



Scuola di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica Curriculum <mark>Scienze chimiche</mark>

# Nanocarriers a base di complessi di ioni rame Copper nanocarriers

Relatore Debora Berti

Correlatore Barbara Lonetti

Candidato Manuel Salvi

# INDICE

| 1. INTR                | ODUZIONE   | pag. 3  |  |  |  |
|------------------------|--|---------|--|--|--|
| 1.1. Ba                | ackground  | pag. 3  |  |  |  |
| 1.2. Problem statement |  |         |  |  |  |
| 1.3. St                | ato dell' arte   | pag. 8  |  |  |  |
| 2. <b>MET</b> (        | DDI E MATERIALI  | pag. 17 |  |  |  |
| 2.1. Ca                | ampioni  | pag. 17 |  |  |  |
| 2.2. M                 | etodi  | pag. 21 |  |  |  |
| 3. <b>RISUL</b>        | TATI   | pag. 22 |  |  |  |
| 3.1                    | Cu <sup>2+</sup> +PEI                                  | pag. 22 |  |  |  |
| 3.2                    | PICM (Cu <sup>2+</sup> +PEI+PEO-PAA)                   | pag. 28 |  |  |  |
| 3.3                    | DLS  | pag. 32 |  |  |  |
| 3.4                    | Sistemi ternari (PEI+PEO-PAA)                          | pag. 36 |  |  |  |
| 3.5                    | Misure a light scattering statico a diverse diluizioni | pag. 39 |  |  |  |
| 3.6                    | DLS multiangolo  | pag. 45 |  |  |  |
| 4. DISCUSSIONE         |  | pag. 55 |  |  |  |
| 5. CONC                | CLUSIONI   | pag. 57 |  |  |  |

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Background

### MORBO DI ALZHEIMER

Il morbo di Alzheimer (Alzheimer's disease: AD) è una patologia

neurodegenerativa, progressiva e irreversibile che colpisce il cervello. È la forma più comune di demenza invalidante, intesa come perdita progressiva delle funzioni cognitive, manifestandosi in età presenile. Circa il 60-70% dei casi di demenza sono dovuti al morbo di Alzheimer e circa il 5% della popolazione sopra i 60 anni ne è affetta.

Le ricerche indicano che le caratteristiche principali della patologia sono le placche amiloidi e gli ammassi neurofibrillari nel cervello. Attualmente non esistono trattamenti specifici in grado di arrestare il decorso della malattia né farmaci che scientificamente ne diminuiscano il rischio.

Inoltre, per una diagnosi definitiva, è necessaria la biopsia del tessuto cerebrale, possibile solo dopo il decesso del paziente.

Quello che viene diagnosticato all'individuo in vita, quindi, è la probabilità di esserne affetto, basata sulla progressione della malattia, test cognitivi ed esami del sangue.

La sua ampia e crescente diffusione nella popolazione, unita alla mancanza di terapie efficaci e all'enorme quantità di risorse necessarie alla gestione la portano a essere una delle malattie a più grave impatto socio-economico del mondo<sup>1</sup>.



#### Figura 1

Morfologia e patogenesi:

Uno degli effetti evidenti a livello macrosopico del morbo di Alzheimer è un grado variabile di atrofia corticale, causata da un'ingrandimento dei solchi parietali. Questo causa un ingrossamento delle cavità ventricolari.

Le strutture del lobo temporale mediale, tra cui l'ipppocampo, la corteccia entorinale e l'amigdala vengono atrofizzate in modo significativo.

Le basi della diagnosi istologica sono rappresentate da alterazioni microscopiche: le placche senili extracellulari, costituite principalmente dal peptide  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), e ammassi neurofibrillari intracellulari, accompagnati da un sostanziale perdita neuronale.

Il peptide A $\beta$  deriva da un taglio del precursore della proteina amiloide (APP), da parte della  $\alpha$ -secretasi seguito da un taglio da parte della  $\beta$ -secretasi. I più noti

frammenti sono l' A $\beta$ 40 e l' A $\beta$ 42, quest'ultimo con una maggore capacità a formare fibrille amiloidi, che si depositano successivamente nel cervello.

L'altre alterazioni microscopiche sono gli ammassi neurofibrillari, essenzialmente costituiti dalla proteina  $\tau$  fosforilata. I frammenti di A $\beta$  sono dei componenti significativi nello sviluppo del morbo di Alzheimer



Figura 2: ammassi neurofibrillari e placche amiloidi

## IL RUOLO DEL RAME NELL'ALZHEIMER

Un ruolo molto importante nella malattia dell' Alzheimer appartiene anche al rame. Il rame (Cu) è un elemento essenziale, necessario per la buona riuscita di molte funzioni biologiche e la sua concentrazione è molto determinante.

É cofattore di vari metalloenzimi ed é implicato nelle malattie neurodegenerative con disturbi dell'omeostasi del Cu (come nell' Alzheimer).

#### I DUE STUDI

Uno studio, pubblicato sulla rivista Proceedings of National Academy of Sciences (PNAS)<sup>2</sup>, è stato effettuato su modello animale e su cellule cerebrali umane ed ha permesso di osservare gli effetti del rame sul cervello di un gruppo di topi che sono stati alimentati con acqua contenente questo elemento.

Il rame è presente nel cibo e negli integratori alimentari e, una delle più comuni fonti di assunzione di questo elemento è l' acqua, a causa dell'uso di tubi prodotti con questo metallo.

I ricercatori dell'Università di Rochester Medical Center (URMC) hanno fatto bere per tre mesi l'acqua contenente il rame ai topi e hanno scoperto che il metallo si era diffuso attraverso il sangue e si era accumulato nei vasi che alimentano il cervello.

Inoltre il rame aveva interrotto la funzione di LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1) attraverso un processo di ossidazione, inibendo la rimozione di beta-amiloide.

Quest' ultima, nel tessuto cerebrale, viene portata all'interno dei vasi sanguigni e successivamente smaltita grazie all' azione dell' LRP1 che si trova nei capillari.

Modificando questo processo si va incontro, quindi, all' accumulo di beta-amiolide e alla formazone di placche nel sistema nervoso.

Ciò che ha fatto preoccupare è che la quantità di rame presente nell'acqua somministrata ai topi era equivalente a quella che un normale cittadino può assumere in una dieta<sup>2</sup>.

In contrapposizione ai risultati ottenuti dagli studi americani<sup>2</sup> ci sono quelli condotti dall'università inglese di Keele, pubblicati a Febbraio su Nature<sup>3</sup>.

Secondo questo studio una riduzione del livello di rame nel cervello favorirebbe l'accumulo di beta-amiloide formando le placche senili. Sono stati analizzati 60 cervelli di pazienti deceduti malati di Alzheimer trovando, in tutti, livelli di rame inferiori rispetto a quelli presenti in soggetti sani<sup>3</sup>.

1.2. Problem statement

## TRASPORTO DEL RAME CON SISTEMI DI NANOCARRIERS ATTRAVERSO LA BARRIERA EMATO-ENCEFALICA.

Per contrastare lo squilibrio di rame una soluzione terapeutica che viene esplorata è la possibilità di trasportare ioni Cu al cervello. A questo scopo, è di prima importanza lo sviluppo di nanocarriers efficaci che siano capaci di veicolare elevate quantità di ioni Cu attraverso la membrana emato-encefalica (BBB: Blood-Brain Barrier) e che siano in grado di rilasciarli in determinate condizioni fisiologiche. In questo contesto, i dendrimeri sono potenzialmente interessanti per la complessazione di ioni metallici grazie alla loro struttura.

Un dendrimero è un polimero dotato di una caratteristica struttura ramificata ad



**Figura 3:** crescita delle generazioni di un dendrimero partendo da un nucleo (riprodotta da referenza 5)

albero. Presenta un nucleo centrale (composto da un atomo o piccolo gruppo di atomi) da cui si sviluppano dei frammenti monomerici, che a loro volta danno vita a delle ramificazione nelle 3 dimensioni, sviluppando una forma complessivamente sferoidale. Può essere visto come formato da 3 parti: in nucleo, il

guscio interno e la superficie (come mostrato in figura 3). La loro dimensione

lineare varia da 1 a 100 nm<sup>4</sup>.

Fino ad ora non sono numerosi gli studi per valutare in modo accurato il loro potenziale come nanovettori per le malattie neurodegenerative.

Nel paragrafo successivo sono descritti gli studi principali.

# 1.3. Stato dell' arte

Nanotrasportatori:

Fehse e collaboratori<sup>5</sup> hanno studiato due tipi di nanocarriers (Figura 4) a base di dendrimeri che si differenziano per le loro proprietà chimiche e di stablizzazione del rame. Le proprietà di incapsulazione e rilascio del Cu in funzione del pH dei due nanocarriers sono state analizzate.

Le "core-multishell nanoparticles" (CMS-NP) sono rappresentate in figura 4a, sono composte da un cuore dendritico di poli(etilenimmina) (PEI), con massa molecolare di 5 kDa, da blocchi lineari anfifilici composti da C18-diacidi alchilici che costituiscono il primo shell, che è circondato da un secondo shell composto da monometil polietilenglicolo (mPEG).

La Fig. 4b mostra la struttura delle nanoparticelle "core-single shell" (CS-NP) che sono composte da un nucleo di dPG (poliglicerolo dendritico) con massa molecolare uguale a 10 kDa, e da una singola shell di trimetiletilene diammina (TMEDA).

Poiché le ammine possono essere tossiche in alte concentrazioni, é stato scelto un nucleo di dPG, non tossico, in modo da aumentare la biocompatibilità dei nanocarrier.

Vista la loro strutura chimica le CMS-NP hanno una tossicità più elevata delle CS-NP come mostra la figura 5 dove è riportata la dipendenza della vitalità di SH-SY5Y (una linea cellulare umana usata nella ricerca scientifica come modello per le funzioni neuronali) dalla concentrazione di rame nei due diversi nanocarriers.



Figura4: CS-NP e CMS-NP (riprodotta da referenza 6)

La complessazione del Cu da parte dei nanocarriers è valutata con uno studio spettroscopico basato sulla diversa assorbanza del rame quando passa da ione in  $[Cu(H_2o)_6]^{2+}$  a ione con gruppi complessanti soluzione come come la polietilenimmina la TMEDA. Risulta che entrambi i tipi di 0 nanocarriers complessano il  $Cu^{2+}$ , in particolare 40 e 60 ioni ognuno nel caso, rispettivamente, del CMS-NP e CS-NP<sup>5</sup>.



**Figura 5**: vitalità di SH-SY5Y in funzione della concentrazione di ioni Cu<sup>2+</sup> nei nanocarriers (riprodotta da referenza 6)

Per quanto riguarda il rilascio intracellulare di Cu in funzione del pH, come vediamo in figura 6, le CS-NP mostrano un rilascio di Cu graduale con la variazione di pH, mentre la risposta del CMS-NP è abbastanza costante nell'intervallo di pH di interesse e il rilascio avviene a dei valori di pH troppo bassi. Questi risulatati possono essere spiegati in base alla diversa struttura chimica dei due nanocarriers : se le CMS-NP complessano il rame nel nucleo di poli(etilenimmina) e sono meno

accessibili, le CS-NP stabilizzano gli ioni di rame nella shell di TMEDA (figura 3) più accessibile.

Per le stesse ragioni il rilascio del Cu è più ostacolato nel caso del CMS-NP.

Per esempio i CS-NP si rivelano più adatti ad essere impiegati per il trattamento dei disordini del Cu nell'ambito di AD poiché, essendo meno tossiche, possono essere usate in maggiori concentrazioni e quindi rilasciare maggior quantità di Cu rispetto alle CMS-NPs. Inoltre il Cu complessato nella shell è più accessibile per processi intracellulari<sup>5</sup>.



**Figura 6**: rilascio intracellulare di Cu<sup>2+</sup> in funzione del pH (riprodotta da referenza 6)





Figura 7: PEI di 2<sup>a</sup> generazione (riprodotta da referenza 7)

In questo lavoro di tesi ho utilizzato dei nanocarriers basati su interazioni elettrostatiche, le "Poly Ion Complex Micelles" (PICM). Le PICM sono costituite da Cu<sup>2+</sup>, PEI di 3<sup>a</sup> generazione e copolimero PEO-PAA (figura 8).

Il PEO-PAA usato nel mio studio aveva un peso molecolare di 7000-3000 Da (rispettivamente PEO e PAA).



Figura 8: PEO-PAA (polietilene ossido-acido poliacrilico)

Il PEI é stato sintetizzato nel laboratorio del Prof. Bianchi che ha studiato la complessazione di diversi ioni metallici da parte del PEI di seconda generazione<sup>4</sup>.



Figura 9: Pei di 3ª generazione (riprodotta da referenza 5)

La complessazione di questi dendrimeri dipende dal loro grado di protonazione, e quindi dal pH.

Il dendrimero L contiene 6 gruppi amminici primari e 4 tenziari che possono essere coinvolti nell'equilibrio di protonazione.

Nell'intervallo di pH usato nel test (2,5-11), però, solo 8 di questi gruppi subiscono protonazione<sup>4</sup>.

Table 1. Protonation Constants of L in 0.10 M Me<sub>4</sub>NCl at 298.1  $\pm$  0.1 K

|                                     | log K          | $\Delta H^{\circ}$ (kJ/mol) | $T\Delta S^{\circ}$ (kJ/mol) |
|-------------------------------------|----------------|-----------------------------|------------------------------|
| $L + H^+ = HL^+$                    | $10.16(2)^{a}$ | -52.4(3)                    | 5.6(3)                       |
| $HL^+ + H^+ = H_2 L^{2+}$           | 9.98(1)        | -46.2(3)                    | 10.7(3)                      |
| $H_2L^{2+} + H^+ = H_3L^{3+}$       | 9.25(3)        | -50.9(5)                    | 1.9(5)                       |
| $H_{3}L^{3+} + H^{+} = H_{4}L^{4+}$ | 9.22(2)        | -52.8(3)                    | -0.2(3)                      |
| $H_4L^{4+} + H^+ = H_5L^{5+}$       | 8.57(2)        | -52.7(2)                    | -3.8(2)                      |
| $H_5L^{5+} + H^+ = H_6L^{6+}$       | 8.32(1)        | -53.6(2)                    | -6.1(2)                      |
| $H_6 L^{6+} + H^+ = H_7 L^{7+}$     | 5.69(2)        | -37.5(2)                    | -5.0(2)                      |
| $H_7 L^{7+} + H^+ = H_8 L^{8+}$     | 2.60(2)        | -23.5(4)                    | -8.7(4)                      |

<sup>*a*</sup>Values in parentheses are the standard deviations on the last significant figures.

(riprodotta da referenza 5)

In particolare l'interazione di L con Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> dà complessi stabili con diverse stechiometrie metalli/leganti: 1:1 (con tutti i metalli), 2:1 (Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>), 3:2 (Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>), e 3:1 (Cu<sup>2+</sup>)<sup>4</sup>.

In figura 9 vediamo una rappresentazione schematica degli ambienti di coordinazione suggeriti per i complessi formati da L in soluzione.

L' andamento del sistema Cu<sup>2+</sup>/L a vari valori di pH è mostrato negli spettri di assorbimento in figura 10.



Figura 10: varie tipologie di complessazione M-L (riprodotta da referenza 5)



**Figura 11**: spettri UV di soluzioni con [L]=2[Cu<sup>2+</sup>] a diversi pH (riprodotta da referenza 5)

*,*~

Sono inoltre stati fatti degli studi sull'interazione di L con  $(NO_3)^-$ ,  $(SO_4)^{2-}$ ,  $(SeO_4)^{2-}$  e  $(PO_4)^{3-}$  in assenza e presenza di Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup>.

In questo lavoro di tesi sono stati studiati i complessi formati da PEI e PEO-PAA in assenza e in presenza di  $Cu^{2+}$ , a due diversi pH: 7,4 e 4,5.

Il primo è il pH fisiologico mentre il secondo è il pH presente nei comparti lisosomiali, dove i nanocarrier sono localizzati dopo internalizzazione per endocitosi.

Lo scopo era studiare le potenzialità delle PICM in quanto trasportatori di Cu<sup>2+</sup> e vedere la capacità di rilascio del metallo nelle condizioni di pH voluto.

# 2. MATERIALI E METODI

# 2.1. Campioni

Nello studio ci siamo concentrati sulla preparazione di PICM (polyion complex micelles) con Cu<sup>2+</sup>, PEI (di 3<sup>a</sup> generazione) e il copolimero PEO-PAA. Per studiare le nanoparticelle sono state analizzate più serie di campioni preparati in modo e concentrazioni differenti, per ampliare il più possibile i casi d'indagine e avere un maggior mumero di risultati sperimentali, da cui dedurre delle conclusioni. In figura 1 sono mostrati tutti i campioni preparati che sono stati poi analizzati con differenti strumenti.







<u>PEI=2  $Cu^{2+}$  +PAA</u>

| [PAA]=0                      | [PAA]=0                      |
|------------------------------|------------------------------|
| [PAA]=0,25[NH <sub>2</sub> ] | [PAA]=0,25[NH <sub>2</sub> ] |
| [PAA]=0,5[NH <sub>2</sub> ]  | [PAA]=0,5[NH <sub>2</sub> ]  |
| [PAA]=0,75[NH <sub>2</sub> ] | [PAA]=0,75[NH <sub>2</sub> ] |
| $[PAA]=1[NH_2]$              | $[PAA]=1[NH_2]$              |

<u>PEI+PAA</u> ([PEI]=1,58 mM)



Gli ultimi campioni delle serie precedenti sono stati diluiti:

Diluizioni:





Figura 1

Di seguito riportiamo i volumi utilizzati in questi studi.

Si specifica che le soluzioni sono state preparate per pesata , approssimando la densità  $\rho$  a quella dell' acuqua: 1 g/cm<sup>3</sup>.

| [PEI] sol. Madre               | 0,0240 | М |
|--------------------------------|--------|---|
| [Cu <sup>2+</sup> ] sol. Madre | 0,03   | М |
| V celletta                     | 0,0005 | L |

| mol PEI  | [PEI]    | μL PEI | μL H <sub>2</sub> O |
|----------|----------|--------|---------------------|
| 1,67E-07 | 3,33E-04 | 6,95   | 476,38              |
| 2,50E-07 | 5,00E-04 | 10,43  | 472,90              |
| 5,00E-07 | 1,00E-03 | 20,86  | 462,47              |
| 1,00E-06 | 2,00E-03 | 41,72  | 441,61              |
| 1,50E-06 | 3,00E-03 | 62,59  | 420,75              |
| 0        | 0        | 0,00   | 483,33              |

**Tabella 1**: campioni Cu<sup>2+</sup>+PEI a pH=7,4 e 4,5 [Cu<sup>2+</sup>]cell.=1mM;mol Cu<sup>2+</sup>=5\*10<sup>-7</sup>;µl Cu<sup>2+</sup>=16,67

|                 |          | _   |
|-----------------|----------|-----|
| [PAA] sol.madre | 0,021    | м   |
| [Cu2+] celletta | 7,90E-04 | Μ   |
| [PEI] celletta  | 1,58E-03 | Μ   |
| [NH2] celletta  | 1,90E-02 | Μ   |
| molPEI          | 7,90E-07 | mol |
| mol NH2         | 9,5E-06  | mol |
| v celletta      | 0,0005   | L   |

| µL PAA | [PAA]   | mol PAA  | μL H2O |      |
|--------|---------|----------|--------|------|
| 0      | 0       | 0        | 453,87 | 0%   |
| 112,86 | 0,00474 | 2,37E-06 | 341,01 | 25%  |
| 225,71 | 0,00948 | 4,74E-06 | 228,16 | 50%  |
| 338,57 | 0,01422 | 7,11E-06 | 115,30 | 75%  |
| 451,43 | 0,01896 | 9,48E-06 | 2,44   | 100% |

**Tabella 2**: campioni Cu<sup>2+</sup>+PEI+PAA a pH=7,4 e 4,5. μl Cu<sup>2+</sup>=13,67; μl PEI=32,96

| [PAA] sol.madre | 0,021    | M   |
|-----------------|----------|-----|
| [PEI] celletta  | 1,58E-03 | M   |
| [NH2] celletta  | 1,90E-02 | M   |
| molPEI          | 7,90E-07 | mol |
| mol NH2         | 9,5E-06  | mol |
| vcelletta       | 0,0005   | L   |

| µL PAA | [PAA]   | mol PAA  | μL H2O |
|--------|---------|----------|--------|
| 0      | 0       | 0        | 467,04 |
| 112,86 | 0,00474 | 2,37E-06 | 354,18 |
| 225,71 | 0,00948 | 4,74E-06 | 241,32 |
| 338,57 | 0,01422 | 7,11E-06 | 128,47 |
| 451,43 | 0,01896 | 9,48E-06 | 15,61  |

**Tabella 3**: campioni PEI+PAA a pH=7,4 e 4,5. μl PEI=32,96

## 2.2. Metodi

Le strumentazioni e tecniche di analisi utilizzate sono state principalmente due: spettroscopia UV/Vis e DLS (Dynamic Light Scattering).

# Spettroscopia UV/Vis:

La spettroscopia UV/Vis è una tecnica spettroscopica di assorbimento molecolare, in particolare si basa sull' assorbimento di radiazioni elettromagnetiche monocromatiche del campo del visibile e dell' UV da parte di molecole.

Questa tecnica ci permette di fare analisi sia quantitative che qualitative e, inoltre, anche studi cinetici.

Lo strumento usato nei miei studi era uno spettrofotometro con un range di lunghezze d' onda ( $\lambda$ ) che andava dai 250 nm a 1400 nm circa.

Personalmente ho sfruttato, per quasi la totalità degli esperimenti, l'intervallo di  $\lambda$  tra 350-850nm.

L'assorbimento di luce da parte del campione viene definito dall' assorbanza (A), una grandezza che si calcola nel modo seguente:  $A=\log (I/I_0)=\log (1/T)$ dove T è la trasmittanza.

L' assorbanza può essere calcolata anche con la "legge di Lambert-Beer":  $A = \varepsilon^* l^* C$ 

dove " $\varepsilon$ " è il coefficiente di assorbimento molare, "l" è il cammino ottico e "C" è la concentrazione della soluzione.



segnale e registratore

#### DLS (Dynamic Light Scattering):

La spettroscopia DLS (diffusione dinamica della luce), o spettroscopia a correlazione di fotoni, è una tecnica utilizzata per determinare il profilo della distribuzione di piccole particelle in sospensione o polimeri in soluzione.

Le particelle in soluzione, una volta colpite dalla luce, disperdono la radiazione in tutte le direzioni (dispersione di Rayleigh).

L'intensità di dispersione fluttua in relazione al tempo, a causa del moto browniano a cui le particelle sono sottoposte.

Le informazioni dinamiche delle particelle vengono ricavate da un' autocorrelazione della traccia di intensità registrata.

*Un parametro molto importante, oltre alla funzione di autocorrelazione, è il "vettore d' onda" (q):* 

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Per la trattazione dei dati ci sono due metodi: "cumulante" o "contin".

#### 3. RISULTATI

3.1 PEI+Cu<sup>2+</sup>

La prima serie di campioni preparata era composta da soluzioni di  $Cu^{2+}$  e PEI in H<sub>2</sub>O.

Erano caratterizzate da precise concentrazioni delle sostanze: mantenendo  $[Cu^{2+}] = 1 \text{mM}$  si è variato il [PEI] in modo che il rapporto [PEI]/[Cu<sup>2+</sup>] fosse 0, 1/3,

1⁄2, 1, 2, 3.

Si parte da una soluzione madre di CuCl<sub>2</sub> 0,03 M e da una di PEI 0,024M.

Come riportato in tabella 1 sono stati prelevati volumi variabili di soluzioni madre.

Il volume finale di tutti i campioni è 500 μL, anche per un motivo di scarsa disponibilità delle soluzioni madri (soprattutto di PEI).

Tutte le serie di campioni usate in questo studio sono state preparate a due diversi pH: 7,4 e 4,5, in modo da vedere il comportamento di questi nanocarriers a diverse condizioni di acidità.

La tecnica di analisi utilizzata per questi primi studi è stata la spettroscopia UV/Vis.



**Figura 1**: spettri di assorbimento UV/Vis di Cu<sup>2+</sup> con diverse [PEI] a pH=7,4. [Cu<sup>2+</sup>]=1 mM; [PEI]/[Cu<sup>2+</sup>]=n



**Figura 2**:  $\lambda$  (Abs max) vs [PEI]/[Cu<sup>2+</sup>] a pH=7,4

La figura 1 mostra lo spettro Uv/Vis della prima serie di campioni a pH=7,4.

Notiamo un blue shift dei massimi di assorbimento, quindi una diminuzione di lunghezze d' onda.

Questo andamento possiamo vederlo in figura 2, dove viene mostrata la variazionedella lunghezza d' onda ( $\lambda$ ) relativa al massimo del picco in relazione alla concentrazione di PEI presente in soluzione.

Altri studi effettuati<sup>4</sup> mostrano come diverse complessazioni, ovvero diversi rapporti tra legante e metallo, portano a spettri leggermente diversi.

In particolare uno studio pubblicato in un articolo di Inorganic Chemistry<sup>4</sup> mette a confronto soluzioni di  $Cu^{2+}$  e legante, in un rapporto [L]=2[ $Cu^{2+}$ ], a diverso pH.

Quello che viene evidenziato è il tipo di complesso che si forma in quelle condizioni: stechiometria 1:1, ogni Cu<sup>2+</sup> si lega a una molecola di PEI.

Questo complesso ha una geometria piramidale a base quadrata e il suo assorbimento cade intorno a 666 nm<sup>4</sup>.

Tuttavia a basse concentrazione di legante, quindi ad alti rapporti [Cu<sup>2+</sup>]/[PEI], si formano complessi con differente stechiometria, in particolare M<sub>2</sub>L, con geometria bipiramidale trigonale.

Gli assorbimenti di questi complessi cadono nella regione fra 780-950 nm.

Ciò che vediamo negli spettri in figura 1 è la dimostrazione della presenza in soluzione di due diversi complessi.

Nei primi campioni, quindi a basse concentrazioni di PEI, il metallo si trova in eccesso rispetto al legante formando anche complessi M<sub>2</sub>L (geometria bipiramidale trigonale), oltre a quelli con stechiometria 1:1.

La presenza dei primi possiamo vederla dalla banda a 750 nm, mentre gli ultimi formano l' altro picco, a 650 nm circa.

All' aumentare di [PEI] nei prossimi campioni cresce la concentrazione di complessi con geometria piramidale a base quadrata (rapporto 1:1), a svantaggio dell' altro complesso. Motivo per cui si attenua la seconda banda a 750 nm circa.

In figura 3 viene mostrato l' andamento del rapporto  $A_{620}/A_{749}$  al variare di n.



Figura 3: rapporto  $A_{620}/A_{749}$  vs n a pH=7,4



**Figura 4**:spettri di assorbimento UV/Vis di Cu<sup>2+</sup> con diverse [PEI]/[Cu<sup>2+</sup>] a pH=4,5. [Cu<sup>2+</sup>]=1 mM; [PEI]/[Cu<sup>2+</sup>]=n



**Figura 5**: λ (Abs max) vs [PEI]/[Cu<sup>2+</sup>] a pH=4,5

Nello spettro di assorbimento degli stessi campioni a pH=4,5 (figura 4) possiamo

notare lo stesso trend.

In questo caso il massimo di assorbimento lo abbiamo nel campione n=2, ovvero dove [PEI]=2[Cu<sup>2+</sup>].

Anche a pH=4,5 si osserva un blue shift.

Anche in questo caso possiamo notare la presenza dei due diversi complessi, anche se in modo minore rispetto agli spettri in figura 1.

A pH=4,5 i gruppi amminici sono maggiormente protonati, diminuendo la tendenza a formare complessi  $M_2L$ , responsabili della banda a 750 nm; a questo pH notiamo molto meno la banda a maggiore  $\lambda$  a causa della rilevanza di complessi con stechiometria 1:1.

Inoltre la diminuzione del pH viene accompagnata anche da uno spostamento dei picchi a lunghezze d' onda minori di pH=7,4.

Confrontando le curve di due stessi campioni (in particolare [PEI]=2[Cu<sup>2+</sup>]) ma a pH differente (figura 7) possiamo notare quanto detto sopra.



Figura 6: rapporto  $A_{620}/A_{749}$  vs n a pH=4,5



**Figura 7**: Cu<sup>2+</sup> e [PEI] a diversi pH. [Cu<sup>2+</sup>]=1 mM; [PEI]/[Cu<sup>2+</sup>]=2

3.2 PICM ( $Cu^{2+}$ , PEI, PEO-PAA)

Nella seconda serie di campioni è stato aggiunto il copolimero, il PEO-PAA (polietilene ossido-acido poliacrilico), la shell più esterna del nanocarrier.

La particolarità del copolimero è il modo con cui si lega al resto della nanoparticella: forma interazioni elettrostatiche con i gruppi amminici del PEI.

La concentrazione di PEO-PAA nei vari campioni è stata scelta in modo che fosse 0-25-50-75-100% rispetto a [NH<sub>2</sub>], ovvero ai gruppi amminici del PEI (questo perchè, teoricamente, variasse in modo graduale il numero di gruppi amminici occupati dal PAA). Quindi in questa serie di campioni abbiamo variato [PAA], mentre [Cu<sup>2+</sup>]=0,79 mM e [PEI]=1,58 mM.

Il PEI utilizzato in questi campioni ha 12 gruppi amminici, perciò [NH<sub>2</sub>]=[PEI]\*12=18,96 mM.

Anche in questo caso sono state preparate due serie di campioni: una a pH=7,4 e

l' altra a pH=4,5, per un totale di 10 campioni.

Le tecniche di analisi utilizzate in questo caso sono la spettroscopia UV/Vis e DLS.



**Figura 8**: spettri di assorbimento UV/Vis di PAA a diverse concentrazioni a pH=7,4. [Cu<sup>2+</sup>]=0,79 mM; [PEI]=1,58 mM



**Figura 9**: λ (Abs max) vs [PAA]% a pH=7,4

Gli spettri di assorbimento della serie di campioni a pH=7,4 (figura 8) mostrano un trend molto simile a quello descritto nei campioni in assenza di PAA: notiamo un aumento di assorbanza al crescere di [PAA] fino al quarto campione ([PAA]=0,75[NH<sub>2</sub>]) per poi diminuire con l' ultima soluzione.

Al variare di [PAA] non si osserva uno shift del massimo di assorbimento (figura 9). Gli spettri di figura 8 sono stati corretti per il contributo di scattering, dovuto all' assorbimento delle nanoparticelle.

Per trovare quindi le curve che interessavano il nostro studio, quindi quelle fornite dalle nanoparticelle, è stato sottratto alle curve un valore di scattering "s".

Quest' ultimo è stato calcolato come s=ax+b, dove "a" è un numero dell' ordine di  $10^9$  e "x" è l' andamento dello scattering:  $1/\lambda^4$ .

Le curve che risultano da questa sottrazione sono, teoricamente, quelle dipendenti dalle nanoparticelle, quindi dai complessi tra Cu<sup>2+</sup>, PEI e PAA, e non dovute allo scattering.

Anche in queste soluzioni abbiamo la presenza simultanea di due tpologie di complessi, attestata dalle due bande: quella a 750 nm circa (complessi M<sub>2</sub>L, geometria bipiramidale trigonale) e a 650 nm circa (stechiometria 1:1, piramide a base quadrata).

La sottrazione del contributo di scattering non rende affidabile la rappresentazione del rapporto  $A_{620}/A_{749}$  vs n.

La figura 10 mostra invece la serie di campioni a pH=4,5.



**Figura 10**: spettri di assorbimento UV/Vis di PAA a diverse concentrazioni a pH=4,5. [Cu<sup>2+</sup>]=0,79 mM; [PEI]=1,58 mM



**Figura 11**:  $\lambda$  (Abs max) vs [PAA]% a pH=4,5

Inoltre sono molto simili anche i valori di Abs max e i  $\lambda$  (relativi ai picchi massimi) si mantengono, anche in questo caso, costanti.

L' unica differenza con gli spettri in figura 6 è la minore rilevanza della seconda banda (complessi M<sub>2</sub>L), dovuta allo stesso motivo descritto negli spettri con Cu<sup>2+</sup> e PEI a pH=4,5: a questi valori di acidità i gruppi amminici risultano maggiormente protonati diminuendo quindi la loro tendenza a formare complessi con stechiometria 2:1.

#### 3.3 DLS

Oltre alle analisi spettroscopiche all' UV/Vis è stato utilizzato anche il DLS (Dynamic Light Scattering).

Con questo strumento è stato possibile stimare le dimensioni delle nanoparticelle a partire da parametri ricavati dalla funzione di autocorrelazione dell' intensità della luce diffusa.

Si è misurata, a ogni campione, un' intensità media espressa in Kilocount per secondo (kcps), a questa si sottaeva l' intensità di scattering dell' acqua, usata come solvente, che contribuisce (se pur in piccola parte) allo scattering totale.

Il valore ottenuto viene diviso per la differenza tra l' intensità di scattering del toluene e la "dark count", ovvero l' intensità rilevata dal detector quando non c'è il campione (rumore di fondo).

#### I=(CRsample-CRH<sub>2</sub>O)/(CRtol-CRdc)

Tutte le misure sono state effettuate a un angolo di 90°.



**Figura 12**: I vs [PAA]% a pH=7,4. [Cu<sup>2+</sup>]=0,79 mM; [PEI]=1,58 mM



**Figura 13**: I vs [PAA]% a pH=4,5. [Cu<sup>2+</sup>]=0,79 mM; [PEI]=1,58 mM

L' intensità aumenta progressivamente con [PAA]; l' ultimo campione non dà risultati attendibili a causa della saturazione del segnale.

Un' altra relazione da far notare è la dimensione delle nanoparticelle con [PEO-PAA].



**Figura 14**: d (diametro) vs [PAA]% a pH=7,4. [Cu<sup>2+</sup>]=0,79 mM; [PEI]=1,58 mM



C' è una relativa variazione dei diametri cambiando la concentrazione di PAA.

All' aumentare della concentrazione di PAA (che in questo caso riveste il ruolo della shell più esterna) non si ha una crescita nei diametri delle nanoparticelle (dovuta a un' ipotetica sovrapposizione di più shell esterne), ma una formazione (in soluzione) maggiore di nanoparticelle di quelle dimensioni.

In conclusione, quindi, non abbiamo una continua crescita dei nanocarriers già formati in precedenza ma la formazione di nuovi.

| pH=7,4                             |   |      |       |  |  |  |
|------------------------------------|---|------|-------|--|--|--|
| PAA% R <sub>h</sub> Polidispersità |   |      |       |  |  |  |
| 25                                 |   | 96,8 | 0,158 |  |  |  |
| 50                                 |   | 92,9 | 0,150 |  |  |  |
| 75                                 | ) | 87,6 | 0,086 |  |  |  |
| 100                                | ) | 71   | 0,098 |  |  |  |

| pH=4,5 |     |                |      |                |  |  |
|--------|-----|----------------|------|----------------|--|--|
| PAA%   |     | R <sub>h</sub> |      | Polidispersità |  |  |
|        | 25  |                | 63,7 | 0,105          |  |  |
|        | 50  |                | 95   | 0,060          |  |  |
|        | 75  |                | 79   | 0,059          |  |  |
|        | 100 |                | 75,3 | 0,033          |  |  |

**Tabella 1**: R<sub>h</sub> e polidispersità a diverse [PAA] ai due pH.

# 3.4 Sistemi ternari (PEI, PEO-PAA)

Un ulteriore analisi è stata effettuata su campioni contenenti PEI e PEO-PAA, per valutare le possibili interazioni tra i due polimeri in assenza del metallo, ovvero Cu<sup>2+</sup>.

La tecnica di preparazione è uguale alla serie precedente: il [PAA] varia da 0, 25, 50, 75, 100% [NH<sub>2</sub>].

La concentrazione di PEI è 1,58 mM.

Il volume totale della celletta è rimasto invariato per tutte le analisi: 500  $\mu$ L.



Figura 16: I vs [PAA]/[PEI] a pH=7,4. [PEI]=1,58 mM



Figura 17: I vs [PAA]/[PEI] a pH=4,5. [PEI]=1,58 mM

Si nota immediatamente la somiglianza tra il trend dell' intensità in assenza di rame a entrambi i pH (figure 16-17) e quelli in presenza del metallo (figure 12-13). Ciò significa che in questo caso il Cu<sup>2+</sup> non gioca un ruolo fondamentale, almeno nel determinare la struttura del PICM.

In entrambi i pH abbiamo una crescita lineare.



Figura 18: d (diametro) vs [PAA]% a pH=7,4. [PEI]=1,58 mM

Anche in queste misure, dove studiamo la variazione del diametro delle nanoparticelle con la concentrazione di [PAA], non ci sono grossi cambiamenti rispetto agli stessi spettri in presenza di rame (figure 14-15).

Quindi anche da un punto di vista dimensionale il rame non contribuisce molto, possiamo dire che i diametri medi vengono già creati dai due polimeri che rappresentano le shell.

Ovviamente il primo dato, quello appartenente al primo campione ([PAA]=0), ovvero il diametro del complesso del Cu<sup>2+</sup> con il solvente, non è attendibile.



Figura 19: d (diametro) vs [PAA]% a pH=4,5. [PEI]=1,58 mM

| pH=7,4 |      |                |                |   | pH=4,5 |                |                |
|--------|------|----------------|----------------|---|--------|----------------|----------------|
|        | PAA% | R <sub>h</sub> | Polidispersità |   | PAA%   | R <sub>h</sub> | Polidispersità |
|        | 25   | 82             | 0,135          |   | 25     | 102            | 0,111          |
|        | 50   | 87,6           | 0,147          |   | 50     | 91,2           | 0,034          |
|        | 75   | 85,6           | 0,117          |   | 75     | 85,6           | 0,047          |
|        | 100  | 69,2           | 0,107          | 1 | 100    | 81,7           | 0,087          |

Tabella 2: R<sub>h</sub> e polidispersità a diverse [PAA] ai due pH

## 3.5 Misure a light scattering statico a diverse diluizioni

Sono state studiate altre serie di campioni preparate per diluizione da Cu<sup>2+</sup>+PEI+PEO-PAA e PEI+PEO-PAA.

In particolare una soluzione per ogni serie, con [PAA]=[NH<sub>2</sub>], quindi con la

maggior concentrazione di copolimero, per un totale di quattro campioni.

Sono state fatte due diluizioni per ognuno (tranne per il campione a pH=4,5 contenente il rame, che è stato diluito una terza volta), in particolare i campioni finali risultavano, rispettivamente, 5 e 10 volte meno concentrati.

Questo è servito per studiare l'andamento dell'intensità diffusa e delle dimensioni delle nanoparticelle al variare della concentrazione delle stesse.

Non solo per confermare una diminuizione dell' intensità al diminuire della concentrazione, ma anche una possibile interazione con il solvente.



Figura 20: I vs diluizioni a pH=7,4. C<sub>0</sub>: [PAA]=18,96mM; [PEI]=1,58mM



**Figura 21**: I vs diluizioni a pH=7,4. C<sub>0</sub>: [PAA]=18,96mM; [PEI]=1,58mM; [Cu<sup>2+</sup>]=0,79mM



Figura 22: I vs diluizioni a pH=4,5. C<sub>0</sub>: [PAA]=18,96mM; [PEI]=1,58mM



**Figura 23**: CR assoluta vs diluizioni a pH=4,5. C<sub>0</sub>: [PAA]=18,96mM; [PEI]=1,58mM; [Cu<sup>2+</sup>]=0,79mM

Riportando in grafico la variazione dell' intensità di scattering con la diluizione del campione vediamo subito che c'è una diminuizione del segnale con l'aumentare della diluizione.

Questo si può spiegare con il fatto che diminuisce la concentrazione delle nanoparticelle, da cui l' intensità di scattering dipende linearmente.

Abbiamo una saturazione del segnale nell' ultimo campione di ogni serie, notando come l' intensità di scattering dell' ultima soluzione non è 10 volte maggiore a quella del primo campione.

Quello che in ascisse è stato chiamato con " $C_0$ " è concentrazione di tutte le sostanze presenti nel campione prima delle diluizioni.

Quindi C<sub>0</sub>/5 e C<sub>0</sub>/10 sono i campioni con Cu<sup>2+</sup>, PEI e PAA rispettivamente cinque e dieci volte meno concentrati.

Possiamo vedere come, anche in questo caso, i valori di intensità non cambiano molto se passiamo dalle soluzioni in presenza di rame a quelle senza (con stesso pH).

Stesso comportamento l' avevamo già visto nei grafici precedenti .

Questo conferma la poca rilevanza del Cu<sup>2+</sup> nell' intensità di scattering totale.

Altra caratteristica sono i maggior valori di "I" nei campioni a pH=4,5, altro dato che possiamo ritrovare anche nelle curve precedenti.

Possiamo quindi concludere che le diluizioni non alterano le caratteristiche delle nanoparticelle, e non ci sono interazioni rilevanti con il solvente dal far cambiare in modo drastico il valore di "I".



Figura 24: d (diametro) vs diluizioni a pH=7,4. C<sub>0</sub>: [PAA]=18,96mM; [PEI]=1,58mM



**Figura 25**: d (diametro) vs diluizioni a pH=7,4. C<sub>0</sub>: [PAA]=18,96mM; [PEI]=1,58mM; [Cu<sup>2+</sup>]=0,79mM



Figura 26: d (diametro) vs diluizioni a pH=4,5. C<sub>0</sub>: [PAA]=18,96mM; [PEI]=1,58mM



**Figura 27**: d (diametro) vs diluizioni a pH=4,5. C<sub>0</sub>: [PAA]=18,96mM; [PEI]=1,58mM; [Cu<sup>2+</sup>]=0,79mM

Riportando in grafico la variazione delle dimensioni delle nanoparticelle con la diluizione del campione non notiamo cambiamenti significativi dei diametri. Le nanoparticelle in soluzione hanno poca interazione con il solvente, non

risentendo molto, quindi, della diluizione.

# 3.6 DLS multiangolo

L' ultima serie di campioni analizzati è costituita dalle soluzioni più diluite.

In questo caso abbiamo effettuato misure multiangolo al DLS: la funzione di correlazione è raccolta a diversi angoli.

Gli studi fatti fino ad ora sullo scattering sono stati effettuati ad un angolo di 90°, significa che la posizione del detectorè ad angolo retto con la direzione del fascio di luce utiizzato per illuminare il campione (nel nostro caso è prodotto da un laser con  $\lambda$ =532 nm).

Uno studio a diversi angoli può essere utile per raccogliere ulteriori informazioni sulle nanoparticelle che sono in soluzione, tra cui la loro forma.

Quando la radiazione colpisce il nanocarrier, questo diffonde luce in diverse direzioni, ipotizzando il diametro della nanoparticella confrontabile con il  $\lambda$  della radiazione incidente si può dedurre che l' intensità di scattering sarà diversa in base all' angolo da cui la osservo; diversamente, una nanoparticella con d<< $\lambda$  diffonderà la radiazione in maniera costante per tutti gli angoli, questo perchè la luce colpisce sempre supercici identiche.

Sono stati scelti 16 angoli diversi: 15°, 25°, 33°, 45°, 55°, 64°, 72°, 80°, 87°, 95°, 102°, 110°, 118°, 127°, 137°, 150°.

Ai primi 3 angoli (più bassi) il campione scatterava molto e il detector rilevava segnali nell' ordine di 1Mcps (1 Megacouts per secondo = 1000000 counts per secondo).

Quando il segnale rilevato supera 500 Kcps circa, la sensibilità del detector diminuisce molto, per questo, per i primi angoli, è stato usato un filtro (0,9) che attenua il fascio (lasciando passare soltanto il 10% di radiazione).

Per quasi tutti i grafici, però, abbiamo tolto i primi 3 valori, ovvero quelli relativi ai 3 angoli più bassi, per la bassa attendibilità e il relativo discostamento dal trend degli altri punti.



**Figura 28**: CR assoluta vs q a pH=7,4 e 4,5, con e senza rame [PEI]=0,158mM; [PAA]=1,9mM

L' andamento dell' intensità scatterata in funzione di q (nei diversi campioni) lo possiamo vedere in figura 28.

La "I" diminuisce al crescere di q abbastanza costantemente.

Come vediamo dai grafici sono stati tolti i primi 3 valori relativi agli angoli più bassi, a causa del loro eccessivo scostamento dagli altri punti e per questo poco attendibili.

Nel calcolo di "I" abbiamo moltiplicato il segnale dell' acqua per il seno dell' angolo in cui facevo la misura:

I=(CRsample-CRH<sub>2</sub>O\*sinθ)/(CRtol–CRdc)

Nei campioni a pH=4,5 si può notare molto più facilmente come l' assenza di rame corrisponda a maggiori valori di intensità, arrivando fino a essere il doppio rispetto a quanto misurato negli stessi angoli su campioni contenenti Cu<sup>2+</sup>.

L' andamento di "I" è comunque lo stesso in entrambi i pH.

Se mettiamo in grafico  $\Gamma$  con q<sup>2</sup> possiamo ricavare D: il coefficiente di diffusione;

"q" rappresenta il vettore d'onda:

 $q=[(4\pi)/\lambda]*[\sin(\theta/2)]$ 

dimensionalmente è "m<sup>-1</sup>" (se il  $\lambda$  lo esprimo in metri).

 $\mathbf{Q}^2$  ha quindi dimensioni di m<sup>-2</sup>.



**Figura 29**:  $\Gamma$  vs q<sup>2</sup> (e linea di tendenza con equazione) a pH=7,4. [PEI]=0,158mM; [PAA]=1,9mM



**Figura 30**:  $\Gamma$  vs q<sup>2</sup> (e linea di tendenza con equazione) a pH=7,4. [PEI]=0,158mM; [PAA]=1,9mM; [Cu<sup>2+</sup>]=0,079mM



**Figura 31**: Γ vs q<sup>2</sup> (e linea di tendenza con equazione) a pH=4,5. [PEI]=0,158mM; [PAA]=1,9mM



**Figura 32**: Γ vs q<sup>2</sup> (e linea di tendenza con equazione) a pH=4,5. [PEI]=0,158mM; [PAA]=1,9mM; [Cu<sup>2+</sup>]=0,079mM

L' andamento di  $\Gamma$  con q<sup>2</sup> lo possiamo vedere nelle figure 27-28-29-30.

Notiamo una proporzionalità abbastanza lineare; questo è stato possibile anche togliendo i primi tre punti (ad angoli bassi), come possiamo vedere dai grafici, ottenendo così anche un fitting lineare migliore.

La differenza di pH e la presenza di ioni rame non sembra influire sull' andamento di  $\Gamma$ , manifestandosi abbastanza costante in tutte le quattro misure e condizioni.

L' inserimento della linea di tendenza ha permesso di identificare l' equazione della stessa, risalendo così a D.

 $\Gamma = Dq^2$ 

Le pendenze mostrate nell' equazioni sono quindi i coefficienti di diffusione:

-campione a pH=7,4 D=4,10\*10<sup>-12</sup> m<sup>2</sup>\*s<sup>-1</sup>

| -campione a pH=7,4 con Cu <sup>2+</sup> | D=3,88*10 <sup>-12</sup> | $m^{2*}s^{-1}$ |
|---|--------------------------|----------------|
| -campione a pH=4,5                      | D=3,52*10 <sup>-12</sup> | $m^{2*}s^{-1}$ |
| -campione a pH=4,5 con Cu <sup>2+</sup> | D=3,96*10 <sup>-12</sup> | $m^{2*}s^{-1}$ |

Da questi valori possiamo ricavarci altre informazioni, come il raggio idrodinamico, utilizzando la seguente formula:

 $R_i = (K_b * T)/(6\pi \eta D)$ 

Al numeratore c' è il prodotto tra la costante di Boltzmann e la temperatura (in Kelvin), mentre al denominatore c' è il prodotto tra "6p", la viscosità dell' acqua e il coefficiente di diffusione.

Quindi, seguendo i calcoli, le dimensioni medie (raggio) delle nanoparticelle in soluzione nei vari campioni sono:

| -campione a pH=7,4                      | R <sub>h</sub> =60,7 nm  |
|---|--------------------------|
| -campione a pH=7,4 con Cu <sup>2+</sup> | R <sub>h</sub> =62,5 nm  |
| -campione a pH=4,5                      | R <sub>h</sub> =68,9 nm  |
| -campione a pH=4,5 con Cu <sup>2+</sup> | R <sub>h</sub> =61,25 nm |

Un altro studio, che ci permetterà di ottenere altre informazioni in seguito, è mettere in grafico il "ln I" con " $q^2$ ".



**Figura 33**: Ln I vs q<sup>2</sup> (e linea di tendenza con equazione) a pH=7,4. [PEI]=0,158mM; [PAA]=1,9mM



**Figura 34**: Ln I vs q<sup>2</sup> (e linea di tendenza con equazione) a pH=7,4. [PEI]=0,158mM; [PAA]=1,9mM; [Cu<sup>2+</sup>]=0,079mM



**Figura 35**: Ln I vs q<sup>2</sup> (e linea di tendenza con equazione) a pH=4,5. [PEI]=0,158mM; [PAA]=1,9mM



**Figura 36**: Ln I vs q<sup>2</sup> (e linea di tendenza con equazione) a pH=4,5. [PEI]=0,158mM; [PAA]=1,9mM; [Cu<sup>2+</sup>]=0,079mM

L' andamento di "ln I" in relazione a  $q^2$  è abbastanza costante in tutti i quattro campioni.

Per ottenere un fitting lineare migliore, e quindi un' equazione molto più precisa, sono stati eliminati i primi 6 valori, a causa del loro relativo scostamento dal trend generale.

Dall' equazione della retta di andamento, e quindi dalla pendenza, ci possiamo ricavare il raggio di girazione atrraverso la formula:

pendenza=  $-R_g^2/3$ 

I valori che troviamo sono dimensioni delle nanoparticelle "nude", ovvero senza contare eventuali sfere di solvatazione.

Di seguito indicherò direttamente i raggi calcolati delle nanoparticelle nei vari campioni:

| -campione a pH=7,4                      | R <sub>g</sub> =55,8 nm |
|---|-------------------------|
| -campione a pH=7,4 con Cu <sup>2+</sup> | R <sub>g</sub> =57,6 nm |
| -campione a pH=4,5                      | R <sub>g</sub> =65,3 nm |
| -campione a pH=4,5 con Cu <sup>2+</sup> | R <sub>g</sub> =57,6 nm |

#### 4. DISCUSSIONE

Gli spettri UV/Vis relativi all' assorbimento di Cu<sup>2+</sup> al crescere della concentrazione di [PEI] mostrano la presenza di due tipologie di complessi: mononucleari e polinucleari (figura 1 e 4), con geometria, rispettivamente, piramidale a base quadrata e bipiramidale trigonale.

All' aumentare della concentrazione del legante c' è una diminuzione di  $[M_2L]$  a causa della maggior disponibilità PEI, attenuandosi quindi la banda a maggiori  $\lambda$  (750 nm), raggiungendo un minimo nel campione con [PEI] massima (figura 1).

Al contrario, nei primi campioni, con un rapporto [PEI]/[Cu<sup>2+</sup>] basso, notiamo con facilità la presenza di due bande.

A pH=4,5 (figura 4) abbiamo un andamento simile; tuttavia risulta meno evidente la presenza dei complessi polinucleari rispetto all' altro pH a causa della protonazione dei gruppi amminici del PEI.

Questo porta a una minor tendenza a formare complessi  $M_2L$  (a [PEI] basse) in soluzione, risultando più rilevante la banda a minor  $\lambda$ .

Possiamo quindi ipotizzare un rilascio di rame passando da pH=7,4 a 4,5.

In figura 7 vediamo la differente formazione del complesso polinucleare in due campioni a uguale concentrazione di Cu<sup>2+</sup> e PEI ma a differente pH.

Con l'aggiunta del copolimero PEO-PAA (figura 8 e 10) abbiamo sempre i due complessi in soluzione; tuttavia, sembrerebbe abbastanza costante la loro concentrazione nei vari campioni, non mostrando un cambiamento significativo delle bande.

Dagli studi al DLS (a pH=7,4) sono emersi diametri maggiori nei campioni in presenza di  $Cu^{2+}$  (figura 1).

L' aumento delle dimensioni può essere dovuto a un cambio strutturale delle nanoparticelle (o aggregati) nel momento in cui c' è il metallo; risulta molto più rilevante quando [PAA]/[NH<sub>2</sub>]=0,25.



**Figura 1**: d<sub>h</sub> (misurato ad un angolo di 90°) vs [PAA]% a pH=7,4 in presenza e in assenza di Cu<sup>2+</sup>. [PEI]=1,58 mM



**Figura 2**: d<sub>h</sub> (misurato ad un angolo di 90°) vs [PAA]% a pH=4,5 in presenza e in assenza di Cu<sup>2+</sup>. [PEI]=1,58 mM

A pH=4,5 abbiamo un andamento opposto, molto significativo quando

[PAA]/[NH<sub>2</sub>]=0,25: all' aggiunta del metallo c' è una diminuzione dei diametri.

Stesso andamento lo vediamo anche nell' intensità, in figura 28.

La presenza del rame sembrerebbe cambiare strutturalmente le nanoparticelle, potrebbe esserci una rottura parziale degli aggregati.

In tutte le soluzioni abbiamo diametri molto grandi, questo fa pensare a una possibile aggregazione di più nanoparticelle con PEO-PAA a ponte.

## 5. CONCLUSIONI

Negli spettri UV/Vis di Cu<sup>2+</sup> e PEI ci sono chiaramente due bande (quello che vediamo è infatti la convoluzione di quest' ultime), a 650 e 750 nm, riconducibili a due differenti complessi: ML e M<sub>2</sub>L, rispettivamente con geometria quadrata planare e bipiramidale trigolare (come descritto nel paragrafo 3.1). La loro formazione è influenzata dalla concentrazione delle due specie e dal pH.

Al valore più alto di acidità, infatti, si ha la maggioranza del complesso con stechiometria 1:1.

Passando da pH=7,4 a 4,5 c'è un leggero rilascio di rame (i complessi M<sub>2</sub>L, più abbondanti a pH=7,4, si rompono a causa della protonazione dei gruppi amminici del PEI).

Andamento simile c' è anche con l' aggiunta del PAA: in quest' ultimo caso il rapporto fra le concentrazioni dei due complessi sembra rimanere costante.

Nelle soluzioni in assenza di rame (PEI+PEO-PAA) non ci sono significativi comportamenti negli spettri DLS anche al variare del pH.

Si può dedurre, quindi, che PEI e copolimero PAA formino interazioni abbastanza

stabili e fisse, a prescindere dall' acidità dell' ambiente o dalla loro concentrazione.

Tutte le curve che mettono in relazione intensità o diametro delle nanoparticelle con la concentrazione di PAA o pH sono molto simili fra loro.

Unica eccezione (nei diametri) c' è quando aggiungiamo il metallo: a pH=7,4 abbiamo una crescita delle dimensioni mentre a pH=4,5 l' andamento è opposto; in entrambi i casi è comunque significativo soltanto nel secondo campione, con [PAA]/[NH<sub>2</sub>]=0,25.

Si pensa che in soluzione le nanoparticelle si aggreghino fra di loro, con il copolimero PEO-PAA a ponte.

1-www.alzheimer.it

2-I. Singh, A. P. Sagare, "Low levels of copper disrupt brain amyloid-β homeostasis by altering its production and clearance", "Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America", 2013, vol.110, 14771-14776

3-M. Mold, L. Ouro-Gnao, "Copper prevents amyloid-β1–42 from forming amyloid fibrils under near-physiological conditions in vitro", Nature, Scientific Report, 2013, 3, 1256

4-C. Bazzicalupi, A. Bianchi, "Metal Ion Binding by a G-2 Poly(ethylene imine) Dendrimer. Ion-Directed Self-Assembling of Hierarchical Mono- and Two- Dimensional Nanostructured Materials, "Inorganic Chemistry", 2013, 2125-2133-2134

5-Susanne Fehse, Sabrina nowag, "Copper transport Mediated by Nanocarrier System in a Blood-Brain Barrier In VItro Mode", Biomacromolecules, 2014, 1912-1913

6-C. Bazzicalupi, A. Bianchi, "Anion and ion-pair binding by a G-2 poly(ethylene imine) dendrimer", Dalton Transactions, 2013, 12130-12136