamente attraverso le feci.

Nelle strategie di *drug delivery*, per rendere efficace ed efficiente il rilascio del farmaco, è necessario che le particelle abbiano dimensioni tali da superare ogni barriera che incontrano lungo il proprio percorso. In genere, 150 nm è la dimensione che permette di oltrepassare facilmente diversi tipi di barriere presenti nel corpo umano, ma esistono altri tipi di ostacoli che richiedono dimensioni decisamente inferiori, come nel caso della BBB (*Blood-brain barrier*) che permette il passaggio solo di particelle ancora più piccole (15-20 nm).[23]

La forma delle particelle è un altro fattore che influisce sui meccanismi di *drug delivery*. Il ruolo che hanno le forme dei nano sistemi, o gli effetti che inducono, non sono ancora totalmente chiari, principalmente perché non esistono semplici e veloci metodi per il controllo di questa caratteristica.

Si possono però ricavare diverse prove del fatto che la forma delle nanoparticelle influenza alcuni fenomeni. Per esempio, la degradazione di strutture sferiche dipenderà esclusivamente dalla loro dimensione, al contrario, nel caso di particelle asimmetriche, vi saranno porzioni della struttura con spessori diversi che quindi presenteranno un profilo di degradazione caratteristico.

La possibilità di mostrare diversi profili fisici rispetto al flusso sanguigno o ad alcune barriere umane, permette a questi sistemi di infiltrarsi in zone inaccessibili a *carrier* di dimensione analoghe, inoltre possono modificare la capacità di alcune proteine d'adsorbirsi superficialmente, perfino rallentando l'azione di fagocitosi dei macrofagi.[24]

E' chiaro che per l'applicazione di queste nanotecnologie in campo biomedico, si richiede uno studio approfondito dei problemi di compatibilità, allo scopo di migliorare la bio-stabilità di questi sistemi con l'ambiente all'interno del corpo umano. Bisogna tenere conto che, disperdere nel corpo umano questi nano-sistemi può causare importanti rischi di trombosi e occlusione delle vene e arterie, nel caso in cui queste strutture presentino scarsa stabilità biologica.[25]

Pertanto, sviluppare strategie per migliorare la stabilità di queste particelle è di fondamentale importanza, non solo per le applicazioni biomediche, come *drug delivery e imaging*, ma anche per evitare problemi di carattere medico.

Negli ultimi anni si sono succeduti molti studi per raggiungere tale obiettivo. Tra questi, la pratica di funzionalizzare la superficie delle particelle con specifiche molecole si è dimostrata molto valida.

Le funzionalizzazioni superficiali possono essere di diverso tipo e svolgere diversi compiti: dal già citato *targeting*, alla possibilità d'aumentare la facilità di dispersione di alcuni

sistemi in solventi non propriamente idonei, alla funzionalizzazione delle superfici interne dei *carrier*, allo scopo di aumentare la stabilità chimica e la quantità di farmaco o agente di contrasto da incapsulare, oppure, a funzioni di protezione, volte all'inibire i processi di aggregazione e flocculazione delle sospensioni di nanoparticelle.[26]

In quest'ultimo caso, in particolare, si è imposto con successo il processo di grafting del polimero PEG (polietilene glicole, detto anche PEO poli etilene ossido) sulla superficie delle nanoparticelle; tale tecnica prende il nome di **PEGylation**. [27, 28]

Il PEG incrementa l'idrofilicità delle particelle e ostacola l'adsorbimento superficiale delle proteine, causa della opsonizzazione, sviluppando un maggior tempo di vita in ambienti bio e rendendo perciò più efficace l'uso di questi *carrier* nelle strategie di *Drug delivery e imaging*. Inoltre, la presenza in superficie di uno strato polimerico, come nel caso del PEG, incrementa la stabilità colloidale delle dispersioni di nanoparticelle dato che introduce una repulsione di tipo sterico tra le particelle, utile in ambienti ad elevata forza ionica.

### 1.3 Scopo della tesi

L'obiettivo di questa tesi è lo studio della funzionalizzazione superficiale con Poli Etilen Glicole (PEG) di un sistema nano particellare per possibili applicazioni bio-mediche. Lo scopo di questo lavoro prevede lo sviluppo di proprietà *stealth* in nano-sistemi, per massimizzarne i tempi di vita negli ambienti bio e svilupparne una maggior stabilità colloidale in sospensione; il tipo di nanoparticella scelta come *carrier* da funzionalizzare è la silice mesoporosa, che verrà descritta nel capitolo successivo.

Le problematiche principali da affrontare in questo lavoro sono di diversa natura e riguardano vari aspetti sia della sintesi che dell'effettiva efficacia dei sistemi prodotti.

Il lavoro di questa tesi, approfondisce le varie tipologie di sintesi per la produzione di MSN *PEGylate*, concentrandosi principalmente sui vari processi di funzionalizzazione superficiale del polimero. Quest'ultimo punto è uno dei principali problemi affrontati nel lavoro; infatti, in letteratura sono riportate varie procedure per il *grafting* del PEG su altrettanti diversi tipi di strutture della silice (superfici, particelle hollow, piene, ...). Ciò che si rende necessario è rendere compatibili questi processi di *PEGylation* con la silice di tipo mesoporoso e indagando l'influenza del polimero sulle caratteristiche chimico-fisiche delle particelle, quali: carica superficiale, porosità e densità di *PEGylation*.

Il fine di questo lavoro non tratta solamente la produzione di questi materiali, ma ne prevede anche la verifica dell'effettivo sviluppo delle proprietà stabilizzanti, in particolare nelle soluzioni fisiologiche, quali PBS (*Phosphate buffered saline*).

Anche se in letteratura, i lavori che riguardano la *PEGylation* di nanoparticelle mesopore di silice sono molti, la maggior parte di questi non tratta la stabilità colloidale di questi sistemi in soluzioni fisiologiche, nonostante la grande importanza che stanno acquisendo nel panorama bio-medico.

Questo punto è essenziale per le future applicazioni mediche, dato che se venisse a mancare non permetterebbe d'eseguire le prove *in vitro*, essenziali per indagare l'effettiva potenzialità di questi sistemi in ambiente biomedico. Pertanto, il lavoro di questa tesi si è concentrato su:

- il tipo di polimero da usare: peso molecolare, dimensione, struttura (ramificato, lineare);

- sul tipo di procedura da seguire (one step, two step, co-condensazione);

con rilevante peso sull'aspetto della purificazione dei sistemi sintetizzati, dato che per gli ambienti biologici e cellulari molti reagenti e solventi adottati anche nella *soft-chemistry*, come può essere la sintesi Stöber, risultano essere particolarmente nocivi. In conclusione, si verificherà che i sistemi sintetizzati siano effettivamente disperdibili in soluzioni saline fisiologiche, e che rimangano stabili per un certo periodo minimo di tempo.

## Capitolo 2

# Nano Carriers: MSN

Nel capitolo precedente sono stati citati alcune delle strutture maggiormente studiate in ambito bio-medico: liposomi, dendrimeri, particelle virali, . . . Tra questi, le nanoparticelle di silice mesoporose (MSN, *Mesoporous Silica Nanoparticles*) rappresentano una delle strutture più promettenti nello sviluppo futuro di nuovi *carrier* per le strategie di *drug delivery*.

La silice è classificata dalla FDA, *Food and Drug Administration*, come *riconosciuta generalmente sicura* (GRAS, *generally recognized as safe*), pertanto è a pieno titolo un ottimo materiale per possibili applicazioni bio-mediche.

La struttura delle nanoparticelle e la stessa silice, risultano essere bio-compatibili con gli ambienti fisiologici, presentando una ridotta se non nulla tossicità, dato che non influenzano né la velocità di crescita delle cellule, nelle prove *in vitro*, né le loro membrane cellulari (e quindi non hanno influenza sulla vitalità cellulare). Questa inerzia biologica sembra mantenersi per molto tempo.[15, 29]

In molti articoli scientifici è possibile trovare questo materiale presente come semplice *shell* attorno a nano particelle di diversa natura, come metalli o semi metalli (nei *quantum dot*), allo scopo di sviluppare una stabilità fisica in queste strutture e di ampliare le possibilità di funzionalizzazione superficiale.[26].

Le ricerche e gli studi condotti invece su nano sistemi a base esclusivamente di silice hanno evidenziato come questo tipo di strutture siano in realtà delle piattaforme molto versatili. In particolare, risalta la loro capacità di integrare all'interno della loro matrice, in modo controllato, diverse funzionalizzazioni o nanomateriali con funzioni anche molto diverse tra loro, ottenendo in tal modo dei sistemi *lab-on-the-particle*. Oltre a farmaci è possibile inserire al loro interno anche altri nano-vettori per produrre i cosiddetti vettori della 3° generazione, descritti nel capitolo precedente.

Un altro punto di forza dei sistemi nanoparticellari di silice è la semplicità con cui è possibile controllare la morfologia delle particelle, variandone sia dimensioni che forme o

## 2. Nano Carriers: MSN

funzionalizzazione, agendo direttamente sulle variabili nel processo di sintesi.[30]

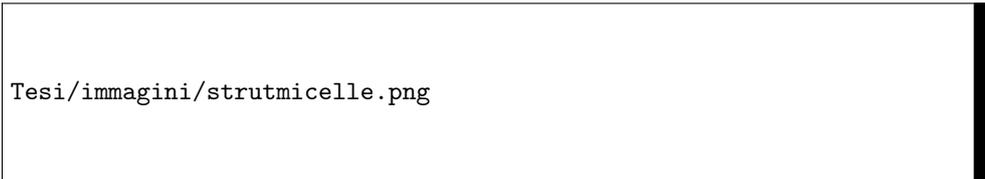
La caratteristica principale di queste strutture è l'elevato grado di porosità, la quale si manifesta con una vasta area superficiale, che può facilmente raggiungere valori di 1000 m<sup>2</sup>/g, e un elevato volume di vuoto, superiore anche a 1 cm<sup>3</sup>/g. Se sezionassimo una particella mesoporosa di silice ciò che osserveremo sarebbe una struttura non piena, ma intersecata in ogni suo punto da diversi pori che danno al materiale le sue caratteristiche porose. Come detto precedentemente, la dimensione di queste strutture porose e il loro arrangiamento sono controllabili in fase di sintesi.

La struttura dei pori varia dal tipo di nanoparticella in esame; esistono sistemi con pori perfettamente ordinati e disposti con simmetria esagonale mentre altri, senza alcun tipo di simmetria e altamente disordinati; questa differenza è alla base della classificazione di questi materiali.[29]

Le strutture conosciute commercialmente come MCM41, fanno parte della famiglia di silici con pori ordinati, identificate dalla sigla **M41S**; questi materiali sono presenti in letteratura già dai primi anni 90', periodo in cui la *Mobil* sperimentava la produzione di sistemi a base silice con l'inserimento di composti templanti durante la fase di sintesi. Il termine M41S in realtà, identifica un insieme molto più vasto di strutture, aventi pori a forma cubica (MCM-48) oppure lamellare (MCM-50).

Commercialmente sono anche presenti altre MSN, tra cui la famiglia di strutture classificate come SBA, sintetizzate in condizioni acide e con templanti non ionici (contrariamente alla famiglia M41S); anche in questo caso esiste una classificazione sulla base della morfologia dei pori, da geometria cubica (SBA-11), esagonale 3-D (SBA-12), lamellare (SBA-14), esagonale 2-D (SBA-15) e a gabbia cubica (SBA-16). Tra queste, la più interessante dal punto di vista applicativo è la SBA-15 che presenta struttura contemporaneamente mesoporosa e microporosa.

Nella figura 2.1 sono riportate alcune delle strutture in cui si può autoassemblare il tensioattivo, le quali svolgono il ruolo di template nella sintesi della silice mesoporosa.[31]



Tesi/immagini/strutmicelle.png

Figura 2.1: Vari tipi di strutture micellari: A.sferica; B.cilindrica; C.doppio strato planare; D.micella inversa; E.fase bi-continua; F.liposoma .

Tuttavia le strutture delle nanoparticelle di silice possono essere ancora differenti; esistono infatti, sistemi sempre a base silicea, cavi. Queste strutture, chiamate *Hollow silica nanoparticle*, sono costituite da un guscio di silice che racchiude uno spazio vuoto, adatto per funzioni d'incapsulamento di farmaci e agenti di *imaging*. [28, 32, 33]

Oltre a tutte le varie strutture fin qui citate, esistono anche delle nano particelle di silice che non presentano alcuna simmetria nell'impaccamento dei pori, anzi, fanno dell'elevato disordine una loro caratteristica identificativa. I pori somigliano a un aggroviglio di forme tubolari, come i solchi lasciati da un verme in una mela e per tale similitudine

## 2. Nano Carriers: MSN

---

vengono comunemente chiamati *worm-like* e classificati come KIT-1 [34].

Per quanto riguarda le dimensioni delle particelle, queste sono perfettamente controllabili ed è possibile spaziare da poche decine di nanometri a valori superiori del micro metro, agendo sulle condizioni chimiche in fase di sintesi. In ogni caso, questo parametro è dimensionato sulla base dell'applicazione bio-medica della nanoparticella, dato che la stessa dimensione influisce sulla velocità di diffusione nel sangue e sulla capacità di aderire alle pareti del sistema circolatorio. Inoltre, particelle di dimensioni troppo elevate vengono rapidamente eliminate dal sistema immunitario (in questo caso si parla di dimensioni fra i 1-5  $\mu\text{m}$ ).[24]

La forma è l'altro parametro fisico che è possibile modificare già in fase di sintesi. Particelle con forma diversa presentano diversi comportamenti, anche se pare non influisca sull'intrappolamento da parte del RES.

Da alcuni studi, invece, risulta che le zone del corpo in cui si accumulano le strutture di silice e lo stesso processo d'eliminazione delle particelle è forma-dipendente; così, mentre le particelle sferiche o a forma di un corto bastoncino si concentrano prevalentemente nel fegato, particelle di forma più allungata si depositano principalmente nella milza e sono caratterizzate da cinetiche d'eliminazione diverse.[15]

La possibilità di funzionalizzare le particelle è una delle principali caratteristiche della silice e uno dei punti di forza di questo materiale.

I gruppi chimici che si vanno a inserire sulla superficie della particella hanno diverse funzioni: introdurre un sito attivo che può essere usato come step intermedio per legare altre specie chimiche e svolgere particolari funzionalità come, *targeting* oppure di protezione.

I principali approcci per funzionalizzare la superficie di questi sistemi, si dividono in tre distinte metodologie:

**Co-condensazione** In questa procedura, le nano particelle vengono sintetizzate in presenza di diversi tipi di precursori, modificati con gruppi funzionali particolari, al fine di produrre strutture caratterizzate da multi funzionalità; alcuni esempi di questi composti sono riportati nella figura 2.2. Questo processo ha il vantaggio d'ottenere delle funzionalizzazioni omogenee sulle superfici delle particelle, inoltre, è possibile operare un controllo della carica superficiale della particella, variando i gruppi funzionali dei precursori utilizzati.

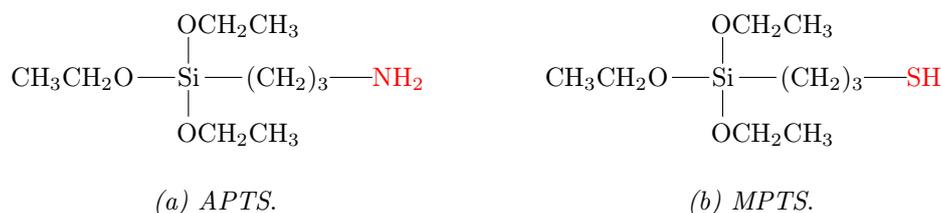


Figura 2.2: Alcuni precursori derivati dal TEOS, usati nella funzionalizzazione delle particelle di silice nel processo di co-condensazione.

**Grafting** La tecnica del *grafting* sfrutta la reattività dei gruppi ossidrilici liberi sulla superficie della silice. Tali siti, vengono usati come punto di ancoraggio per diversi tipi di funzionalizzazione, i quali formano legami covalenti in tal punto.

## 2. Nano Carriers: MSN

---

***imprint coating method*** In questa procedura, dei complessi metallo-legante, vengono aggraffati sulla superficie della silice mediante la formazione di un legame covalente fra la molecola del legante e la particella di silice. Quando viene eliminato lo ione metallico del complesso, le molecole di legante si trovano già nella conformazione adatta per legare altri ioni metallici dello stesso tipo; pertanto, questa procedura permette d'ottenere funzionalizzazioni molto più specifiche e selettive rispetto agli altri processi di *grafting*. [29]

Il tipo di gruppo funzionale, oltre che a fornire siti di reazione specifici sulla superficie di silice, ne modifica pesantemente la carica superficiale. Questo parametro è fondamentale per la stabilità fisica delle sospensioni di questi sistemi, in particolar modo quando si trovano all'interno del corpo, dove si è in presenza di soluzioni saline tamponate.

Una caratteristica delle nanoparticelle di silice mesoporosa è la presenza di due distinti tipi di superficie, una interna ai pori e una esterna a contatto con l'ambiente, che possono essere funzionalizzate in maniera diversa. L'area interna può essere trattata in modo tale che presenti particolari gruppi funzionali sulla propria superficie, i quali possono svolgere la funzione di stabilizzanti per *drug* caricati all'interno della particella; al contrario, la superficie esterna può essere invece funzionalizzata con polimeri idrofilici (come il PEG) per aumentare la dispersività e la stabilità colloidale del nano-sistema. [35, 36] Un'ulteriore opzione prevede la possibilità di chiudere parzialmente i pori con alcuni particolari polimeri-tappo (es. poli acido lattico); in tal modo, è possibile regolare il rilascio dei farmaci trasportati dato che questi tappi modificano la loro struttura e conformazione spaziale in presenza di determinate specie chimiche o di variazione di pH (similmente a quello che fanno gli *smart*-polimeri citati nel precedente capitolo). In questo senso, si producono *carrier* capaci di rilasciare i farmaci esclusivamente in zone che presentano un particolare ambiente. [37]

La stabilità fisica di questi sistemi deve essere intesa in due modi: il primo riguarda esclusivamente la stabilità fisica colloidale del sistema, che risulta determinata dalle forze in gioco all'interno della dispersione; in questo caso, la presenza di una certa carica sulla superficie della nano particella (nel caso della silice, negativa) introduce una forza repulsiva di tipo elettrostatico che stabilizza il sistema colloidale, mantenendo ben separate le nanoparticelle. Questo contributo viene meno quando la soluzione dispersa presenta un'elevata forza ionica o particolari valori di pH [38]. In questo caso il doppio strato elettrico, con cui si propaga l'effetto di repulsione elettrostatico, si assottiglia e le particelle risultano aggregare e sedimentare più facilmente. Perciò, funzionalizzare la superficie di questi sistemi significa modificare tale carica con il rischio di compromettere la loro stabilità fisica (nel caso in cui i gruppi funzionali vadano a neutralizzare la carica superficiale), a meno che il gruppo funzionale che si va inserire non determini una variazione della carica, ma introduca un contributo di repulsione sterico (come diversi polimeri tra cui il PEG). [39]

Il secondo tipo di stabilità deve essere introdotto per tenere in considerazione l'ambiente fisiologico che le particelle incontrano nelle applicazioni biomediche. In questi ambienti, una particella risulterà maggiormente stabile quando presenta un basso tasso d'adsorbimento proteico superficiale, dato che verrà poi difficilmente riconosciuta dal sistema immunitario del corpo umano (es. macrofagi).

In questo senso, il segno della carica superficiale può influenzare il fenomeno dell'aggregazione; infatti molte componenti cellulari e la maggior parte dei sistemi biologici sono

caricati negativamente, e pertanto possono dare un'interazione non specifica con nanoparticelle caricate con segno opposto.[23]. Anche in questo caso, la funzionalizzazione con vari polimeri idrofilici permette un aumento di questo tipo di bio-stabilità.

Esistono due processi con cui si possono produrre particelle di silice: il metodo Stöber e il processo di microemulsione inversa, entrambi metodi con approccio *bottom-up*. Le silici usate come supporto fisico in questo lavoro di tesi sono state prodotte esclusivamente mediante processo Stöber, che verrà illustrato di seguito.

## 2.1 Sintesi Stöber templata

La sintesi Stöber è un processo sol-gel ideato dal chimico Werner Stöber nella seconda metà degli anni 60' [40], che per la sua semplicità e versatilità si è imposta come la metodologia più diffusa per la produzione di nano particelle di silice di forma sferica; un esempio di questi sistemi è raffigurato nella figura 2.3. Il processo prevede la formazione controllata di particelle di silice, mediante il controllo delle reazioni d'idrolisi e condensazione di precursori alcol-silani, fig. 2.4, tutto ciò avviene in soluzioni alcoliche a elevato pH.

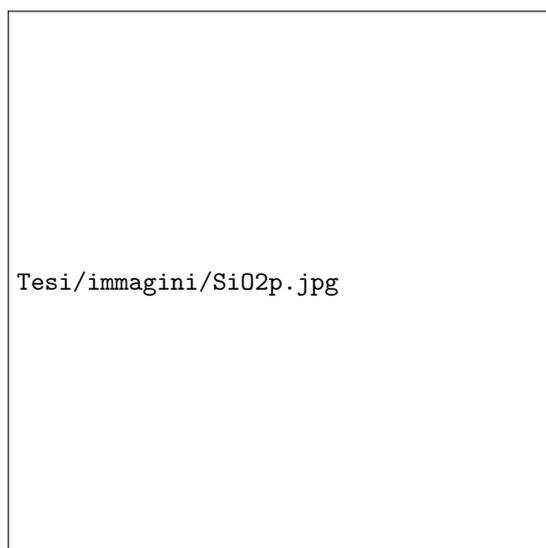


Figura 2.3: Esempio di una classica particella di silice sintetizzata mediante processo Stöber.

Il processo permette d'ottenere una popolazione monodispersa di nanoparticelle, che in termini numerici significa una variabilità nella distribuzione delle dimensioni al massimo del 10%. La forma di queste strutture è funzione della dimensione: particelle con diametro inferiore ai 100 nm tendono a essere meno sferiche rispetto a particelle più grandi per il semplice motivo che le disomogeneità che appaiono nei primi stadi di crescita delle sfere di silice vengono omogeneizzate durante la costruzione della matrice.[41]

Le reazioni in cui concorre il precursore della matrice di silice sono: l'idrolisi e la condensazione.

Nella prima, il gruppo alcossido del precursore viene sostituito da un gruppo -OH,



Figura 2.4: Schema delle reazioni d'idrolisi (A) e condensazione (B) di un precursore della silice, processo Stöber.

mediante reazione d'idrolisi con l'acqua.

La seconda invece, prevede la formazione di un legame silossano con un altro precursore idrolizzato oppure con uno ancora non sostituito, come riportato in fig. 2.4.

Le due reazioni risultano catalizzate da due diversi valori di pH. Mentre la velocità d'idrolisi risulta incrementare in ambiente acido e conduce alla formazione di un gel, la reazione di condensazione supera la prima solo per elevati valori di pH, con un meccanismo di catalisi riportato in fig. 2.5, e conduce invece alla sintesi di particelle di silice con forme e dimensioni determinate.[42]

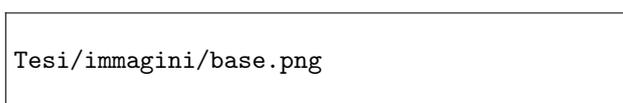


Figura 2.5: Meccanismo di catalisi basica della reazione di condensazione. La base deprotona un gruppo -OH di una molecola di alcossi silano rendendola maggiormente nucleofila; il passaggio successivo è la reazione di condensazione dove si ha l'attacco nucleofilo della precedente molecola su di un'altra di precursore. Quest'ultima reazione è catalizzata dalla maggior nucleofilicità del componente nucleofilo.

La nucleazione e la crescita di questi sistemi dipendono da diverse variabili di processo:

- la percentuale di acqua nell'ambiente di sintesi.  
L'acqua è necessaria al processo d'idrolisi e ne accelera la reazione; la sua concentrazione modifica la dimensione finale della particella, inizialmente aumentandone il diametro per poi invertire l'effetto a causa della maggior diluizione dei siti di nucleazione delle particelle.
- pH e tipo di catalizzatore.  
In generale, la specie chimica utilizzata come base è l'ammoniaca ( $\text{NH}_3$ ); essendo la specie chimica che promuove la reazione di catalisi basica, anche la sua concentrazione influenza le dimensioni finali della particella. Nello specifico, elevate concentrazioni di ammoniaca producono particelle di grandi dimensioni; questo effetto si inverte ad elevati pH dato che aumentano i siti di nucleazione e per tanto la quantità di precursore viene distribuita fra molte più particelle con il risultato di diminuire le dimensioni medie delle particelle.
- il tipo di alcol usato come co-solvente.  
Il tipo di alcol influisce sulla velocità di formazione delle particelle; per questa variabile, la cinetica segue la serie:

Metanolo > Etanolo > n-Butanolo > ecc.

Allo stesso modo varia la distribuzione e il valore medio della dimensione delle particelle prodotte.

- il precursore.  
Influisce, attraverso la sua concentrazione e il tipo di sostituenti a cui è legato, sempre sulla dimensione delle particelle. Ovviamente maggiore sarà la quantità di precursore utilizzato, maggiore sarà il diametro medio finale di queste.

Il controllo di ognuno di questi permette d'ottimizzare il processo di sintesi e i parametri fisici delle particelle.[41, 42]

**Meccanismo di formazione** Il processo di formazione delle nanoparticelle di silice è stato soggetto di diversi studi; tali ricerche hanno confermato che la produzione delle particelle avviene attraverso due distinti meccanismi, riassunti nei seguenti modelli:

- Il primo è il modello dell'addizione di monomeri.  
Dove si considera il processo di idrolisi come la reazione limitante dell'intera sintesi. In questo modo la crescita della particella avviene solo per successiva aggiunta di monomeri e risulta dipendere dalla concentrazione di precursore, nello specifico dalla concentrazione elevata alla 1/6.
- il secondo è il modello dell'aggregazione controllata.  
Questo modello prevede che la formazione delle particelle sia causata, invece, dall'aggregazione di più particelle primarie, in genere dimeri del precursore. In questo caso, la velocità di aggregazione è il fattore che incide sulle dimensioni e sulla distribuzione delle particelle finali.

Ciò che effettivamente avviene è una contemporanea azione dei due meccanismi, anche se in particolari condizioni uno risulta prevalere sull'altro.[41-43]

Le particelle ottenute con il semplice processo Stöber sono strutture piene che presentano un ultra-microporosità [41], pertanto non sono sfruttabili come possibili *carrier* per applicazioni biomediche.

Nel 1992, Kresge et al. [44] idearono una variante della procedura Stöber con cui era possibile sintetizzare particelle di silice dotate di un'elevata porosità; questi sistemi sono caratterizzati da pori in un intervallo tra 1.5 e 10 nm e disposti con vari arrangiamenti. Questa sintesi richiede l'uso di agenti templanti, tipicamente tensioattivi organici di varia dimensione e natura. Questi composti, si autoassemblano per generare strutture 3D micellari di varia forma che sono determinate dalle variabili dell'ambiente di reazione come: pH, concentrazione del surfattante e rapporto acqua/alcol.

Le strutture autoassemblate di surfattante fungono da template per la struttura di silice in formazione, come è riportato nella figura 2.6. In particolare, la silice si dispone attorno ai sistemi micellari per interazione elettrostatica (la silice di per sè presenta una carica negativa, mentre la testa polare delle micelle è carica positivamente) per generare particelle mesoporose in cui è intrappolato il tensioattivo, che viene poi rimosso per semplice calcinazione o estrazione chimica.[37]



Figura 2.6: Nella figura sono riportati i principali passaggi della sintesi di particelle di silice mesoporose. Inizialmente viene posto il surfattante (1) nell'ambiente di reazione, che si autoassembla in strutture 3D di varia forma (2). Una volta aggiunto il precursore, la struttura di silice si condensa attorno le micelle per interazione elettrostatica (3); il passo successivo è l'eliminazione del surfattante per estrazione chimica o calcinazione

Il surfattante maggiormente utilizzato è il CTAB, fig. 2.7 [21, 45, 46], ma è possibile utilizzare altri tipi di surfattanti a carattere anionico, cationico o semplicemente senza carica (non ionico)[47] come alcuni tipi di co-polimero tra cui il *PluronicF127*.

Tesi/immagini/CTAB.png

Figura 2.7: CTAB: *CetilTrimetilAmmonio Bromuro*

Variando il tipo di surfattante, nello specifico la lunghezza della sua catena alifatica, è possibile regolare entro certi limiti la dimensione delle strutture micellari e quindi la dimensioni dei pori [48], oltre che a incidere in parte sulle dimensioni finali delle particelle di silice [38]. In ogni caso il parametro più importante da tenere in considerazione è il parametro d'impaccamento,  $g$ , definito come:

$$g = \frac{V}{h \cdot a_o}$$

dove, come mostrato in fig. 2.8,  $V$  è il volume che occupa l'intera molecola di surfattante,  $h$ , la lunghezza della catena idrofobica e  $a_o$  l'area della sua testa polare.

Tesi/immagini/surfa.png

Figura 2.8: Nell'immagine, si fanno notare le corrispondenze reali dei parametri  $V$ ,  $h$ ,  $a_o$ . Si noti come  $V/h$  sia l'area media che occupa la catena idrofobica e che il conseguente valore di  $g$  non è altro che un'indicazione di quanto quest'area sia maggiore o minore rispetto a quella fissa della testa polare.

Il parametro  $g$  determina la forma delle strutture micellari in cui si autoassemblano le molecole di surfattante ed è funzione del pH, della concentrazione di surfattante e della presenza di co-solventi. All'aumentare di tale parametro, le strutture delle micelle subiscono una transizione di fase, modificando la propria geometria. Pertanto una scelta accurata dei parametri di sintesi permette di scegliere l'arrangiamento, la dimensione e la forma delle strutture 3D del surfattante che di conseguenza definisce la struttura finale delle particelle di silice prodotte.

Al fine di esporre ogni aspetto che riguarda questo tipo di processo, è doveroso riportare qualche informazione sul metodo d'estrazione del surfattante dalle nanoparticelle di silice mesoporosa, dato che è questo risulta tossico per l'ambiente cellulare, in particolare nel

caso si usi il CTAB [49]. L'eliminazione può avvenire per calcinazione o estrazione chimica. La prima richiede elevate temperature (superiori ai 400-500°C ) e comporta l'eliminazione fisica della componente organica e la condensazione dei gruppi silanolici che hanno reagito solo in parte [29]; il processo causa un certo grado di condensazione fra le singole particelle, che comporta un certa aggregazione e una conseguente diminuzione della stabilità colloidale delle sospensioni.[15]

Il secondo processo è l'estrazione chimica. In questo caso le particelle di silice sono sottoposte a più estrazioni con acidi e solventi alcolici, in particolare metanolo ed etanolo. Il vantaggio è che non si incorre in processi d'aggregazione come nel caso precedente [15] e si ottengono nano-particelle separate e con basso grado d'aggregazione.

Nel prossimo capitolo si approfondirà la possibilità di funzionalizzare queste nano particelle con il polimero PEG, allo scopo d'incrementare la loro stabilità fisica non solo all'interno del corpo umano, rispetto all'adsorbimento proteico e all'*opsonizzazione* in generale, ma anche nelle sospensioni prodotte in PBS (*Phosphate Buffer Solution*) dove le particelle di silice non funzionalizzate non riescono a rimanere disperse per più di pochi minuti.

La stabilità fisica delle sospensioni in PBS è assolutamente necessaria per eseguire i test *in vitro* ed è sorprendente constatare come nonostante gli studi su questi materiali siano innumerevoli e stiano proseguendo da svariati anni, sono pochi quelli che trattano quest'ultimo aspetto, tutt'altro che banale.[15]

# Capitolo 3

## PEGylation

Il termine *PEGylation* è usato per indicare il processo di aggraffaggio di molecole di PEG (*Poli Etilen Glicole*) sulla superficie di un generico supporto fisico. Il polimero si può ancorare in diversi modi:

- un **fisi-adsorbimento**; un semplice adsorbimento superficiale senza alcun tipo di legame chimico, e in alcuni casi promosso da interazione elettrostatiche tra superficie e polimero;
- un **chemi-adsorbimento**, ovvero con la formazione di un vero e proprio legame chimico tra il PEG e il supporto da PEGylare.
- oppure, mediante un **intrappolamento** all'interno della matrice del materiale da funzionalizzare;[50, 51]

*PEGylare* significa generare un *layer* di PEG su di una superficie, allo scopo di sviluppare una resistenza all'adsorbimento superficiale di macromolecole biologiche, proteine ed enzimi, e/o introdurre una componente di stabilizzazione sterica nel caso di sistemi in sospensione.

La presenza del polimero dona al supporto una serie di proprietà, utili nelle applicazioni biomediche; infatti, la strategia della *PEGylation* risulta vincente nel proteggere vari tipi di nanoparticelle, in particolare quelle finalizzate alle tecniche di *Drug Delivery* e *Imaging*. Essenzialmente, la funzionalizzazione superficiale con il PEG previene e inibisce il processo di *opsonizzazione* impedendo alle proteine del sistema immunitario di depositarsi sulle nanoparticelle, rendendole di fatto stabili per maggior tempo all'interno del flusso sanguigno; inoltre, la dimensione aggiunta del sistema *PEGylato* riduce la probabilità che la particella sia filtrata dai reni e conseguentemente espulsa prematuramente dal corpo umano [22, 52, 53]. I sistemi *PEGylati* manifestano una minor immunigenicità rispetto alle controparti non *PEGylate* come conseguenza della copertura pressoché totale della loro superficie da parte del polimero, il quale evita l'interazione fra l'interfaccia della particella e gli antigeni, che segnalerebbero il corpo estraneo ai macrofagi e ne rivelerebbero la presenza all'interno del corpo ospite.

Poter disporre di medicinali o vettori farmacologici con queste caratteristiche permette di utilizzare i farmaci con maggiore efficienza, consentendo da un lato un guadagno in termini di costo del principio attivo, e da l'altro, l'insorgere di minori effetti collaterali a vantaggio del paziente, come dimostrato in fig. 3.1, dove si confronta l'andamento temporale della

### 3. PEGylation

concentrazione di un farmaco (l'interferone) in forma base oppure dopo essere stato *PEGylato*.

Nei sistemi colloidali, l'applicazione del processo di *PEGylation* alle particelle costituenti il colloide, permette di ottenere sospensioni più concentrate e con maggior stabilità fisica nel tempo; ciò risulta possibile grazie al contributo di repulsione sterica che genera il *layer* di PEG e che mantiene, dal punto di vista energetico, stabile la sospensione [54]. Inoltre è possibile sfruttare l'affinità del polimero con solventi non acquosi, per migliorare la solubilità di enzimi o proteine altrimenti difficilmente solubili; funzionalizzando la superficie degli enzimi con il poli etilene glicole, si rendono accessibili alcune reazioni enzimatiche anche in ambienti diversi non canonici alle macromolecole biologiche, il tutto con una modesta perdita dell'efficienza catalitica [53].



(a) *Farmaco non PEGylato.*



(b) *Farmaco PEGylato.*

Figura 3.1: *Effetto della strategia di PEGylation applicata al'Interferone(IFN)- $\alpha 2a$ : la figura a riporta l'andamento della concentrazione dell'IFN nel flusso sanguineo durante un ipotetica settimana, si possono chiaramente distinguere i momenti delle tre assunzioni del farmaco; la figura b riportata invece, come varia la concentrazioni di un sistema PEG@IFN (il PEG usato ha peso 40 KDalton), si può notare come la PEGylation mantenga la concentrazione della proteina costante per tempi maggiori che in assenza dello strato protettivo di PEGm [55]*

I primi studi che trattano le strategie di funzionalizzazione superficiale con il PEG risalgono ai lavori di *Abuchowski et Al.*[56, 57] svolti verso la fine degli anni 70'. In questi

articoli si sono mossi i primi passi nello sviluppo delle procedure di *PEGylation*. Inizialmente, i primi sistemi ad aver subito il processo di *PEGylation* erano degli enzimi, in particolare quelli della famiglia delle *hydrogen-peroxide oxidoreductase*, di origine bovina. Lo scopo, dei primi lavori di Abuchowski, era di sviluppare un'immunità biologica sugli enzimi-*PEGylati* una volta re-iniettati nel corpo di topi, al fine di dimostrare l'efficacia del processo di *PEGylation* nello sviluppo di proprietà stealth su macromolecole organiche applicate *in vivo*. I risultati positivi di queste iniziali ricerche hanno spinto altri ricercatori a sviluppare nuove tecniche di *PEGylation* su nuovi supporti, in particolare su proteine e nano carriers per applicazioni biomediche.

La ricerca in questo campo è molto attiva come testimoniano gli svariati lavori che si possono trovare in letteratura sull'argomento. Questi ultimi spaziano dall'ottimizzazione dei vari processi di *PEGylation*, all'implementazione di modelli teorici capaci di spiegare i meccanismi di protezione derivanti dallo strato di PEG. Parallelamente si sono sviluppati nuovi composti chimici derivanti dal PEG, aggiungendo nuove possibilità di funzionalizzazione a quella che già oggi è una considerevole chimica di coniugazione del poli etilene glicole[52, 53, 58].

Nella prossima sezione, si esporrà la teoria alla base del processo di protezione dall'adsorbimento proteico generato dalla funzionalizzazione superficiale di polimeri, allo scopo di capire quali siano le variabili che influenzano maggiormente questo fenomeno. Successivamente verrà riportata una breve descrizione del PEG (Poli Etilene Glicole), per capire quali sono i motivi per cui è stato scelto questo particolare polimero.

### 3.1 Modelli teorici

L'adsorbimento superficiale delle proteine in presenza di polimeri aggraffati è un processo molto difficile da modellizzare a causa dell'elevato numero di variabili in gioco; lo studio di questi fenomeni richiede, oltre che a una profonda conoscenza delle energie d'interazione di ogni componente che costituisce il sistema, di tener conto di tutte le possibili configurazioni delle varie strutture molecolari insite nel modello (che nel caso di polimeri e proteine influiscono in misura elevata sulla descrizione del problema). Un'ulteriore complessità del sistema è introdotta dal tipo di superficie funzionalizzata; a seconda dell'interazione polimero-superficie varia la resistenza all'adsorbimento proteico della superficie stessa, dato che si modifica la distribuzione stessa delle catene (più precisamente dei monomeri del polimero) nei pressi dei siti di aggraffaggio.

Queste difficoltà sono state superate in parte solo negli ultimi tempi con l'accesso a calcolatori con elevata velocità di elaborazione dei dati, i quali hanno consentito l'uso di simulazioni molecolari più elaborate con grandezze-*output* termodinamiche più precise. Contemporaneamente, negli ultimi vent'anni sono stati presentati diversi approcci teorici al problema, ognuno dei quali presentava vincoli sempre meno rigidi ai modelli rendendoli via via più fedeli al fenomeno reale.

I primi modelli risalgono ai lavori di *Jeon et Al*, dove il problema dell'adsorbimento superficiale delle proteine veniva considerato in termini energetici, e in particolare, veniva ricavata l'energia libera richiesta da una proteina per raggiungere una superficie con aggraffati dei polimeri.

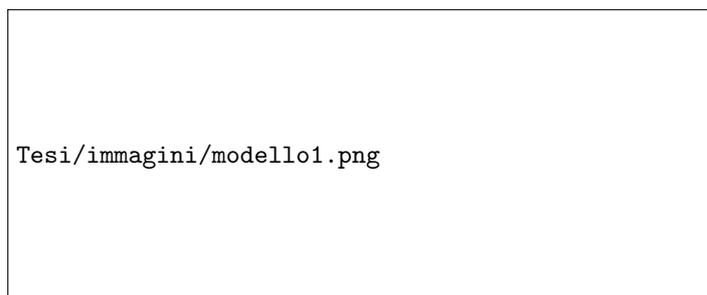


Figura 3.2: Modello utilizzato nel lavoro di *Jeon et Al*<sup>[59]</sup>; si noti lo strato di PEG assunto come una struttura perfettamente ordinata a *brush*.

Il sistema descritto da questo modello consiste in una superficie a carattere idrofobo, ricoperta da uno strato di polimero aggraffato in conformazione rigorosamente *brush*, che interagisce con una proteina di dimensioni infinite, la quale rivolge la propria componente idrofoba verso la superficie, come mostrato in fig. 3.2.

In dettaglio, l'approccio utilizzato da *Jeon et Al* calcola la repulsione sterica generata dalle catene polimeriche, dividendone il fenomeno in due contributi distinti: uno *osmotico* e uno *elastico*, caratterizzati da due costanti  $K_1$  e  $K_2$  ricavate empiricamente. Questi due contributi raccolgono le interazioni repulsive dovute alla presenza del peptide all'interno della struttura del polimero; il contributo osmotico racchiude la variazione dei potenziali chimici tra il *bulk* e l'interno del *layer* di polimero, mentre quello *elastico* spiega la variazione delle strutture polimeriche a causa della compressione esercitata dal corpo estraneo. Le interazioni attrattive derivano da forze di tipo di *Van der Waals* fra i principali corpi macroscopici che costituiscono il sistema (proteina-polimero, proteina-superficie, e le interazioni con il solvente) e sono calcolate mediante le costanti di *Hamaker* per ogni coppia d'interazione.

L'approccio al problema di *Jeon*, considera anche la possibile interazione attrattiva presente fra le componenti idrofobe della proteina e della superficie; per piccole distanze, tale forza risulta raggiungere intensità di 2 ordini di grandezza maggiore rispetto alle interazioni di Van der Waals considerate in questa teoria e per tanto assume un ruolo chiave nella fisica del processo di adsorbimento proteico.

Il modello però, applica delle importanti approssimazioni: in primo luogo, richiede che le catene polimeriche formino uno strato di tipo *brush*, a spazzola, perfettamente ordinato e ciò è in contraddizione con molti lavori in cui si risalta il fatto che una struttura del genere è difficile da ottenere con polimeri a basso PM [25, 60]; inoltre, le interazioni considerate in quest'approccio sono: la repulsione sterica tra le catene di polimero e le proteine, le forze attrattive di Van der Waals tra la superficie e le proteine, e le eventuali interazioni idrofobiche fra la superficie e la componente idrofoba delle proteine, le quali sono solo una parte del totale interazioni presenti e non tengono conto delle varie conformazioni delle proteine e del polimero.

I risultati ottenuti da questo approccio teorico rispecchiano i dati sperimentali, concludendo che la capacità di impedire l'adsorbimento proteico su di una generica superficie sia una funzione della densità superficiale delle catene e del peso molecolare medio del polimero usato. [59] Anche se il modello di *Jeon et Al* spiega il minor assorbimento superficiale di proteine come una conseguenza delle interazioni steriche del polimero presente sulla superficie, in realtà una miglior conoscenza del meccanismo d'adsorbimento, sviluppata in questi ultimi anni, fa capire che gli effetti di tutte le variabili che governano il fenomeno

d'assorbimento proteico sono ancora poco conosciuti.

Un modello più universale deriva dai lavori di *Subramanian et Al* [61]; in questo caso non si tratta il problema di un adsorbimento superficiale di proteine come tale ma più generalmente dell'avvicinamento di un generico corpo solido a una superficie funzionalizzata con catene polimeriche. Il sistema che descrive questo modello è molto vicino alla geometria del precedente: una superficie su cui sono aggraffate delle catene polimeriche e una particella in prossimità delle terminazioni del polimero. Le somiglianze si limitano a questo, dato che l'obiettivo di questa rappresentazione è capire l'influenza delle conformazioni del polimero sull'energia libera del sistema; il calcolo ricorre all'uso della *self-consistent field theory* per ricavare le energie del sistema. Il punto di forza di questo modello, a differenza del precedente, è che considera due diverse configurazioni del polimero aggraffato in superficie:

- la forma *mushrooms*, ovvero a fungo; dove il polimero si allarga sulla superficie, occupandone una vasta area;
- e la forma *brush*, a spazzola; in cui il polimero, proprio come in una spazzola, si dispone con le catene perpendicolari alla superficie.

Per ognuno di questi stati, vengono prese in considerazione le situazioni in cui lo strato polimerico si comporti come solido oppure liquido.

Nel caso della conformazione *brush*, il termine strato solido indica che i siti di aggraffaggio del polimero sono immobili sulla superficie, perciò, qualsiasi interazione che avviene con possibili particelle in superficie non modificano in alcun modo la densità delle catene polimeriche; al contrario, per strato liquido si intende il caso in cui i siti d'aggraffaggio del polimero si possano muovere sulla superficie mantenendo però il numero totale delle catene costante; in quest'ultimo caso, in presenza di un'interazione è possibile che la densità di catene superficiali possa variare localmente, uno schema di questo modello viene mostrato in fig. 3.3.

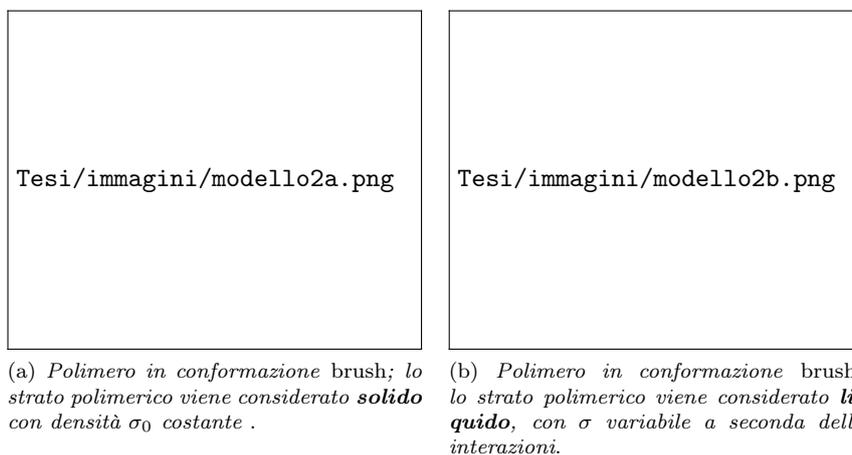


Figura 3.3: Modello grafico dell'approccio seguito da *Subramanian et Al* [61].

Questo approccio è molto interessante dato che prende in considerazione le variazioni della struttura dello strato polimerico e le stesse configurazioni del polimero, quando vi sono delle particelle estranee in prossimità della superficie. Infatti, i risultati ottenuti da questo modello permettono di discriminare, anche energeticamente, le situazioni in cui

il polimero si presenti strutturato a *brush* o *mushrooms*, confermando l'importanza della morfologia dello strato polimerico nel fenomeno dell'assorbimento proteico.

Nonostante i modelli fin qui descritti riescano a spiegare in maniera più o meno approssimativa la resistenza di una superficie all'adsorbimento proteico in presenza di un polimero aggraffato, negli ultimi anni è stata sviluppata una teoria che analizza decisamente con maggior dettaglio questo problema. Tale teoria prende il nome di SCMF, *Single Chain Mean Field* e sarà esposta nella prossima sezione del documento. Va precisato che fin qui il problema analizzato riguarda solamente l'adsorbimento proteico, in realtà, l'argomento di questa tesi, la *PEGylation*, è un processo usato anche per migliorare la stabilità dei sistemi colloidali. In quest'ultimo tipo di problema, l'approccio teorico generalmente più accettato è la teoria DLVO che sarà spiegata brevemente nei capitoli successivi.

### 3.1.1 Teoria SCMF, Single Chain Mean-Field

La teoria oggi più completa e accettata, per la descrizione dell'adsorbimento superficiale di proteine su di una generica superficie funzionalizzata con polimeri, è la *SCMF, Single Chain Mean-Field*.

La teoria SCMF, prende in considerazione tutte le possibili interazioni del sistema, sia rispetto al polimero e sia rispetto alle proteine e alla superficie in esame; di questi componenti considera le interazioni di tipo intramolecolare e intermolecolare. In particolare per quest'ultimo tipo d'interazione, la teoria introduce con un'approssimazione di campo medio. Tuttavia, i risultati e le simulazioni di questo modello, forniscono dati e informazioni qualitativi sulle grandezze termodinamiche del sistema in accordo con le osservazioni sperimentali e simulazioni al computer, pertanto le approssimazioni che il modello introduce non influiscono in modo significativo sulla sua capacità di descrivere il problema in modo corretto.

La trattazione matematica della teoria esula da questo lavoro ma è riportata in diversi lavori.[62, 63]

Le varie simulazioni condotte con questo approccio teorico conducono a importanti risultati che possono essere riassunti in pochi punti:

- la densità di polimero aggraffato superficialmente è il fattore chiave per la protezione delle superfici dall'adsorbimento proteico;
- il tipo di superficie ha un importante ruolo nel modificare la struttura del *layer* polimerico e quindi il suo comportamento rispetto al fenomeno dell'adsorbimento proteico;
- il vero effetto protettivo del polimero non nasce dalla sua interazione sterica, anche se ne è un importante fattore, ma dalla sua capacità di occupare i siti superficiali dove le proteine possono adsorbire, riducendone di fatto il loro numero nel volume prossimo alla superficie. [25]
- ogni tipo di struttura dello strato polimerico ha punti di forza e debolezza, per esempio: a parità di densità di catene, la conformazione *brush* riduce la cinetica dell'adsorbimento proteico superficiale grazie all'estensione delle catene verso il bulk della soluzione. Però, una volta raggiunto uno stato d'equilibrio fra proteine adsorbite e desorbite, presenta in termini assoluti, un maggior numero di peptidi sulla superficie. Al contrario, in situazioni in cui la conformazione del polimero è maggiormente schiacciata sulla superficie (*mushroom* o *pancake*) si ha l'effetto opposto, le proteine

adsorbite all'equilibrio sono di meno ma l'equilibrio viene raggiunto in un lasso di tempo minore.

- nei casi in cui, la densità di catene non permetta l'adsorbimento delle proteine perché non vi è lo spazio fisico necessario all'adsorbimento, questo avviene lo stesso a causa della flessibilità dei peptidi. Infatti, possono variare la loro configurazione e penetrare lo strato di polimero; tale effetto deve essere studiato e calcolato per ogni tipologia di proteina.

I risultati ottenuti con la teoria SCMF sono coerenti con le soluzioni ottenute con le simulazione al computer e le sue previsioni risultano riprodurre fedelmente il fenomeno d'assorbimento reale e l'effetto delle variabili.

Nonostante ciò il modello teorico appena esposto mostra dei importanti limiti: non si tiene conto della cinetica del processo, non si considerano le interazioni proteina-polimero a lungo raggio e il caso in cui il grafting polimerico sia disomogeneo.

A parte ciò, il successo di questo modello sta nel riuscire a fornire una spiegazione teorica dell'entità degli adsorbimenti superficiali delle proteine, al variare di diversi fattori fisici quali [25]:

- conformazione del *layer* polimerico;
- densità superficiale delle catene;
- tipo di superficie;
- dimensione della catena di polimero;

Non è possibile trattare separatamente ogni fattore (densità, conformazione, ...) dato che sono legati indissolubilmente fra loro; è possibile, però, discriminare due casi ben distinti:

- il caso in cui la superficie PEGylata non abbia alcun tipo d'interazione con i monomeri del polimero, come mostrato in fig. 3.4;

In questo caso, la struttura del *layer* è data dal valore della densità di catene aggraffate superficialmente; a un basso valore di densità, le catene di polimero si trovano isolate tra loro e pertanto assumono la strutture di tipo *mushroom*, mentre nel caso di densità più elevate, le varie interazioni steriche fra le catene permettono allo strato polimerico d'assumere la conformazione a *brush*.

In queste condizioni, la lunghezza della catena non influisce sulle proprietà dello strato polimerico [64].

- il caso in cui la superfici PEGylata abbia un comportamento di tipo attrattivo verso le componenti del polimero, fig. 3.5;

In questo secondo caso, quando il polimero presenta bassi valori di densità, assume una forma a *pancake*, presentandosi appiattito per tutta la sua lunghezza sulla superficie. Contrariamente al caso di prima un aumento del numero di catene di polimero non porta alla formazione di un *layer a brush*, infatti vi è una sovrapposizione delle due configurazioni che dipende molto dalla lunghezza del polimero [60].

Ogni conclusione derivante dai ragionamenti condotti fin'ora sulla teoria SCMF è perfettamente applicabile nelle situazioni in cui il polimero aggraffato sia il Poli Etilene Glicole, o PEG.

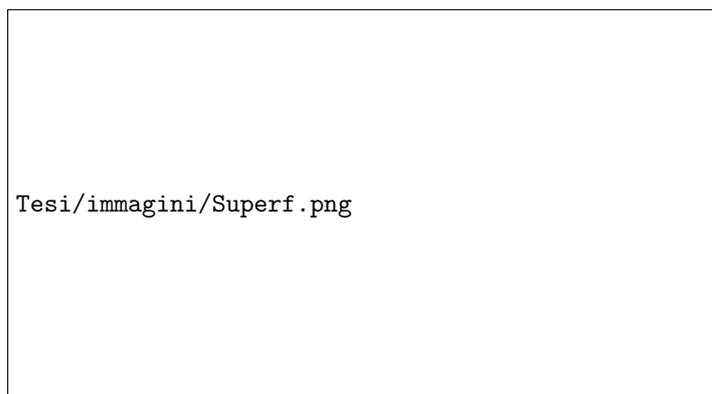


Figura 3.4: Nella figura sono riportate le due configurazioni che assume il polimero quando la superficie **non** ha alcuna interazione con le catene di polimero. Nella parte **a** si ha bassa densità di catene e la conformazione è di tipo *brush-room*; nella parte **b** la densità di PEG aggraffato è maggiore e le catene formano la struttura a *brush*

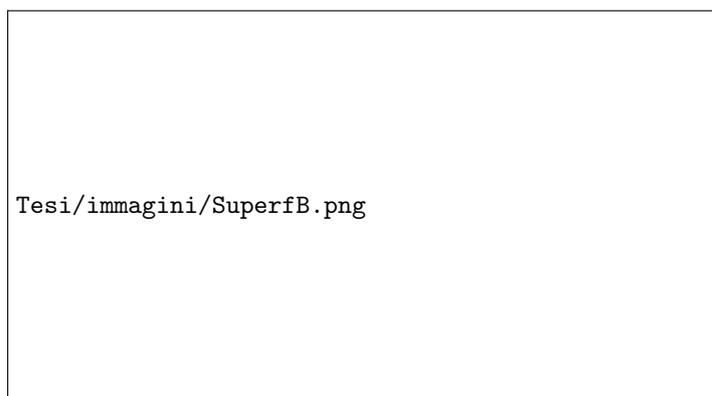
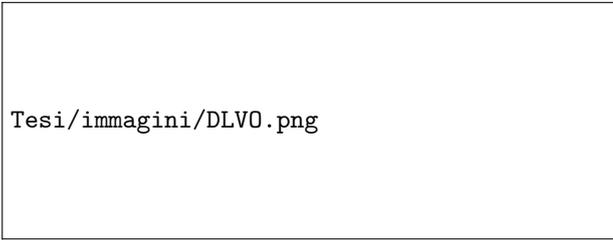


Figura 3.5: Nella figura sono riportate le due configurazioni che assume il polimero quando la superficie ha un'interazione attrattiva. Nella parte **a** si ha bassa densità di catene e la conformazione è di tipo a *pancake*; nella parte **b** la densità di polimero aggraffato è maggiore e le catene, anche se rimangono parzialmente schiacciate sulla superficie, tendono a formare una debole struttura a *brush*

### 3.1.2 Teoria DLVO

La teoria SCMF descriva egregiamente le interazioni fra proteine e superfici *PEGylate*; nei sistemi in sospensioni, come nel caso di nanoparticelle di silice funzionalizzate con il PEG allo scopo d'inibire i processi di flocculazione e segregazione, viene in genere applicata la teoria **DLVO** (acronimo delle iniziali degli ideatori della teoria: Derjaguin, Landau, Verwey e Oveerbeek). Questo approccio teorico è capace di calcolare l'energia del sistema-sospensione e a descrivere le forze in gioco all'equilibrio, tenendo conto del volume di sovrapposizione dei gusci del polimero e delle costanti di Hamaker facilmente reperibili in letteratura [65]. La teoria DLVO permette di studiare l'interazione tra le particelle disperse in un liquido definendo quindi, i parametri all'interno dei quali la sospensione è

stabile.



Tesi/immagini/DLVO.png

Figura 3.6: Modello del sistema studiato dalla teoria DLVO;  $\delta$  è lo spessore dello strato di PEG,  $h$  è la distanza fra le particelle considerate sfere rigide e  $R$  è il raggio delle particelle [66].

Questa teoria assume che le particelle si comportino come sfere rigide circondate da uno strato più o meno flessibile di PEG, come mostrato in fig. 3.6; anche in questo caso di provvede al calcolo delle varie energie d'interazioni del sistema [66], che si possono dividere in:

- interazioni attrattive di Van der Waals, calcolata tra due particelle aventi diametro  $R$  e spessore dello strato polimerico superficiale  $\delta$ .  
Per determinare il valore di tale interazione è necessario conoscere le costanti di *Hamaker* sia del polimero che avvolge le particelle(s) sia del mezzo di dispersione ( $m$ ) che della la stessa particella;
- interazioni repulsive causata dal doppio strato elettrico formato dagli ioni adsorbiti sulla superficie delle particelle.  
Il modello DLVO lega questo tipo d'interazione allo spessore del doppio strato elettrico descritto dal modello di Debye-Hückel, alla forza ionica del mezzo disperdente e alla carica superficiale che presentano le stesse particelle.  
Questo tipo di interazione viene a mancare in ambienti ad elevata forza ionica ed è il motivo principale per cui si esegue il processo di *PEGylation*.
- interazione sterica dovuta alla presenza del polimero in superficie; questa componente si divide in due parti.  
La prima è un'interazione di tipo *osmotico*, tale termine deriva infatti dal flusso di solvente che si viene a generare a causa della variazione del potenziale chimico del mezzo disperdente nella zona di sovrapposizione dei due gusci polimerici, per cui a distanze comprese tra  $\delta < h < 2\delta$ .

Il secondo tipo d'interazione sorge quando le distanze fra le particelle sono inferiori a  $h < \delta$ ; si tratta di una forza di tipo elastico, dovuta alla perdita di entropia di configurazione delle catene causato dal contatto con la superficie delle altre particelle.

Sommando i vari contributi è possibile conoscere i profili dell'energia libera del sistema al variare della distanza fra le particelle così da comprendere quando la sospensione è termodinamicamente stabile (si sta sempre trattando equilibri termodinamici e non cinetica) o quando si è in presenza di fenomeni di flocculazione/agggregazione.

## 3.2 PEG

Il PEG è un polimero termoplastico idrofilico;



disponibile in svariati pesi molecolari (dalle poche centinaia alle svariate migliaia di Dalton), con una discreta monodispersione ( $M_w/M_n$ ), circa a 1.01 per bassi pesi molecolari  $< 4000$  Da e maggiore, circa 1.1, per polimeri con PM elevato ( $> 50.000$ ).

Il PEG è sintetizzato dall'ossido d'etilene mediante polimerizzazione *anionica ad apertura d'anello*, iniziata da un attacco nucleofilo portato da uno ione idrossido all'anello epossidico. In particolare, nell'applicazione studiata in questo lavoro, viene usata la sua forma mono-metilata, derivante da una polimerizzazione iniziata da uno ione metossido, al fine d'ottenere una catena con un solo gruppo funzionale -OH.

Il polimero che si trova in commercio presenta un problema di cui va tenuto debito conto; in genere, a causa della presenza di acqua nel reattore di sintesi possono rimanere tracce nel prodotto finale di composti diolo-PEG non metilati. Queste catene presentano PM molto elevati dato che la crescita del PEG avviene su più gruppi attivi; in tal modo, questi composti possono arrivare a rappresentare fino al 15% in peso del polimero totale, causando difficoltà nei calcoli delle sintesi e nelle procedure stesse di *PEGylation*.

Per ovviare a questo problema esistono procedure che metilano i dioli-PEG in eccesso e che possono essere eseguite in laboratorio, precedentemente alla fase di *PEGylation*[67].

La struttura chimica del PEG lo rende un composto solubile allo stesso tempo in ambienti acquosi e organici, anche se la sua solubilità risulta inversamente proporzionale al peso molecolare e alla temperatura. La temperatura d'ebollizione e fusione varia con il PM medio della soluzione polimerica, in genere per  $PM$  minore di 500 si presenta liquido a temperatura ambiente, mentre è solido al di sopra di tale valore.[50, 68, 69]

Il polimero possiede una buona resistenza ad acidi e a basi, sopporta temperature moderatamente elevate (per brevi periodi di tempo) e la presenza di agenti ossidanti come il perossido d'idrogeno e il Sodio Boro idruro. Oltretutto risulta essere atossico, non immunogenico e quindi pienamente compatibile con il corpo umano, da cui viene espulso attraverso le urine (per bassi PM) mentre attraverso le feci per catene con PM più elevato [21, 50, 67, 68, 70, 71]. Nonostante sia dimostrato che le catene di PEG con piccolo peso molecolare ( $< 400$  Da) siano degradate a prodotti metilici tossici dagli enzimi *alcohol dehydrogenase* del corpo, non si è mai osservata alcuna tossicità del polimero (anche per PM superiori). Questo dato è supportato dai numerosi anni in cui il PEG viene usato nel settore alimentare e farmacologico[67], e dal fatto che i primi farmaci funzionalizzati con il PEG risultano essere stati approvati dalla FDA (*Food and Drug Administration*) già dai primi anni 90'. [55, 72]

In letteratura si possono trovare svariati lavori dove il PEG trova applicazione; principalmente riguardano il campo biologico in cui è utilizzato per facilitare fenomeni di fusione delle membrane cellulari o per conferire proprietà *stealth* a particelle o proteine; ma esistono vari altri campi in cui risulta funzionale: dal già citato *drug delivery* alla sintesi templata, oppure nella produzione di batterie dove il PEG funzionalizzato è usato come plastificante a basso PM per aumentare la conducibilità elettrica del mezzo elettrico interno alla pila.[73, 74]

### 3.2.1 Degradazione termica

Secondo alcuni studi, il PEG allo stato solido degrada a temperature relativamente basse all'aria (80°C), mentre in atmosfera priva di ossigeno sembra essere più stabile. Quando si trova in soluzione, presenta una stabilità termica maggiore dato che non risulta avere degradazione fino ai 105°C [75], probabilmente a causa di un fattore protettivo operato dal solvente.

Il meccanismo di degrado termico prevede la reazione della struttura del polimero con l'ossigeno presente nell'aria per formare  $\alpha$ -idropersossidi, che decomponendo generano gruppi aldeidici, facilmente rivelabili all'IR dal picco d'assorbimento a circa 1710  $\text{cm}^{-1}$ . [76, 77]

### 3.2.2 Chimica di coniugazione del PEG

Negli ultimi anni la chimica di funzionalizzazione del PEG ha conosciuto un rapido sviluppo e ora si conoscono numerosi processi per la produzione di derivati del PEG ottenuti dalla funzionalizzando di uno dei due, o d'entrambi, i gruppi terminali -OH del polimero, nel caso della sua forma diolo. In questo modo sono state sintetizzate varie derivazioni del PEG: da una semplice metilazione di uno dei due gruppi funzionali, a una più elaborata funzionalizzazione con un gruppo *maleidico, isocianato, succinimidico*. . . [22, 50, 52, 53, 67, 69, 78]

Nella tabella 3.1 sono riportati alcuni esempi.

Ogni tipo di funzionalizzazione è pensata per una particolare reazione, per esempio, nel caso di proteine o enzimi il sito tipico d'ancoraggio è il gruppo esterno -NH<sub>2</sub> delle lisine, le quali rappresentano quasi un decimo degli aminoacidi totali che costituiscono la proteina. Il PEG maggiormente utilizzato rimane in ogni caso la sua forma mono-metossi dato che non genera ponti con altre strutture proteiche a differenza della sua forma bi-funzionale.

La chimica di coniugazione del Poli Etilene Ossido o Glicole viene suddivisa in due tipi di *generazione*, che si differenziano per semplice successione cronologica e per tipo di problematiche risolte.

- prima generazione;  
si tratta della chimica di coniugazione sviluppata inizialmente; caratterizzata da catene a ridotto PM, impurezze nel prodotto finale e derivati poco o addirittura non selettivi.

Ne fanno parte i derivati succinimidici, come in tab. 3.1 oppure i derivati *cloro-triazina* del polimero in fig. 3.7. A causa dell'elevato peso molecolare del polimero usato

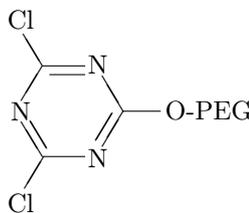


Figura 3.7: Coniugazione PEG: esempio 1° generazione, dicloro-triazina-PEG

(in genere PM superiore a 5000) la percentuale di diolo presente nel bulk polimerico

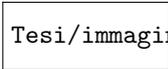
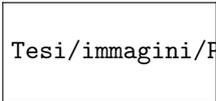
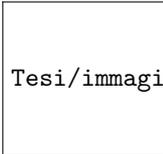
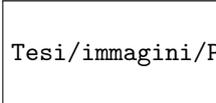
Molecola	Descrizione
	mPEG-OH Da questa molecola mono-funzionalizzata si possono ottenere i PEG derivati.
	PEG-aldeide; Una prima funzionalizzazione del PEG, è ottenuto da una reazione a <i>two-step</i> .
	PEG-Succinimide; Una importante funzionalizzazione del PEG; può reagire con ammine primarie (come quella dell'APTS).
	PEG-Silano; Una importante funzionalizzazione del PEG; usata per il processo di PEGylation di particelle metalliche o di silice.

Tabella 3.1: Alcuni esempi di possibili PEG-derivati, usati nel processo di PEGylation

può raggiungere concentrazioni in peso anche del 15% rendendo inefficiente la sintesi di questo tipo di derivati e la conseguente coniugazione proteica.

- seconda generazione;  
questo sviluppo della chimica di coniugazione del PEG si è resa necessaria per correggere quei problemi che la prima generazione non considerava: uso di polimeri con PM più elevato, legami instabili, mancanza di selettività e riduzione dell'attività manifestata dalla proteina/enzima PEGylato.  
Un derivato del PEG nato da questa nuova chimica è il mPEG-PropionAldeide, riportata in fig. 3.8, che a differenza del semplice mPEG-Aldeide non presenta il problema della dimerizzazione e risulta molto selettiva per le  $\alpha$ -ammine.

Oltre alle ammine, vi sono derivati del PEG che possono reagire selettivamente con i gruppi -SH (tioli) o altri gruppi funzionali presenti su proteine o altre macromolecole biologiche. In effetti, esiste una vastissima chimica di coniugazione adatta ad ogni tipo di situazione, che risulta troppo vasta per essere riportata in questa tesi, ma dettagliatamente approfondita nei lavori di *Robert et Al.*, *Zalipsky et Al.*, *Harris et Al.* e *Veronese et Al.* [52, 55, 58, 67]

Nel caso del processo di PEGylation, vi è la possibilità di usare non solo PEG di tipo



Figura 3.8: Coniugazione PEG:esempio 2° generazione, mPEG-propionaldehide

lineare ma anche con struttura ramificata, detta appunto *star-PEG* [79]. Questo PEG possiede una forma che genera una minore interazione sterica durante il processo di ancoraggio sulla silice, e di conseguenza è possibile generare strati di polimero molto più densi e compatti di quelli ottenuti con il solo PEG lineare [79, 80].

### 3.3 PEGylation su MSN

La PEGylation è in genere un processo di POST-Sintesi, ovvero successivo alla sintesi del supporto da *PEGylare*, anche se esistono diversi lavori dove si sviluppano processi di *PEGylation* contemporaneamente alla fase di sintesi dei sistemi nanomatrici. Nel caso di nanoparticelle di silice mesoporosa, se si vogliono impregnare i pori con farmaci o altre molecole, è necessario sviluppare il processo come POST-Impregnazione per evitare che lo strato di PEG aggraffato impedisca l'ingresso dei *guest* nei pori.

La strategia di *PEGylation* da seguire va scelta con cura e sulla base dei processi che la particella PEGylata deve subire successivamente. Appare ovvio che, dopo la *PEGylation* non può seguire un trattamento chimico con l'uso di reagenti particolarmente aggressivi che possono degradare il polimero, o addirittura un trattamento termico. Recenti lavori hanno ipotizzato che al contrario, un blando riscaldamento può in qualche misura consolidare il legame fra PEG e silice [81], tuttavia altri lavori mettono in discussione questo punto.

La PEGylation di sistemi silicei mesoporosi risulta essere poco trattata in letteratura. Sebbene che la chimica per legare il PEG alla silice sia molto vasta e ben conosciuta, come riportato nel precedente capitolo, le variazioni delle proprietà fisiche delle nanoparticelle di silice che hanno subito *PEGylation* non hanno molti termini di paragone nelle banche dati scientifiche.

Ciò che ovviamente interessa di questi sistemi è come si mantiene la porosità dopo il processo di PEGylation, essenziale per l'applicazione di *drug delivery*, insieme alla configurazione dello strato polimerico e della densità di catene superficiali che possono influire su un'ulteriore funzionalizzazione, come per esempio lo sviluppo successivo di funzioni di *targeting*.

Questa lacuna di informazioni fa capire come questo tipo di sistemi, anche se non risultano essere propriamente innovativo, sono di recente affermazione nel caso di applicazioni biomediche.

Una prima difficoltà si incontra già nel calcolo della superficie libera delle nanoparticelle, ovvero quella interessata al *grafting* del PEG. Questo dato è essenziale per determinare la densità di PEGylation; si noti bene che non viene presa in considerazione l'intera area della nanoparticella, capace di raggiungere anche valori elevati di 1000 m<sup>2</sup> per grammo di

materiale, ma solamente l'area esterna, di certo molto minore.

In letteratura comunque, sono presenti alcuni lavori che trattano l'argomento e che hanno sviluppato modelli teorici per calcolare tale valore.

I principali parametri da considerare in una particella mesoporosa che ha subito un processo di *PEGylation* sono:

- la densità superficiale di PEG legato;
- lo spessore dello strato polimerico;
- la porosità residua;

Nelle prossime sezioni verranno approfonditi i diversi aspetti di questi parametri, dalle incidenze delle condizioni di sintesi alla relazione con il tipo di PEG usato.

### 3.3.1 La densità superficiale di catene

La densità superficiale delle catene è controllabile variando la concentrazione del polimero attivato nella reazione di *PEGylation*; in verità, uno studio condotto da *He Q. et Al.* e *Zhu et Al.* [21, 82] mette in relazione anche il peso molecolare del polimero (collegato all'effetto sterico della molecola) al parametro di densità delle catene. Il lavoro rivela che per ogni tipo di PEG (che sia 300, 600 o 5000 di PM) esiste una concentrazione ottimale di polimero da usare nella reazione di *PEGylation* al fine di ottenere il valore massimo di densità; a concentrazioni maggiori, l'effetto sterico del polimero inibisce ulteriori attacchi sulla superficie della silice e di fatto non ne aumenta la densità superficiale.

Per conoscere la densità di PEG legato superficialmente alle nanoparticelle è necessario conoscere la superficie libera su cui vi è la possibilità di *grafting*. Questa corrisponde alla superficie esterna della particella, ovvero alla superficie dell'analogo sfera piena a cui viene sottratta l'area occupata dalle imboccature dei pori; questa affermazione vale solo se si introduce un'importante assunzione: che il polimero non entri nei pori e non ne funzionalizzi la superficie interna. Questa ipotesi corrisponde solitamente alla realtà per polimeri ad elevato PM; il PEG con peso molecolare pari a 2000 Dalton è abbastanza grande da non riuscire ad entrare nei pori, o per lo meno è sfavorito in questo, dato che risulta lungo circa 13 nm rispetto a pori di circa 2-3 nm. [66] Ciò non si può affermare per catene più corte, dove l'area di *grafting* calcolata non è più rappresentativa di quella reale; in quest'ultimo caso molto dipende non solo dal tipo di polimero usato (PM grande o piccolo) ma anche dalla procedura di *PEGylation*, come sarà approfondito nei capitoli successivi.

Secondo l'articolo di *Sofia J. et Al.* [80], è possibile stimare la densità superficiale di catene di PEG legate sulle nanoparticelle **mesoporose**, conoscendo la dimensione della particella ricavata dalle immagini TEM, come spiega anche *Cauda et Al.* nel suo lavoro [83]. Proprio da quest'ultimo articolo è possibile con alcune approssimazioni, ricavare questo dato dalla seguente eq.: [84]

$$D_{\text{PEG}} = [\text{molecole}/\text{nm}^2] = \frac{\rho\beta N_A d 10^{-24}}{6M(1 - \frac{\rho V_p}{3})} \quad (3.1)$$

dove,

$\rho$  è la densità della silice che oscilla fra i 1,85 e 2,20 g/cm<sup>3</sup>,  $\beta$  è la perdita in peso dovuta al PEG nell'analisi TGA [mg/g],  $N_A$  è il numero di Avogadro,  $d$  è la dimensione della particella determinata dalle immagini TEM,  $M$  è il peso molecolare del polimero,  $V_p$  è il volume dei pori calcolato mediante tecnica BET.

Il modello alla base dell'equazione 3.1 assume che :

- le particelle siano sferiche;
- i pori siano cilindrici, dritti, senza difetti o curve, e che attraversino da lato a lato l'intero volume della particella;
- il numero dei mesopori è definito come il doppio del numero dei cilindri (la testa e la coda a ogni estremità della particella);

L'approccio a questo problema consiste inizialmente nel calcolo del volume occupato dai pori in una sola nanoparticella; questo valore viene determinato dalla massa di una di queste nanoparticelle moltiplicate per la misura del volume dei pori [ $cm^3/g$ ] ottenuto mediante analisi BET:

$$V_{pori}^1 = V_{BET} \cdot w^1$$

$$w^1 = \rho_{silice} \cdot V_{sfera}^1$$

$$V_{sfera}^1 = \frac{4}{3}\pi \cdot d_{TEM}^3 \quad (3.2)$$

dove,  $V_{pori}^1$  è il volume occupato dai pori in una sola particella,  $V_{BET}$  è il dato ottenuto dalla tecnica BET,  $w^1$  è il peso di una singola nanoparticella,  $\rho_{silice}$  è la densità della silice,  $V_{sfera}^1$  è il volume di una particella piena avente diametro pari al valore ricavato dalle immagini TEM,  $d_{TEM}$ .

Ottenuto il volume dei pori di una singola particella, si ricava la superficie libera della nanoparticella :

$$S_{free}^1 = S_{piena}^1 - S_{pori}^1$$

$$S_{piena}^1 = 4\pi\left(\frac{d_{TEM}}{2}\right)^2 \quad S_{pori}^1 = n_{pori} \cdot \pi\left(\frac{d_{pori}}{2}\right)^2$$

$$n_{pori} = \frac{V_{pori}^1}{V_{cilindri}} \quad V_{cilindri} = \pi\left(\frac{d_{pori}}{2}\right)^2 \cdot d_{TEM} \quad (3.3)$$

dove,  $S_{free}^1$  è la superficie disponibile di una nanoparticella,  $S_{piena}^1$  è la superficie della stessa particella in assenza di pori,  $S_{pori}^1$  è l'area che occupano i pori di diametro  $d_{pori}$  sulla superficie,  $n_{pori}$  è il numero di pori presenti in una particella: calcolato dividendo il volume vuoto della particella ( $V_{pori}^1$ ) per il volume di un ipotetico cilindro lungo  $d_{TEM}$  e con base rotonda con diametro  $d_{pori}$  ricavato dalla misura della distribuzione dei pori sempre mediante tecnica BET.

A questo punto per determinare la superficie disponibile alla funzionalizzazione di 1 grammo di nanoparticelle:

$$S_{free}^{tot} = S_{free}^1 \cdot \frac{1}{w^1} \quad (3.4)$$

Unendo le varie equazioni 3.2, 3.3, 3.4 e inserendo la quantità di polimero legato alle particelle, ottenuta dall'analisi TG, dopo alcuni passaggi si risale all'eq. 3.1 da cui è possibile ricavare il valore della densità di PEGylation.

### 3.3.2 Spessore dello strato di PEG

Il diametro medio delle particelle dopo il processo di *PEGylation* aumenta a causa della presenza del PEG superficiale e può essere determinato mediante la tecnica DLS oppure direttamente al TEM. Nel primo caso, la tecnica dello *Dinamic Light Scattering* misura la

dimensione idrodinamica della particella, ovvero la dimensione del sistema costituito dalla particella stessa e lo strato del mezzo disperdente che si muove solidale a essa; questa misura dipende principalmente dall'interazione fra la superficie della particella e il mezzo in cui è dispersa, oltre che dai fenomeni di aggregazione che possono insorgere durante la prova. Per esempio, le particelle di silice *nude* mostrano dimensioni idrodinamiche maggiori in acqua rispetto alle stesse PEGylate. Nelle particelle ricoperte da polimero, l'interazione del PEG con il solvente sembra essere più debole rispetto a quella che genera la superficie della silice, perciò è giustificato un diametro idrodinamico minore.

Nel caso in cui, la particella sia *PEGylata* solo parzialmente, si osserva una minor diminuzione della sfera idrodinamica rispetto al caso precedente, indipendentemente dal PM del polimero [83]; probabilmente ciò è causato dall'incompleto ricoprimento superficiale dello strato di PEG. Risulta possibile ottenere elevate densità di *PEGylation* e ricoprimenti pressoché totali della superficie della particella mediante il *grafting* di polimeri con lunghezza delle catene diverse (o di diverso PM medio).

Le dimensioni del sistema ricavate dalle immagini TEM risultano essere più piccole rispetto a quelle determinate con la DLS, a causa delle condizioni presenti all'interno della camera del TEM. Dagli ingrandimenti è possibile determinare un aumento medio delle dimensioni tra le particelle PEGylate e non, riconducibile a una variazione di diametro dell'ordine dei 10-15 nm, come riportato dalla letteratura [83]; inoltre è possibile notare un cambiamento nella morfologia dei pori della particella e un arrotondamento dei bordi, come se vi fosse presente una sorta di deposito superficiale.

### 3.3.3 Conformazione dello strato polimerico

Un'altra proprietà del polimero che influenza le proprietà della particella PEGylata è il tipo di conformazione che assume la catena. La configurazione del polimero è legata anche al suo peso molecolare: all'aumentare del PM medio del PEG legato, le catene si modificano da una configurazione prevalentemente a *brush* (spazzola), vedi fig. 3.9, a quella fungo *mushroom*, come mostrato nella fig. 3.10 [12]. La conformazione a spazzola presenta un'elevata densità superficiale di polimero e una miglior disposizione delle catene che si estendono verso l'esterno della particella; tali caratteristiche rendono questa struttura del PEG, la migliore al fine di sviluppare proprietà *stealth* nei nano-sistemi. La configurazione a fungo, invece, genera uno strato di PEG con bassa densità di catene e di qualità minore rispetto la prima, ma presente una mobilità delle catene decisamente maggiore rispetto alla conformazione a spazzola, che ne migliora la resistenza al fenomeno dell'*opsonizzazione*. Al contrario, sembra che per alte densità di *PEGylation*, di PEG a elevati pesi molecolari, la forma *brush* limiti enormemente la flessibilità delle catene, riducendo l'effetto di stabilità sterica che si cerca d'ottenere.[12, 21]

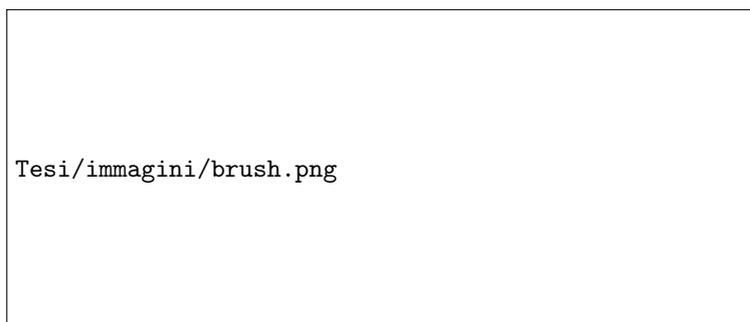


Figura 3.9: PEGylation con conformazione a spazzola delle catene di PEG, la sola variazione della forma del polimero ne aumenta la densità di ancoraggio.

La copertura superficiale ottimale si ottiene, quindi, con una configurazione intermedia fra le due, al fine d'ottenere un'alta densità superficiale delle catene e una contemporanea alta mobilità, così da ricoprire interamente e in maniera efficiente la particella.[22] In questo caso non si è tenuto conto dell'interazione polimero-superficie che può incidere pesantemente sulla struttura del *layer* polimerico.

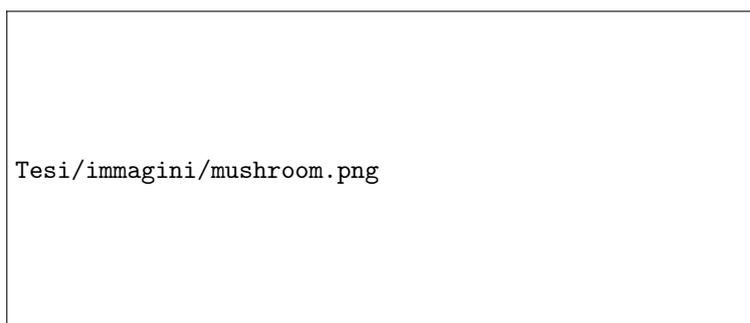


Figura 3.10: PEGylation con conformazione *mushroom*

L'uso di catene di PEG a diversa lunghezza, o diverso peso molecolare, può essere una strategia per aumentare la stabilità delle particelle *PEGylate*; infatti lo strato fisso d'acqua superficiale (*FALT*, *fixed aqueous layer thickness*, parametro legato alla qualità della *PEGylation* e fondamentale per la stabilità sterica del sistema) varia a seconda della struttura che assume il polimero e pare che, usando catene di lunghezza diversa, questo strato aumenti, vedi fig. 3.11 [85]. Ciò è vero solo per un certo rapporto fra il PEG con PM elevato e con PM piccolo, al discostarsi da questo valore, lo spessore del *FALT* varia tra i due casi estremi di *PEGylation* con solo PEG a PM elevato o PM piccolo. Questo effetto è stato messo in luce da uno studio condotto su liposomi *PEGylati*, e nonostante la diversa natura delle particelle, presenta un riscontro anche nel caso delle nanoparticelle di silice [83].

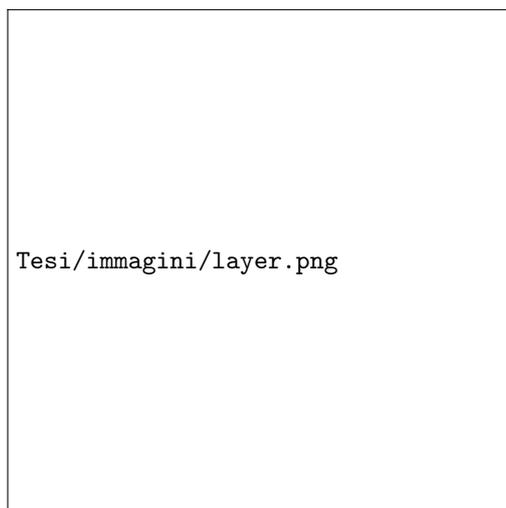


Figura 3.11: Variazione della dimensione del *FALT* a seconda del valore e della distribuzione di PM del polimero: a) PEG con catene a lunghezza ridotta, b) PEG con catena a lunghezza elevata, c) PEG di diverso PM e catena di diversa lunghezza

## Porosità

La porosità nelle MSN PEGylate varia a seconda del PM del polimero legato. Polimeri di grandi dimensioni non sono fisicamente capaci di entrare nei pori della silice (si tratta di pori con diametri medi tra i 2.5 e 3 nm), ma possono in qualche modo occluderne l'accesso, pertanto la distribuzione delle porosità nella nanoparticella non varia anche se risulta drasticamente diminuita. Bisogna notare però, che la tecnica BET utilizzata per questa misura richiede che il campione venga raffreddato a temperatura dell'azoto liquido, pertanto il polimero legato in queste condizioni risulta rigido e può occludere l'ingresso dei pori. In questo modo, il valore misurato di porosità della particella di silice PEGylata risulta drasticamente sottostimato rispetto al valore reale.[21].

In caso di polimeri più piccoli, con PM inferiore a 500 Dalton, il PEG si lega anche all'interno dei pori, in pratica riducendo realmente la porosità interna delle nanoparticelle.

## 3.4 Processi di PEGylation

Il processo di PEGylation di nanoparticelle di silice mesoporose può essere condotto sia durante la sintesi delle stesse particelle (Co-condensazione) [86], sia in un momento successivo (Post-Sintesi). In entrambi i casi, a seconda della procedura seguita, vi è l'uso del polimero tale e quale, senza che abbia subito alcuna modifica, oppure di un suo derivato funzionalizzato, come le varie coniugazioni del PEG descritte nel capitolo precedente, tra cui il PEG-Silano.

Il polimero si lega sulla superficie della particella disponendosi a seconda dell'ingombro sterico presente tra le catene del PEG, che perciò, risulta essere uno dei principali fattori che determina: la densità di PEG aggraffato e la struttura stessa del *layer* polimerico. Ciò significa che come detto precedentemente, polimeri con PM medio diverso possono dare

densità di PEGylation diverse.

In entrambi i processi, il polimero può legarsi in vari modi alla superficie dei supporti: un fisi-adsorbimento superficiale, mediante legami di semplice natura elettrostatica, oppure, con un chemio-adsorbimento, dove tra la catena di polimero e il supporto si instaura un vero e proprio legame chimico. C'è da precisare che ognuna di queste interazioni presenta pregi e difetti: nel caso di una PEGylation con un metodo non-covalente, la particella perde le sue proprietà di stabilità in mezzi con elevata forza ionica in tempi relativamente brevi a causa delle deboli forze di legame in gioco, inoltre la densità superficiale di catene del polimero risulta essere scarsa[87]; per tutta questa serie di motivi, questo approccio viene poco utilizzato[88]. Un esempio di questa metodologia si trova nel lavoro di *Thierry B. et Al*[89].

Il metodo covalente, fig. 3.12, sopperisce a questi problemi con un legame più forte tra supporto e polimero, tuttavia le condizioni di sintesi che richiedono questo tipo di procedura sono in genere incompatibili con la presenza di possibili molecole, come di farmaci che si intende caricare; inoltre la procedura da seguire risulta complessa e con tempi di reazione molto lunghi.[74, 90]



Figura 3.12: Possibili risultati di tecniche covalenti di PEGylation[50], è possibile usare PEG bifunzionalizzati per ottenere ulteriori siti di reazione per legare molecole specifiche: proteine, anticorpi,...

In questo capitolo, verranno riportate le procedure e le tecniche di PEGylation, compatibili con le nanoparticelle di silice, e che comportano la formazione di legami chimici tra il PEG e la superficie delle particelle.

Queste procedure si dividono in:

- le procedure di *grafting* del tipo *POST-sintesi*, che avvengono successivamente alla sintesi delle particelle. Possono essere ulteriormente suddivise in due categorie:

**Grafting from** Consiste in una reazione di polimerizzazione con cui si sintetizza il polimero direttamente sulla superficie della particella; in genere sulla nanoparticella viene aggraffato un'iniziatore polimerico, da cui si sviluppa il polimero aggiungendo all'ambiente di reazione il monomero.[91, 92]

**Grafting to** In questo tipo di processo, il PEG o la superficie di silice, o entrambi, vengono funzionalizzati con particolari gruppi funzionali, per poi fatti rea-

gire insieme allo scopo d'aggraffare il polimero sulla particella con un legame covalente.[88]

- le procedure di *grafting* che avvengono durante la sintesi delle particelle; le quali possono essere divise a seconda del tipo di derivato del PEG usato:

**PEGylation diretta/Intrappolamento** In questa procedura si utilizza il PEG e la silice non funzionalizzata e la reazione di *grafting* coinvolge i gruppi ossidrilici delle due specie. Anche se tale procedura viene riportata in alcuni articoli, è messa in dubbio da altri lavori scientifici.

**Co-condensazione** In questa procedura si utilizza un derivato del PEG, in genere PEG-Silano, che, aggiunto durante la sintesi delle MSN, produce particelle *PEGylate* (il PEG-Silano possiede 3 gruppi -OEt capaci d'idrolizzare, pertanto tende a disporsi sulla superficie delle particelle in accrescimento anche per effetto dell'elevato ingombro sterico del polimero).

Generalmente i processi di *PEGylation* usano reattivi chimici comuni tra loro, solitamente quelli maggiormente usati sono riportati nella tabella 3.2.

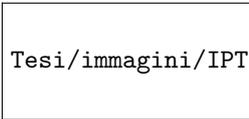
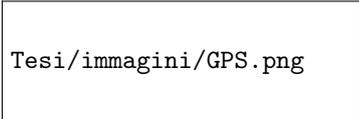
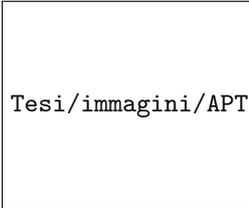
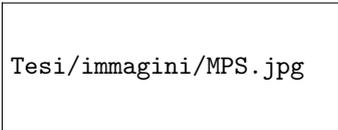
Struttura	Nome
 Tesi/immagini/IPTS.png	IPTS, 3-Isociannato Propil Trietossi Silano; Il principale reagente alla base delle reazioni di sintesi dei PEG-Silani
 Tesi/immagini/GPS.png	GPTS, 3-Glicidossi Propil TrietossiSilano; Un'altro importante reagente alla base delle reazioni di sintesi dei PEG-Silani, usato prevalentemente nel processo a TWO STEP
 Tesi/immagini/APTS.png	APTS 3-Amino Propil TrietossiSilano; Questo silano è usato principalmente nei processi TWO STEP come sito di aggraffaggio del PEG sulla superficie della silice.
 Tesi/immagini/MPS.jpg	MPS, 3-Metacrilato PropiltrirossiSilano; Un'altra funzionalizzazione del TEOS, usato come punto d'aggancio del PEG sulla superficie della particella.

Tabella 3.2: Reagenti silanici maggiormente utilizzati nella PEGylation

### 3.4.1 GRAFTING FROM

Il processo di PEGylation con metodo **grafting from**, prevede la crescita delle catene polimeriche di PEG direttamente sulla superficie delle nanoparticelle di silice; questa tecnica permette d'ottenere una maggior densità di catene aggraffate, per effetto della piccola barriera sterica generata del polimero in accrescimento, che si traduce in una migliore diffusione delle molecole di monomero nei siti di reazione.

Gli svantaggi sono un basso  $\overline{PM}$  del polimero e un mancato controllo della dimensione delle catene (ovvero, un'elevata polidispersione del polimero aggraffato).

Il PEG non è il solo polimero che si può aggraffare con questa procedura di *grafting*. Come riportato nell'articolo di *Radhakrishnan* [88], è possibile sintetizzare diversi polimeri direttamente sulla superficie delle particelle mediante le *polimerizzazioni inizializzate superficialmente*. A seconda del polimero, esistono differenti meccanismi di reazione, che coinvolgono reagenti e condizioni diverse; alcuni di queste reazioni sono: ATRA (*Atom*

*transfer radical addition*, RAFT(*reversible addition-fragmentation chain transfer*),...

Nel caso specifico, se si vuole sintetizzare il Poli etilen glicole sulle particelle di silice, il processo di *grafting from* viene denominato ROP, *ring-opening polymerization* dell'ossido d'etilene e viene descritto nell'articolo di *Joubert et Al.* [93]. La metodologia segue 3 passaggi distinti e l'uso di tre reattivi:

**1° passaggio** Le particelle di silice vengono funzionalizzate superficialmente con il GPS, *3-glycidoxypropyl trimethoxysilane*, fig 3.2, allo scopo d'introdurre sulla superficie della particella i siti d'ancoraggio del polimero;

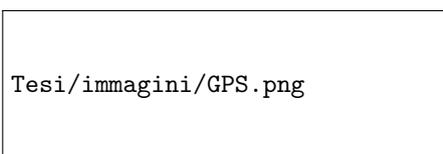


Figura 3.13: Struttura chimica del 3-glycidoxypropyl trimethoxysilane

**2° passaggio** Alle particelle di silice aggraffate con GPS, viene aggiunto *aluminium isopropoxide*, che si lega sulla superficie nei siti ossidrili liberi dal GPS; questo composto è l'iniziatore metallico del processo di polimerizzazione.

**3° passaggio** Infine, va aggiunto il monomero, l'ossido d'etilene che va ad accrescere le catene del polimero.

A questo punto, le particelle vengono lavate e centrifugate più volte in etanolo per eliminare i reagenti non reagiti, o il PEG non aggraffato; infine vengono seccate sotto vuoto. Il grado di polimerizzazione medio viene calcolato, dalle concentrazioni monomero e d'iniziatore, assumendo che solo uno dei due gruppi ossidrili, derivati dall'apertura dell'anello del GPS, reagisca [93]; come riportato dall'articolo, questo processo non ottiene rese di conversione molto alte, che sono influenzabili anche dal tipo di silice utilizzata.

Un'altra sintesi interessante è descritta nell'articolo di *Khan et Al* [94]; in questo caso si sintetizza sulla particella di silice, il Poli-*Glycidol* simile al PEG, anche se in questa procedura si punta ad ottenere un polimero altamente ramificato e non lineare; si suppone che il meccanismo di reazione sia lo stesso dell'esempio precedente, il ROP, però in ambiente decisamente basico che permette la crescita del polimero su entrambi i gruppi ossidrili derivanti dall'idrolisi dell'anello del glicidolo, fig. 3.14, allo scopo di generare una struttura decisamente ramificata.

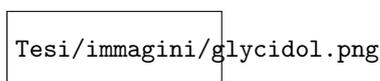


Figura 3.14: Struttura chimica del Glycidol

### 3.4.2 GRAFTING TO

A differenza della tecnica di *PEGylation* precedente, il processo *grafting to* prevede l'uso del polimero PEG già sintetizzato, e il processo di funzionalizzazione avviene attraverso una reazione specifica tra un polimero mono- o bi- funzionalizzato e la superficie della

nanoparticella di silice anch'essa funzionalizzata.

Esistono varie strategie da seguire, le quali possono essere suddivise a seconda del numero dei passaggi che coinvolgono l'uso delle particelle di silice:

**Sintesi ONE STEP** Viene prima sintetizzato il composto PEG-Silano, o PEG-attivato, usato nella reazione di PEGylation vedi es. tab 3.1; in seguito si aggrappa il polimero sulla particella di silice mediante una reazione che coinvolge la componente attiva del PEG-Silano;

**Sintesi TWO STEP** In questo caso vengono funzionalizzate, a parte, la superficie della particella e uno dei due gruppi terminali del PEG; successivamente li si fa reagire fra loro in modo da aggrappare il polimero alla superficie;

Di seguito sono riportate le sintesi trovate in letteratura con i relativi articoli e suddivise a seconda del numero di sintesi che segue la nanoparticelle di silice( una sola volta, ONE STEP; due volte, TWO STEP).

#### Procedure di sintesi ONE STEP

Questa metodologia si concentra sulla sintesi del **PEG-Silano**, una specie chimica che funziona da compatibilizzante tra la silice e il PEG; successivamente segue la reazione di grafting vera e propria, con la formazione di legami covalenti fra il PEG-Silano e la particella.

La struttura di base della molecola di PEG-Silano è più o meno la stessa per tutte le metodologie, ciò che in verità cambia è il legame-ponte fra il gruppo silano e il PEG del composto, e dipende dal tipo di reagenti usati; è possibile trovare PEG-silani legati da:

- un gruppo carbamato (legame uretanico), vedi fig 3.15:

Tesi/immagini/PEGSiCarb.png

Figura 3.15: PEG-silano ottenuto da IPTS e PEG

Il composto deriva dalla reazione di gruppo ossidrilico (mPEG-OH) e un gruppo isocianato (IPTS) catalizzato dalla presenza di DBTL, *DiButilTin DiLaurate* [70, 71, 75, 90, 95–98] è possibile sintetizzare il composto anche senza catalizzatore, ma a più alta temperatura e con un maggior tempo di reazione [99]; oppure dalla reazione fra un PEG funzionalizzato con un acido (PEG-COOH) e un silano (APTS) [66].

La caratterizzazione avviene per identificazione dei picchi caratteristici nello spettro IR del gruppo carbamato, e la scomparsa dell'assorbimento dovuto al gruppo -OH del PEG[75, 100].

- un gruppo carbamidico; a differenza del carbamato sono presenti due gruppi ammidici invece che uno solo, vedi fig 3.16:

Tesi/immagini/PEGSiUr.png

Figura 3.16: PEG-silano ottenuto da IPTS e PEG-NH<sub>2</sub>

Derivato sempre da un gruppo isocianato (IPTS) e un'ammina primaria mPEG-NH<sub>2</sub> (in questo caso un PEG precedentemente funzionalizzato)[96];

- un gruppo amminico secondario, vedi fig 3.17: derivato dalla reazione tra un PEG

Tesi/immagini/PEGSiAm.png

Figura 3.17: PEG-silano ottenuto da PEG-Br e APTS

funzionalizzato con un buon gruppo uscente (-Br o -Ts, tosilato) e un silano (APTS)[83, 101];

- un semplice ponte etereo, vedi fig 3.18;  
In questo caso il PEG-Silano è ottenuto dalla reazione tra il semplice PEG-OH e il

Tesi/immagini/PEGSiCl.png

Figura 3.18: PEG-silano ottenuto da PEG-OH e TetraCloruro di silicio

Si(Cl)<sub>4</sub> catalizzata dalla TriEtil Ammina o in genere di una base di Lewis.[73, 81]

**Reazione fra il PEG-Silano e la silice** Successivamente alla sintesi del PEG-Silano, segue la reazione di grafting;

Tesi/immagini/Silaniz.png

Figura 3.19: Meccanismo di condensazione tra la superficie di silice e PEG-silano

Il meccanismo di reazione è relativamente semplice: tra i gruppi silossanici del PEG-silano e i gruppi ossidrilici presenti sulla superficie della particella di silice, avviene una reazione di *silianizzazione*, con la formazione di legami a ponte Si-O-Si tra gli atomi di silicio delle due specie reagenti, vedi fig 3.19, e il conseguente *grafting* del polimero. Tale sintesi viene eseguita in vari ambienti:

- in un semplice refluxo in Toluene [98],
- in una soluzione acqua/etanolo in presenza di un acido,[102],
- in etanolo con acido [98],

- ancora in acqua in presenza di una base [70, 75];
- successivamente alla sintesi delle nanoparticelle di silice, aggiungendo di fatto il composto PEG-silano dopo poche ore l'inizio del processo Stöber [15, 103];

I tempi di reazione non sono comparabili tra i lavori, in ogni caso a seconda dell'ambiente di reazione si avranno tempi che variano da poco meno di un'ora fino al massimo di un giorno.

Ovviamente, si assume che in ogni procedura, il tempo di reazione scelto permetta di ricoprire con il massimo numero possibile di molecole di PEG la superficie delle nanoparticelle, in relazione alla concentrazione di PEG-Silano utilizzata.

Successivamente, la polvere ottenuta viene lavata più volte in acqua o etanolo e centrifugata, al fine d'eliminare ogni traccia d'impurezze.

Va detto che, in molti articoli, al processo di PEGylation precede una fase di idrolizzazione-attivazione superficiale della silice, sia essa sotto forma di particella o altra geometria (per esempio una superficie generica), allo scopo di massimizzare il numero di gruppi -OH superficiali su cui si vanno ad aggraffare le molecole di PEG; tale reazione è condotta prevalentemente in ambiente acido e in presenza di forti agenti ossidanti. [96, 98, 104]

Inoltre, è stato dimostrato che eseguire un processo idrotermale (in ambiente acquoso a circa 90°), successivamente al processo di PEGylation, comporta un aumento della stabilità delle nano-particelle PEGylate in ambienti fisiologici, quali PBS.[103]

#### Procedure di sintesi TWO STEP

In questo caso non viene sintetizzato un composto compatibilizzante, come il PEG-silano, ma si funzionalizza separatamente la superficie della particella di silice e un gruppo terminale del PEG, vedi fig. 3.20; i composti che si ottengono hanno il vantaggio di poter reagire specificatamente fra loro e a condizioni più blande rispetto al metodo precedentemente descritto.

Le strategie di sintesi sono molto varie, e in genere è diffuso l'utilizzo di agenti funziona-

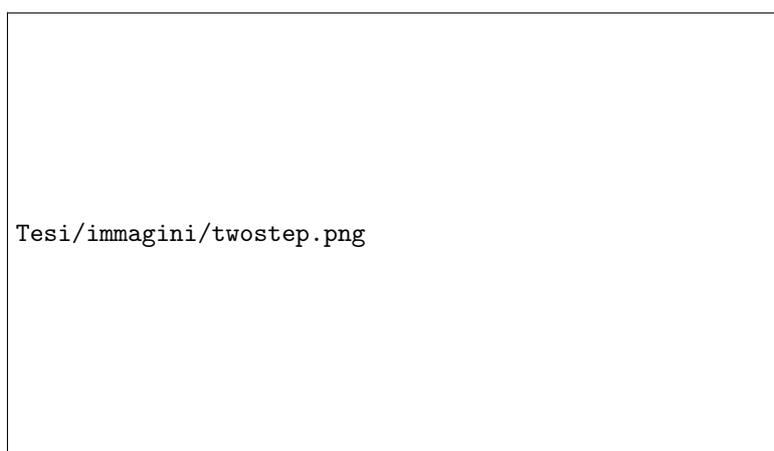


Figura 3.20: Meccanica di processo della sintesi *two step*

lizzanti come l'APTS e il GPTS, vedi tab.3.2, e le reazioni maggiormente usate sono quelle tra gruppi isocianati, succinimidici e amminici; di seguito sono riportate brevemente le strategie di sintesi ricavate dagli articoli scientifici presenti nella letteratura:

- il lavoro di *Zhu et Al*[54], propone una *PEGylation* partendo dal poli etilenossido funzionalizzato con un gruppo amminico. In tale processo, viene prima aggraffato il composto APTS sulla superficie delle particelle di silice in solvente d'etanolo a temperatura ambiente; successivamente il PEG-NH<sub>2</sub> e la silice vengono posti a reagire insieme con *p-phenylene diisothiocyanate*, che lega le due strutture a ponte con legami carbimidici.
- l'articolo di *Pilloni et Al*[105], segue una procedura più complicata; dal classico mPEG-OH si ottiene per sintesi successive un PEG funzionalizzato con il gruppo succinimidico, che si lega selettivamente ad ammine primarie, come quella presente sull'APTS che viene precedentemente aggraffato sulla particella di silice.
- la procedura seguita da *Zhang et Al*[92] è più semplice dato che parte da un PEG già funzionalizzato con il gruppo isociannato, fatto reagire con una superficie di silice precedentemente funzionalizzata con l'APTS;
- metodologia diversa seguono i lavori di *Pielher et Al*[106], *Shen et Al*[107] e *Feng et Al*[108]; in questo caso, la silice viene inizialmente funzionalizzata con il GPTS. L'anello epossidico introdotto dal GPTS reagisce selettivamente con diversi tipi di PEG derivati, nel caso di questi lavoro vengono usati un PEG-ammina e un PEG-COOH, entrambi aggraffati con successo sulla superficie della particella.

La chimica di reazione del GPTS richiede un piccolo approfondimento. Come detto prima, il gruppo epossidico introdotto sulla superficie della particella reagisce con vari tipi di PEG funzionalizzati e di conseguenza varia anche il tipo di legame-ponte che unisce la silice al PEG; ciò garantisce una notevole libertà al processo di PEGylation, dato che è possibile usare la derivazioni del polimero che più si adatta alle condizioni di sintesi. Nella tabella 3.21, è riportato un breve scorcio dei prodotti di reazione di alcune funzionalizzazione del PEG con il GPTS.

- un'altra strategia di sintesi prevede l'impiego del MPS (Methacryloxypropyltrimethoxysilane, fig 3.22); secondo il lavoro di *Flesch et Al*[109], si procede inizialmente aggraffando sulla superficie della particella il MPS su cui si lega il polimero funzionalizzato con un altro gruppo Metacrilato mediante una copolimerizzazione diretta iniziata da KPS (potassium persulfate).
- la strategia di PEGylation usata da *Godin et Al* [110], si basa sulla reazione specifica fra un gruppo succinimidico, tab.3.1, presente sulla molecola di PEG, e il gruppo amminico primario sulla particella di silice, precedente funzionalizzato con l'APTS; il prodotto della reazione è un polimero perfettamente legato alla silice mediante legame amidico.
- una sintesi relativamente complicata è quella di *Lin Y.S. et Al* [111]. Partendo da un funzionalizzazione della silice con l'IPTS, si riesce a ottenere un legame-ponte tra il PEG e la silice di tipo -NH-CH<sub>2</sub>-, mediante la sintesi di un PEG-chetone e l'uso di adeguati catalizzatori;
- infine, l'articolo di *Wang et Al* [112], presenta una PEGylation che utilizza un PEG non funzionalizzato. Ciò è possibile grazie alla funzionalizzazione della superficie della silice con gruppi -Cl che sostituiscono i gruppi ossidrilici; la sintesi è condotta per 4 h a Temp. ambiente, sotto atmosfera d'azoto e con l'uso del *cloruro di tionile*,



Figura 3.21: Reazioni tra il GPTS e alcune delle principali funzionalizzazioni del PEG.

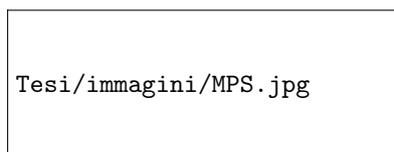


Figura 3.22: struttura chimica del 3- Metacrilato PropiltrimetossiSilano

$SOCl_2$ . Successivamente vengono fatti reagire il PEG e la silice clorurata in etanolo sempre per 4h a temperatura ambiente; la sintesi produce una polvere bianca di nanoparticelle di silice PEGylata, che va lavata più volte in acetone e infine seccata sotto vuoto.

### 3.4.3 PEGylation diretta, intrappolamento e co-condensazione

Alcuni lavori introducono la possibilità di *PEGylare* le particelle di silice mediante reazione diretta fra il gruppo terminale ossidrilico del PEG e i gruppi ossidrilici della superficie della silice. In realtà, la reazione di aggraffaggio del PEG avviene in simultanea con quella di sintesi delle nanoparticelle, cosicché molte delle catene risultano intrappolate nella matrice silicea e una piccola parte si aggraffa sulla superficie [87]. Questa tecnica di Co-condensazione è molto più usata nel caso di semplici silani funzionalizzati (come l'APTS, IPTS, ...), e genera particelle con elevata densità di gruppi funzionali distribuiti omogeneamente nel sistema. [113]

La procedura seguita in questi articoli prevede la sintesi delle particelle di silice, secondo il classico metodo Stöber, in presenza del PEG libero nell'ambiente di reazione. [86, 114, 115]

Parte del polimero si lega alla superficie della particella in formazione mediante una rea-

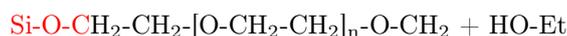
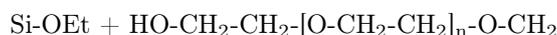


Figura 3.23: Reazione di Trans esterificazione tra i gruppi ossidrilici del polimero e quelli presenti sulla superficie della silice.

zione di *trans-esterificazione*: La reazione è una condensazione fra il gruppo silanolo superficiale e il gruppo terminale alcolico del PEG, con formazione del legame etero Si-O-C, come si vede in fig. 3.23; in molti lavori è chiamata *reazione di trans-esterificazione* dato che il meccanismo ricorda da vicino l'*esterificazione di Fischer* (dove un acido carbossilico è direttamente convertito in un estere con un alcol, in presenza di acidi minerali e alta temperatura).

Il meccanismo è una *sostituzione acilica nucleofila*, acido-catalizzata, dato che il gruppo ossidrilico non è abbastanza acido per dare il via al processo.[116]

La percentuale di PEG che si lega alla silice seguendo una procedura di intrappolamento o di PEGylation diretta risulta essere, salvo alcune eccezioni, bassa rispetto alle tecniche viste nei capitoli precedenti, inoltre le analisi TGA condotte su questi sistemi ibridi, mostrano come la perdita in peso di PEG avvenga a temperature maggiori rispetto al polimero puro, come se l'intrappolamento delle catene polimerica nella matrice di silice ritardasse la decomposizione del polimero. [117]

**Co-condensazione** Nel caso si non si usi il polimero puro, ma il composto PEG-Silano, la sintesi prende il nome di **co-condensazione**. Questa procedura si può trovare in alcuni articoli che trattano il problema della stabilità fisica delle sospensioni prodotte con le nanoparticelle mesoporose di silice *PEGylate*. L'aggiunta del composto PEG-Silano avviene al termine del processo Stöber, in modo tale che la condensazione dei gruppi silanoli del composto PEG-silano avvenga sulla superficie delle particelle da poco sintetizzate, che presentano basso grado d'aggregazione.[15, 83, 101]

Questa metodologia è caratterizzata da un importante problema. Il tensioattivo presente all'interno della silice deve essere successivamente eliminato mediante estrazione chimica, dato che un processo di calcinazione degraderebbe il polimero aggraffato. L'efficienza di questa fase d'eliminazione dipende da vari fattori: solvente usato (metanolo, etanolo,...), ioni di scambio (acidi, ione ammonio,...) e numero di estrazioni; inoltre, probabilmente, la stessa dimensione dei pori regola la cinetica d'estrazione e la stessa presenza del PEG sulla superficie di questi sistemi può ostacolare in qualche modo l'uscita delle molecole di tensioattivo dai pori.

Nel prossimo capitolo del documento verrà descritta la parte sperimentale del lavoro svolto, con la descrizione dettagliata delle procedure e la caratterizzazione di ogni sistema prodotto.

# Capitolo 4

## Parte sperimentale

### 4.1 Reagenti utilizzati

I composti chimici usati in questo lavoro sono stati usati come tali, senza essere sottoposti ad alcun tipo di purificazione.

Composto	PM Dalton	Densità[20°C] g/cm <sup>3</sup>	Purezza %	Marca	CAS
Etanolo	46	0.789	>99.9	Carlo Erba Reagents	[64-17-5]
Metanolo	32.04	0.791	>99.6	Sigma-Aldrich	[67-56-1]
Toluene	92.14	0.865-0.869	>99.5	Carlo Erba Reagents	[108-88-3]
Cetil Trimetil Ammonio Broruro [CTAB]	364.46	-	-	Sigma-Aldrich	[57-09-0]
Amminio idrossido	17.03	0.88	-	Fluka	[1336-21-6]
Tetra Etil Orto Silicato [TEOS]	208.33	0.933	98	Sigma-Aldrich	[78-10-4]
3-Isocianato Propil Trietossi Silano [IPTS]	247.37	0.999	>95	Sigma-Aldrich	[24801-88-5]
Mono-Metossi Poli Etilen Glicole [mPEG]	5000	-	-	Sigma-Aldrich	[9004-74-4]
1-6 DiIsocianato Esano [DIE]	168.2	1.040	>98	Sigma-Aldrich	822-06-0
Acido cloridrico	36.45		37		

Il mPEG è stato trattato sottovuoto per alcune ore, allo scopo d'eliminare ogni residuo di acqua presente.

## 4.2 Procedura di sintesi:MSN

Le nanoparticelle di silice mesoporose sono state sintetizzate seguendo la preparativa riportata nell'articolo di *Qiao et al* [46]. Il processo è una sintesi Stöber templata, in cui la presenza di un tensioattivo cationico (CTAB) sviluppa la porosità all'interno delle particelle di silice.

In un pallone da 200 ml vengono inseriti 56,6 ml di acqua deionizzata, 8,86 ml di alcol etilico, 2,08 g di CTAB e 0,484 ml di soluzione acquosa d'idrossido d'ammonio. La soluzione viene lasciata, sotto forte agitazione, alla temperatura di 50°C.

Dopo 30 minuti, vengono aggiunti goccia a goccia 5,48 ml di TEOS, mediante apposito imbuto gocciolatore. La sospensione viene mantenuta a 60°C, sotto energica agitazione per 2 ore.

Terminata la reazione, la sospensione viene lasciata raffreddare fino a temperatura ambiente per poi venir separata mediante centrifugazione. Successivamente, la componente solida della soluzione colloidale separata dal surnatante, viene ri-dispersa in alcol etilico e di nuovo centrifugata. Questa operazione va ripetuta per almeno 3 volte per eliminare i reagenti che non hanno reagito durante la sintesi delle particelle.

Infine, il precipitato bianco che si ottiene, viene trattato termicamente in muffola alla temperatura di 550°C per almeno 6 ore; questo passaggio permette la completa eliminazione del surfattante (CTAB). La polvere ottenuta viene stoccata in un essiccatore oppure dispersa, con l'aiuto di un sonicatore a punta, in acqua bi-distillata e conservata in frigo a 4°C.

Le quantità riportate permettono d'ottenere circa 1.5 g di nanoparticelle di silice. I rapporti dei reagenti rispetto al TEOS sono riportati in dettaglio nella tabella 4.1

TEOS	NH <sub>3</sub>	Acqua	Alcol Etilico	CTAB
1	0.28	125.7	6.1	0.24

Tabella 4.1: Nella tabella, sono riportati i rapporti molari dei vari reagenti rispetto al TEOS.

## 4.3 Procedure di sintesi: PEGylation

In questo lavoro di tesi si sono esplorate le tecniche di PEGylation su nanoparticelle di silice con approccio *grafting to*, riportate in letteratura. Questa metodologia si può dividere in 2 principali processi, che si dividono a seconda del numero di reazioni che coinvolgono le nanoparticelle di silice:

**ONE STEP** La procedura prevede la sintesi di un composto mPEG-Silano e la successiva reazione di condensazione con le particelle di silice, già sintetizzate.

**TWO STEP** In questa metodologia la silice viene inizialmente funzionalizzata con un gruppo chimicamente attivo (in questo caso un gruppo isocianato -NCO). La successiva reazione consiste nel legare le catene di PEG alla superficie della silice mediante reazione fra il gruppo attivo inserito in precedenza e il gruppo -OH del polimero.

Oltre all'approccio *grafting to* si è voluto esplorare anche una sintesi diretta di particelle di silice mesoporose *PEGylate*:

**CO-CONDENSAZIONE** Questa procedura prevede la *Pegylation* mediante l'aggiunta del composto PEG-Silano durante la sintesi Stöber. Secondo un recente studio [103], operare un trattamento idrotermale di seguito a questa procedura, migliora la qualità della *PEGylation*.

Il PEG utilizzato in questo lavoro è il uso derivato monometile, con peso molecolare medio di 5000 Dalton.

### 4.3.1 Procedura ONE STEP

Inizialmente si procede con la sintesi del composto PEG-Silano, mediante reazione d'accoppiamento fra il gruppo isocianato del composto IPTS (3-Isocianato Propil Trietossi Silano) e il gruppo ossidrilico del mPEG.

La procedura seguita è riportata in diversi lavori scientifici,[75, 99, 117] e viene schematizzata in fig. 4.1.

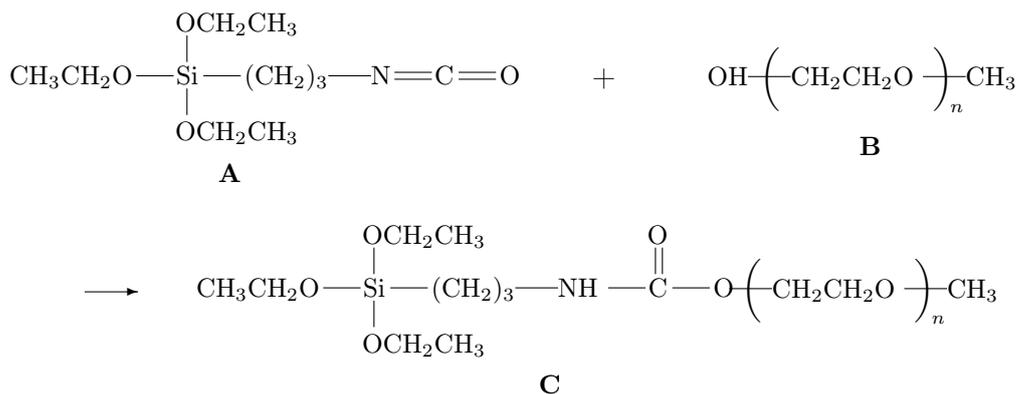
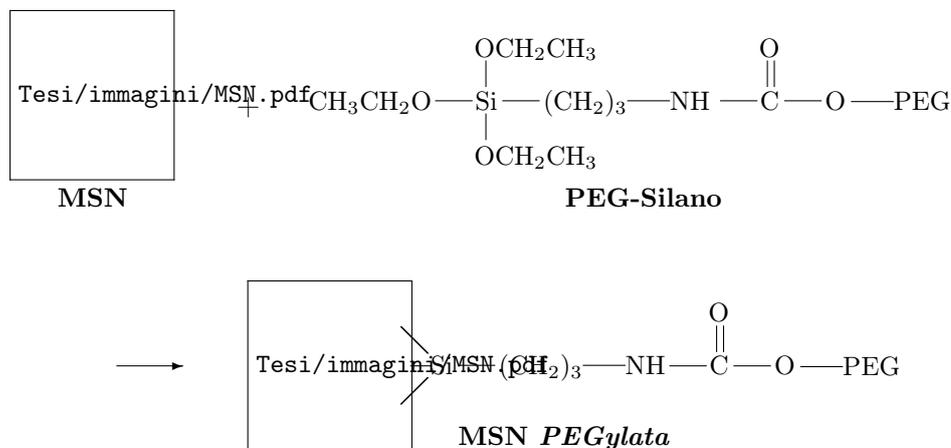


Figura 4.1: Schema della reazione d'accoppiamento per la sintesi del composto PEG-Silano. Il composto A è l'*3-Isocianato Propil Trietossi Silano*, IPTS; il composto B è il *Poli Etilene Glicole mono metilato*, mPEG; il composto C è il PEG-Silano.

La reazione di *grafting* avviene in toluene, dove vengono disperse, insieme al composto PEG-Silano, le nanoparticelle di silice mesoporosa ottenute dal processo Stöber descritto precedentemente. In questo ambiente avviene la *PEGylation* delle nanoparticelle mediante reazione di condensazione fra il gruppo silanico del PEG-Silano e i gruppi ossidrilici superficiali della silice, come mostrato in fig. 4.2.

Figura 4.2: Schema della reazione di *grafting*.

### Sintesi del PEG-Silano

In un pallone da 100 ml vengono inseriti 15 g di mPEG. Il polimero viene sciolto a 70°C sotto flusso d'azoto e mantenuto in agitazione per 30 min. Vengono aggiunti 0.85 ml di IPTS e la reazione viene lasciata proseguire per le seguenti 24 h, nelle stesse condizioni. Successivamente, si aggiungono altri 0.85 ml di IPTS e si prosegue la reazione per ulteriori 24h.

Infine, il liquido contenuto nel pallone viene raffreddato e lasciato solidificare su di un vetrino; il solido che si ottiene viene inizialmente macinato con un mortaio, poi purificato disperdendo la polvere in n-esano e recuperando il prodotto di sintesi mediante centrifugazione. L'operazione viene condotta almeno per 3 volte. La polvere così ottenuta viene fatta seccare sotto vuoto e stoccata in un essiccatore.

Durante la sintesi è necessario mantenere un flusso costante di azoto per mantenere il più possibile anidro l'ambiente di reazione, dato che, la presenza di acqua provoca un drastico calo nella resa di reazione, con la produzione di composti amminici derivanti dall'idrolisi del gruppo isocianato.

### Reazione di *grafting*

In un bicchiere da 100 ml vengono posti 30 ml di toluene e 300 mg di nanoparticelle silice mesoporosa. La miscela viene posta in bagno sonico per 30 minuti al fine di disperdere le particelle nel toluene. E' possibile usare un sonicatore a punta per migliorare la qualità della dispersione.

La sospensione viene versata in un pallone da 100 ml dotato di sistema per il riflusso del solvente e riscaldata a 90°C sotto forte agitazione. Successivamente, in un bicchiere da 100 ml vengono posti 2 g di composto PEG-Silano, precedentemente sintetizzato, e 40 ml di toluene; la miscela viene posta nel bagno sonico per 15 min e poi inserita nel pallone con la silice.

La sospensione viene mantenuta in queste condizioni (90°C, a riflusso) per le successive 24 h.

Infine, la silice *PEGylata* viene recuperata mediante centrifugazione.

Il processo di purificazione viene eseguito disperdendo la polvere in alcol etilico e centrifugando nuovamente la sospensione, tale operazione viene eseguita per 3 volte in alcol e 2

in acqua bi-distillata.

Infine, le particelle vengono risospese in acqua bi-distillata, filtrate attraverso un filtro gooch (porosità G3) e stoccate in frigorifero a 4°C.

### 4.3.2 Procedura TWO STEP

La PEGylation eseguita con procedura *Two step* prevede una prima attivazione della superficie della silice con il 1-6 Di-Isocianato Esano (DIE), al fine di legare un gruppo attivo sulla superficie della particella, come mostrato in fig. 4.3.

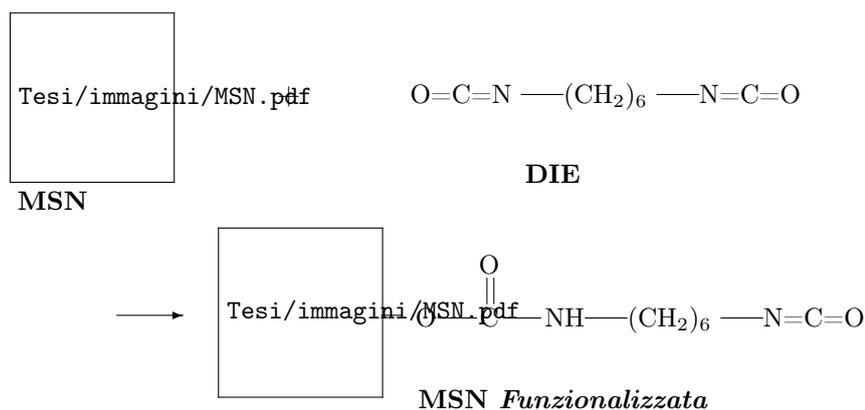


Figura 4.3: Schema della reazione di *attivazione* delle nanoparticelle di silice mesoporose, nel processo *two step*.

Infine, il PEG viene aggraffato sui siti isocianato ( $-N=C=O$ ) presenti sulla particella, mediante reazione d'accoppiamento con il gruppo ossidrilico della catena polimerica, come mostrato in fig. 4.4.

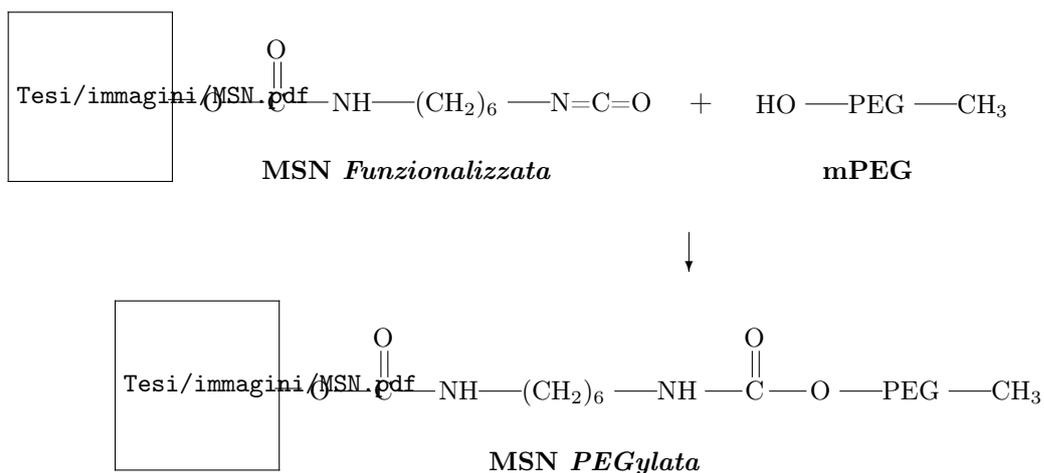


Figura 4.4: Schema della reazione di *grafting* nel processo *two step*.

### Attivazione superficiale delle MSN

In un bicchiere da 100 ml vengono posti 60 ml di toluene e 600 mg di nanoparticelle silice mesoporosa, precedentemente sintetizzata. La miscela viene posta in bagno sonico per 30 minuti al fine di disperdere le particelle nel toluene. Se questa operazione non ha successo è possibile usare un sonicatore a punta per migliorare la qualità della dispersione.

La sospensione viene versata in un pallone da 100 ml dotato di sistema per il riflusso del solvente, posta sotto forte agitazione e sotto flusso d'azoto; in seguito, nel pallone vengono aggiunti 1.63 ml (10.11 mmoli) di DIE e la reazione viene lasciata proseguire per 50 h a 50°C.

Successivamente la sospensione viene centrifugata, ri-sospesa in n-esano e ri-centrifugata. La polvere che si ottiene deve essere utilizzata in breve tempo per evitare la decomposizione dei gruppi isocianato aggraffati superficialmente alle particelle di silice.

### Reazione di *grafting*

Le particelle di silice funzionalizzate con gruppi isocianato vengono poste in un pallone da 100 ml con 60 ml di toluene in agitazione sotto flusso d'azoto e mantenute alla temperatura costante di 50°C.

Successivamente, in un bicchiere da 100 ml vengono posti 7.5 g di mPEG e 40 ml di toluene; la miscela viene posta nel bagno sonico per 15 min e poi inserita nel pallone con la silice.

Sempre sotto flusso d'azoto, la reazione viene fatta continuare per 24 h a 50°C.

Infine, la silice *PEGylata* viene recuperata mediante centrifugazione.

Il processo di purificazione viene eseguito disperdendo la polvere in alcol etilico e centrifugando nuovamente la sospensione, tale operazione viene eseguita per 3 volte in alcol e 2 in acqua bi-distillata.

Infine, le particelle vengono risospese in acqua bi-distillata, filtrate attraverso un filtro gooch (porosità G3) e stoccate in frigorifero a 4°C.

### 4.3.3 Procedura di CO-CONDENSAZIONE

In un pallone da 100 ml si segue la procedura della sintesi delle nanoparticelle di silice mesoporosa riportata nella sezione precedente. Trascorse 2 ore dall'addizione del TEOS nell'ambiente di reazione, vengono aggiunti 1.5 g del composto PEG-silano precedentemente sintetizzato.

In seguito, trascorse altre 2 ore, la miscela viene centrifugata e dispersa in metanolo per 2 volte, al fine d'eliminare i reagenti di reazione non reagiti. La polvere che si ottiene, viene dispersa in 150 ml di metanolo e 12 ml di acido cloridrico concentrato in un pallone da 250 ml; la sospensione viene scaldata a riflusso di solvente sotto agitazione a 80°C per 24 ore per estrarre il CTAB. Trascorso questo periodo di tempo, la miscela viene centrifugata e la polvere ri-sospesa in etanolo per almeno 3 volte e altre ulteriori 2 volte in acqua bi-distillata. Infine, le particelle ottenute vengono ri-sospese in acqua bi-distillata, filtrate attraverso un filtro gooch (porosità G3), per eliminare i macro-aggregati, e stoccate in frigorifero a 4°C.

### Trattamento Idrotermale

Una variante della procedura riportata precedentemente prevede un trattamento idrotermale delle particelle di silice *PEGylate*. Tale trattamento viene eseguito prima d'eliminare il tensioattivo e ha lo scopo di migliorare la *PEGylation* sulle particelle, completando la

reazione di condensazione dei gruppi silanologici del PEG-silano, che non hanno reagito completamente.

Trascorse le 2 ore dall'aggiunta del composto PEG-Silano, la sospensione viene filtrata con un *gooch*, il filtrato viene posto in un pallone da 100 ml e scaldato a 90 °C per 24 ore sotto agitazione. In seguito la procedura prevede l'estrazione del CTAB, come riportato nella metodica precedente e la successiva purificazione.

Le operazioni eseguite con la centrifuga in tutte le procedure precedentemente descritte vengono condotte con il seguente settaggio: 9000 rpm, 12500 g per 30 min.

## 4.4 Strumenti di caratterizzazione

Le particelle di silice mesoporosa *PEGylate* sono state caratterizzate con i seguenti strumenti.

Lo strumento per l'analisi dell'area superficiale attraverso la misura dell'adsorbimento dell'azoto è un Micrometrics ASAP 2010.

Per le immagini microscopiche si è usato un microscopio elettronico a trasmissione (TEM) JEOL JEM 3010.

Le analisi termo gravimetriche sono state condotte in flusso d'azoto con un *rate* di temperatura di 10°C/min in un *range* tra i 40 °C e i 1000°C. Il materiale di confronto è allumina. Lo strumento utilizzato è un Netzsch STA 409.

Per le analisi IR si è utilizzato un NEXUS FT-IR, le misure sono state eseguite in *DRIFT* con l'accessorio Nicolet AVATAR Diffuse Reflectance. Gli spettri IR sono generati dalla raccolta di 200 *runs* con risoluzione di 2 cm<sup>-1</sup>. Il materiale disperdente usato è il KBr.

Le analisi DLS sono state eseguite con lo strumento Zetasizer Nano ZS con sorgente laser He-Ne da 633nm.

# Capitolo 5

## Risultati e discussione

In questa sezione sono riportate le caratterizzazioni eseguite sui vari sistemi prodotti. Nella prima parte sono state caratterizzate le nanoparticelle di silice mesoporosa ottenute dalla sintesi Stöber, allo scopo di poter valutare le variazioni alle proprietà fisiche indotte dal processo di *PEGylation*. Successivamente è stato analizzato il composto PEG-Silano, essenziale per alcune delle sintesi seguite in questo lavoro.

In seguito, si riportano le caratterizzazioni delle varie particelle prodotte con i tre processi di *PEGylation* descritti nel capitolo precedente, approfondendo in particolar modo la variazione della porosità causata dal processo stesso. Infine, nell'ultima parte è stata studiata la stabilità colloidale dei diversi sistemi sintetizzati, in particolare, in soluzioni saline fisiologiche, PBS, al fine di verificare l'effettivo sviluppo di proprietà *stealth* nelle particelle di silice *PEGylate*.

Le nanoparticelle di silice che non hanno subito alcun tipo di trattamento verranno indicate come MSN, mentre quelle *PEGylate*, MSN@PEG con indicato fra parentesi se ottenute dal processo *one step* (1), *two step* (2) o co-condensazione (*cc*).

### 5.1 Caratterizzazione: MSN

Le nanoparticelle di silice mesoporosa sono state caratterizzate mediante spettroscopia IR, adsorbimento-desorbimento gas (BET) e TEM.

#### Spettroscopia Infrarossa

Lo spettro d'assorbimento infrarosso delle nanoparticelle di silice, è caratterizzato dalla presenza di diversi assorbimenti, fig. (5.1).

L'intenso picco a  $3750\text{ cm}^{-1}$  è dovuto ai gruppi ossidrilici (-OH) superficiali delle particella. Questi gruppi rappresentano i possibili siti di *grafting* della silice e in genere, la scomparsa del loro segnale dimostra che sia avvenuta una qualche funzionalizzazione superficiale della particella.

Dalla stessa zona è possibile osservare una banda, anche molto intensa, fra i  $3700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ , legata alle vibrazioni di *stretching* asimmetrico degli stessi gruppi ossidrilici, che si sovrappongono alla banda d'assorbimento della molecola d'acqua, presente come specie adsorbita sulla superficie della silice. Anche il picco d'assorbimento presente a  $1640\text{ cm}^{-1}$  è legato all'acqua adsorbita del materiale. L'intensità di questi assorbimenti dipende dalla



Figura 5.1: Spettro d'assorbimento infrarosso di nanoparticelle di silice mesoporo-rose sintetizzate mediante processo Stöber. I picchi d'assorbimento caratteristici sono indicati con un cerchietto.

percentuale d'acqua presente nel campione, ad esempio quello riportato in fig. 5.1 risulta essere particolarmente anidro.

Infine, gli intensi assorbimenti presenti tra i  $1400$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$  sono caratteristici dei legami silossanici (Si-O-Si).

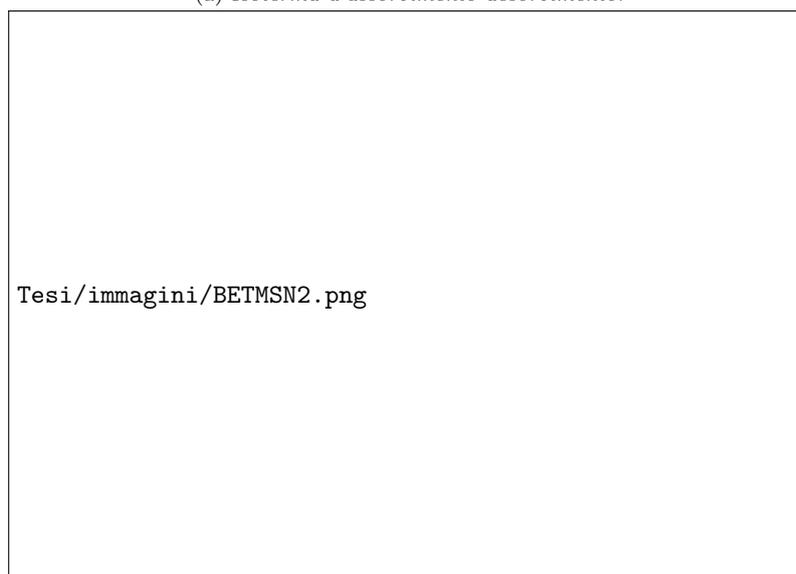
### Adsorbimento-desorbimento gas

La porosità delle nanoparticelle di silice prodotte è molto elevata. Come ricavato dalle analisi d'adsorbimento e desorbimento di gas, in media la superficie specifica di questi materiali raggiunge circa  $1000\text{ m}^2/\text{g}$  e un volume interno dei pori pari a circa  $1\text{ cm}^3/\text{g}$ .

Le isoterma che generano queste strutture sono di tipo IV, tipiche dei materiali mesoporosi. Inoltre, presentano una distribuzione della porosità relativamente stretta e caratterizzata da pori con diametro medio di  $2.7\text{ nm}$ , come riportato nelle immagini in fig. 5.2.



(a) *Isoterma d'assorbimento-desorbimento.*



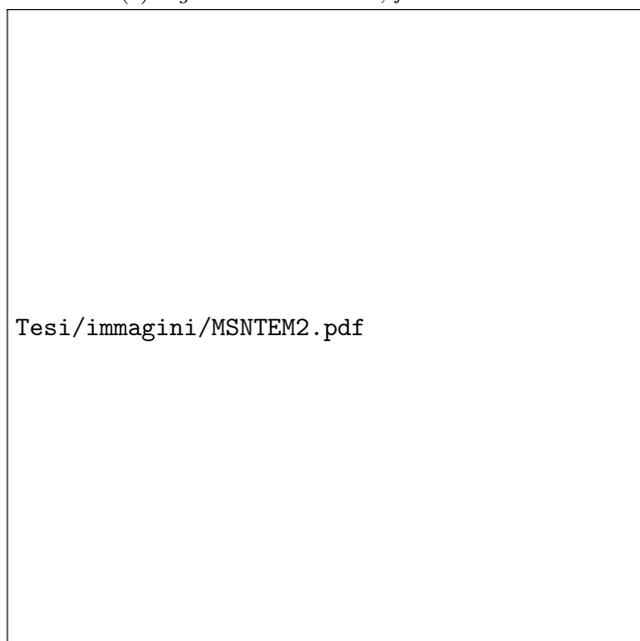
(b) *Distribuzione diametro pori.*

Figura 5.2: Isoterma d'adsorbimento e distribuzione dei pori di nanoparticelle di silice mesoporosa.

## Immagini TEM



(a) Ingrandimento 25000x, fascio 300 kV.



(b) Ingrandimento 60000x, fascio 300 kV.

Figura 5.3: Magnificenze TEM di nanoparticelle di silice mesoporose ottenute dal processo Stöber.

Nella figura 5.3 sono riportate due immagini ottenute al TEM delle nanoparticelle di silice prodotte seguendo la procedura descritta nel capitolo precedente. In particolare, le immagini si riferiscono a un campione di particelle con dimensione media di  $95 \pm 7$  nm. Le particelle in queste immagini risultano aggregate a causa delle condizioni di alto vuoto presenti all'interno del microscopio elettronico e probabilmente anche per un'eccessiva concentrazione di particelle usate per l'analisi.

## 5.2 Caratterizzazione: PEG-Silano

Il composto PEG-Silano, fig. 4.1, è stato caratterizzato mediante spettroscopia infrarossa al fine di verificare l'effettiva sintesi e caratterizzarne la struttura chimica.

Per far ciò, si sono confrontati gli spettri d'assorbimento IR dei reagenti con quelli che invece appartengono al prodotto di reazione analizzato; in particolare si sono evidenziati i picchi dello spettro IR che appartengono al legame uretanico (-O-(C=O)-NH-), elemento essenziale per confermare l'effettiva sintesi del composto PEG-silano.[75, 102]

I principali assorbimenti IR sono elencati in tabella 5.1 mentre nelle immagini in figura 5.4 sono riportati i confronti degli spettri IR tra il composto PEG-Silano e rispettivamente, il mPEG<sup>1</sup> e l'IPTS<sup>2</sup>.

Composto	Gruppo funzionale	Numero d'onda cm <sup>-1</sup>
mPEG	-OH	3480 [90]
	C-H	2900-2700
IPTS	-N=C=O	2000-2500 [71, 102]
	Si-O-C	1100 [75]
	Si-C	780 [102]
PEG-Silano	>C=O	1720-1700 [70, 97]
	C-N-H	1540 e 3345 [71, 90, 102]

Tabella 5.1: Tabella riassuntiva dei principali assorbimenti che caratterizzano i composti chimici in esame.

In fig. 5.4 è riportato il confronto fra gli spettri d'assorbimenti IR tra il mPEG e l'IPTS; si può notare come la banda tra i 2000-2500 cm<sup>-1</sup> dello spettro dell'IPTS sia sparita dallo spettro del PEG-Silano. Tale banda appartiene al gruppo isocianato (-N=C=O) e la sua scomparsa indica che tale gruppo ha reagito e non è più presente nel prodotto di reazione.

Gli assorbimenti a 1710 e 1550 cm<sup>-1</sup>, caratteristici del legame uretanico sono presenti anche nel composto IPTS oltre che nel composto PEG-silano. Ciò, molto probabilmente, è causato dalla presenza d'impurezze o da degradazioni che ha subito il composto IPTS durante il lasso di tempo impiegato per eseguire l'analisi (l'IPTS, infatti, è un composto estremamente reattivo, e in presenza di acqua genera derivati amminici primari, che presentano forti assorbimenti IR attorno i 1550 cm<sup>-1</sup>).

<sup>1</sup>mPEG = Monometil PoliEtilen Glicole

<sup>2</sup>IPTS = 3-Isocianato Propil Trietossi Silano



(a) Confronto fra gli spettri: *PEG-Silano* e *IPTS*.



(b) Confronto fra gli spettri: *mPEG* e *PEG-Silano*.

Figura 5.4: Confronto fra gli spettri d'assorbimenti IR dei reagenti e del composto PEG-Silano

Il grafico di fig. (a) 5.4 confronta gli spettri d'assorbimento IR tra il mPEG e il composto PEG-Silano, mentre nella figura (b) fig. 5.4 confronta gli spettri d'assorbimento IR tra l'IPTS e il composto PEG-Silano. Come si può notare, rispetto al polimero puro, il composto sintetizzato presenta i picchi caratteristici del legame uretanico a 1710, 1550 e 3350  $\text{cm}^{-1}$ ; inoltre sono presenti il picco d'assorbimento IR dei gruppi etilici ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ) a 790  $\text{cm}^{-1}$ , tipici del gruppo silano legato alla catena del polimero. Un'ulteriore prova dell'avvenuta reazione fra il mPEG e l'IPTS è la scomparsa dell'assorbimento a 3450  $\text{cm}^{-1}$  nello spettro del PEG-Silano, presente invece nello spettro del mPEG; questo picco è dovuto al gruppo ossidrilico ( $-\text{OH}$ ) del polimero, che in fase di sintesi reagisce con il gruppo isocianato dell'IPTS.

### 5.3 Caratterizzazione: ONE STEP

#### Spettroscopia IR

Il confronto fra gli spettri d'assorbimento IR tra le particelle di silice PEGylata e non, in fig. 5.5, evidenzia la presenza del polimero aggraffato e quindi dell'avvenuta *PEGylation*.



Figura 5.5: Confronto fra gli spettri d'assorbimento IR delle particelle di silice: **non PEGylate** e **PEGylate** con processo *one step*.

L'assorbimento a 3750  $\text{cm}^{-1}$  nello spettro della silice nuda è causato dai gruppi ossidrilici presenti sulla superficie della silice stessa. La scomparsa di questo picco dimostra che è avvenuta una funzionalizzazione superficiale che ha reso non più disponibili tali siti di reazione.

La conferma dell'aggraffaggio del PEG sulla superficie delle particelle di silice è supportata da due fattori:

- la presenza della banda tra i 2800 e i 2900  $\text{cm}^{-1}$  nello spettro della silice *PEGylata*, che evidenzia la presenza di gruppi alifatici (-CH<sub>2</sub>-) appartenenti al PEG;
- la presenza degli assorbimenti caratteristici del legame uretanico, 1710 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ , che confermano la presenza del legame tra il PEG e il gruppo silano, appartenente al composto PEG-Silano sintetizzato in precedenza.

Dall'altra parte, risulta improbabile che il polimero sia presente come fisi-adsorbito sulla superficie della silice o semplicemente in forma libera, dato che l'elevato numero di passaggi di purificazione durante la procedura di sintesi, permette d'eliminare ogni traccia di PEG non reagito. Pertanto, gli assorbimenti IR del polimero, presenti nello spettro delle nanoparticelle di silice *PEGylate*, si può assumere appartengano esclusivamente al PEG aggraffato sulla silice.

### Analisi termo-gravimetrica

Per quantificare la quantità di PEG presente realmente sulle particelle si è effettuata una misura termo-gravimetrica.



Figura 5.6: Confronto fra l'analisi termogravimetrica di: PEG, MSN PEGylate e MSN.

Nella figura 5.6 è riportato il confronto dell'analisi termo-gravimetrica fra la silice non *PEGylata* e quella *PEGylata*. Si noti come la perdita di peso che avviene a circa 400°C nelle particelle di silice *PEGylate*, sia riconducibile alla degradazione del polimero legato alla loro superficie, dato che, l'eliminazione termica del PEG avviene alla medesima temperatura.

Pertanto è possibile considerare tale valore come la percentuale in peso di PEG aggraffato alle particelle e risalire al valore di densità di *PEGylation* seguendo il modello teorico riportato nei capitoli precedente (si veda eq.3.1).

Da ciò risulta che, nelle condizioni di sintesi, il processo *one step* lega alle particelle di silice una quantità di polimero pari a circa il 32% in peso di tutto il sistema; considerando che le particelle di questo campione hanno dimensione media di  $99.5 \pm 7$  nm, la densità media di catene polimeriche sulla superficie delle particelle è di circa  $6.5$  molecole/nm<sup>2</sup>.

Per ricavare le condizioni ottimali di sintesi per il processo *One step*, sono state sintetizzate una serie di nanoparticelle *PEGylate* con il medesimo processo ma variandone la quantità di PEG-Silano introdotto nell'ambiente di reazione e il tempo della reazione di *grafting*, pari per tutti i campioni a 3 ore.

Le quantità di PEG-silano usato nelle prove risulta essere rispetto alla silice delle nanoparticelle pari allo 4, 2, 1, 0.2 e 0.1 % molare.

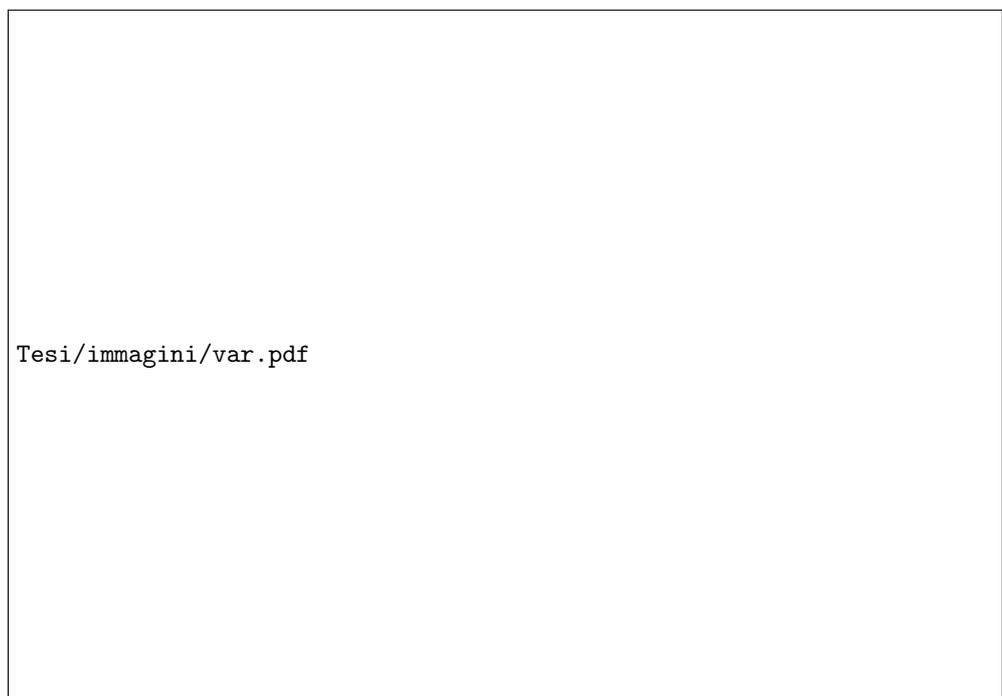


Figura 5.7: Andamento della quantità di PEG legato sulle particelle di silice al variare della quantità di PEG-Silano aggiunta durante il processo di *PEGylation*. L'errore associato alla densità di *PEGylation* è del 10% della misura, mentre quello associato al rapporto percentuale fra PEG-Silano e silice è inferiore allo 0.1 %

Si noti dalla figura 5.7, che la densità di *PEGylation* tende a crescere lentamente per elevate concentrazioni di PEG-Silano; tale comportamento è imputabile alla saturazione della superficie disponibile alla funzionalizzazione con il polimero.

Alla luce di questi dati è possibile affermare che, nelle condizioni in cui si opera general-

mente e utilizzate in questa tesi (rapporto molare PEG-Silano/silice pari al 7.5 %), l'intera area superficiale disponibile della particella viene funzionalizzata con il polimero.

### Adsorbimento-desorbimento di gas: BET

Una delle principali ragioni per cui le nanoparticelle mesoporose di silice sono d'estremo interesse scientifico, è l'elevata porosità che possiedono.

Il processo di *PEGylation* influenza questo parametro, di fatto occludendo l'entrata dei pori con il polimero oppure funzionalizzando la superficie interna delle particelle; in ogni caso, quello a cui si assiste è una generale diminuzione della porosità del sistema, anche se in recenti studi è stato ipotizzato che tale calo sia sovrastimata dalla tecnica BET utilizzata per ricavare il dato della porosità [102].

Anche le nanoparticelle PEGylate mediante processo *One Step* risentono di tale riduzione, come si può notare dalla fig. 5.8.

Le particelle di silice mesoporose non *PEGylata* presentano un'isoterma di tipo IV, tipica dei materiali mesoporosi con elevata superficie specifica e grande volume interno dei pori, dove il diametro medio di quest'ultimi è di circa 2.7 nm. Al contrario, le particelle sottoposte al processo di *PEGylation* presentano un piccola anche se non trascurabile porosità. I dati sono riportati in tab. 5.2.

Campione	Volume pori cm <sup>3</sup> /g	Andamento	Superficie specific (teoria BET) m <sup>2</sup> /g	Andamento
MSN	0.977	-	969.9	-
MSN@PEG(1)	0.288	-70.6%	144.6	-85.1%

Tabella 5.2: Riassunto dei principali parametri ricavati dall'analisi d'adsorbimento e desorbimento di gas sulle particelle di silice *PEGylate* o non.

Come si può notare, una volta eseguita la *PEGylation*, la porosità della particella mesoporosa di silice cala drasticamente. La causa principale risulta essere la chiusura dei pori da parte delle catene di PEG aggraffato superficialmente; risulta invece poco probabile che il calo di porosità sia dovuto all'entrata del polimero all'interno dei pori e alla possibile funzionalizzazione della superficie interna. A conferma di ciò va tenuto conto dell'ingombro sterico che caratterizza la catena polimerica, infatti, se una molecola PEG lineare con peso molecolare medio di 2000 Da raggiunge circa i 13 nm [66], un polimero di PM medio 5000, come quello usato in questo lavoro, possiede catene lunghe fino ai 30 nm che difficilmente riescono a penetrare all'interno dei pori della particella.



(a) *Isoterma d'assorbimento-desorbimento.*



(b) *Distribuzione diametro pori.*

Figura 5.8: Isoterma d'adsorbimento e distribuzione dei pori di nanoparticelle di silice mesoporosa *PEGylate* mediante processo *one step*.

## Immagini TEM

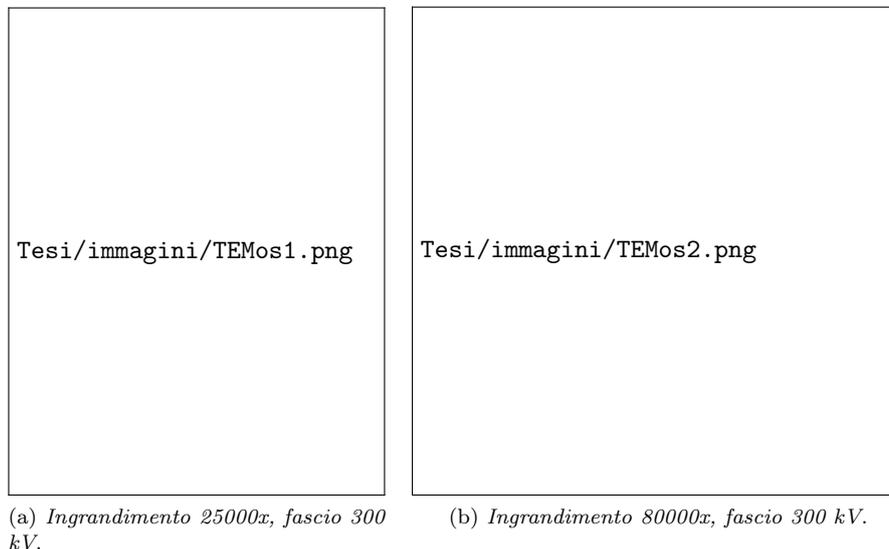


Figura 5.9: Immagini TEM di particelle di silice mesoporosa *PEGylata* (a destra) o non (a sinistra), mediante processo *One step*.

Le immagini delle particelle ottenute mediante microscopia elettronica in trasmissione sono utili per determinare la dimensione media delle particelle.

Nell'immagine 5.9 è possibile vedere come appaiono le particelle di silice mesoporosa nude e come invece appaiono una volta aggraffato il PEG. La forma delle particelle non subisce variazioni significative, mentre ciò che si può evidenziare è come vari il bordo della particella stessa. Nell'immagine a sinistra, le particelle non ricoperte da polimero presentano un contorno frastagliato dovuto essenzialmente alla presenza dei pori, al contrario, nell'immagine a destra, le particelle di silice *PEGylate* possiedono un contorno arrotondato e la stessa struttura dei pori risulta essere meno visibile proprio a causa della presenza dello strato polimerico, come si può anche osservare nell'ingrandimento in figura 5.10.

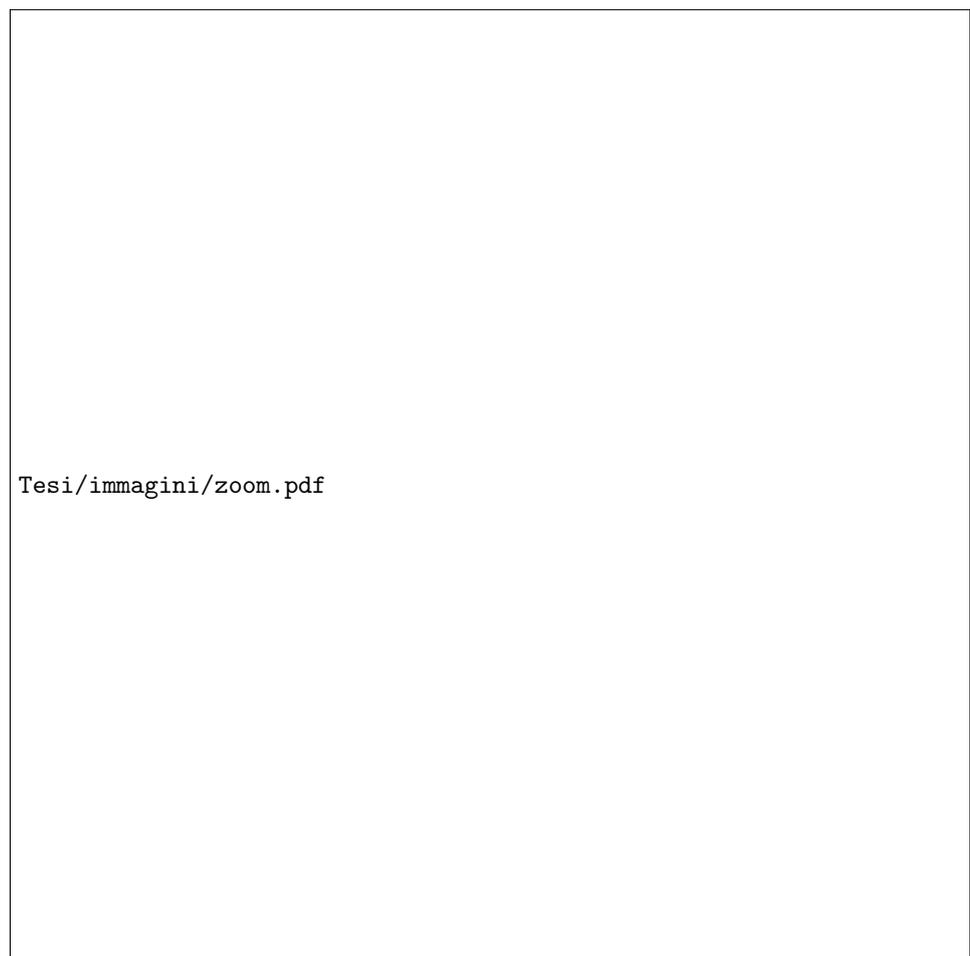


Figura 5.10: Ingrandimento di una particelle di silice *PEGylata*. Ingrandimento 80000x, energia del fascio 300 kV.

Mediante la misura del diametro di un campione di circa 100 particelle è possibile definirne una dimensione media. Mentre le MSN hanno dimensione media di 96 nm, le stesse MSN *PEGylate* hanno dimensione media di 111 nm. Ne risulta che la variazione di dimensione fra la particella *PEGyalta* e non è di circa 15 nm.

**Staining** Data la difficoltà d'osservare direttamente lo strato polimerico aggraffato sulle particelle di silice, si è ricorso alla tecnica di *staining*. Tale tecnica prevede l'impiego di un agente di contrasto durante l'analisi delle particelle al TEM al fine di aggiungere maggior contrasto al componente del sistema che risulta poco visibile, in questo caso il PEG; è però necessario che questo agente interagisca con il polimero, sia per semplice fisi.adsorbimento che chemi-adsorbimento.

In questo lavoro si è usato lo ione uranile come agente di *staining*,  $UO^{2+}$ , il quale viene intrappolato fra le catene del polimero.[18, 118]

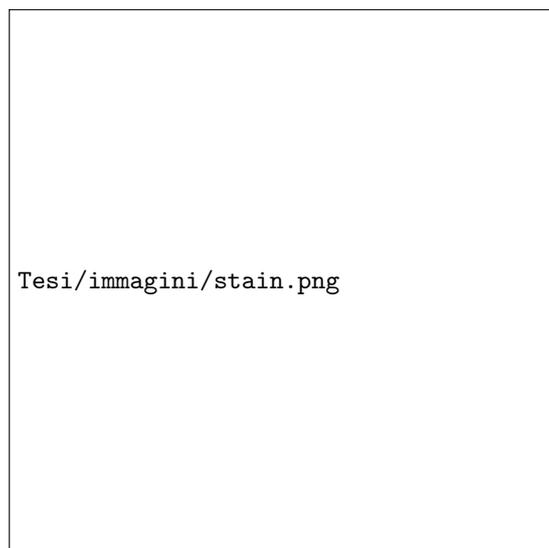


Figura 5.11: Immagini TEM di particelle di silice mesoporosa *PEGylata*, stesso campione della figura 5.9, ottenuta con tecnica di *staining*. Ingrandimento 50000x, fascio 300 kV

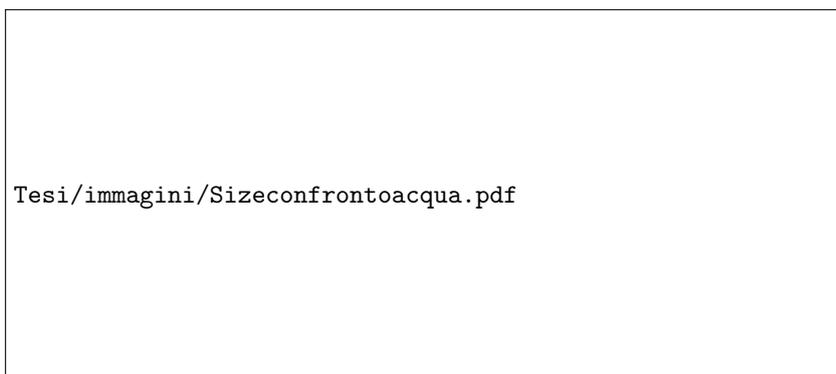
Come si può notare dalla figura 5.11, l'impiego dell'agente di contrasto permette di distinguere approssimativamente due strutture che formano la particella: un *core* centrale di silice e un guscio di polimero che circonda la particella.

Le strutture riportate nell'immagine potrebbero essere scambiati per semplice sovrapposizione di particelle; in realtà la differenza di contrasto fra i due sistemi (la silice e il guscio polimerico) rivela delle strutture concentriche tra loro, dando forza all'ipotesi che sia effettivamente uno strato cresciuto sulle superfici sferiche delle particelle.

### Dynamic light scattering, DLS

La tecnica DLS permette di ricavare importanti parametri sulle sospensioni generate dalle nanoparticelle di silice tra cui:

- il diametro medio idrodinamico.  
Esso rappresenta la dimensione del sistema particella più strato di solvente che si muove solidale a essa; è indicativo dell'interazione solvente-particella e del grado di aggregazione della sospensione.
- il potenziale superficiale.  
E' un parametro che indica la carica superficiale associata alla singola particella, dovuta ai gruppi funzionali presenti sulla superficie stessa. Influenza la stabilità di tipo colloidale e biologica del sistema.



(a) Confronto dimensioni idrodinamiche fra particelle di silice *PEGylate* e non, in acqua.



(b) Confronto dimensioni idrodinamiche fra particelle di silice *PEGylate* e non, in PBS.

Figura 5.12: Confronto dei diametri medi idrodinamici delle particelle funzionalizzate con il PEG e non. La curva in rosso rappresenta le particelle *PEGylate*, mentre quella in verde rappresenta le particelle di silice nuda.

Nella figura 5.12 a e b, si può notare come all'interno della popolazione delle varie particelle *PEGylate* e non, sia in acqua che in PBS, esistano due tipi di distribuzioni: per la silice nuda, la prima ha un diametro medio di 200 nm e l'altra di 1000 nm; per la silice *PEGylata* la più piccola ha diametro medio di 90 nm e l'altra di 300nm. Le popolazioni di particelle a elevata dimensione, sono probabilmente formate da aggregati che lo strumento rappresenta come particelle singole.

Si noti come le dimensioni ricavate da questa tecnica sono maggiori rispetto a quelle ricavate al TEM (in questo campione MSN sono di 65 nm), dato che viene considerato il raggio idrodinamico della particella e non il solo raggio della sfera.

Ciò che interessa capire da questi grafici, è chiarire l'influenza del processo di *grafting* del PEG sulla dimensione idrodinamiche delle particelle.

In acqua, le silici *PEGylate* presentano dimensioni minori rispetto alle loro controparti senza PEG; tale comportamento può essere spiegato dalla minore interazione fra la silice e il solvente tra cui si pone lo strato di polimero. Infatti, dato che lo strumento misura il sistema particella+solvente, che si muovono tra loro solidali, se viene aggraffato del polimero sulla superficie della silice vi saranno meno molecole di solvente che interagiranno con la particella dato che il PEG scherma parte della superficie, e di conseguenza verrà

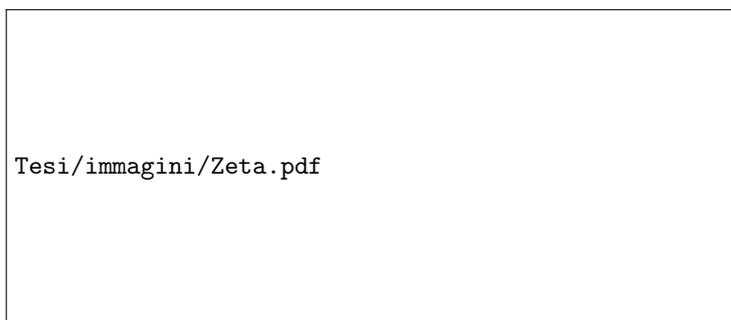


Figura 5.13: Potenziale associato alla carica superficiale presente sulle particelle di silice, sia *PEGylata* che non. In rosso è rappresentato il campione che ha subito il processo di *PEGylation*, mentre in verde il campione di silice nuda.

misurato un diametro idrodinamico inferiore. Ciò spiega la differenza di diametro fra le particelle di silice *PEGylate* e non, misurato con la tecnica DLS.

In PBS, fig.5.12b, le distribuzioni dei due tipi di particelle sono circa le stesse. In questo caso, risulta probabile che l'elevata forza ionica del mezzo influenzi in qualche modo lo strato di polimero, incrementando il raggio idrodinamico delle particelle. Tale comportamento è noto in letteratura.[103]

In figura 5.13 sono poste a confronto le distribuzioni del potenziale associato alla carica superficiale delle nanoparticelle prodotte. Tale dato è molto importante dato che incide sulla stabilità fisica delle sospensioni formate dalle particelle, inoltre, determina il tipo d'interazione che il nanosistema instaura con molte macromolecole biologiche. Come si può osservare, sia i campioni di silice nuda sia di quella *PEGylata* presentano la stessa distribuzione centrata attorno al valore medio di -20mV. Tale comportamento è riscontrato in alcuni lavori scientifici, dove si è accertato che la diminuzione della carica superficiale delle particelle avviene con polimeri a PM più elevato di quello in uso in questo lavoro.[21]

## 5.4 Caratterizzazione: TWO STEP

### Spettroscopia IR

Le nanoparticelle di silice mesoporosa *PEGylate* ottenute con il processo *Two Step* sono state caratterizzate mediante spettroscopia infrarossa allo scopo di determinare la struttura e i gruppi funzionali presenti nel sistema.

Il processo *two step* prevede un'iniziale funzionalizzazione superficiale delle particelle col il DIE<sup>3</sup>. Tale metodica, produce delle MSN con gruppi isocianato superficiali.

<sup>3</sup>DIE = 1-6 Di-Isocianato Esano



Figura 5.14: Confronto fra gli spettri d'assorbimento della silice non trattata, MSN, e quella invece che ha subito il processo di attivazione con il composto DIE (MSN@NCO), nel processo *Two Step*.

Nella figura 5.14 si sono messi a confronto gli spettri della silice nuda (MSN) e di quella funzionalizzata con il composto DIE, MSN@NCO. Come si può notare dall'immagine, rispetto allo spettro d'assorbimento della silice pura, la silice attivata presenta alcune differenze sostanziali che confermano l'avvenuta funzionalizzazione; anche in questo caso gli assorbimenti caratteristici sono segnalati da dei pallini:

- la scomparsa del picco d'assorbimento a  $3750\text{ cm}^{-1}$ , prova dell'effettiva funzionalizzazione superficiale della silice;
- comparsa del gruppo di picchi d'assorbimento fra i  $2900\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ , dovuti ai gruppi alifatici della catena del DIE;
- banda d'assorbimento tra i  $2500\text{ e }2000\text{ cm}^{-1}$ , caratteristica del gruppo isocianato ( $\text{-N=C=O}$ ), presente ora come gruppo superficiale della particella di silice;
- presenza degli assorbimenti infrarosso del legame uretanico a  $1710\text{ e }1550\text{ cm}^{-1}$ .

Alla luce di ciò è possibile affermare che le nanoparticelle di silice mesoporosa sono state funzionalizzate con successo ed è perciò possibile eseguire la successiva fase di *PEGylation*.



Figura 5.15: Confronto fra gli spettri d'assorbimento della silice precedentemente attivata, MSN@NCO, e quella invece che ha subito il processo di *PEGylation*.

L'immagine in figura 5.15 pone a confronto gli spettri IR della silice funzionalizzata superficialmente con il gruppo isocianato, con quella che ha subito il processo *two step* di *PEGylation*. Come era logico supporre, nel grafico non vi sono prove evidenti della presenza del PEG, dato che i contributi d'assorbimento dei carboni alifatici e del legame uretanico, insieme alla scomparsa del picco d'assorbimento a  $3750\text{ cm}^{-1}$ , sono già presenti nel campione MSN@NCO.

Una prova indiretta della presenza del polimero sulla superficie delle particelle è la maggior intensità degli assorbimenti IR dei carboni alifatici nello spettro del campione MSN@PEG(2) (assorbimenti tra i  $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ ) insieme alla scomparsa della banda caratteristica del gruppo isocianato (assorbimento a  $2250\text{ cm}^{-1}$ ), che quindi ha reagito nel processo di *PEGylation*.

Alla luce di ciò, la conferma dell'avvenuta *PEGylation*, mediante processo *two step*, richiede un'analisi termo-gravimetrica.

### Analisi termo-gravimetrica

Rispetto alla sintesi *One step*, la sintesi *Two step* prevede l'utilizzo del composto DIE per funzionalizzare inizialmente la particella di silice. Pertanto, nell'analisi TG, va diviso il contributo alla perdita di peso data dal solo mPEG da quella invece dovuta dal residuo di DIE aggraffato, sia che abbia reagito con il PEG sia che invece non lo abbia fatto.

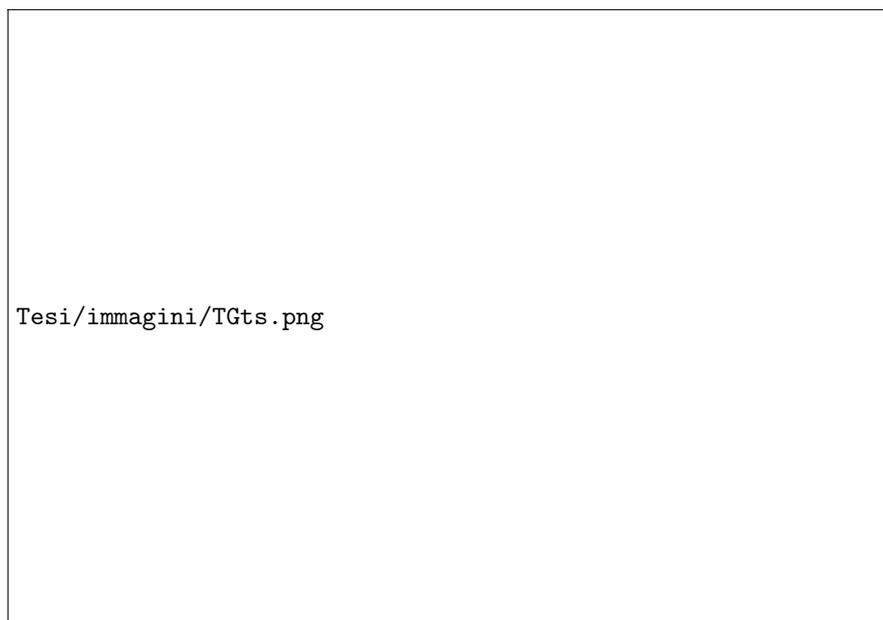


Figura 5.16: Confronto fra l'analisi termogravimetrica di: **MSN**, **mPEG** e **MSN@PEG(2)**.

Dalla figura 5.16 si può osservare la presenza di due distinte variazioni di peso, centrate a 250°C e 400°C. Mentre la prima perdita di peso è legata alla degradazione termica delle molecole di DIE ancorate sulla superficie della silice, la seconda deriva unicamente dalla degradazione del mPEG.

Nel campione sintetizzato secondo la procedura descritta nel processo *Two step* risulta che la perdita di peso legata al DIE, una volta eliminato il contributo della silice, è pari al 12.8%, mentre la perdita di peso del mPEG è del 26.1%.

Le densità di queste specie sulla superficie della particella risultano essere rispettivamente di: 63.7 molecole/nm<sup>2</sup> per il DIE e 3.8 molecole/nm<sup>2</sup> per il PEG; mentre il dato del PEG risulta verosimile, confrontato con i valori delle densità ricavati dal precedente processo di *PEGylation*, il dato riferito alla densità del DIE è inverosimilmente troppo elevato.

Una possibile spiegazione è che la prima fase di funzionalizzazione delle particelle di silice non prenda luogo esclusivamente sulla loro superficie esterna, ma coinvolga anche in parte quella interna dei pori. Assumendo ciò, da un lato è possibile spiegare l'elevato valore della densità di *grafting* del composto DIE, mentre d'altro lato indica che sia avvenuta una funzionalizzazione anche all'interno delle particelle, la quale può causare dei problemi per le possibili applicazioni biomediche che questo tipo di materiale può esprimere.

Con i dati ottenuti da quest'analisi è possibile ipotizzare il tipo di struttura del *layer* che si è formato sulla MSN. Dato che, il composto DIE aggraffato è presente in quantità maggiore rispetto alle PEG sulla superficie della silice, è possibile ipotizzare che lo strato cresciuto sulla particella sia formato da:

- un primo strato costituito dal DIE; il quale, se a una estremità presenta il legame uretanico con cui è legato alla superficie della silice, nell'altra presenta o il PEG, con cui è legato attraverso un altro legame uretanico, oppure un gruppo amminico (-NH<sub>2</sub>), derivato dall'idrolisi del gruppo isocianato.

- un secondo strato con densità superficiali minori rispetto al DIE, costituito dal polimero (PEG) legato al gruppo funzionale esterno del DIE.

### Adsorbimento-desorbimento gas

L'analisi BET di un campione di nanoparticelle di silice *PEGylate* con processo *Two step* mostra un drastico calo della porosità del sistema.



Figura 5.17: Confronto fra l'analisi BET di particelle mesoporose di silice *PEGylate* e non, con processo *Two step*; il grafico rappresenta il confronto delle isoterme di adsorbimento e desorbimento dei due sistemi.

In fig. 5.17 e 5.18 si può notare come le particelle prodotte mediante processo *two step* presentino un drastico calo della loro porosità, anche maggiore rispetto alle particelle sintetizzate mediante processo *one step* in cui si raggiungono, oltretutto, densità di *PEGylation* più elevate.

Questo comportamento può essere un'ulteriore prova che avvalorata l'ipotesi che vi sia una funzionalizzazione interna dei pori delle nanoparticelle.

Campione	Volume dei pori cm <sup>3</sup> /g	Andamento	Superficie specifica (teoria BET) m <sup>2</sup> /g	Andamento %
MSN	0.977	-	969.9	-
MSN@PEG(2)	0.193	-80.6%	64.9	-93.3%

Tabella 5.3: Riassunto dei principali parametri ricavati dall'analisi d'adsorbimento e desorbimento di gas sulle particelle di silice *PEGylate* o non e relativa variazione percentuale.

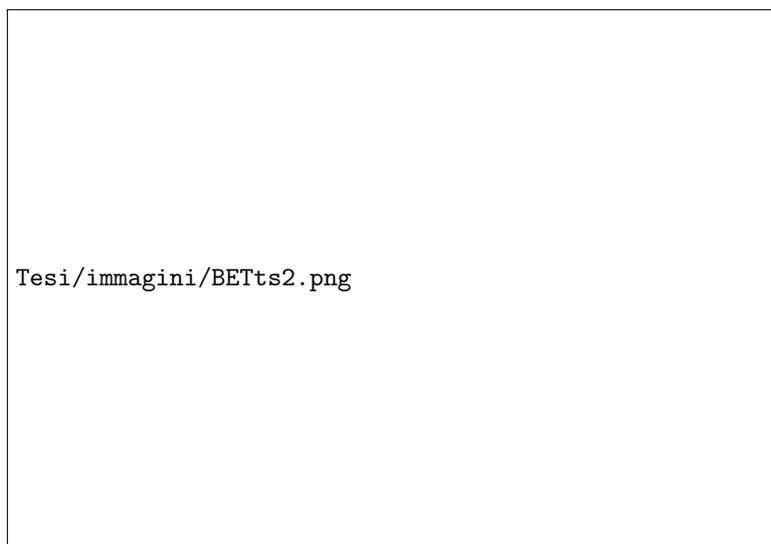
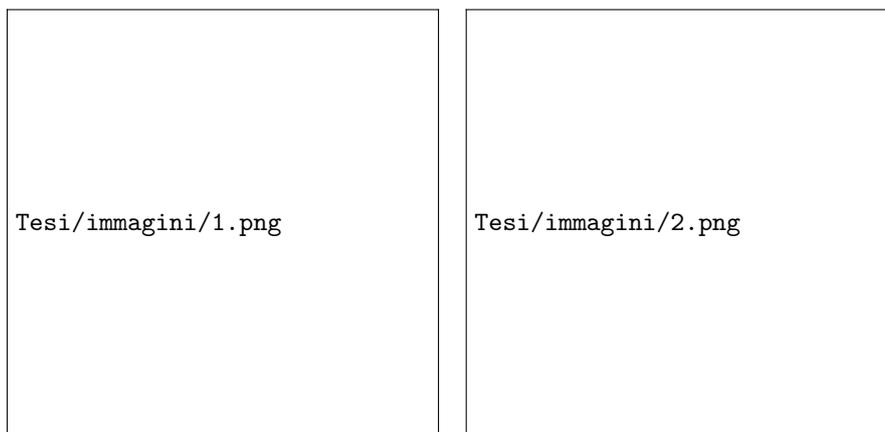


Figura 5.18: mentre il secondo è il confronto fra la distribuzione volumetrica dei pori. In quest'ultimo è riportata anche la distribuzione dei pori di un campione di silice *PEGylata* mediante processo *One step*.

### Immagini TEM

Le immagini ottenute mediante microscopia elettronica a trasmissione mostrano uno strato sulle particelle che può essere ricondotto al polimero aggraffato.



(a) Ingrandimento 100000x, fascio 300 kV. (b) Ingrandimento 50000x, fascio 300 kV.

Figura 5.19: Immagini TEM di particelle di silice mesoporosa *PEGylata* mediante processo *Two step* a due diversi ingrandimenti.

Dalle immagini in fig. 5.19, in particolare negli ingrandimenti in figura (a), si può notare attorno alle particelle uno strato di materiale non presente negli ingrandimenti osservati al TEM di MSN non *PEGylata*, fig. 5.3. Inoltre, le particelle presentano un

bordo arrotondato e non frastagliato come invece è quello delle particelle non *PEGylate*, riportate in fig. 5.3. In questo caso non si è applicato un metodo di *staining*, dato che la differenza di morfologia tra le MSN e le MSN@PEG(2) è visibile anche in condizioni di contrasto normali.

## 5.5 Caratterizzazione: Co-condensazione

Una parte delle particelle di silice mesoporosa prodotte con il processo di co-condensazione, hanno subito un blando trattamento idrotermale al fine di migliorarne il *grafting* del polimero sulla loro superficie. Perciò le caratterizzazioni che seguono sono state eseguite sia sulle particelle che hanno o non hanno, questo subito trattamento. I campioni sono chiamati rispettivamente **Hy** e **NoHy**.

### Spettroscopia IR

Lo spettro d'assorbimento IR delle particelle di silice *PEGylata* mediante processo di co-condensazione è riportato in figura 5.20.



Figura 5.20: Confronto spettri d'assorbimento IR fra particelle di silice non *PEGylate* e particelle sintetizzate con processo di co-condensazione e senza trattamento idrotermale.

Come per le particelle sintetizzate nei precedenti processi, anche in questo caso si possono osservare delle variazioni nello spettro d'assorbimento IR delle strutture di silice *PEGylata* rispetto alle MSN nude. La scomparsa del picco a  $3750\text{ cm}^{-1}$  evidenzia che la silice sia stata funzionalizzata superficialmente, dato che ne scompaiono quasi del tutto i gruppi funzionali ossidrilici superficiali. Invece, la presenza degli assorbimenti a  $1720\text{-}1700$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$  confermano che vi sia un legame uretanico nella struttura appartenente al

composto PEG-silano legato alle superfici della particella.

Le nanoparticelle prodotte, sia che abbiano o non abbiano subito il trattamento idrotermale, presentano gli stessi assorbimenti nello spettro infrarosso, salvo alcune differenze.

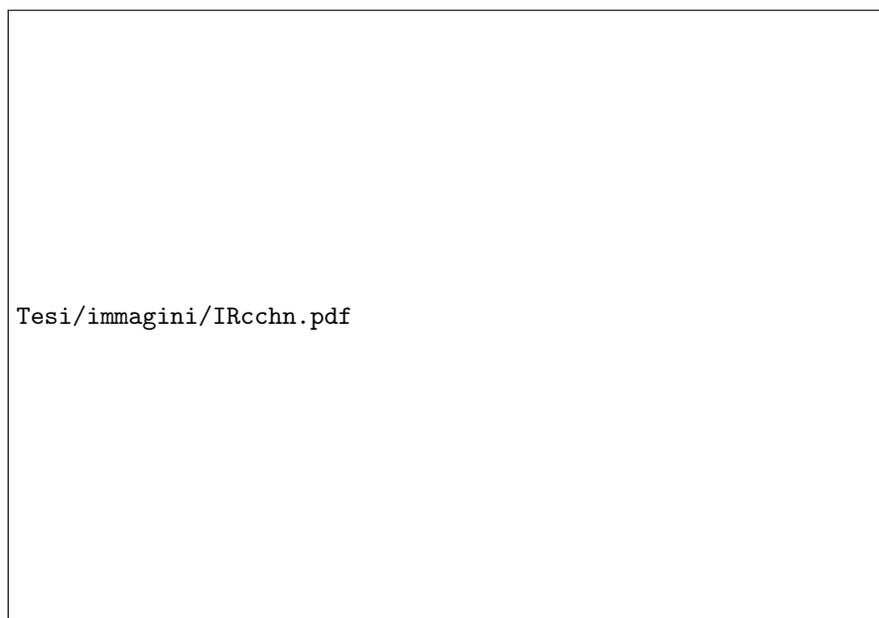


Figura 5.21: Confronto spettri d'assorbimento IR fra particelle di silice *PEGylate* con processo di co-condensazione; lo spettro d'assorbimento IR di colore nero è legato alle particelle che hanno subito trattamento idrotermale, quello in rosso invece appartiene a quelle non trattate.

Nella figura 5.21 è riportato il confronto fra gli spettri d'assorbimento IR delle particelle che hanno subito il trattamento idrotermale e non. Come si può osservare, le particelle che non sono state sottoposte a questo trattamento presentano un piccolo picco a  $3750\text{cm}^{-1}$  (indicato dal punto in figura 5.21), che indica la presenza di gruppi ossidrilici sulla superficie della silice. Ciò significa che parte della superficie della particella non è stata completamente funzionalizzata.

Al contrario, nelle particelle che hanno subito il trattamento, tale picco scompare del tutto, probabilmente a causa del completamento della reazione di *grafting* del PEG sull'intera superficie libera della particella; affermazione confermata dall'analisi termo-gravimetrica seguente.

### Analisi termogravimetrica

L'analisi termo-gravimetrica condotta su queste particelle ha prodotto una serie di risultati interessanti, che confermano quanto già riportato in letteratura.[15] Il trattamento idrotermale risulta migliorare in modo evidente la qualità della *PEGylation*, come si può notare nell'analisi termo-gravimetrica in fig. 5.22.

Il campione trattato con il processo idrotermale mostra una perdita di peso maggiore del campione non trattato. Tale differenza è di circa il 10% ed è riconducibile al PEG in più

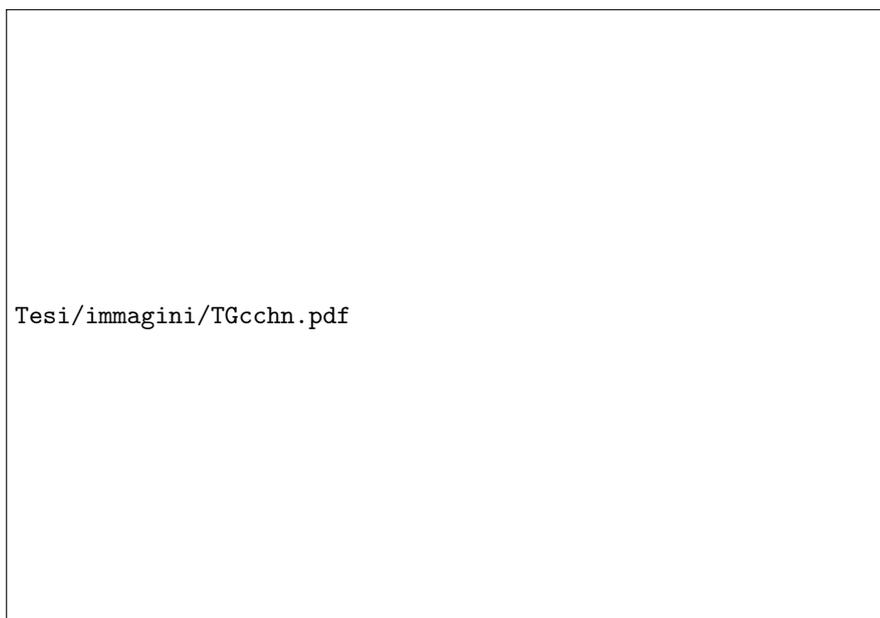


Figura 5.22: Confronto fra gli andamenti termo-gravimetrici del campione di nanoparticelle trattato con il processo idrotermale (curva rossa) e non (curva nero).

aggraffato .

Questo conferma che il trattamento termale conduce a un miglioramento nella resa di *PEGylation*, consolidando i legami di quelle catene di PEG ancora non del tutto legate alla superficie delle particelle. Nel campione NoHy, tale trattamento non viene condotto, in tal modo quella parte di PEG non ancora legata in modo stabile alla superficie della silice, viene eliminata nelle procedure di purificazione e pertanto non risulta aggraffata.

### Adsorbimento-desorbimento di gas

La porosità e struttura delle nanoparticelle *PEGylate* ottenute per co-condensazione sono completamente diverse dalle particelle di silice viste nei precedenti casi.

L'isoterma d'adsorbimento riportata in figura 5.23 è stata ottenuta dall'analisi dei due differenti campione. Dall'isoterma è possibile estrapolare alcune informazioni:

- entrambe le isoterme manifestano un piccolo flesso a bassi valori di pressione relativa (tra 0.2 e 0.3); ciò indica che, le particelle possiedono una certa mesoporosità.
- si può inoltre ipotizzare, che le particelle formino delle sovrastrutture caratterizzate da pori di dimensione maggiori dei precedenti. Ciò è supportato dall'elevato assorbimento che le particelle manifestano a pressioni relative maggiori di 0.9, caratteristico di strutture aggregate.



Figura 5.23: Isoterma di adsorbimento e desorbimento dei campione di nanoparticelle *PEGylate* sintetizzate con processo di co-condensazione, sia che ha subito il processo idrotermale (Hy), che no (NoHy).

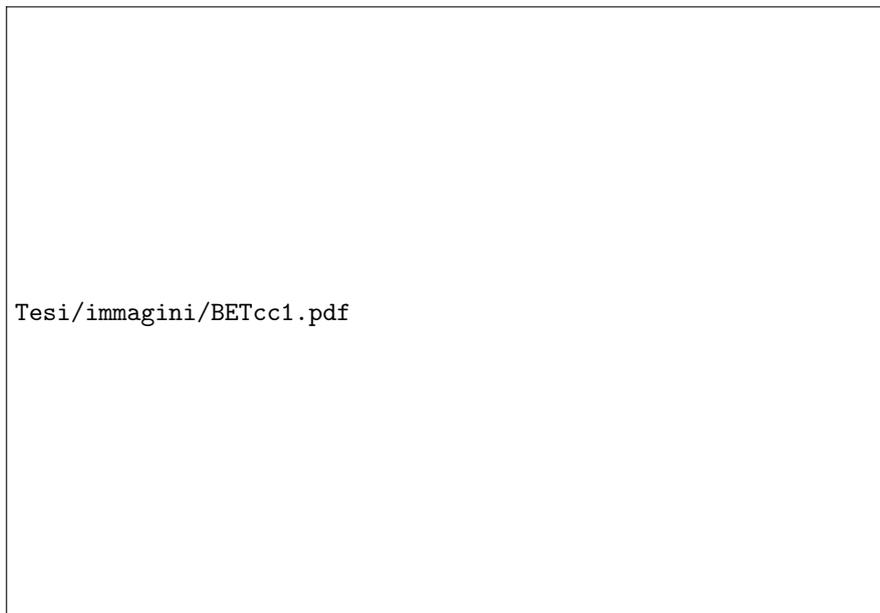


Figura 5.24: Distribuzione del diametro medio dei pori del campione di nanoparticelle *PEGylate* che ha subito il processo idrotermale.

La distribuzione dei pori non pare variare con il trattamento termico. Infatti, anche se entrambi i campioni presentano una distribuzione simile della dimensione dei pori, centrata a circa 2.3 nm, la diversa altezza della distribuzione può essere attribuita alla diversa quantità di polimero aggraffato (come si può vedere dall'analisi termo-gravimetrica in fig. 5.22), che ostruisce in misura diversa i pori delle due particelle.

Queste particelle *PEGylate* presentano:

Campione	Volume dei pori cm <sup>3</sup> /g	Superficie specifica (teoria BET) m <sup>2</sup> /g
Hy	1.49	484
NoHy	1.07	754

Tabella 5.4: Riassunto dei principali parametri ricavati dall'analisi d'adsorbimento e desorbimento di gas sulle particelle di silice *PEGylate* con processo di co-condensazione e trattate o meno col processo idrotermale.

I diversi valori di superficie specifica e di volume dei pori del campione Hy rispetto a quello NoHy (riportati in tab. 5.4), sono probabilmente causati dal processo idrotermale; il quale, in qualche modo influisce sulla morfologia delle particelle modificandone la struttura e favorendo un certo grado d'aggregazione, come si può vedere nell'immagine TEM in fig. 5.25.

La dimensione media dei pori risulta diversa da quello che si ottiene nelle MSN precedentemente sintetizzate per gli altri processi di *PEGylation* (2.7 nm), nonostante le condizioni di sintesi e la quantità di reagenti siano le stesse. Pertanto, dato che l'unica variabile è l'aggiunta del composto PEG-Silano all'interno dell'ambiente di reazione, si può affermare che anche la stessa presenza del polimero durante la sintesi delle MSN comporti profonde variazioni della struttura e morfologia delle particelle finali, che andrebbero studiate e approfondite, ma che esulano dal compito di questo lavoro.

## Immagini TEM

Le nanoparticelle di silice prodotte con questa procedura risultano essere molto diverse da quelle sintetizzate fin'ora, nelle precedenti prove.

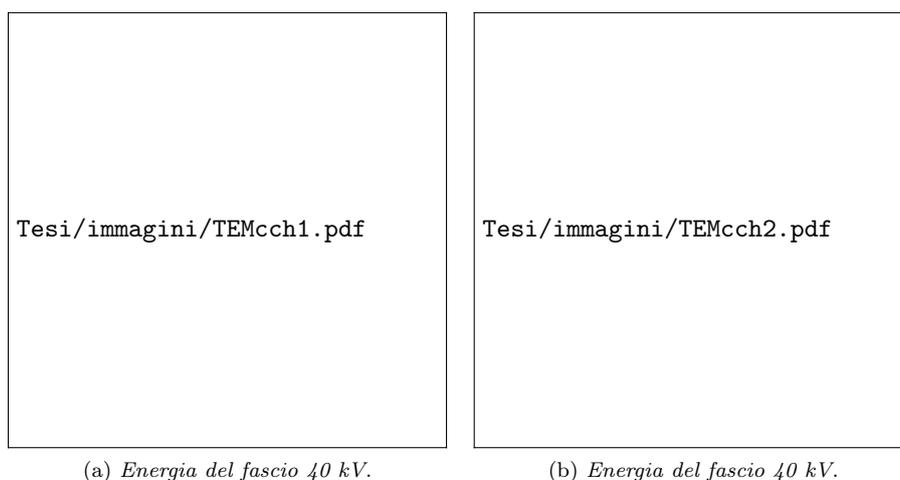


Figura 5.25: Immagini TEM del campione di nanoparticelle di silice prodotte mediante processo di co-condensazione e trattamento idrotermale (Hy).

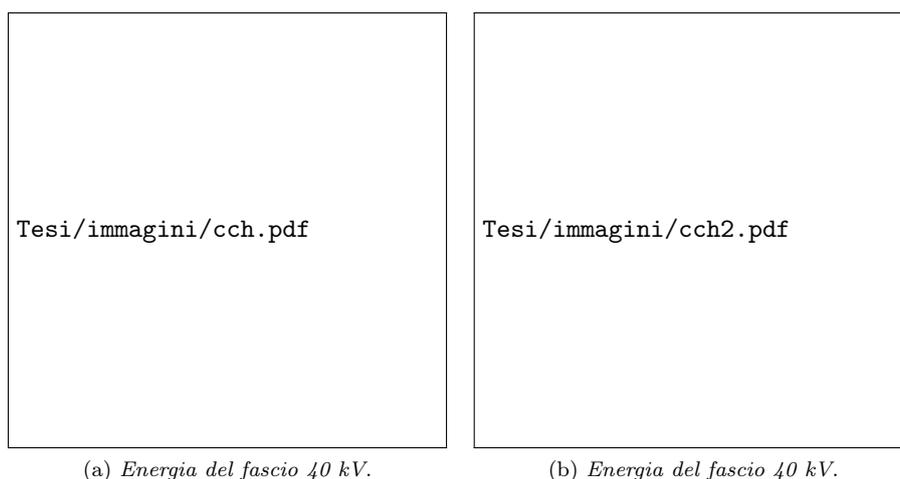


Figura 5.26: Immagini TEM del campione di nanoparticelle di silice prodotte mediante processo di co-condensazione e senza trattamento idrotermale (No-Hy).

Come già detto precedentemente, il processo di co-condensazione, a differenza degli altri due (*one step e two step*), influenza direttamente la sintesi delle nanoparticelle. Dalle immagini riportate in fig. 5.25 e 5.26, è possibile notare come le strutture di silice generate siano sempre porose, come testimoniano i canali dei pori presenti nelle singole particelle, ma di dimensione media di circa 30-40 nm, notevolmente minori rispetto ai casi precedenti. Si vuole evidenziare, come le particelle riportata nelle immagini TEM tendano a rimanere maggiormente aggregate, in particolare nel campione Hy che ha subito il processo idrotermale. Tale morfologia delle strutture può spiegare gli elevati valori di volume assorbito a pressione relativa maggiore di 0.9, mostrati nell'analisi BET in figura 5.23, e caratteristico

di strutture aggregate.

## 5.6 Prove di stabilità

Le prove di stabilità riguardano principalmente la stabilità di tipo fisico delle sospensioni generate con le nanoparticelle di silice mesoporosa *PEGylate*, sintetizzate precedentemente. Le prove sono state eseguite disperdendo un ugual numero di particelle in due diversi mezzi: acqua e PBS.

Le prove svolte disperdendo le particelle in acqua hanno dimostrato che a distanza di 5 giorni, le particelle di silice *PEGylate* e anche non, rimangono disperse senza presentare sedimentazione o aggregazione, come dimostrano le foto in fig. 5.27.



Figura 5.27: Sospensioni in acqua delle nanoparticelle prodotte con le tre procedure precedentemente descritte. Campioni:

**A**, particelle di silice mesoporosa;

**B**, MSN *PEgylate* con processo *one step*;

**C**, MSN *PEGylate* con processo *two step*;

**D**, MSN *PEGylate* con processo di co-condensazione e trattamento idrotermale;

**E**, MSN *PEGylate* con processo di co-condensazione senza trattamento idrotermale;

**F**, acqua per confronto.

Al contrario, le prove eseguite disperdendo le particelle in PBS, evidenziano la stabilità fisica di un solo tipo di sospensione, quella preparata con le nanoparticelle *PEGylate* con la procedura *one step*, come si può vedere dalle immagini riportate in figura 5.28.



Figura 5.28: Sospensioni in PBS delle nanoparticelle prodotte con le tre procedure precedentemente descritte. Campioni: Campioni:

- A**, particelle di silice mesoporosa;
- B**, MSN *PEGylate* con processo *one step*;
- C**, MSN *PEGylate* con processo *two step*;
- D**, MSN *PEGylate* con processo di co-condensazione e trattamento idrotermale;
- E**, MSN *PEGylate* con processo di co-condensazione senza trattamento idrotermale;
- F**, acqua per confronto.

Le particelle prodotte con le tecniche di co-condensazione e processo *two step* non risultano stabili in sospensione per più di 24 h, in particolare, le prime citate formano aggregati già dopo pochi minuti, come si può osservare nei campioni D-E in figura 5.28(a).

# Capitolo 6

## Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono state sintetizzate diversi tipi di nanoparticelle mesoporose di silice mediante sintesi Stöber templata. Tali sistemi sono caratterizzati da un'elevata porosità, una distribuzione molto stretta dei pori centrata attorno un diametro medio di 2.7 nm e una dimensione media delle particelle tra i 50 e i 100 nm, che li rendono potenziali strutture per diverse applicazioni bio-mediche, in particolare per il *drug delivery*.

Tali particelle manifestano però, una scarsa stabilità fisica e biologica in molti mezzi disperdenti, in special modo nei fluidi fisiologici che possiedono elevata forza ionica; per ovviare a questa problematica, il lavoro di questa tesi ha indagato sulle possibili funzionalizzazioni da applicare a queste nanoparticelle, per svilupparne stabilità e proprietà *stealth* soprattutto nelle applicazioni *in vivo*. In particolare, la ricerca si è concentrata sulle procedure di *PEGylation* che è la tecnica maggiormente utilizzata per risolvere queste problematiche. Tale procedura consiste nella funzionalizzazione superficiale delle nanoparticelle di silice con il polimero PEG, *PoliEtilenGlicole*, allo scopo di:

- inibire l'adsorbimento di proteine sulla superficie della particella stessa, che causa il fenomeno dell'*opsonizzazione*,
- sviluppare preparative che aumentino il contributo di repulsione sterica fra le nanoparticelle, che aumentino la stabilità fisica delle sospensioni delle MSN in solventi ad elevata forza ionica.

Il tipo di PEG utilizzato in queste procedure è di tipo lineare con peso molecolare medio di 5000 Dalton; in particolare è stata usata la sua forma mono metilata, in cui uno dei suoi gruppi terminali ossidrilici è sostituito da un gruppo metilico, per evitare complicazioni durante i processi di *grafting*.

Il lavoro svolto si è concentrato sullo studio delle varie possibilità di *PEGylation* di nanoparticelle mesoporose di silice, in particolare approfondendo l'approccio **grafting to**. In linea generale, questa procedura utilizza un polimero funzionalizzato che può aggirare direttamente sulle particelle di silice (*one step*) oppure dopo una funzionalizzazione della loro superficie (*two step*).

In questo lavoro di tesi si sono confrontate le particelle di silice mesoporosa *PEGylate* mediante processo *one step* e *two step*. Inoltre è stato condotto uno studio sul metodo di co-condensazione, che secondo alcuni lavori, permette la produzione di particelle *PEGylate* direttamente nella fase di sintesi Stöber delle particelle.

Mediante il processo *one step* è possibile funzionalizzare le particelle mesoporose di silice con grandi quantità di PEG, raggiungendo elevate densità di *PEGylation*. La porosità di queste particelle risulta essere drasticamente ridotta rispetto alle MSN non *PEGylate*; tale calo può essere giustificato dalla presenza del polimero che occlude l'ingresso dei pori, ma può essere anche in parte sovrastimato a causa delle basse temperature utilizzate nella tecnica di caratterizzazione, le quali, irrigidiscono le catene di polimero che di fatto possono tappare l'ingresso dei pori in misura maggiore di quanto non avviene alle temperature ordinarie.

A parte questo problema legato a tutte le MSN *PEGylate*, il processo *one step* si è dimostrato molto promettente, di relativa facile esecuzione e senza particolari svantaggi. Al contrario, le altre due procedure sono affette da diverse problematiche.

In particolare, nella procedura *two step*, le particelle di silice *PEGylate* che sono state prodotte, presentano una funzionalizzazione anche interna dei pori che può causare, oltre che la diminuzione della porosità dell'intero sistema, l'insorgere di diversi problemi di compatibilità fra le funzionalizzazioni e i possibili *guest* caricati in queste strutture. Qualora venisse controllata, questa funzionalizzazione interna potrebbe invece, rappresentare un vantaggio nel processo d'impregnazione, in particolare per quei composti che manifestano una certa affinità con i gruppi funzionali all'interno dei pori. In ogni caso la drastica riduzione della porosità dovrà essere risolta dato che incide sulla quantità di materiale che queste MSN sono capaci di ospitare all'interno della loro struttura. La quantità di PEG aggraffato con questo processo non raggiunge i valori di densità che presentano le particelle *PEGylate* con il processo *one step*; inoltre, dall'analisi termogravimetrica sembra che lo strato presente sulla superficie della particella sia costituito da un primo *layer* molto denso, costituito dal composto DIE aggraffato (presente come forma idrolizzata, ovvero come ammina primaria) sopra il quale vi è un secondo *layer*, legato ad alcune delle catene di DIE del primo strato, formato dal PEG.

Il processo di co-condensazione invece, produce particelle di per se già *PEGylate* ma essendo una procedura che incide direttamente sulla sintesi Stöber delle particelle stesse, provoca variazioni nella dimensione e morfologia nelle strutture finali, come si può osservare dalle immagini mostrate in fig 5.25, ottenute al TEM .

Le prove di stabilità colloidale hanno evidenziato come il processo *one step* permetta d'ottenere particelle con elevata densità di *PEGylation*, a differenza delle altre metodologie; queste particelle risultano stabili in sospensione di PBS per più di 5 giorni, contrariamente agli altri campioni che già dopo poche ore presentano un precipitato sul fondo del porta campione.

Pertanto, ai fini delle future applicazioni biomediche e dei possibili risvolti applicativi di queste strutture, il processo di *PEGylation* con approccio **grafting to** che comporta i maggiori vantaggi, in termini di densità di polimero aggraffato e minori problematiche, è il processo *one step*.

### Sviluppi futuri

L'applicazione finale di queste strutture di silice *PEGylate* è il *drug delivery* e il lavoro fin qui condotto, rappresenta un piccolo passo in avanti sullo sviluppo di potenziali *nano-carriers* per quest'applicazione bio-medica.

## 6. Conclusioni

---

In questo lavoro si è dimostrato che come sia possibile produrre MSN *PEGylate* capaci di rimanere a lungo in sospensione in mezzi a elevata forza ionica, quali gli ambienti fisiologici; il passaggio successivo è di verificare che questi sistemi non danneggino le cellule e che non interferiscano in alcun modo sul loro metabolismo. Ciò, viene appurato da analisi condotte *in vitro* e *in vivo*, con le quali si determina l'effettiva inerzia biologica delle nanoparticelle di silice *PEGylate*. Oltre a ciò, è necessario indagare sull'adsorbimento proteico manifestato dalle particelle prodotte in questo lavoro di tesi, fenomeno che in definitiva, rappresenta l'ostacolo maggiore da superare e la principale causa al limitato tempo di vita, all'interno del corpo, che i sistemi di silice mesoporosa mostrano nelle prove *in vivo*. Inoltre, vi è la necessità di capire in che modo il processo di *PEGylation* incida sulla quantità di guest che queste strutture sono capaci di contenere.

Se anche questi test venissero superati, i sistemi prodotti potrebbero essere ulteriormente funzionalizzati con macromolecole biologiche (enzimi, proteine, . . .), per implementarne funzioni di *targeting* (in particolare di tipo attivo) o anche d'*imaging*.

Un problema che sarà necessario affrontare è l'ottimizzazione del processo di *PEGylation* nel caso in cui si voglia caricare qualche *guest* all'interno delle particelle mesopore; in particolare, in caso di sostanze sensibili a temperatura e solventi organici, come possono essere diversi tipi di farmaci e proteine, il processo di *grafting* del polimero deve essere compatibilizzato con il *drug* che di volta in volta si presenterà; inoltre, si dovrà tenere conto anche della presenza di possibile altre funzionalizzazioni, come il possibile *targeting* citato precedentemente, al fine di non modificarne o inibirne le funzioni che esplica.

# Ringraziamenti

Si ringrazia, il relatore, professore Alvisè Benedetti, per l'occasione e la possibilità di svolgere questo interessante lavoro di laurea, il professore Pietro Riello e la dott.ssa Loretta Storaro per l'aiuto e il supporto dato durante tutto il periodo di tirocinio.

Si ringrazia il professore Stefano Polizzi, la dott.ssa Patrizia Canton e il dott. Davide Cristofori per le analisi eseguite al TEM. Un grazie per gli innumerevoli campioni analizzati, al tecnico Martina Marchiori e alla dott. Francesca Izzo.

Si ringrazia il dott. Massimiliano Perduca e la facoltà di scienze MM.FF.NN. dell'università di Verona per le analisi DLS.

Un ringraziamento particolare: ai dottori Isidora Freris, Alvisè Parma, Luca Bellotto, ai tecnici Tiziano Finotto, Loris Bertoldo e Davide Cristofori per l'aiuto fornito, la grande disponibilità e soprattutto la compagnia.

Un doveroso ringraziamento va ai dottorandi che mi hanno supportato e aiutato durante il periodo di tesi: Riccardo Marin, Gabriele Sponchia e Niccolò Mazzucco.

# Capitolo 7

## Appendici

### 7.1 FT-IR

La spettroscopia infrarossa è una tecnica d'indagine spettroscopica che utilizza la radiazione infrarossa per ricavare informazioni strutturali su diversi tipi di molecole.

La vasta raccolta bibliografica e il gran numero di spettri depositati nelle banche dati rendono questa procedura rapida, versatile e con la possibilità d'indagare vari tipi di materiale, ideale per le caratterizzazioni da laboratorio. In linea generale, la tecnica si basa sull'assorbimento selettivo della radiazione Infrarossa da parte di gruppi caratteristici di atomi, ne consegue che ogni molecola genera uno spettro che differisce dagli altri a seconda dei gruppi funzionali che possiede, come una sorta di impronta digitale e che ne permette, salvo rare eccezioni, la facile e veloce identificazione in un campione.

#### Basi teoriche

La radiazione infrarossa è una regione dello spettro elettromagnetico compresa tra la zona del visibile e quella del microonde, in genere la spettroscopia infrarossa prende in considerazione un intervallo più stretto tra i  $4000\text{ cm}^{-1}$  e i  $400\text{ cm}^{-1}$ .

L'interazione che la radiazione infrarossa ha con la materia può essere rappresentata in termini di variazione dei dipoli molecolari associati ai moti vibrazionali e rotazionali di un specifico gruppo di atomi.

In definitiva, la radiazione infrarossa può essere assorbita e convertita da una serie di atomi o molecole in energia e moti rotazionali del sistema stesso; questo si traduce in uno spettro d'assorbimento del composto in esame, formato da assorbimenti discreti, essendo queste energie assorbite quantizzate. L'assorbimento della radiazione IR genera anche a moti vibrazionali (in genere con le frequenze tra i  $10.000$  e i  $100\text{ cm}^{-1}$ ) caratterizzati anch'essi da energie quantizzate. In realtà, questi assorbimenti vibrazionali non sono discreti ma si presentano come delle bande; ciò, è causato del fatto che per ogni livello vibrazionale, esistono svariati livelli rotazionali associati che possono dare origine ad assorbimenti.

I moti vibrazionali possono essere scomposti in due principali tipologie: *stretching* e *bending*. La differenza fra i due sta nel tipo di movimento coinvolto nella vibrazione. Mentre lo *stretching* è un movimento lungo l'asse di legame che lega i due atomi, il *bending* è un movimento in cui si varia l'angolo di legame di due atomi legati a un terzo comune. Le

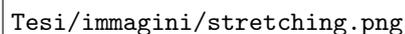


Figura 7.1: Modi vibrazionali di *stretching*: A. *stretching* simmetrico, B. *stretching* asimmetrico

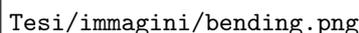


Figura 7.2: Modi vibrazionali di *bending*: C. Deformazione, D. *Rocking*, E. *Wagging*, F. *Twisting*; il segno + e - indicano oscillazioni perpendicolari al piano del foglio.

vibrazioni si dividono ulteriormente in simmetriche o asimmetriche a seconda se i moti degli atomi risultino in fase o meno.

In ogni caso, è essenziale che le vibrazioni generino una variazione periodica del momento di dipolo della molecola; se ciò avviene, si genera un accoppiamento fra il campo elettrico generato dal dipolo oscillante e il campo elettromagnetico della radiazione IR, che viene assorbita.

Il numero di modi vibrazionali che può presentare una molecola è legato al numero di atomi che essa contiene. Se vi sono  $n$  atomi nella molecola, vi saranno  $3n$  modi vibrazionali (1 per ogni direzione dello spazio:  $x$ ,  $y$ ,  $z$ ). Nel caso di una molecola non lineare, il numero di modi vibrazionali associati ai singoli atomi saranno  $3n-6$ , dato che vanno sottratti i 3 modi rotazionali e i 3 traslazionali della molecola stessa. Nel caso di una molecola lineare, invece, questi saranno  $3n-5$ .

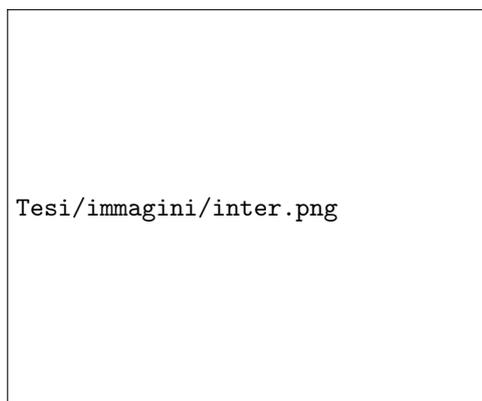
Oltre a questi determinati assorbimenti, esistono altri fenomeni che incrementano il numero di bande presenti nello spettro IR: generazione di seconde o terze armoniche o combinazione di toni fra più frequenze; e altri che invece ne diminuiscono il numero nel *range* di frequenze analizzato: modi rotovibrazionali senza generazione di dipolo o bassa intensità di alcune transizioni.

I moti di *stretching* possono essere approssimati applicando la legge di *Hooke*, e trattando il sistema come un oscillatore armonico; costituito da due masse (gli atomi) legate da una molla (il legame chimico). In tal modo è possibile descrivere matematicamente il moto vibrazionale e determinare le frequenze caratteristiche d'assorbimento.

$$v = \frac{1}{2\pi c} \left[ \frac{f}{m^*} \right]^{1/2} \quad (7.1)$$

dove,  $v$  è la frequenza d'assorbimento,  $f$  è la forza del legame e  $m^*$  è la massa ridotta del sistema.

Queste frequenze possono in realtà non corrispondere a quelle reali. Ciò è causato dal fatto che, il legame è ovviamente influenzato dal contorno chimico e dal mezzo in cui si trova. Pertanto, anche la preparazione del campione, la presenza di altri gruppi funzionali sulla stessa molecola, gli isotopi e la presenza di legami a idrogeno, possono far variare i

Figura 7.3: Interferometro di *Michelson*

valori di frequenza di un certo modo rotovibrazionale.

## Spettroscopia Infrarossa a trasformata di Fourier

Questa tecnica si è imposta velocemente per la velocità e accuratezza delle analisi, riducendo notevolmente il tempo necessario per l'ottenimento di un singolo spettro. Ciò che distingue principalmente questa tecnica da quella classica è la modalità con cui viene manipolato e analizzato il fascio di radiazione IR proveniente dal campione in esame.

Mentre nella tecnica classica è presente un monocromatore, ovvero un sistema ottico che ha lo scopo di variare gradualmente la frequenza del fascio come avviene di fatto in un analogo spettrofotometro UV-Vis, in uno strumento FTIR non vi è nulla del genere.

In questo caso il fascio inviato al campione non è monocromatico, come richiederebbe la tecnica classica, ma contiene tutte le frequenze dello spettro da analizzare (tra i  $5000$  e i  $400\text{ cm}^{-1}$ ). Il raggio così composto entra in un *interferometro di Michelson*, fig. 7.3, dove il fascio viene splittato in due singoli raggi. Ogni raggio viene riflesso da uno specchio, per poi successivamente ricongiungersi presso il rivelatore. Uno degli specchi non è fisso, per cui muovendolo si inducono sul raggio ricongiunto, fenomeni di interferenze costruttiva e distruttiva.

Il rivelatore raccoglie l'interferogramma prodotto dal fascio proveniente dal campione, che altro non è che lo spettro d'assorbimento nel dominio del tempo. Il calcolatore, applicando la trasformata di Fourier ai dati raccolti, genera lo stesso spettro nel dominio delle frequenze, da cui si ottiene, sottraendo il segnale di *background*, lo spettro d'assorbimento IR del campione.

[119–121]

I principali vantaggi della tecnica FT-IR tecnica sono:

- Non si usano monocromatori o fenditure che limitano l'intensità del fascio (*vantaggio di Jacquinot*);
- La scansione dell'intero spettro avviene in contemporanea, riducendo drasticamente il tempo d'analisi (*vantaggio di Fellgett*);

## 7.2 DLS

La tecnica DLS detta anche **PCS**, *Photon Correlation Spectroscopy* è molto diffusa in campo biologico e permette, attraverso la misura del moto *Browniano*, una veloce caratterizzazione fisica di diverse macrostrutture organiche, quali proteine ed enzimi, ma risulta altrettanto utile nello studio di nano-sistemi in sospensione, quali polimeri e nano-particelle. Le proprietà fisiche che vengono determinate con questa tecnica sono:

- la dimensione idrodinamica delle particelle.  
Ovvero la dimensione del sistema particella più solvente che si muove solidale alla particella stessa.
- il potenziale zeta.  
il quale è legato alla carica superficiale delle particelle in sospensione;
- il peso molecolare medio.  
Calcolato principalmente nel caso di polimeri e proteine.

La tecnica si basa sull'acquisizione dello scattering della luce generato dalle particelle in sospensione e sull'analisi della variazione dell'intensità nel tempo di questa radiazione diffusa .

Se una particella in sospensione viene illuminata da una sorgente luminosa, come un laser, essa diffonderà la luce in ogni direzione; tale fenomeno prende il nome di *scattering*, spiegato e risolto da varie teorie tra cui quella di *Rayleigh* e di *Mie*. Se invece, le particelle che danno origine al fenomeno di *scattering* sono molte di più, la luce diffusa risultante sarà la somma delle diffusioni di ogni singola particella. Ora, nel caso particolare in cui queste sorgenti di *scattering* (le particelle) siano stazionarie (ovvero ferme), se si raccogliesse la radiazione diffusa entro un certo angolo solido, questa si presenterebbe come un'immagine statica costituita da un'insieme di zone molto luminose e altrettante scure, dove di fatto non arriva alcuna luce. Tale è, una figura di interferenza causata dal fatto che, sebbene lo scattering sia lo stesso per ogni particelle, i singoli centri di *scattering* si trovano a distanze diverse dal rilevatore e le condizioni d'interferenza sia costruttiva che distruttiva coincideranno solo per certi angoli, dove i raggi diffusi da ogni corpuscolo saranno in fase o meno rispetto agli altri.

In realtà, le particelle in sospensione non sono ferme ma si muovono costantemente a causa del moto *Browniano* (il movimento causato dagli urti casuali delle molecole di solvente contro il corpo sospeso); la velocità con cui si muovono questi corpi dipende dalla loro dimensione, più sono piccole e più il moto è veloce viceversa se sono particelle più grandi, tale relazione è descritta dall'equazione di **Stokes-Einstein**.

A causa del moto *Browniano*, l'intensità della radiazione diffusa che giunge al rilevatore varia nel tempo, appunto perché si modificano di continuo le posizioni delle particelle e quindi le condizioni d'interferenza della luce misurata al sensore. Lo strumento, in definitiva, misura la variazione della luce diffusa nel tempo e da ciò ne ricava le informazioni d'interesse.



Figura 7.4: Esempio dell'andamento temporale dell'intensità di luce diffusa da particelle in sospensione.

In fig. 7.4, è riportato un tipico andamento dello *scattering* di nanoparticelle al variare del tempo. L'intensità varia attorno ad un valore costante, con alcune fluttuazioni sia positive che negative che si ripetono ad un intervallo più o meno regolare.

Definendo la curva della luce diffusa con la funzione  $A$ , si può definire il suo valore medio lungo un certo intervallo  $T$ , più grande rispetto le fluttuazioni, come:

$$\langle A(t) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t) dt \quad (7.2)$$

Se si considera un valore della funzione  $A$  ad un certo tempo  $t+\tau$ ,  $A(t+\tau)$  (dove  $\tau$  è per definizione piccolo rispetto alle fluttuazioni), questo risulterà tendere al valore di  $A(t)$  per piccoli valori di  $\tau$ , mentre divergerà per valori crescenti di  $\tau$ . Questa **correlazione** temporale può essere espressa matematicamente dal valore medio del prodotto delle due funzioni:

$$\langle A(t)A(t+\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t)A(t+\tau) dt \quad (7.3)$$

Lo strumento DLS elabora questo tipo di correlazione per i vari valori di  $\tau$ , generando un grafico tipo quello riportato in fig. 7.5,

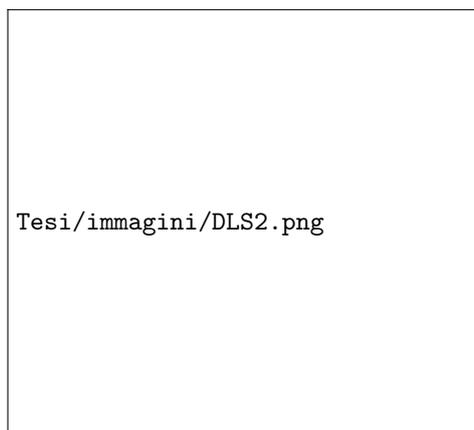


Figura 7.5: Profilo della funzione di correlazione temporale della variabile A, riportata in fig. 7.4.

La funzione correlazione è caratterizzate da un decadimento compreso tra il valore di massimo  $\langle A^2 \rangle$  e di minimo  $\langle A \rangle^2$ , i quali corrispondono al valore di ascissa  $\tau=0$ ,

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} \langle A(0)A(\tau) \rangle = \langle A^2 \rangle \quad (7.4)$$

Mentre per valori elevati di  $\tau$  si avrà:

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \langle A(0)A(\tau) \rangle = \langle A \rangle^2 \quad (7.5)$$

La funzione di autocorrelazione viene espressa come la forma normalizzata al valore di  $\langle A^2 \rangle$  dell'eq.7.3

$$G(\tau) = \frac{\langle A(t)A(t+\tau) \rangle}{\langle A(t)^2 \rangle} \quad (7.6)$$

e in genere, quando è legata alla cinetica delle particelle come nel caso della tecnica DLS, segue un decadimento di tipo esponenziale,

$$G(\tau) = 1 - (\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2) \exp^{-\frac{\tau}{\tau_o}} \quad (7.7)$$

Il valore di  $\tau_o$  prende il nome di **tempo di decadimento**.

Tale parametro della funzione di autocorrelazione è legato alla frequenza delle fluttuazioni che è a sua volta legata alla velocità di spostamento delle particelle, legata alle dimensioni delle particelle stesse.[122]

Pertanto particelle di dimensione diverse manifesteranno decadimenti della funzione di autocorrelazione diversi, fig. 7.7.



Figura 7.6: Andamento temporale della luce diffusa per particelle di dimensione diversa. Si noti come particelle grandi, muovendosi più lentamente diano origine a fluttuazioni meno frequenti, al contrario, particelle più piccole generano fluttuazioni molto più frequenti a causa della loro alta velocità



Figura 7.7: Confronto del profilo della funzione di autocorrelazione prodotta dalla variazione dello scattering di particelle di grande e di piccola dimensione

Il tempo di decadimento è correlato al coefficiente di diffusione delle particelle considerate, pertanto, secondo la relazione di *Stokes*, è un parametro legato sia alla temperatura che alla viscosità del mezzo disperdente. A parità di queste, lo strumento è capace di ricavare il valore medio e la distribuzione delle dimensioni di un qualsiasi nano-sistema in dispersione.

Nel caso in cui, le particelle in sospensione risultino avere dimensioni diverse, la tecnica DLS può esprimere la distribuzione totale delle dimensioni delle particelle in 3 distinti modi [123]:

- rispetto al numero di particelle;
- rispetto al volume delle particelle;  
in questa rappresentazione, le particelle più grandi pesano di più nella distribuzione.
- rispetto allo *scattering*;  
in questo caso, la differenza di segnale è dovuto al fatto che le particelle più grandi diffondono di più la luce; infatti secondo l'approssimazione di *Rayleigh* l'intensità della luce diffusa è proporzionale alla sesta potenza del diametro del centro di *scattering*.

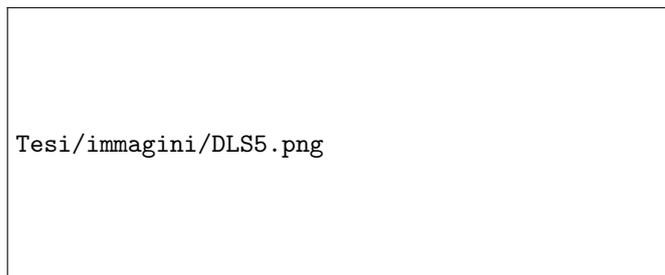


Figura 7.8: Nella figura, le tre diverse distribuzioni che può esprimere la tecnica DLS. Il caso in figura rappresenta una sospensione con due uguali popolazioni di particelle a dimensione diversa (5 e 50 nm). A sinistra, la distribuzione delle dimensioni delle particelle è pesata sul numero di particelle; al centro, è pesata sul volume delle particelle e a destra sull'intensità della luce diffusa.

### 7.3 Tecnica Adsorbimento-Desorbimento di gas

Una delle tecniche maggiormente usate nella determinazione delle proprietà fisiche superficiali di materiali porosi, è l'adsorbimento di atomi o molecole gassose.

Mediante questa procedura è possibile ricavare alcuni parametri fisici particolarmente importanti per questi sistemi, quali:

- Superficie specifica;
- Volume vuoto occupato dai pori;
- Distribuzione delle dimensioni e del volume dei pori;
- entalpia d'adsorbimento;

L'adsorbimento del gas sulla superficie del materiale può essere di due tipi: fisico, perciò si tratterà di *fisi-adsorbimento* determinato da interazioni deboli e di natura elettrostatica (forze di Van der Waals, interazione fra dipoli elettrici) e chimico, dove invece vi è la formazione di un vero e proprio legame chimico. La differenza essenziale fra i due tipi d'interazione è legata alla reversibilità della reazione; così, mentre per l'adsorbimento fisico vi è la possibilità per il gas di de-adsorbirsi dal materiale, nel chemi adsorbimento il processo risulta irreversibile.

La caratterizzazione dei materiali porosi avviene mediante l'analisi delle isoterme di *adsorbimento-desorbimento*, ovvero le curve che rappresentano la quantità di gas adsorbito a temperatura costante dal materiale, in funzione della pressione parziale a cui è posto. La normale procedura che si segue per costruire queste isoterme prevede un'iniziale degassaggio del campione mediante un trattamento termico; successivamente segue un raffreddamento fino alla temperatura di liquefazione del gas utilizzato nella misura, che verrà mantenuta per l'intera durata dell'analisi. Nella gran parte dei casi il gas è l'azoto, e pertanto, la temperatura da raggiungere è di circa 77K.

A questo punto, l'isoterma di adsorbimento viene costruita inserendo gradualmente, all'interno del porta-campione, del N<sub>2</sub>, e registrando di volta in volta i valori di pressione parziale ( $p/p^o$ , con  $p^o$ , pressione di vapore del gas alla temperatura d'esercizio) e volume adsorbito. Infine, operando nel modo opposto, si raccolgono i dati che vanno a costruire l'isoterma di de-adsorbimento.

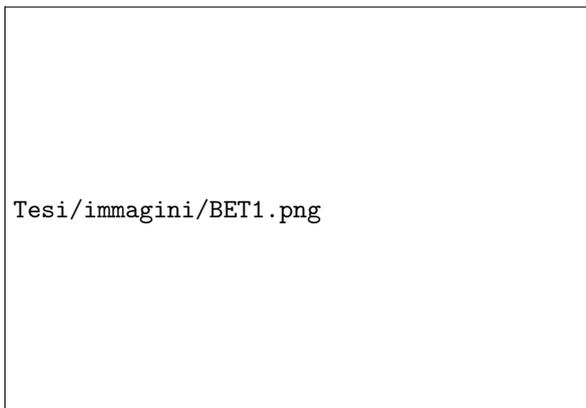


Figura 7.9: I principali tipi di isoterme d'adsorbimento secondo la classificazione IUPAC

Queste curve sono differenti a seconda del tipo di materiale analizzato, e manifestano andamenti diversi a seconda della dimensione e del volume dei loro pori.

La normativa IUPAC classifica le isoterme d'adsorbimento e desorbimento in 6 tipologie, riportate in fig. 7.9.

**Tipo I** è tipica di materiali con micropori di dimensioni molecolari.

**Tipo II** è una deviazione dell'isoterma di tipo I, caratterizzata dalla formazione di multistrati di gas successivamente alla formazione di un monostrato. Risulta tipica per materiali con una larga distribuzione delle dimensioni dei pori o per materiali non-porosi.

**Tipo III** è un'isoterma simile al tipo II. Tipica di materiali macro-porosi.

**Tipo IV** simile al tipo II, è caratterizzata dalla presenza di un'isteresi fra l'isoterma d'adsorbimento e desorbimento. Tale comportamento è dovuto alla condensazione delle molecole di gas nei pori. Questa curva è tipica dei materiali mesoporosi.

**Tipo V** è tipica di materiali che danno bassa interazione tra gas e superficie. L'isteresi è causata sempre dalla condensazione del gas nei pori come nel caso precedente.

**Tipo VI** è un'isoterma a scalini. Tipica di materiali non porosi dove ogni scalino rappresenta la formazione di uno strato di gas adsorbito.

Per determinare le proprietà fisiche dei materiali porosi è necessaria l'applicazione di modelli e teorie che diano una spiegazione alle varie tipologie di isoterma.

La teoria di *Langmuir* è una di queste, ed è la base di partenza da cui poi si sviluppano i moderni modelli, come la teoria BET. Secondo Langmuir esiste una relazione che lega la pressione di un gas e il volume adsorbito per la formazione di un solo monostrato di molecole di gas su di una superficie. Tale relazione, espressa matematicamente nell'eq.7.8,

$$p = k \frac{\theta}{1 - \theta} \quad (7.8)$$

considera il parametro  $\theta$ , definito come il rapporto tra il volume di gas adsorbito (V) e il volume di gas necessario per formare un monostrato completo di molecole di gas adsorbite

( $V_m$ ). Si capisce che conoscendo i parametri legati a una singola molecola di gas (volume molecolare, densità di ricoprimento superficiale, ...) è possibile ricavare i valori della superficie specifica del materiale analizzato. Però, la teoria di Langmuir fa un'importante assunzione, ovvero che si formi unicamente un monostrato di molecole adsorbite, pertanto il passo successivo per una miglior conoscenza del fenomeno sarà quello d'introdurre nella teoria la formazione del multi-strato di gas adsorbito.

Oggi, il modello d'adsorbimento maggiormente diffuso è quello formulato da *Brunauer, Emmett e Teller*, che prende il nome di BET. In tale teoria si introducono alcune assunzioni: che i fenomeni di adsorbimento e desorbimento siano in equilibrio tra loro per ogni valore di pressione parziale e che inoltre l'interazione fra superficie e molecola di gas vari a seconda se quest'ultima si trovi vicino alla superficie (e pertanto legata all'energia d'adsorbimento) o negli strati più esterni (e quindi legata all'entalpia d'evaporazione). Da ciò, la teoria BET conclude che:

$$\frac{V}{V_m} = \frac{cp}{(p - p^0)[1 + (c + 1)\frac{p}{p^0}]} \quad (7.9)$$

dove  $c$  è legato alle energie d'interazione fra superficie e molecola di gas adsorbita. Con la teoria BET si può estrapolare il valore di  $V_m$  leggendo direttamente il volume adsorbito a  $p/p^0 \simeq 0.3$ , ma ciò non risulta molto accurato. Dato che l'isoterma a pressioni relative basse (fino a 0.3) è lineare rispetto alla pressione parziale ( $p/p^0$ ), nella normale procedura, si linearizza l'eq. 7.9,

$$\frac{p}{V(p^0 - p)} = \frac{1}{V_m c} + \frac{c - 1}{V_m c} \frac{p}{p^0} \quad (7.10)$$

e in tal modo è possibile ricavare dall'intercetta il valore di  $V_m$ , da cui, conoscendo l'area che occupa una molecola di gas adsorbito ( $\sigma^0$ ) e il numero di Avogadro ( $N_A$ ) è possibile ricavare l'area superficiale del materiale.

$$A_{spec} = \frac{V_m N_A \sigma^0}{22.414} \quad (7.11)$$

Un altro dato ricavabile con questa tecnica è il volume totale dei pori. Tale valore si ottiene assumendo che: quando la pressione raggiunge valori prossimi alla pressione di saturazione del gas, il volume di gas adsorbito sulla superficie esterna del materiale poroso risulta trascurabile rispetto al gas presente all'interno dei pori. In tal modo il volume di gas adsorbito può essere considerato come il volume totale dei pori.

Un altro parametro importante è la distribuzione e la dimensione media dei pori. Per ricavare questo dato si applica il modello BJH, acronimo delle iniziali degli autori della teoria *Barrett, Joyner and Halenda*. In tale approccio si assume che i pori siano costituiti da cilindri di diametro costante e che al loro interno avvenga la condensazione del gas a determinate pressioni legate alla dimensione del poro.

Ciò che il modello predice è che quando la pressione del gas è pari a  $p^0$ , tutti i pori risultano riempiti del gas condensato, ovvero di liquido; se a questo punto si riduce gradualmente la pressione, parte del liquido nei pori comincerà a evaporare. In realtà, questa evaporazione non avviene contemporaneamente allo stesso modo per tutti i pori, ma avverrà inizialmente nei pori con diametro maggiore ( $r_m$ ), seguendo la legge di Kelvin,

$$\log\left(\frac{p^*}{p^0}\right) = \frac{2\gamma \vartheta \cos(\theta)}{RT r_m} \quad (7.12)$$

$\theta$  è l'angolo di contatto,  $\vartheta$  è il volume molare del gas condensato,  $\gamma$  è la tensione superficiale. La pressione critica  $p^*$  rappresenta la pressione alla quale avviene la condensazione del gas

nei pori con diametro  $r_m$ . Pertanto, raccogliendo i dati di pressione e volume di gas adsorbito, è possibile risalire alla distribuzione dei pori e quindi anche al loro diametro medio.

# Bibliografia

- [1] Feynman R. “There’s plenty of room at the bottom”. lectures. 1959.
- [2] Michael Faraday. “Experimental relations of gold (and other metals) to light”. In: *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 147 (1857), pp. 145–181.
- [3] Bailus Walker e Charles P Mouton. “Nanotechnology and nanomedicine: a primer.” In: *Journal of the National Medical Association* 98.12 (dic. 2006), pp. 1985–8. ISSN: 0027-9684.
- [4] S Moein Moghimi, a Christy Hunter e J Clifford Murray. “Nanomedicine: current status and future prospects.” In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19.3 (mar. 2005), pp. 311–30. ISSN: 1530-6860.
- [5] K John Morrow, Raj Bawa e Chiming Wei. “Recent advances in basic and clinical nanomedicine.” In: *The Medical clinics of North America* 91.5 (set. 2007), pp. 805–43. ISSN: 0025-7125.
- [6] R Gref et al. “The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres”. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* (1995).
- [7] Mihrimah Ozkan Nathaniel G. Portney. “Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing”. In: *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006), 620 –630.
- [8] Elvin Blanco, Mauro Ferrari, Rita E. Serda, Biana Godin. “Multi-stage delivery nano-particle systems for therapeutic applications”. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1810 (2011), 317 –329.
- [9] Stergios Logothetidis. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*. A cura di Springer. NanoScience e Technology, 2011.
- [10] Slowing, I. et al. “Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Biosensing Applications”. In: *Advanced Functional Materials* 17 (2007), pp. 1225–1236. ISSN: 1616301X.
- [11] Joseph D. Meyers, Irene Panagopoulos, Baowei Fei, Yu Cheng, Anna C. Samia e Clemens Burda. “Highly Efficient Drug Delivery with Gold Nanoparticle Vectors for in Vivo Photodynamic Therapy of Cancer”. In: *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (32), (2008), 10643–10647.
- [12] Kathleen F Pirollo e Esther H Chang. “Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake?” In: *Trends in biotechnology* 26.10 (ott. 2008), pp. 552–8. ISSN: 0167-7799.

- [13] Sanjeeb K Sahoo e Vinod Labhasetwar. "Nanotech approaches to drug delivery and imaging." In: *Drug discovery today* 8.24 (dic. 2003), pp. 1112–20. ISSN: 1359-6446.
- [14] Tomohiro Sawa Jun Fang e Hiroshi Maeda. "Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS". In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* Volume 519 (2004), pp. 29–49.
- [15] Yu-Shen Lin, Katie R. Hurley e Christy L. Haynes. "Critical Considerations in the Biomedical Use of Mesoporous Silica Nanoparticles". In: *The Journal of Physical Chemistry Letters* (gen. 2012), pp. 364–374. ISSN: 1948-7185.
- [16] Farahidah Mohamed e F Christopher. "Engineering Biodegradable Polyester Particles With Specific Drug Targeting and Drug Release Properties". In: *In Vivo* 97.1 (2008), pp. 71–87.
- [17] Monzer Fanun. *COLLOIDS IN DRUG DELIVERY*. A cura di ARTHUR T. HUBBARD. SURFACTANT SCIENCE SERIES, 2010.
- [18] Li-Sheng Wang et al. "Biofunctionalized phospholipid-capped mesoporous silica nanoshuttles for targeted drug delivery: improved water suspensibility and decreased nonspecific protein binding." In: *ACS nano* 4.8 (ago. 2010), pp. 4371–9. ISSN: 1936-086X.
- [19] Si-Han Wu, Yann Hung e Chung-Yuan Mou. "Mesoporous silica nanoparticles as nanocarriers." In: *Chemical communications (Cambridge, England)* 2002 (giu. 2011), pp. 9972–9985. ISSN: 1364-548X.
- [20] Albert Figuerola et al. "From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications." In: *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 62.2 (ago. 2010), pp. 126–43. ISSN: 1096-1186.
- [21] Qianjun He et al. "An anticancer drug delivery system based on surfactant-templated mesoporous silica nanoparticles." In: *Biomaterials* 31.12 (apr. 2010), pp. 3335–46. ISSN: 1878-5905.
- [22] Donald E Owens e Nicholas a Peppas. "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles." In: *International journal of pharmaceutics* 307.1 (gen. 2006), pp. 93–102. ISSN: 0378-5173.
- [23] Omid Veisheh, Jonathan W Gunn e Miqin Zhang. "Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging." In: *Advanced drug delivery reviews* 62.3 (mar. 2010), pp. 284–304. ISSN: 1872-8294.
- [24] Samir Mitragotri Julie A. Champion Yogesh K. Katare. "Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers". In: *Journal of Controlled Release* 121 (2007), pp. 3–9.
- [25] A Theoretical Approach. "Protein Adsorption on Surfaces with Grafted Polymers ." in: *Biophysical Journal* 72. February (1997).
- [26] Eun Chul Cho et al. "Inorganic nanoparticle-based contrast agents for molecular imaging." In: *Trends in molecular medicine* 16.12 (dic. 2010), pp. 561–73. ISSN: 1471-499X.
- [27] John M. Walker. *Drug Delivery Systems*. A cura di Series. METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2008. ISBN: 9780387726274.
- [28] Chee Leng Lay et al. "Poly(ethylene glycol)-graft-hollow silica vesicles for drug delivery." In: *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 16.10 (mar. 2010), pp. 3001–4. ISSN: 1521-3765.

- [29] Igor I Slowing et al. “Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers.” In: *Advanced drug delivery reviews* 60.11 (ago. 2008), pp. 1278–88. ISSN: 0169-409X.
- [30] Yuanzhe Piao et al. “Designed Fabrication of Silica-Based Nanostructured Particle Systems for Nanomedicine Applications”. In: *Advanced Functional Materials* 18.23 (dic. 2008), pp. 3745–3758. ISSN: 1616301X.
- [31] V. Meynen, P. Cool e E.F. Vansant. “Verified syntheses of mesoporous materials”. In: *Microporous and Mesoporous Materials* 125.3 (ott. 2009), pp. 170–223. ISSN: 13871811.
- [32] Jaemoon Yang et al. “Hollow silica nanocontainers as drug delivery vehicles.” In: *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 24.7 (apr. 2008), pp. 3417–21. ISSN: 0743-7463.
- [33] Xian Wang et al. “Fabrication of microporous hollow silica spheres templated by NP-10 micelles without calcinations”. In: *Applied Surface Science* 257.7 (gen. 2011), pp. 2481–2488. ISSN: 01694332.
- [34] Sophie Biz. *Synthesis and Characterization of Mesostructured Materials*. Vol. 40. 3. Ago. 1998, pp. 329–407. ISBN: 3033200834.
- [35] Axel Schlossbauer Johann Kecht e Thomas Bein. “Selective Functionalization of the Outer and Inner Surfaces in Mesoporous Silica Nanoparticles”. In: *Chem. Mater.* 20 (2008), pp. 7207–7214.
- [36] Valentina Cauda et al. “Multiple core-shell functionalized colloidal mesoporous silica nanoparticles.” In: *Journal of the American Chemical Society* 131.32 (ago. 2009), pp. 11361–70. ISSN: 1520-5126.
- [37] Igor I. Slowing et al. “Mesoporous silica nanoparticles: structural design and applications”. In: *Journal of Materials Chemistry* 20 (2010). ISSN: 0959-9428.
- [38] Kazuhisa Yano e Yoshiaki Fukushima. “Synthesis of mono-dispersed mesoporous silica spheres with highly ordered hexagonal regularity using conventional alkyl-trimethylammonium halide as a surfactantElectronic supplementary information (ESI) available: time courses of particle size and scatteri”. In: *Journal of Materials Chemistry* 14.10 (2004), p. 1579. ISSN: 0959-9428.
- [39] Swadeshmukul Santra Xiaojun Zhao Lisa R. Hilliard Joshua E. Smith Yanrong Wu Weihong Tan Lin Wang Kemin Wang. “Watching Silica Nanoparticles”. In: *AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* (2006), pp. 647–654.
- [40] W Stober. “Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range\*1”. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 26.1 (gen. 1968), pp. 62–69. ISSN: 00219797.
- [41] Herbert Giesche. “Synthesis of monodispersed silica powders II. Controlled growth reaction and continuous production process”. In: *Journal of the European Ceramic Society* 14.3 (gen. 1994), pp. 205–214. ISSN: 09552219.
- [42] I Introduction. “Studies of the Kinetics of the Precipitation of Uniform Silica Particles through the Hydrolysis and Condensation of Silicon Alkoxides”. In: *Interface* 142.1 (1991).
- [43] Chernal Engineering. “Uniform Silica Particle Precipitation : An Aggregative Growth Model”. In: *Interface* 142.1 (1991).

- [44] W. J. ROTH J. C. VARTULI J. S. BEC C. T. KRESGE M. E. LEONOWICZ. "Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism". In: *Nature* 359 (1992), pp. 710–712.
- [45] Qiang Cai et al. "Dilute Solution Routes to Various Controllable Morphologies of MCM-41 Silica with a Basic Medium †". In: *Synthesis* 10.13 (2001), pp. 258–263.
- [46] Qiao Zhen-An et al. "Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles via Controlled Hydrolysis and Condensation of Silicon Alkoxide". In: *Chemistry of Materials* 21.16 (ago. 2009), pp. 3823–3829. ISSN: 0897-4756.
- [47] Cedric Boissie et al. "A Study of the Assembly Mechanism of the Mesoporous MSU-X Silica Two-Step Synthesis". In: *Synthesis* 11 (2001), pp. 3580–3586.
- [48] Manuel Arruebo et al. "Development of Magnetic Nanostructured Silica-Based Materials as Potential Vectors for Drug-Delivery Applications". In: *Chemistry of Materials* 18.7 (apr. 2006), pp. 1911–1919. ISSN: 0897-4756.
- [49] Oleg Tovmachenko Uma Shanker Rai Hongtao Yu Paresh Chandra Ray Shuguang Wang Wentong Lu. "Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes". In: *Shuguang Wang, Wentong Lu, Oleg Tovmachenko, Uma Shanker Rai, Hongtao Yu, Paresh Chandra Ray* 463 (2008), 145–149.
- [50] Ajay S Karakoti et al. "PEGylated inorganic nanoparticles." In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 50.9 (feb. 2011), pp. 1980–94. ISSN: 1521-3773.
- [51] Junghae Suh et al. "PEGylation of nanoparticles improves their cytoplasmic transport." In: *International journal of nanomedicine* 2.4 (gen. 2007), pp. 735–41. ISSN: 1176-9114.
- [52] Francesco M Veronese e Gianfranco Pasut. "PEGylation, successful approach to drug delivery." In: *Drug discovery today* 10.21 (nov. 2005), pp. 1451–8. ISSN: 1359-6446.
- [53] F M Veronese. "Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions." In: *Biomaterials* 22.5 (mar. 2001), pp. 405–17. ISSN: 0142-9612.
- [54] Yufang Zhu et al. "PEGylated hollow mesoporous silica nanoparticles as potential drug delivery vehicles". In: *Microporous and Mesoporous Materials* 141.1-3 (mag. 2011), pp. 199–206. ISSN: 13871811.
- [55] J Milton Harris e Robert B Chess. "Effect of pegylation on pharmaceuticals." In: *Nature reviews. Drug discovery* 2.3 (mar. 2003), pp. 214–21. ISSN: 1474-1776.
- [56] a Abuchowski et al. "Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase." In: *The Journal of biological chemistry* 252.11 (giu. 1977), pp. 3582–6. ISSN: 0021-9258.
- [57] a Abuchowski et al. "Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol." In: *The Journal of biological chemistry* 252.11 (giu. 1977), pp. 3578–81. ISSN: 0021-9258.
- [58] Samuel Zalipsky. "Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules". In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 95 (1995).
- [59] J.D. Andrades S.I. Jeon. J. H.Lee e P.G. De Gennes. *Protein-surface Interaction in the presence of Polyethylene Oxide*. Journal of Colloid and Interface Science, Vol.142. 1991.

- [60] I Szeleifer e M A Carignano. "Tethered polymer layers : phase transitions and reduction of protein adsorption". In: 448 (2000), pp. 423–448.
- [61] G Subramanian, D R M Williams e P A Pincus. "Interaction between Finite-Sized Particles and End Grafted Polymers". In: *Society* 9297.94 (1996), pp. 4045–4050.
- [62] Timothy Mcpherson et al. "Prevention of Protein Adsorption by Tethered Poly ( ethylene oxide ) Layers : Experiments and Single-Chain Mean-Field Analysis". In: *Adsorption Journal Of The International Adsorption Society* 7463.12 (1998), pp. 176–186.
- [63] K. Lee.S.J.;Park. "Protein interaction with surface:separation distance-dependent interaction energies". In: *J.Va.Sci.Technol.* 12 (1994), pp. 1–7.
- [64] I.Szeleifer. "Protein adsorption on tethered polymer layers: effect of polymer chain architecture and composition". In: *Physica A* 244 (1997), pp. 370–388.
- [65] Lennart Bergstrm. "Hamaker constants of inorganic materials". In: *Interface Science* 70 (1997), pp. 125–169.
- [66] Carola Barrera, Adriana P Herrera e Carlos Rinaldi. "Colloidal dispersions of mono-disperse magnetite nanoparticles modified with poly(ethylene glycol)." In: *Journal of colloid and interface science* 329.1 (gen. 2009), pp. 107–13. ISSN: 1095-7103.
- [67] M J Roberts, M D Bentley e J M Harris. "Chemistry for peptide and protein PEGylation." In: *Advanced drug delivery reviews* 54.4 (giu. 2002), pp. 459–76. ISSN: 0169-409X.
- [68] D Andrades. "Blood compatibility of polyethylene surfaces". In: *Science* 20.95 (1995), pp. 1043–1079.
- [69] Discrete P E G Reagents. "Discrete PEG Reagents". In: 1995 (2002), pp. 707–742.
- [70] Ling Hu et al. "Comparison of various methods of grafting of modified-PEG onto maghemite nanoparticles in aqueous medium including synthesis by microwave refluxing". In: (2009), pp. 277–284.
- [71] Regina Okner, Abraham Jacob Domb e Daniel Mandler. "Electrochemically deposited poly(ethylene glycol)-based sol–gel thin films on stainless steel stents". In: *New Journal of Chemistry* 33.7 (2009), p. 1596. ISSN: 1144-0546.
- [72] C Simone Fishburn. "The Pharmacology of PEGylation : Balancing PD with PK to Generate Novel Therapeutics". In: *October* 97.10 (2008), pp. 4167–4183.
- [73] Khalil Amine et al. "Novel silane compounds as electrolyte solvents for Li-ion batteries". In: *Electrochemistry Communications* 8 (2006), pp. 429–433.
- [74] Prithwiraj Maitra et al. "Poly ( ethylene oxide ) Silananted Nanosize Fumed Silica : DSC and TGA Characterization of the Surface". In: *Composites* 15 (2003), pp. 8994–9004.
- [75] L. Hu et al. "One step grafting of monomethoxy poly(ethylene glycol) during synthesis of maghemite nanoparticles in aqueous medium". In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 330.1 (nov. 2008), pp. 1–7. ISSN: 09277757.
- [76] Seongok Han e Dongsook Kwon. "Thermal/oxidative degradation and stabilization of polyethylene glycol". In: *Polymer* 38.2 (1997), pp. 317–323.
- [77] Seongok Han. "Thermal degradation of poly ( ethyleneglycol )". In: *Polymer Degradation and Stability* 41 (1995), pp. 203–208.

- [78] Samuel Zalipsky e J Milton Harris. "Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly ( ethylene glycol )". In: *Symposium A Quarterly Journal In Modern Foreign Literatures* 2 (1997), pp. 1–13.
- [79] Jürgen Groll et al. "Biofunctionalized, ultrathin coatings of cross-linked star-shaped poly(ethylene oxide) allow reversible folding of immobilized proteins." In: *Journal of the American Chemical Society* 126.13 (apr. 2004), pp. 4234–9. ISSN: 0002-7863.
- [80] Sj Sofia, V Premnath e Ew Merrill. "Poly(ethylene oxide) Grafted to Silicon Surfaces: Grafting Density and Protein Adsorption." In: *Macromolecules* 31.15 (lug. 1998), pp. 5059–70. ISSN: 0024-9297.
- [81] Sadhana Sharma, Robert W Johnson e Tejal a Desai. "Evaluation of the stability of nonfouling ultrathin poly(ethylene glycol) films for silicon-based microdevices." In: *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 20.2 (gen. 2004), pp. 348–56. ISSN: 0743-7463.
- [82] X Zhu et al. "Grafting of High-Density Poly ( Ethylene Glycol ) Monolayers on Si ( 111 )". In: 2778.111 (2001), pp. 7798–7803.
- [83] Valentina Cauda, Christian Argyo e Thomas Bein. "Impact of different PEGylation patterns on the long-term bio-stability of colloidal mesoporous silica nanoparticles". In: *Journal of Materials Chemistry* 20.39 (2010), p. 8693. ISSN: 0959-9428.
- [84] Valentina Cauda, Christian Argyo e Thomas Bein. "Supporting Information Impact of different PEGylation patterns on the long-term bio-stability of colloidal mesoporous silica nanoparticles". In: *Journal of Materials c* (2010), pp. 1–18.
- [85] Yasuyuki Sadzuka et al. "Effects of mixed polyethyleneglycol modification on fixed aqueous layer thickness and antitumor activity of doxorubicin containing liposome." In: *International journal of pharmaceutics* 238.1-2 (mag. 2002), pp. 171–80. ISSN: 0378-5173.
- [86] F. Branda et al. "Synthesis structure and stability of amino functionalized PEGylated silica nanoparticles". In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 367.1-3 (set. 2010), pp. 12–16. ISSN: 09277757.
- [87] Iria Maria Rio-Echevarria et al. "Highly PEGylated silica nanoparticles: "ready to use" stealth functional nanocarriers". In: *Journal of Materials Chemistry* 20.14 (2010), p. 2780. ISSN: 0959-9428.
- [88] Bindushree Radhakrishnan, Rajesh Ranjan e William J. Brittain. "Surface initiated polymerizations from silica nanoparticles". In: *Soft Matter* 2.5 (2006), p. 386. ISSN: 1744-683X.
- [89] Benjamin Thierry et al. "Electrostatic self-assembly of PEG copolymers onto porous silica nanoparticles." In: *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 24.15 (ago. 2008), pp. 8143–50. ISSN: 0743-7463.
- [90] Zhang Guo et al. "Self-assembly of silanated poly(ethylene glycol) on silicon and glass surfaces for improved haemocompatibility". In: *Applied Surface Science* 255.15 (mag. 2009), pp. 6771–6780. ISSN: 01694332.
- [91] Chun-Yan Hong, Xin Li e Cai-Yuan Pan. "Grafting polymer nanoshell onto the exterior surface of mesoporous silica nanoparticles via surface reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization". In: *European Polymer Journal* 43.10 (ott. 2007), pp. 4114–4122. ISSN: 00143057.

- [92] Zhenkun Zhang et al. "Synthesis of poly(ethylene glycol) (PEG)-grafted colloidal silica particles with improved stability in aqueous solvents." In: *Journal of colloid and interface science* 310.2 (giu. 2007), pp. 446–55. ISSN: 0021-9797.
- [93] Mathieu Joubert et al. "Hairy PEO-Silica Nanoparticles through Surface-Initiated Polymerization of Ethylene Oxide". In: *Macromolecular Rapid Communications* 26.8 (apr. 2005), pp. 602–607. ISSN: 1022-1336.
- [94] Majad Khan e Wilhelm T. S. Huck. "Hyperbranched Polyglycidol on Si/SiO<sub>2</sub> Surfaces via Surface-Initiated Polymerization". In: *Macromolecules* 36.14 (lug. 2003), pp. 5088–5093. ISSN: 0024-9297.
- [95] Hyunjoon Kim, Choonwon Lim e Suk-In Hong. "Gas Permeation Properties of Organic-Inorganic Hybrid Membranes Prepared from Hydroxyl-Terminated Polyether and 3-isocyanatopropyltriethoxysilane". In: *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 36.2 (nov. 2005), pp. 213–221. ISSN: 0928-0707.
- [96] Jacques Blümmel et al. "Protein repellent properties of covalently attached PEG coatings on nanostructured SiO<sub>2</sub>-based interfaces." In: *Biomaterials* 28.32 (nov. 2007), pp. 4739–47. ISSN: 0142-9612.
- [97] C Oh et al. "Preparation of PEG-grafted silica particles using emulsion method". In: *Materials Letters* 59.8-9 (apr. 2005), pp. 929–933. ISSN: 0167577X.
- [98] Seongbong Jo e Kinam Park. "Surface modification using silanated poly(ethylene glycol)s". In: *Synthesis* 21.June 1999 (2000).
- [99] H.Y. Chang e C.W. Lin. "Proton conducting membranes based on PEG/SiO<sub>2</sub> nanocomposites for direct methanol fuel cells". In: *Journal of Membrane Science* 218.1-2 (lug. 2003), pp. 295–306. ISSN: 03767388.
- [100] Chen Zhang et al. "Preparation of mesoporous silica microspheres with multi-hollow cores and their application in sustained drug release". In: *Particuology* 8.5 (ott. 2010), pp. 447–452. ISSN: 16742001.
- [101] Valentina Cauda, Axel Schlossbauer e Thomas Bein. "Bio-degradation study of colloidal mesoporous silica nanoparticles: Effect of surface functionalization with organo-silanes and poly(ethylene glycol)". In: *Microporous and Mesoporous Materials* 132.1-2 (lug. 2010), pp. 60–71. ISSN: 13871811.
- [102] Qianjun He et al. "The effect of PEGylation of mesoporous silica nanoparticles on nonspecific binding of serum proteins and cellular responses." In: *Biomaterials* 31.6 (feb. 2010), pp. 1085–92. ISSN: 1878-5905.
- [103] Nardine Abadeer Yu-Shen Lin e Christy L. Haynes. "Stability of small mesoporous silica nanoparticles in biological media". In: *Chem. Commun.*, 47 (2011), pp. 532–534.
- [104] Vuk Uskoković et al. "PEGylated silicon nanowire coated silica microparticles for drug delivery across intestinal epithelium." In: *Biomaterials* 33 (nov. 2011). ISSN: 1878-5905.
- [105] Martina Pilloni et al. "PEGylation and preliminary biocompatibility evaluation of magnetite-silica nanocomposites obtained by high energy ball milling." In: *International journal of pharmaceutics* 401.1-2 (nov. 2010), pp. 103–12. ISSN: 1873-3476.
- [106] J Piehler et al. "A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces." In: *Biosensors & bioelectronics* 15.9-10 (gen. 2000), pp. 473–81. ISSN: 0956-5663.

- [107] Chen Shen et al. "Electrochimica Acta Physicochemical properties of poly ( ethylene oxide ) -based composite polymer electrolytes with a silane-modified mesoporous silica SBA-15". In: *Electrochimica Acta* 54 (2009), pp. 3490–3494.
- [108] Libang Feng et al. "Preparation of poly(ethylene glycol)-grafted silica nanoparticles using a facile esterification condensation method". In: *Polymer Bulletin* 63.3 (apr. 2009), pp. 313–327. ISSN: 0170-0839.
- [109] Christophe Flesch et al. "Poly ( ethylene glycol ) Surface Coated Magnetic Particles". In: (2005), pp. 1494–1498.
- [110] Biana Godin et al. "Tailoring the degradation kinetics of mesoporous silicon structures through PEGylation." In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 94.4 (set. 2010), pp. 1236–43. ISSN: 1552-4965.
- [111] Y S Lin e V Hlady. "Colloids and surfaces". In: *Colloids and Surfaces* 3 (1994), pp. 49–62.
- [112] Lingyuan Wang et al. "Study on Preparation and Properties of Poly(ethylene glycol)-Modified Nano-SiO<sub>2</sub>". In: *Journal of Scientific Conference Proceedings* 1.2 (giu. 2009), pp. 268–271. ISSN: 19376456.
- [113] Chia-Hung Lee, Tien-Sung Lin e Chung-Yuan Mou. "Mesoporous materials for encapsulating enzymes". In: *Nano Today* 4.2 (apr. 2009), pp. 165–179. ISSN: 17480132.
- [114] Hao Xu et al. "Room-temperature preparation and characterization of poly (ethylene glycol)-coated silica nanoparticles for biomedical applications." In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 66.4 (set. 2003), pp. 870–9. ISSN: 1549-3296.
- [115] Philippe Lesot et al. "Structural–dynamical relationship in silica PEG hybrid gels". In: *Journal of Materials Chemistry* 8.1 (1998), pp. 147–151. ISSN: 09599428.
- [116] N a Alcantar, E S Aydil e J N Israelachvili. "Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces." In: *Journal of biomedical materials research* 51.3 (set. 2000), pp. 343–51. ISSN: 0021-9304.
- [117] Chul Oh et al. "Facile synthesis of PEG–silica hybrid particles using one-step sol–gel reaction in aqueous solution". In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 349.1-3 (ott. 2009), pp. 145–150. ISSN: 09277757.
- [118] Mathieu Laurencin et al. "Interactions between giant unilamellar vesicles and charged core-shell magnetic nanoparticles." In: *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 26.20 (ott. 2010), pp. 16025–30. ISSN: 1520-5827.
- [119] F. X. Webster R. M. Silverstein. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley& Son, Inc. 6th Edition. 1997.
- [120] Julio de Paula Peter Atkins. *ATKINS' PHYSICAL CHEMISTRY*. A cura di W. H. Freeman e Company. Eighth Edition. Oxford University Press, 2006.
- [121] J. M. Hollas. *Modern Spectroscopy*. A cura di Wiley. 4a ed., 2004.
- [122] Robert Pecora Bruce J. Berne. *DYNAMIC LIGHT SCATTERING: APPLICATIONS TO CHEMISTRY, BIOLOGY, AND PHYSICS*. A cura di JOHN WILEY & SONS. WILEY-INTERSCIENCE PUBLICATION.
- [123] *Zetasizer  $\mu$ V User Manual*. Malvern Instruments. 2008.