

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

**“POLIMERIZZAZIONE RADICALICA A TRASFERIMENTO ATOMICO
BIOCATALIZZATA IN SOLUZIONE E DA SUPERFICIE”**

RELATORE: EDMONDO M. BENETTI

LAUREANDO: MICHELE DANI

Matricola n° 2033714

Anno Accademico 2023/2024

Sommario

1. INTRODUZIONE	3
1.1 POLIMERIZZAZIONI RADICALICHE A TRASFERIMENTO ATOMICO	4
1.2 POLIMERIZZAZIONE RADICALICA CONTROLLATA INIZIATA DALLA SUPERFICIE	5
1.3 L'USO DI ENZIMI COME BIOCATALIZZATORI	6
2. MATERIALI E METODI	6
3. PARTE SPERIMENTALE	7
4. RISULTATI E COMMENTI	11
4.1 ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 3	12
4.2 ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 4	13
4.3 ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 5	15
4.4 ATRP di OEGA catalizzata da Mb a pH 5	17
4.5 CARATTERIZZAZIONE DELL'IDROGEL	24
5. CONCLUSIONI	25
BIBLIOGRAFIA	26

1. INTRODUZIONE

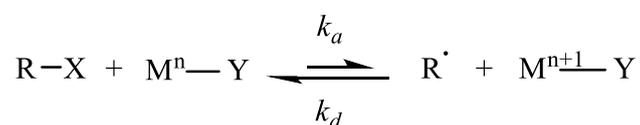
La polimerizzazione radicalica a trasferimento atomico (ATRP) è uno dei metodi di polimerizzazione radicalica controllata più utilizzati poiché permette di ottenere polimeri con peso molecolare noto, stretta distribuzione di pesi molecolari, *i.e.* bassa dispersità (D) e architettura definita. In ATRP vengono impiegati tipicamente complessi di Cu(I) capaci di attivare il legame carbonio-alogeno in un iniziatore o specie dormiente, generando un radicale propagante e un complesso di Cu(II) che disattiva reversibilmente le specie radicaliche. Tale equilibrio tra radicali propaganti e dormienti può però essere regolato anche da proteine con appropriata attività redox, permettendo di condurre ATRP in condizioni più miti e più eco- e citocompatibili. In particolare, l'emoglobina e la mioglobina, proteine del sangue che contengono rispettivamente 4 e 1 gruppo eme, non solo immagazzinano e trasportano l'ossigeno, ma sono anche in grado di mostrare attività ATRPasi tramite la coppia redox Fe(II)/Fe(III). In questo lavoro di tesi, la capacità di emoglobina e mioglobina di agire da biocatalizzatori in ATRP è stata studiata in soluzioni acquose, variando il pH e impiegando diversi monomeri quali acido acrilico, 2-metacrililossietil fosforilcolina e oligo(etilen glicole) metiletere acrilato. Inoltre, le condizioni ottimizzate in soluzione sono state poi impiegate per funzionalizzare un idrogel, utilizzando un approccio di tipo "grafting from" per far crescere delle catene polimeriche direttamente dalla superficie dell'idrogel.

1.1 POLIMERIZZAZIONI RADICALICHE A TRASFERIMENTO ATOMICO

Sin dalla metà degli anni '90, le polimerizzazioni radicaliche controllate sono largamente utilizzate con monomeri come stirene e (meta)acrilati per riuscire a sintetizzare polimeri con peso molecolare noto, stretta distribuzione di pesi molecolari e architettura definita. I polimeri sintetizzati con queste tecniche presentano gruppi funzionali noti al termine delle catene, e perciò possono essere utilizzati per introdurre funzionalità desiderate o per iniziare nuove polimerizzazioni formando copolimeri a blocchi.

Nella polimerizzazione radicalica a trasferimento atomico solitamente viene utilizzato un centro metallico a basso stato di ossidazione, come il Cu(I) o il Fe(II), come catalizzatore. Questo reagisce con un iniziatore, un alogenuro alchilico in cui il legame C-X subisce una rottura riduttiva. In seguito a questo processo di attivazione il centro metallico si trova in uno stato di ossidazione più alto di un'unità, complessato con l'alogeno proveniente dall'iniziatore. Si forma inoltre un radicale organico che, reagendo con i monomeri, propaga la catena.

I radicali vengono generati attraverso un processo reversibile: l'alogeno infatti viene poi trasferito dal catalizzatore alla catena radicalica, interrompendone la crescita e trasformandola in una specie dormiente (schema 1). Questa, infatti, finché l'alogeno è legato alla catena, non andrà a propagarsi, né verrà terminata legandosi ad altre specie radicaliche.



Schema 1: Meccanismo di una generica ATRP

Nell'ATRP tradizionale occorre una quantità considerevole di metallo catalizzatore, perciò successivamente sono state sviluppate diverse tecniche che permettono di diminuirne la quantità necessaria. In particolare, si può aggiungere un eccesso di una specie riducente che rigenera l'attivatore riducendo le specie di Cu(II) che si accumulano a seguito di reazioni di terminazione. Questo sistema, che permette un uso più limitato di catalizzatore ed è pertanto più ecosostenibile e industrialmente applicabile, è detto ARGET ATRP: *Activators ReGenerated by Electron Transfer ATRP*¹.

1.2 POLIMERIZZAZIONE RADICALICA CONTROLLATA INIZIATA DALLA SUPERFICIE

La polimerizzazione radicalica controllata iniziata dalla superficie (SI-CRP) è una tecnica che consente la crescita di polimeri direttamente da una superficie solida o da particelle. Questa metodologia è cruciale per creare strati di polimeri funzionali, modificando in modo controllato le proprietà chimiche, fisiche o biologiche delle superfici.

Durante questo processo, un iniziatore viene legato alla superficie di un materiale, come un metallo o una nanoparticella. Da questo punto i monomeri vengono aggiunti in maniera controllata, spesso con tecniche ATRP o RAFT (Reverse Addition-Fragmentation Chain Transfer), portando alla formazione di polimeri lineari che si estendono dalla superficie stessa (spazzole polimeriche, o *polymer brush*). Questa tecnica è denominata “grafting from”. In alternativa, si possono aggiungere alla superficie opportunamente funzionalizzata direttamente dei polimeri formati in precedenza con tecnica “grafting to” (figura 1).

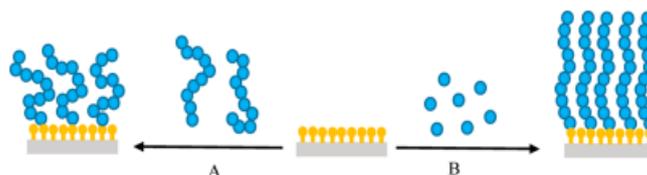


Figura 1: Schematizzazione della tecnica “grafting to” (A) e “grafting from” (B)²

Questo secondo approccio permette un controllo preciso sulla lunghezza della catena e la composizione del polimero. Tuttavia, l’approccio grafting from premette di raggiungere densità di catene aggraffate più elevata. Negli ultimi 20 anni le spazzole polimeriche sono diventate sempre più diffuse, specialmente per applicazioni come le superfici sensibili agli stimoli, superfici anti fouling, stabilizzazione colloidale, regolazione delle proprietà di adesioni e bagnanti. In anni più recenti sono stati fatti progressi significativi nell’applicazione di spazzole polimeriche negli ambiti della catalisi, dell’elettronica, della sintesi di nanomateriali e della biosensoristica. Inoltre, le spazzole polimeriche hanno trovato spazio nella modifica di substrati innovativi, come fibre naturali, nanofibre polimeriche, materiali mesoporosi, grafene, virus e nanoparticelle proteiche^{2,3}.

1.3 L'USO DI ENZIMI COME BIOCATALIZZATORI

L'emoglobina è la componente principale dei globuli rossi nel sangue dei vertebrati. La sua funzione per molti è semplicemente quella di legare e trasportare ossigeno attraverso i suoi quattro gruppi eme. Nel corso degli anni si è scoperto che l'emoglobina è una proteina molto più versatile, in grado per esempio di trasportare altre molecole che non siano l'ossigeno, come CO₂, NO, H₂S o CO.¹

L'emoglobina è anche un enzima redox, con un'attività pseudoperossidasi, in quanto i suoi atomi di ferro possono ciclare tra stati di ossidazione +2, +3 e +4. Non solo catalizza la conversione di diversi perossidi inorganici, ma è stato scoperto che reagisce anche con composti organici bromurici. L'emoglobina può quindi catalizzare la polimerizzazione di monomeri acrilammidi, acrilati e metacrilati tramite un processo di ATRP.¹

Diversamente dai complessi dei metalli di transizione tradizionali, i centri di Ferro sono fortemente legati all'emoglobina stessa, e ciò inibisce il rilascio di Fe in soluzione, andando a minimizzare la possibilità di contaminazione del polimero da metalli pesanti. Questo è anche possibile grazie alla capacità di poter rimuovere l'enzima dopo la polimerizzazione.⁴

2. MATERIALI E METODI

Emoglobina (Sigma Aldrich), Mioglobina (Sigma Aldrich), (+)-L-ascorbato di sodio (Sigma Aldrich), bromuro di sodio (Sigma Aldrich), Acetato di sodio (Merck), acido acetico (Sigma Aldrich), acido tricloroacetico (Sigma Aldrich), 2-idrossietil-2-bromoisobutirato (Sigma Aldrich), cloruro di sodio (Carlo Erba), acido acrilico (Sigma Aldrich), oligo(etilen glicole) metiletero acrilato (Sigma Aldrich), 2-metacrilolilossietil fosforilcolina (Sigma Aldrich), N,N-dimetilformammide (Merck), ossido deuterato (Eurisotop).

Per analizzare i vari campioni sono stati utilizzati un NMR da 200 MHz e uno da 300 MHz di marca *Bruker*. Per analizzare l'idrogel è stato utilizzato uno spettrometro FT-IR di marca *Agilent*.

Per misurare il peso molecolare e la dispersità del polimero è stata usata una GPC (Gel Permeation Chromatography), con una precolonna, e una fase stazionaria D6000M + D3000. La fase eluente è DMF + LiBr, mentre la calibrazione è stata effettuata con PMMA (polimetilmetacrilato). Il flusso in entrata è stato impostato a 1 mL/min.

3. PARTE SPERIMENTALE

I vari monomeri sono commercializzati con un inibitore all'interno del prodotto (MEHQ, *Monomethyl Ether of HydroQuinone*), per evitare che in certe condizioni essi vadano a reagire e polimerizzare. Come prima cosa, quindi, è stato necessario purificare un volume sufficiente di oligo(etilen glicole) metilacrilato (OEGA, massa molare media $M_n \sim 500$). Questo si può fare filtrando il monomero in una siringa contenente uno strato di ossido di alluminio basico e alla cui uscita è stato aggiunto un filtro in politetrafluoroetilene, PTFE, (0,2 μm) per le sostanze organiche.

È stato poi necessario preparare il tampone con acido acetico/acetato di sodio a pH 4. Sono quindi state preparate una soluzione 0,1 M di acetato di sodio e una soluzione 0,1 M di acido acetico, e sono stati mescolati rispettivamente 15 e 85 mL secondo la formula:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

In una fiala è stata preparata una soluzione di L-ascorbato di sodio 2,7 mg/mL, mentre per la soluzione di reazione è stato considerato di usare 9 mL totali, divisi nel seguente modo:

- 1,8 mL di monomero OEGA (20% del volume totale);
- 6 μL di iniziatore HEBIB (2-idrossietil-2-bromoisobutirato) (1/100 di moli rispetto al monomero);
- 9,6 mg di emoglobina (Hb), disciolti in 4,95 mL di tampone;
- 0,1 mL di DMF (N,N-dimetil formammide);
- saranno in seguito aggiunti 2,25 mL della soluzione di L-ascorbato di sodio, al momento dell'inizio della polimerizzazione, utilizzandolo come agente riducente.

Sono stati aggiunti anche 40,2 mg di bromuro di sodio NaBr (10 volte le moli di iniziatore). La sua funzione è formare un equilibrio di attivazione/deattivazione con l'iniziatore bromuro, che altrimenti porterebbe la polimerizzazione a essere troppo veloce e poco controllata.

Il DMF è un composto che all' ^1H NMR mostra un singoletto, corrispondente all'H aldeidico, ben separato dai segnali del monomero e del polimero ($\delta \sim 8$ ppm). Il fatto che esso non reagisca ma che rimanga costante durante tutto il tempo della polimerizzazione ci permette di usare il suo segnale all' ^1H NMR come uno "standard" su cui basarci per comprendere quanto monomero è stato convertito in polimero.

Dopo aver aggiunto un'ancoretta magnetica e aver sigillato il pallone Schlenk, è stato fatto gorgogliare l'argon al suo interno per 30 minuti per rimuovere l'ossigeno presente, che altrimenti andrebbe a terminare la polimerizzazione (figura 2).



Figura 2: Setup con il pallone Schlenk (in basso) e la fiala con ascorbato di sodio (in alto)

Al termine di questo lasso di tempo sono stati aggiunti 2,25 mL di L-ascorbato di sodio ed è stato prelevato circa 1 mL di soluzione. Successivamente è stato prelevato 1 mL di campione ogni due ore fino a sei ore, e uno il giorno successivo, per determinare la cinetica di reazione.

Per preparare il tubo da analizzare all' ^1H NMR sono stati prelevati 50 μL di campione e 600 μL di acqua deuterato D_2O .

Una volta stabilito che c'è conversione, occorre purificare il polimero. Per prima cosa è necessario separarlo dall'acqua, quindi si liofilizza il tutto: con ghiaccio secco e acetone si forma una miscela eterogenea con una temperatura di -78°C . Si immerge il pallone Schlenk per dare modo a tutto di solidificarsi e successivamente si lascia una giornata sottovuoto a -54°C cosicché il ghiaccio evapori direttamente, lasciando nel pallone il polimero.

Successivamente è necessario rimuovere l'emoglobina: occorre ridisciogliere il tutto in cloroformio (in questo caso specifico sono bastati 10 mL, ma è possibile che ne servano di più in base a quanto materiale rimane). In questo modo il polimero organico viene disciolto, mentre l'emoglobina viene denaturata e rimane in sospensione. Successivamente si filtra il tutto con della carta da filtro e si fanno due estrazioni con un imbuto separatore utilizzando un volume di *brine* (una soluzione acquosa satura

di cloruro di sodio NaCl) corrispondente al volume di cloroformio (figura 3), e si raccoglie la fase organica. Per concludere si fa evaporare il solvente organico tramite rotavapor.



Figura 3: Fase di estrazione con brine

Lo stesso procedimento è stato fatto variando il pH (a 3, 5 e 6) e il monomero: è stato utilizzato anche l'acido acrilico (AA) e 2-metacrililossietil fosforilcolina (MPC).

Sono state quindi preparate altre miscele di reazione, tenendo conto che per l'ATRP dell'acido acrilico vengono solitamente impiegati cloruri alchilici come iniziatori⁵ (si è optato per l'acido tricloroacetico), e che MPC è un monomero che a temperatura ambiente è solido.

Per l'ATRP di AA:

- 1,8 mL di AA;
- 43,2 mg di acido tricloroacetico;
- 154,2 mg di NaCl;
- 68,4 mg di Hb, disciolti in 4,95 mL di tampone;
- 0,1 mL di DMF;
- 2,25 mL di L-ascorbato di sodio, con una concentrazione di 18,45 mg/mL.

Per l'ATRP di MPC:

- 412 mg di MPC;
- 3 mg di Hb, disciolti in 2,25 mL di tampone;
- 2 μ L di HEBIB;
- 13,4 mg di NaBr;
- 0,1 mL di DMF;
- 0,75 mL di L-ascorbato di sodio, con una concentrazione di 2,7 mg/mL.

Per quest'ultima soluzione si è scelto di fare un volume totale di 3 mL anziché 9 per non dover usare un'elevata quantità di monomero MPC.

Infine, si è tentata una polimerizzazione ATRP iniziata da superficie e mediate fotochimicamente, SI-photoATRP, un tipo di ATRP dove le catene crescono da una superficie opportunamente funzionalizzata (in questo caso il materiale di supporto è un idrogel), che può avvenire senza necessità di degasare la miscela di reazione e che richiede di irradiare il sistema con luce monocromatica rossa ($\lambda = 630$ nm).

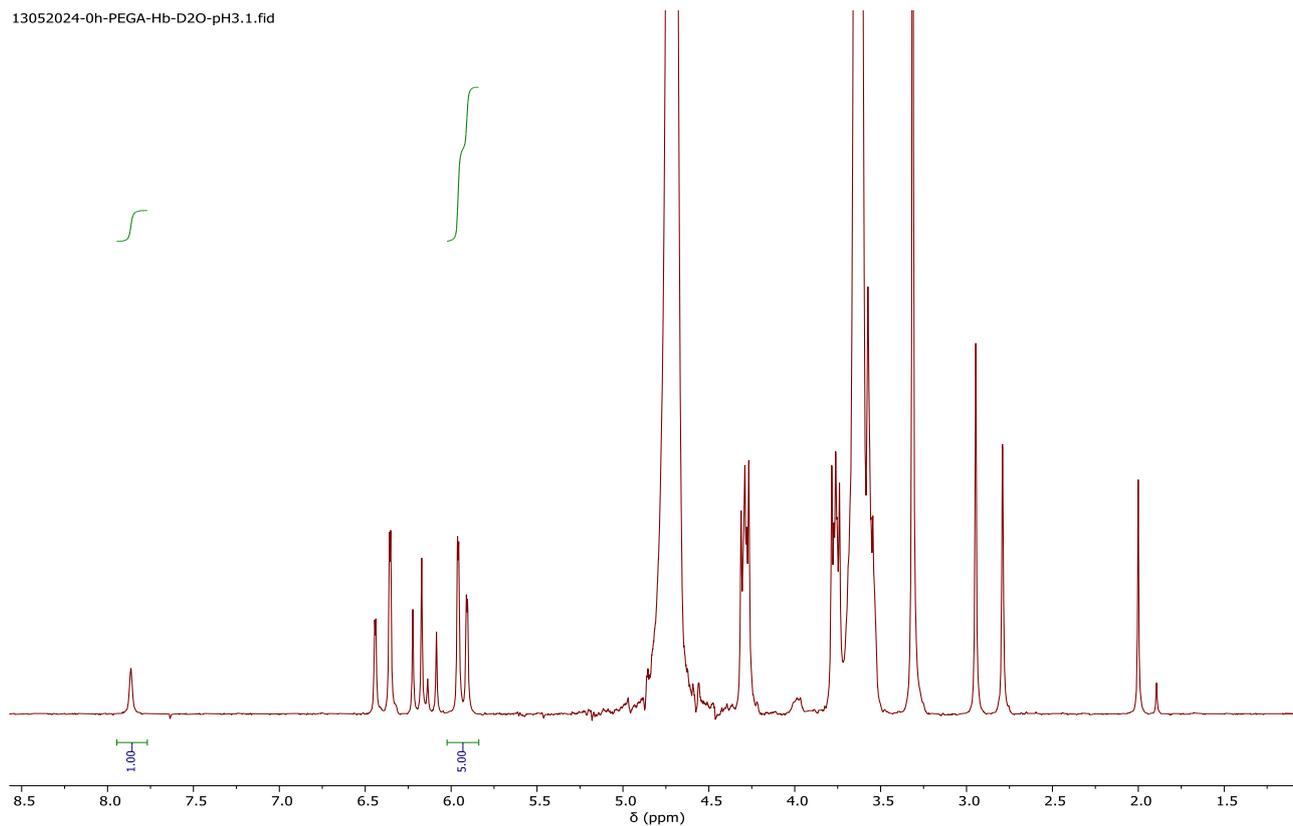
Si è immerso il supporto funzionalizzato in un vetrino Petri, contenente:

- 650 μ L di tampone a pH 5;
- 2,8 mL di Hb (concentrazione 1,84 mg/mL);
- 1 mL di monomero OEGMA 500 (oligo(etilen glicole) metiltere metacrilato);
- 50 μ L di colorante blu di metilene (MB^+). Sotto irradiazione di luce rossa, MB^+ viene eccitato e, per reazione con un donatore di elettroni (un'ammina terziaria), si forma MB^* , il quale è in grado di ridurre le specie di Fe^{III} in Hb a Fe^{II} , permettendo quindi di rigenerare continuamente l'attivatore. In questo sistema, quindi, non serve introdurre L-ascorbato di sodio poiché la sua azione riducente viene svolta da MB^* . Quest'ultimo è anche in grado di reagire con l'ossigeno disciolto, trasformando l'ossigeno di singoletto in ossigeno di tripletto⁶;
- 500 μ L di DMSO (dimetilsolfossido). Serve a reagire con l'ossigeno di tripletto generato come descritto sopra, a formare $DMSO_2$, prima che l'ossigeno vada a reagire con i radicali propaganti e/o con la specie di Fe^{II} in Hb, rallentando o interrompendo la polimerizzazione;
- 6,25 μ L di PMDETA (N, N, N', N', N''-pentametildietilentriammina), che funge da elettrodonatore.

Si è lasciata la piastra sotto la luce monocromatica per due ore, al termine delle quali si è analizzato il supporto di idrogel tramite spettrometria infrarossa.

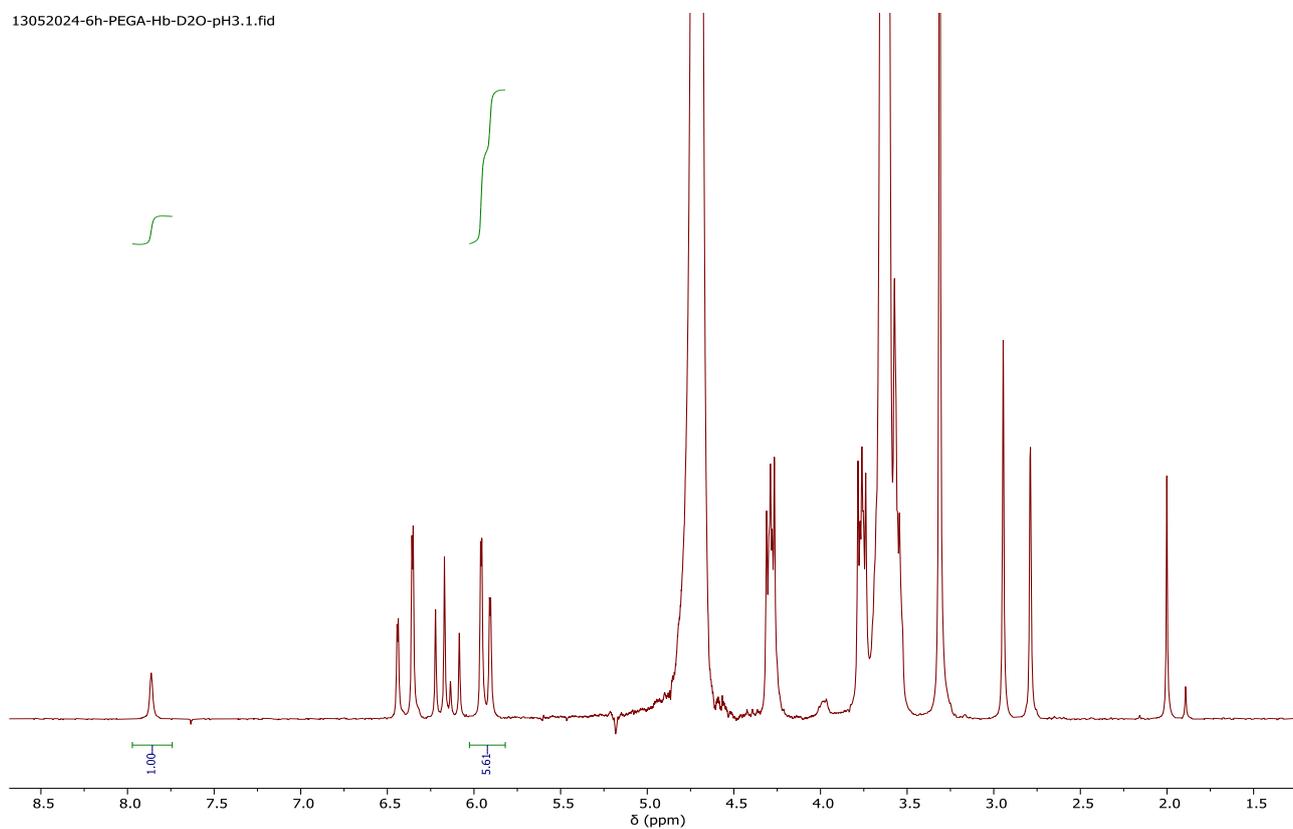
4.1 ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 3

13052024-0h-PEGA-Hb-D2O-pH3.1.fid



Spettro 2: ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 3, 0h

13052024-6h-PEGA-Hb-D2O-pH3.1.fid



Spettro 3: ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 3, 6h

Come si può vedere dagli spettri 2 e 3, la conversione dopo 6 ore di polimerizzazione è rimasta a zero:

$$(0h): 1 - \frac{5.00}{5.00} = 0$$

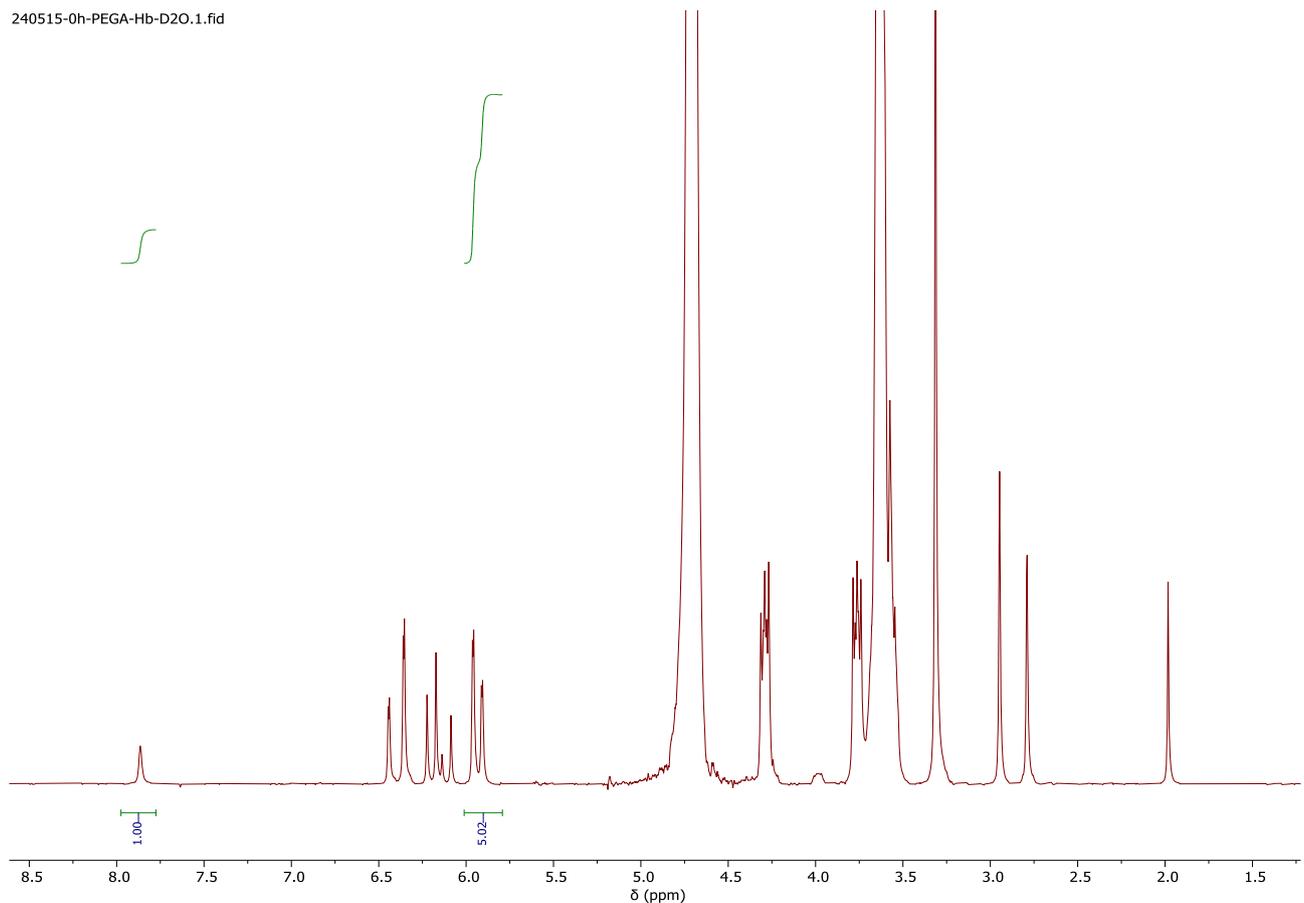
$$(6h): 1 - \frac{5.61}{5.00} = -0.122$$

In questo caso la conversione verrebbe negativa, bensì questo è da considerare come un'impresione nell'integrazione (avendo usato in queste prime analisi l'NMR 200 MHz risulta più probabile avere risultati imprecisi).

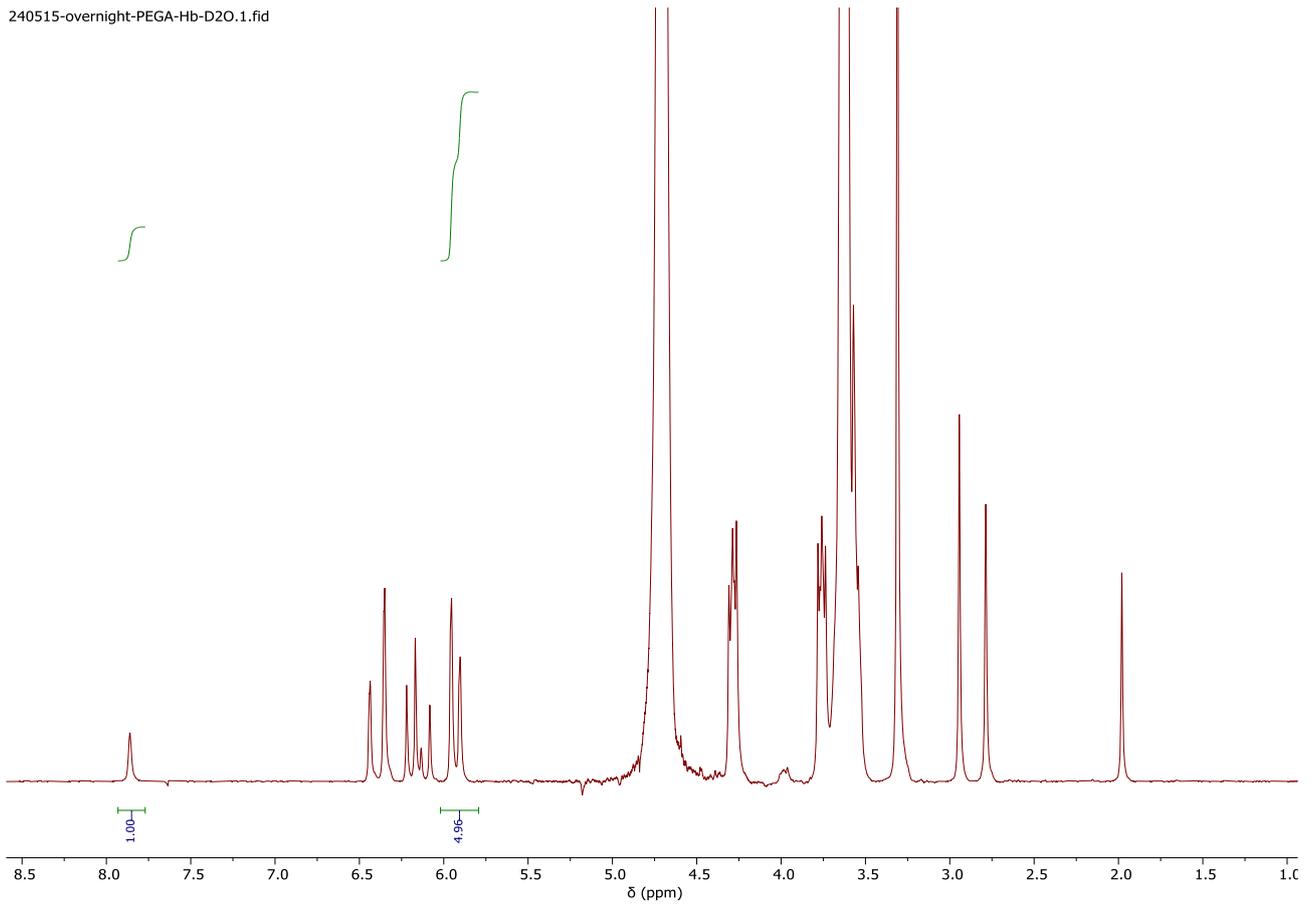
Questo risultato si è potuto vedere anche al momento del prelievo dei campioni: nel corso delle ore la viscosità della soluzione non aumentava, come ci si poteva aspettare. Per questo motivo sono stati analizzati solamente due campioni, il primo e l'ultimo.

Si è quindi provato a cambiare il pH del tampone da 3 a 4:

4.2 ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 4



Spettro 4: ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 4, 0h



Spettro 5: ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 4, circa 22h

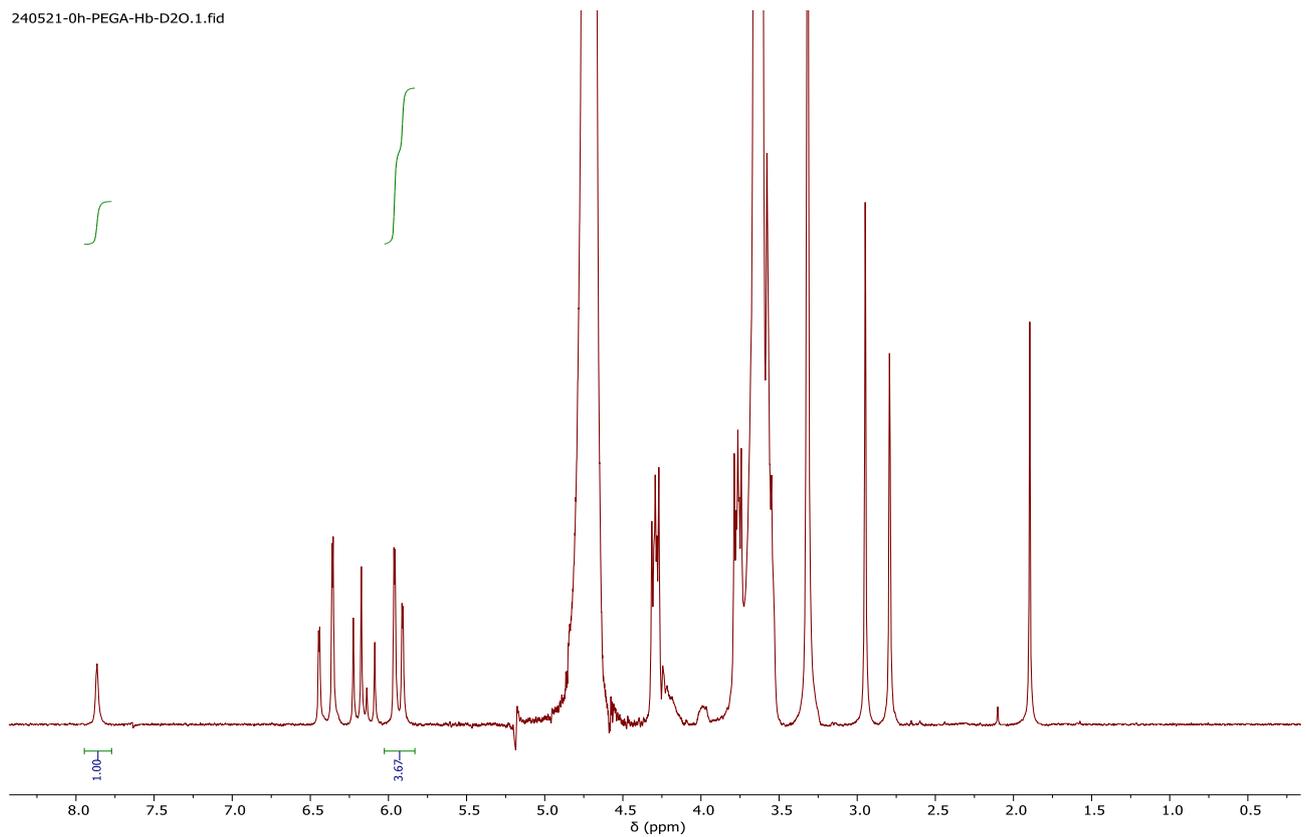
Anche in questo caso la conversione risulta quasi nulla:

$$(22h): \left(1 - \frac{4.96}{5.02}\right) \cdot 100 = 1,2\%$$

Si è fatto un ulteriore tentativo, cambiando pH da 4 a 5.

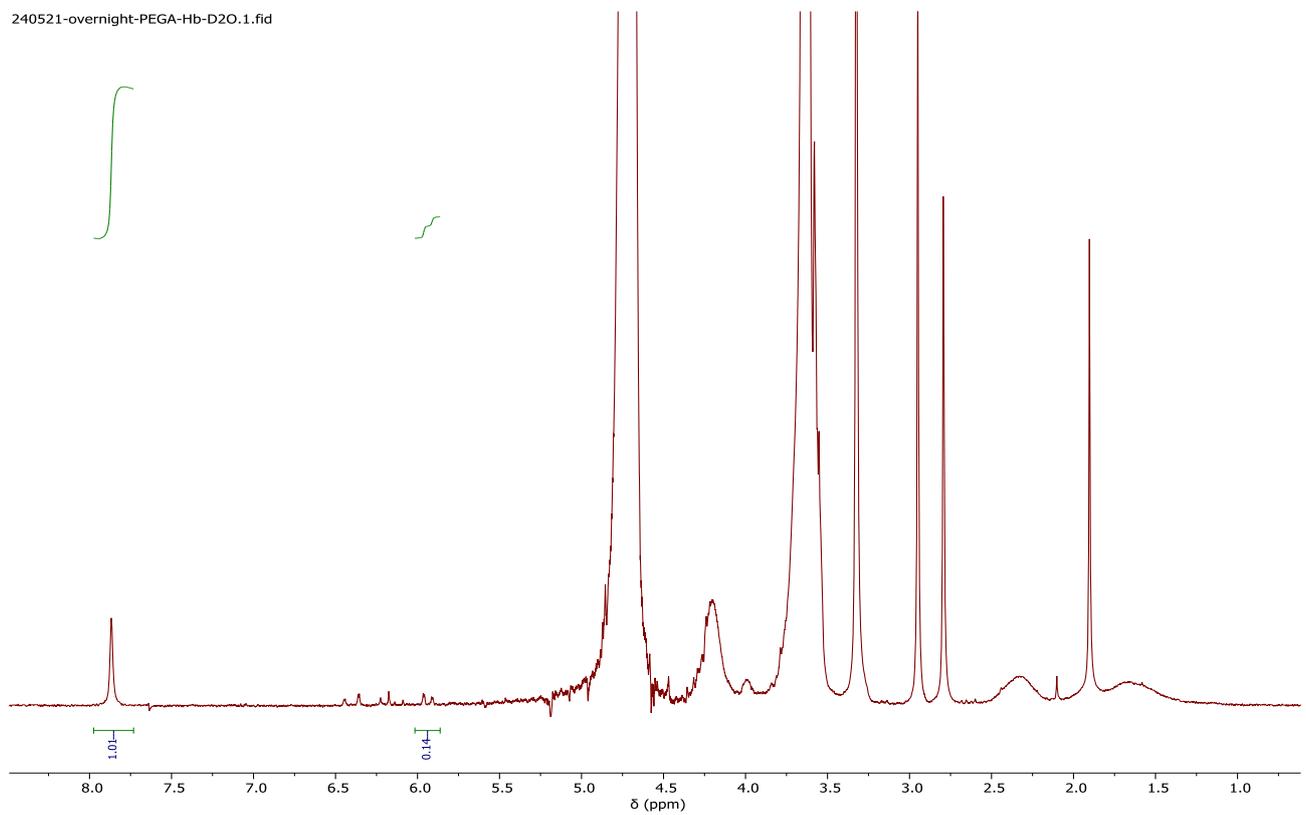
4.3 ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 5

240521-0h-PEGA-Hb-D2O.1.fid



Spettro 6: ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 5, 0h

240521-overnight-PEGA-Hb-D2O.1.fid



Spettro 7: ATRP di OEGA catalizzata da Hb a pH 5, 24h

Conversione dopo 24 ore: $\left(1 - \frac{0.14}{3.67}\right) \cdot 100 = 96,2\%$

Dato che questa polimerizzazione è avvenuta con successo, si è potuto purificare e analizzare il polimero come riportato nella sezione sperimentale: tramite analisi GPC (*Gel Permeation Chromatography*) si è risaliti al peso molecolare del polimero e alla sua dispersità (\mathcal{D}).

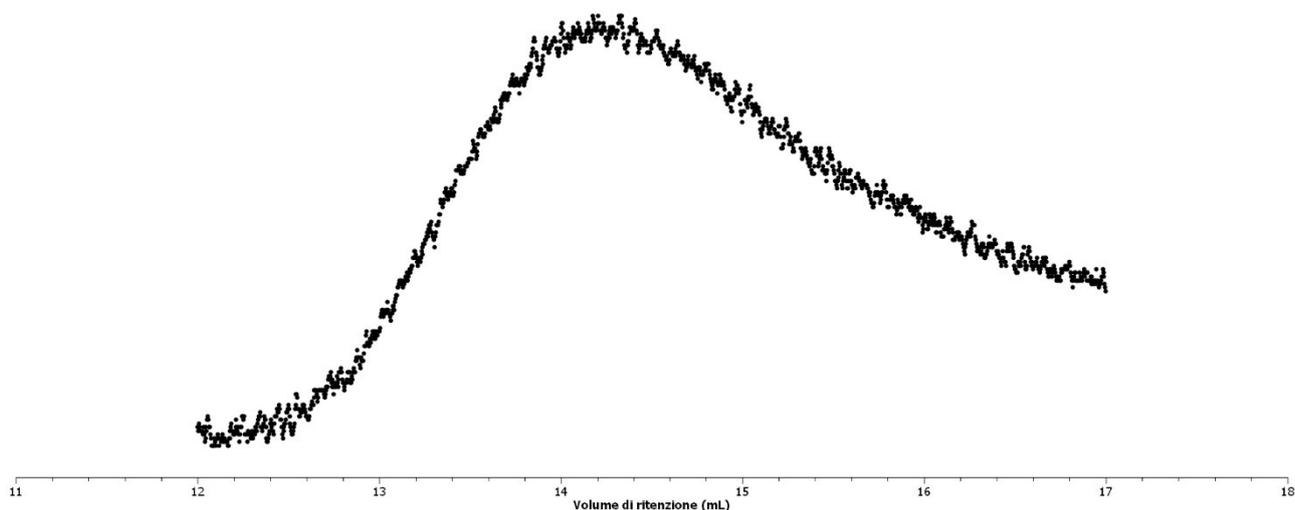


Grafico 1: Cromatogramma GPC del polimero PEGA dopo purificazione

Come si può notare dal Grafico 1, la distribuzione di pesi molecolari non è stretta come ci si aspetterebbe da un processo di ATRP ben controllato.

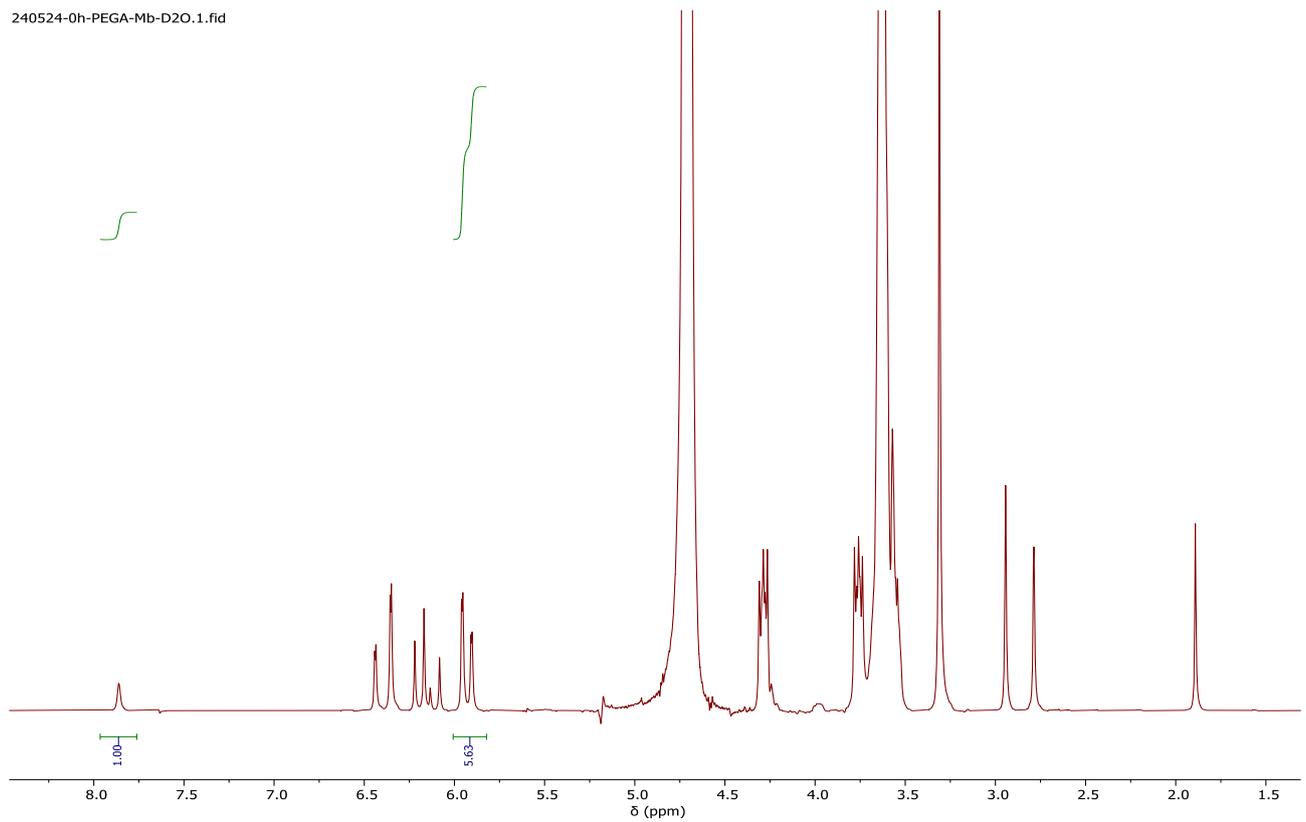
M_n (Da)	370300
M_w (Da)	827800
\mathcal{D} (M_w / M_n)	2,24

Tabella 1: Parametri ottenuti tramite analisi GPC del polimero ottenuto, usando una curva di calibrazione basata su standard di poli(metil metacrilato) (PMMA).

Dato il basso controllo ottenuto sulla polimerizzazione si è ipotizzato che questo fosse almeno parzialmente dovuto alla struttura del catalizzatore, in quanto Hb è un tetramero di elevato peso molecolare (circa 65 kDa) che perciò diffonderà lentamente nel sistema, e questo può limitare la sua abilità di disattivare le specie radicaliche propaganti, riducendo il controllo. Per questo si è passati alla mioglobina come biocatalizzatore, che ha un peso inferiore (circa 17,5 kDa).

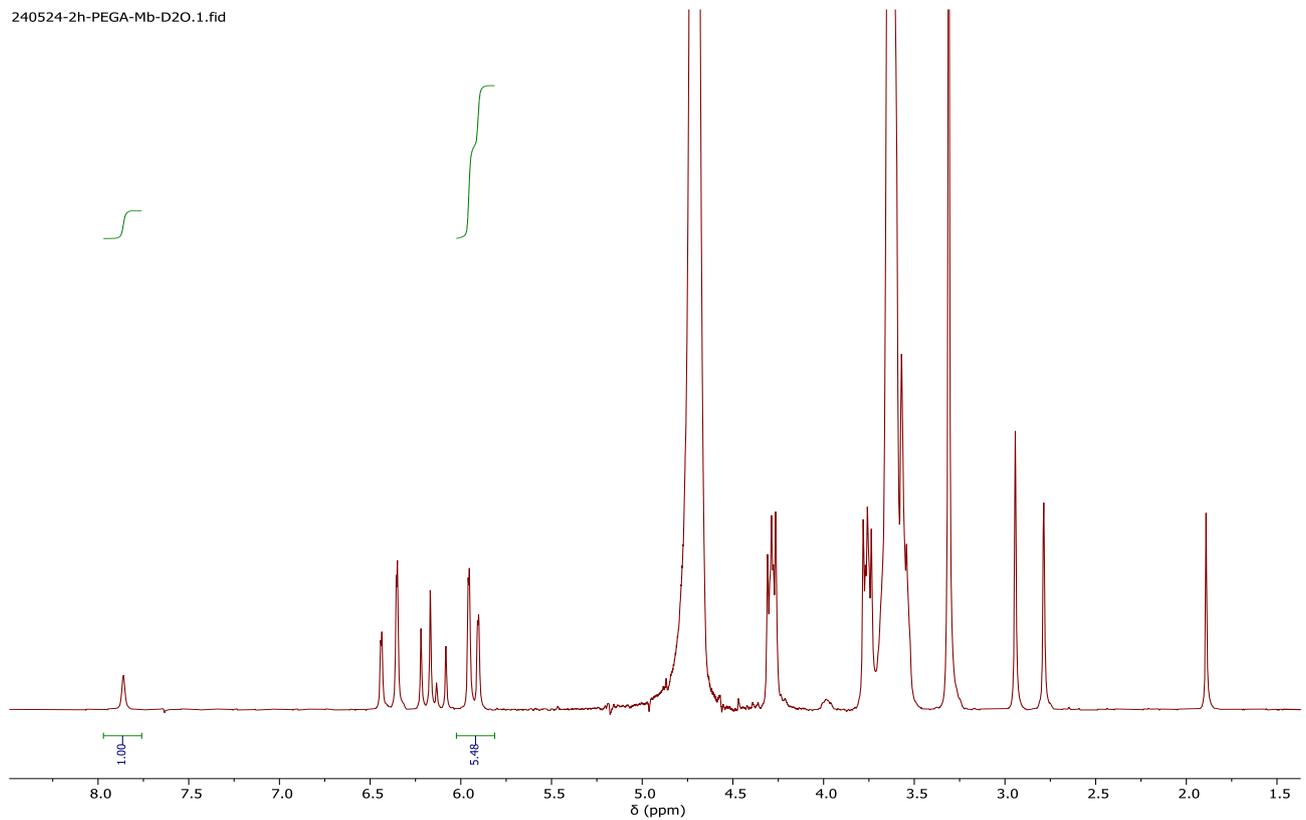
4.4 ATRP di OEGA catalizzata da Mb a pH 5

240524-0h-PEGA-Mb-D2O.1.fid



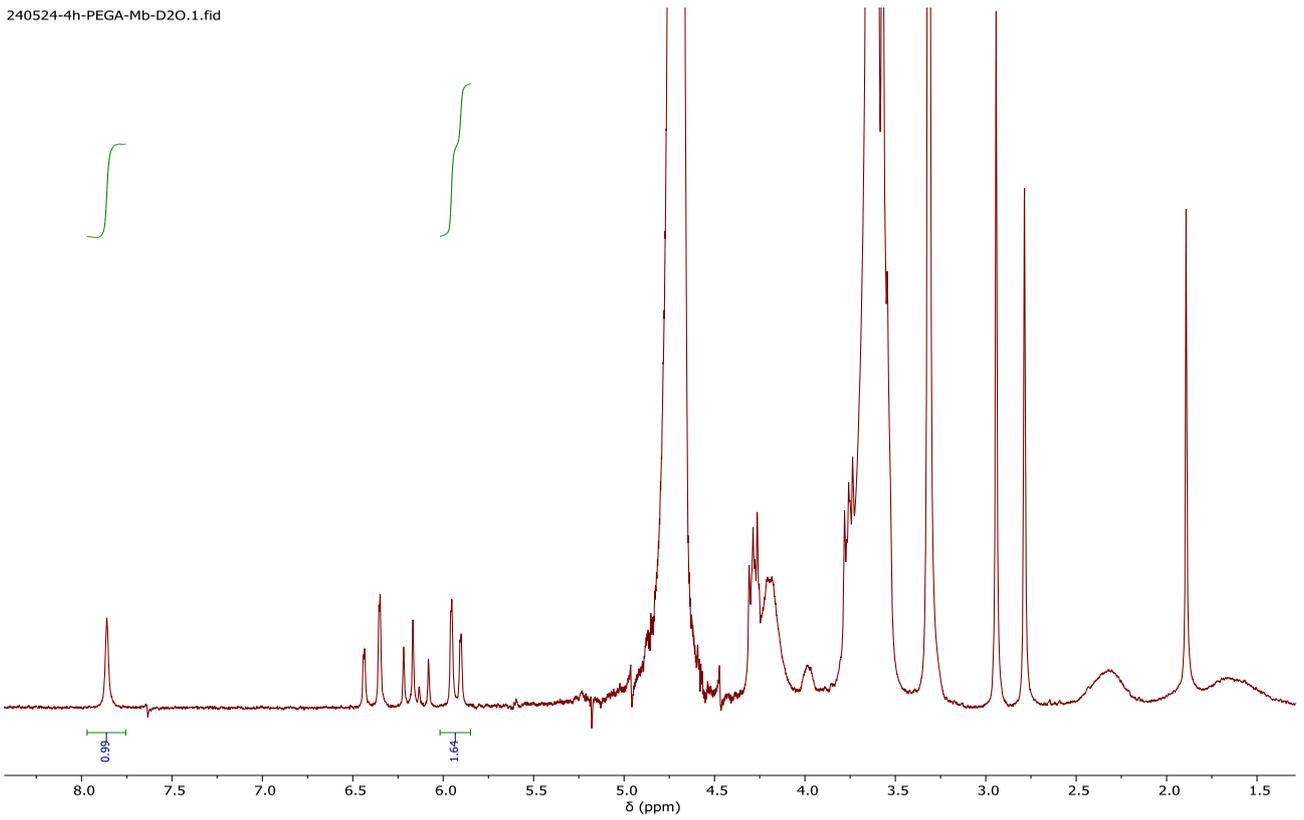
Spettro 8: ATRP di OEGA catalizzata da Mb a pH 5, 0h

240524-2h-PEGA-Mb-D2O.1.fid



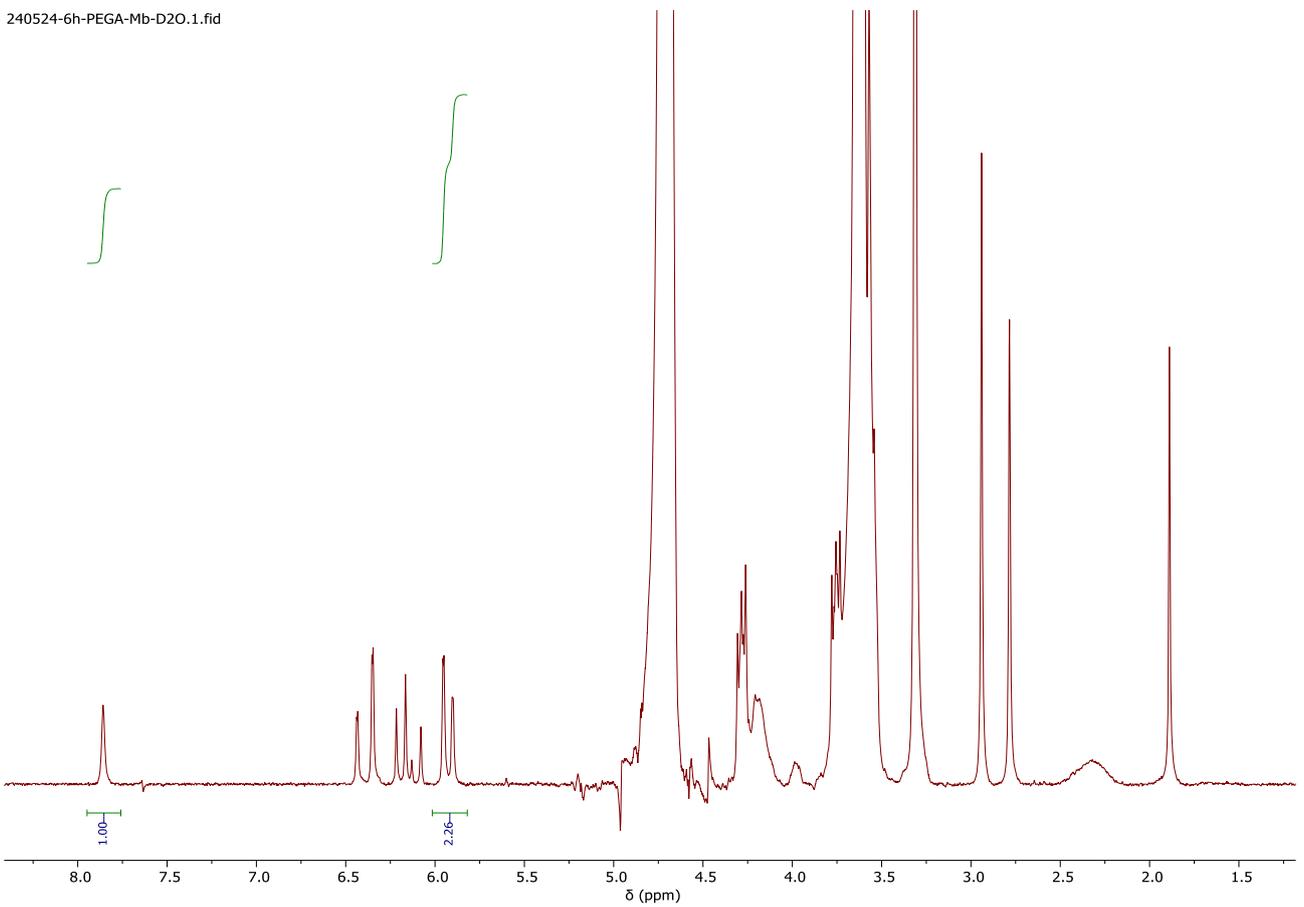
Spettro 9: ATRP di OEGA catalizzata da Mb a pH 5, 2h

240524-4h-PEGA-Mb-D2O.1.fid



Spettro 10: ATRP di OEGA catalizzata da Mb a pH 5, 4h

240524-6h-PEGA-Mb-D2O.1.fid



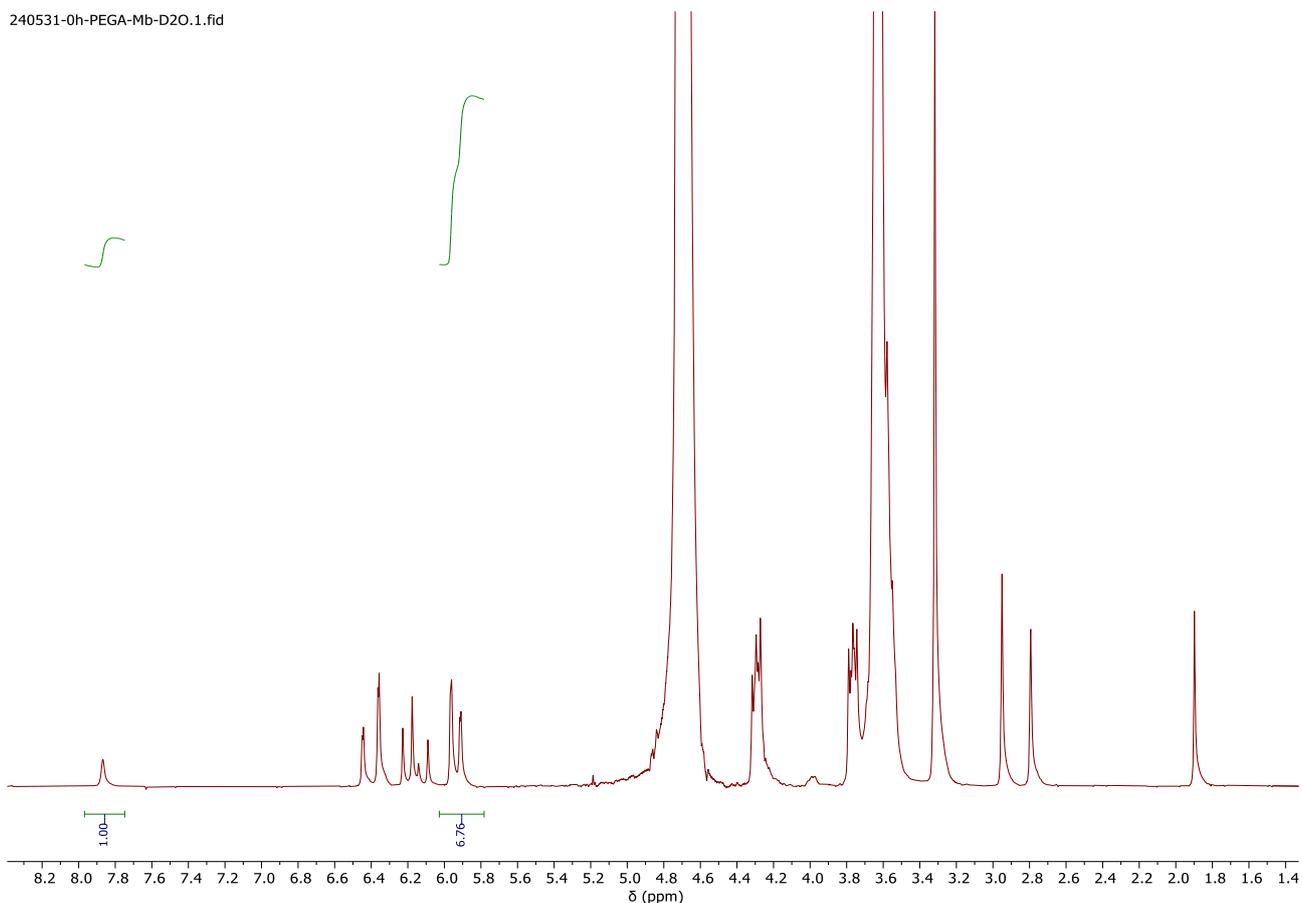
Spettro 11: ATRP di OEGA catalizzata da Mb a pH 5, 6h

$$(2h): \left(1 - \frac{5.48}{5.63}\right) \cdot 100 = 2,7\%$$

$$(4h): \left(1 - \frac{1.55}{5.63}\right) \cdot 100 = 72,5\%$$

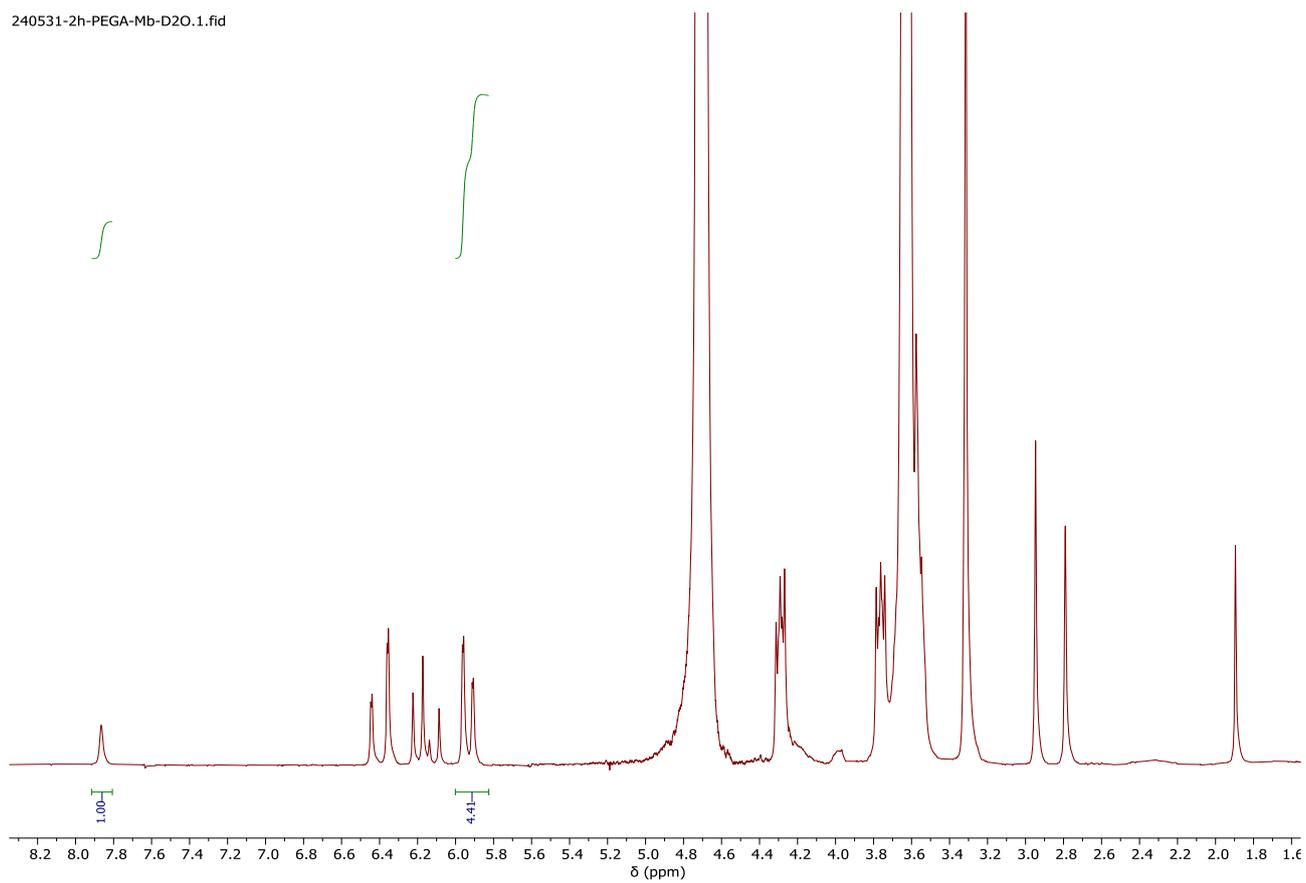
$$(6h): \left(1 - \frac{2.26}{5.63}\right) \cdot 100 = 59,9\%$$

In questa polimerizzazione, la conversione dopo 2 ore era di appena il 3%. Questo può essere dovuto al fatto che al momento del prelievo del primo campione non si era degasata la siringa. Ciò implica che l'ossigeno presente al suo interno sia entrato nell'ambiente di reazione e che abbia ossidato parzialmente il catalizzatore rallentando la polimerizzazione. Oltre a questa dimenticanza, l'analisi all' ^1H NMR mostra dei dati anomali, quindi si è deciso semplicemente di ripetere la polimerizzazione con gli stessi parametri.



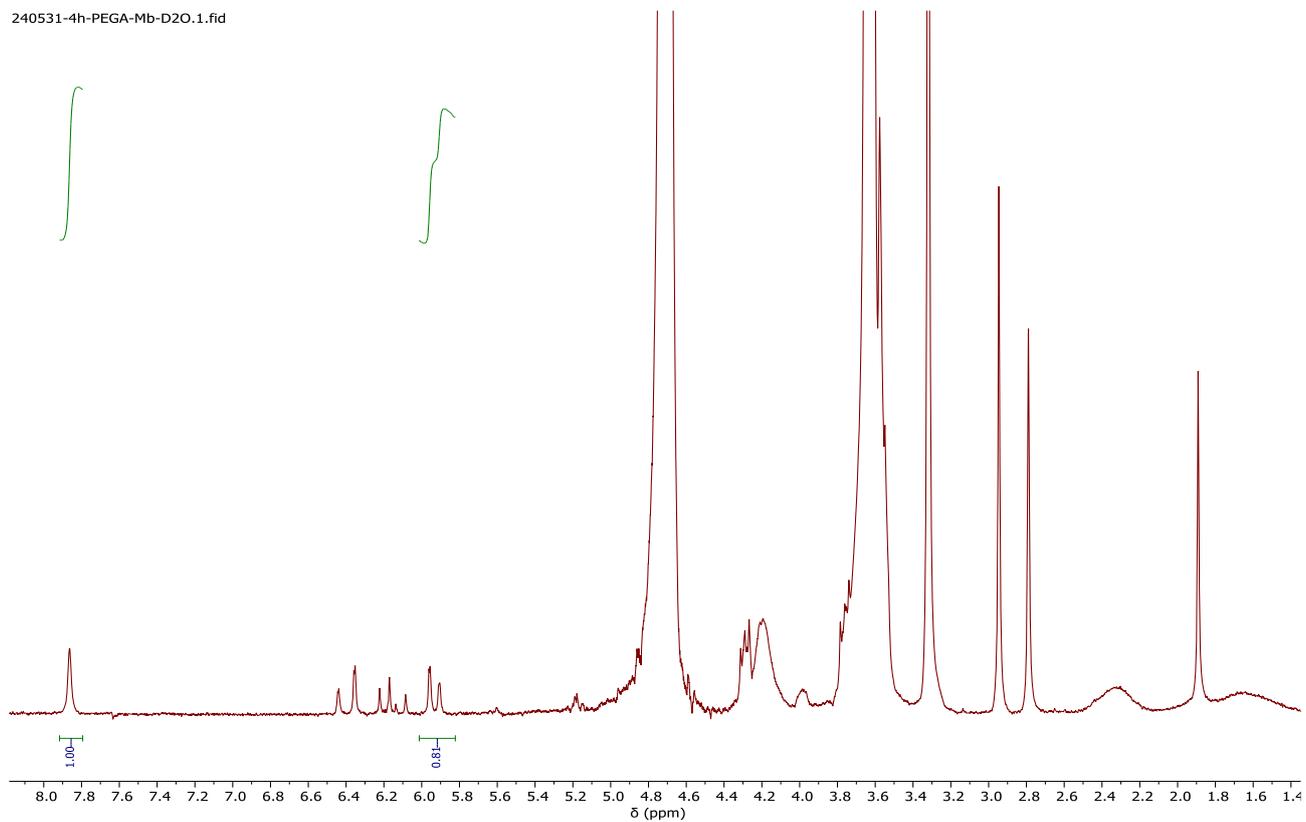
Spettro 12: ATRP di OEGA catalizzata da Mb a pH 5, 0h

240531-2h-PEGA-Mb-D2O.1.fid



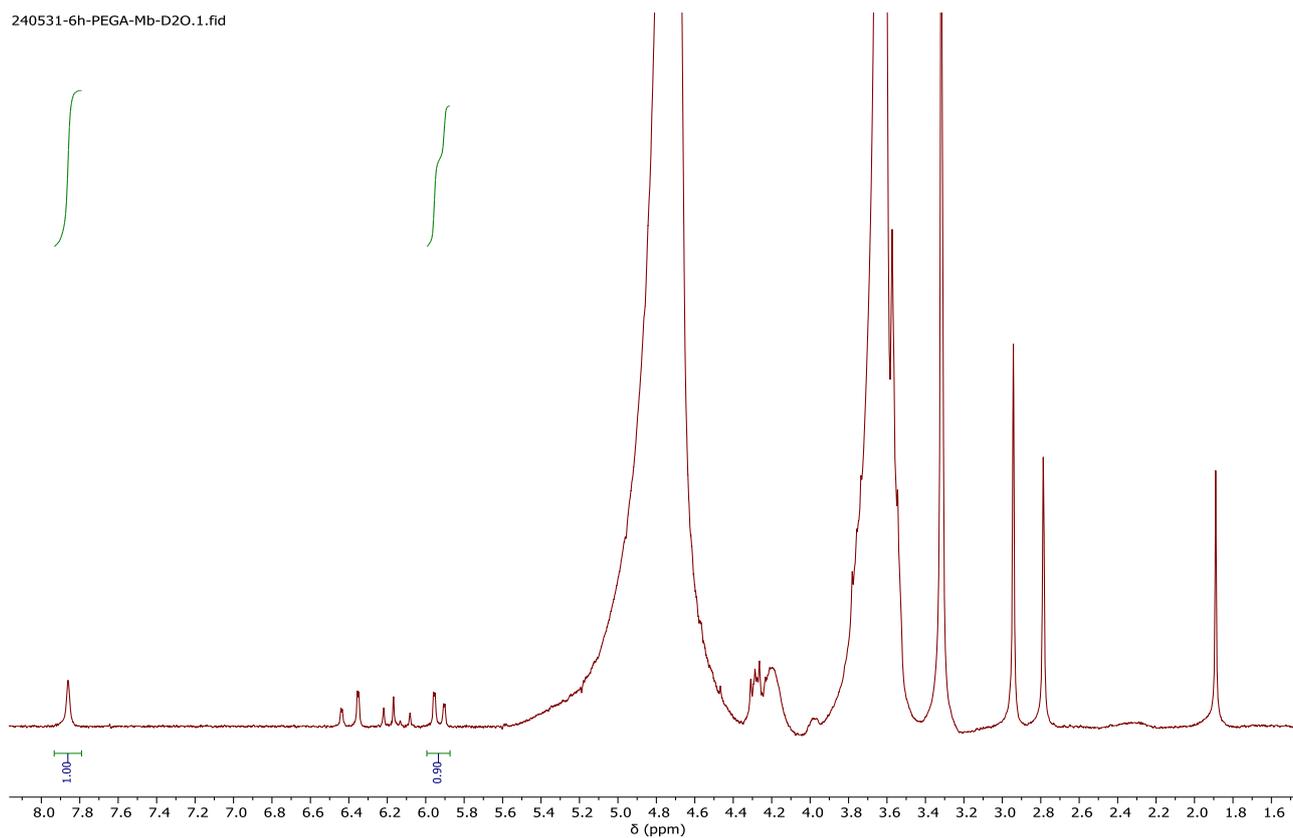
Spettro 13: ATRP di OEGA catalizzata da Mb a pH 5, 2h

240531-4h-PEGA-Mb-D2O.1.fid



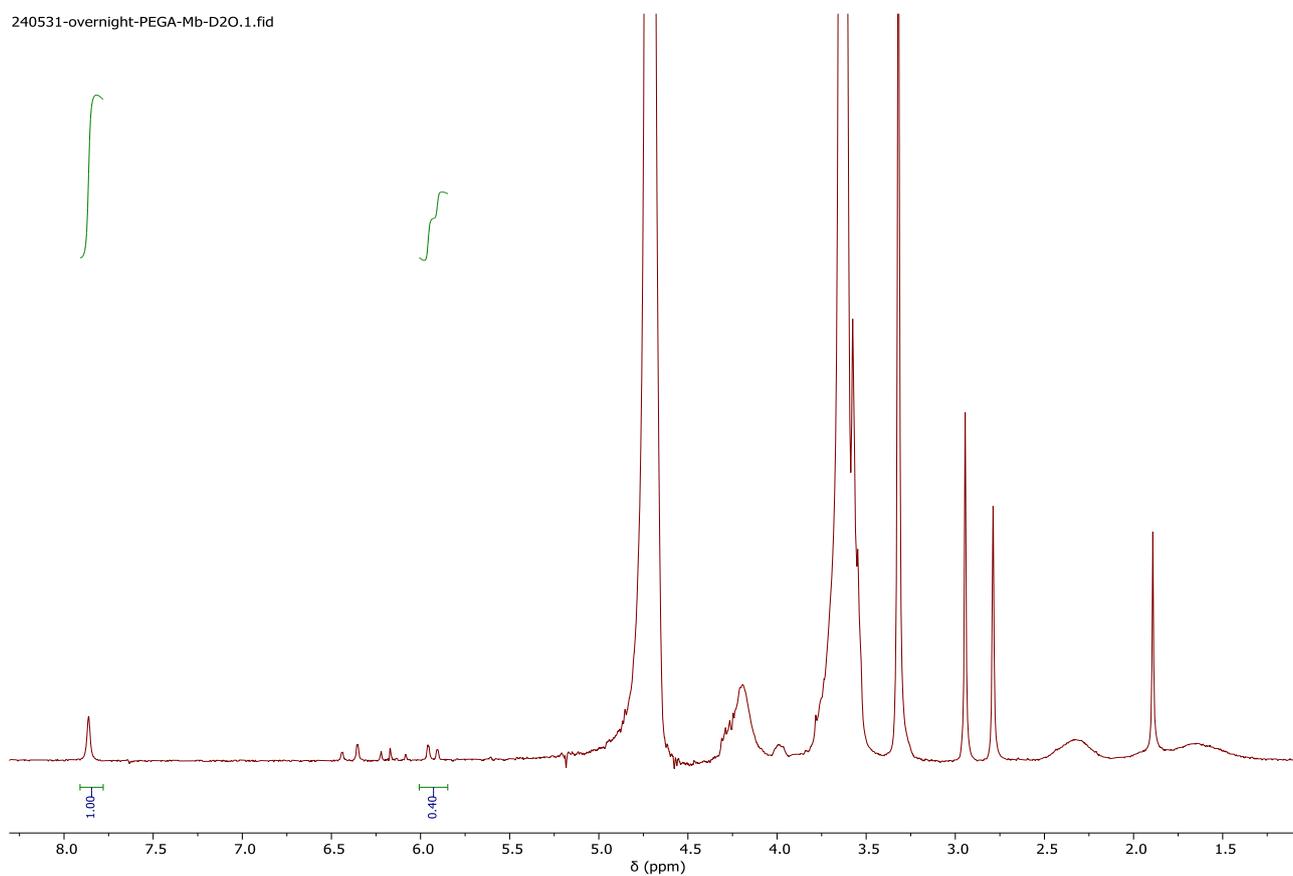
Spettro 14: ATRP di OEGA catalizzata da Mb a pH 5, 4h

240531-6h-PEGA-Mb-D2O.1.fid



Spettro 15: ATRP di OEGA catalizzata da Mb a pH 5, 6h

240531-overnight-PEGA-Mb-D2O.1.fid



Spettro 16: ATRP di OEGA catalizzata da Mb a pH 5, circa 24h

$$(2h): \left(1 - \frac{4.41}{6.76}\right) \cdot 100 = 34,8\%$$

$$(4h): \left(1 - \frac{0.81}{6.76}\right) \cdot 100 = 88,0\%$$

$$(6h): \left(1 - \frac{0.90}{6.76}\right) \cdot 100 = 86,7\%$$

$$(24h): \left(1 - \frac{0.40}{6.76}\right) \cdot 100 = 94,1\%$$

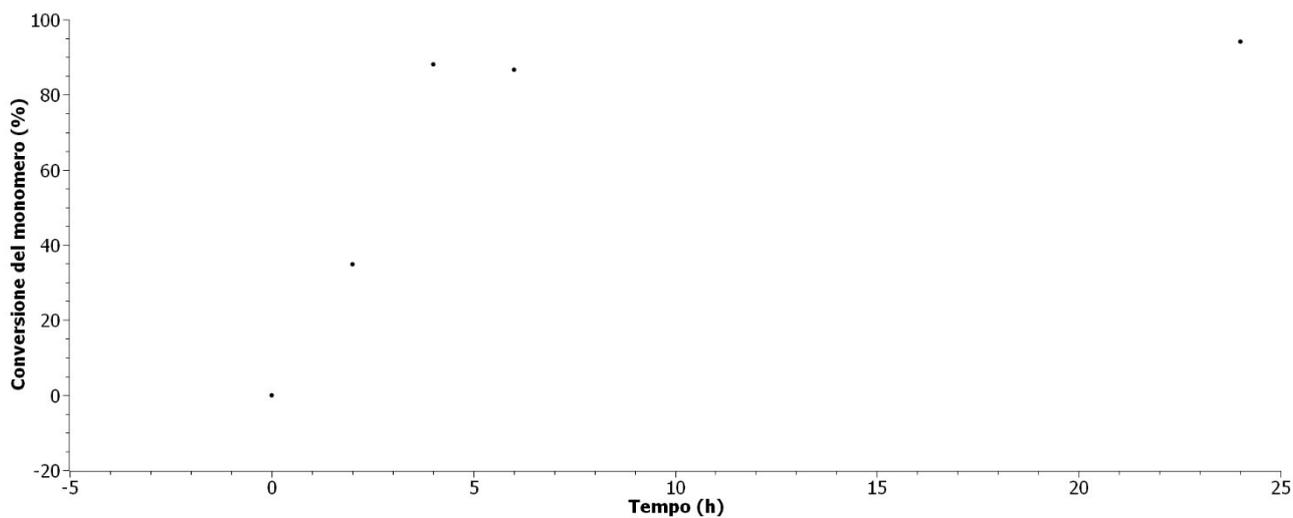


Grafico 2: Conversione del OEGA in funzione del tempo durante la polimerizzazione catalizzata da Mb a pH 5

Come si nota riportando su un grafico la conversione di monomero in funzione del tempo (grafico 2), la polimerizzazione raggiunge rapidamente una conversione elevata, e dopo 24 h la conversione del monomero è confrontabile con quella ottenuta usando Hb come catalizzatore.

Successivamente la polimerizzazione di OEGA con la mioglobina come catalizzatore è stata provata anche a pH 3 e 4, tuttavia non si è osservata una conversione del monomero apprezzabile, come nel caso delle corrispondenti polimerizzazioni catalizzate da Hb. Si può quindi affermare che un pH di 5 sia necessario sia per Hb che Mb per ottenere un'efficace attivazione degli alogenuri alchilici. Questo può essere dovuto, come riportato in letteratura per Hb, alla conformazione assunta da queste proteine a diversi pH, permettendo di esporre in maniera diversa i siti catalitici variandone l'accessibilità da parte dei substrati.

Per verificare la versatilità del processo si è deciso di effettuare un'ATRP di un monomero diverso: 2-metacrililossietil fosforilcolina (MPC). Questo monomero ha natura zwitterionica, ossia possiede una separazione di carica netta nella stessa molecola, che la fa comunque risultare con carica neutra.

Le polimerizzazioni di MPC a pH 5 e 4 con emoglobina non hanno dato però conversione di monomero apprezzabile. Si è ipotizzato che questo, soprattutto a pH 5, fosse dovuto alla reattività elevata dei radicali terziari generati da questo monomero metacrilico: data la rapida attivazione da parte di Hb e simultaneamente la scarsa capacità di disattivazione, viene generata una quantità relativamente elevata di radicali e gli eventi di terminazione risultano dominanti.

Si è poi passato a studiare l'ATRP di acido acrilico, e si è provata una polimerizzazione a pH 5 catalizzata dall'emoglobina e con acido tricloroacetico come iniziatore.

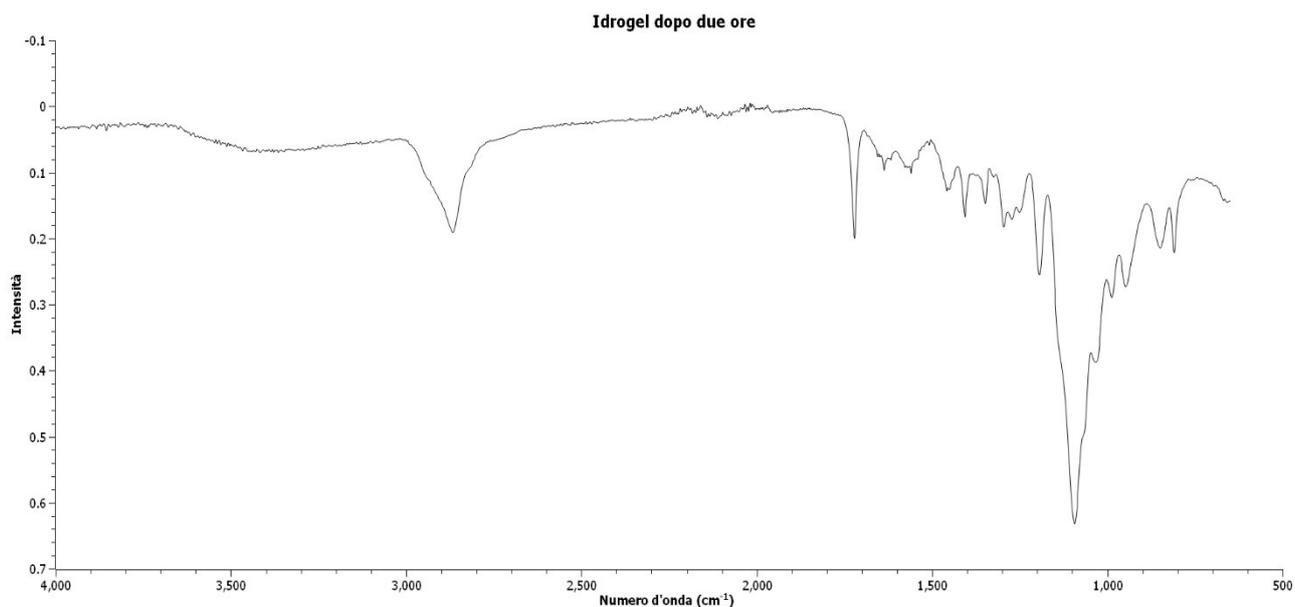
Il giorno successivo la soluzione si era separata in due fasi: un precipitato di colore marrone e il surnatante di colore giallo pallido (figura 4). Controllando il pH risultava 3.



Figura 4: Soluzione separata in due fasi

L'acidità, con 1,8 mL di acido acrilico in 9 mL di soluzione totali, risultava troppo elevata, per cui si è provato a ridurre il quantitativo di monomero, dal 20% al 10% in volume, andando anche a controllare il pH della soluzione dopo l'aggiunta di ogni reagente.

Partendo da un pH di 6, dopo l'aggiunta dell'iniziatore (acido tricloroacetico), questo è sceso a ~ 5. Una volta messi 0,9 mL di acido acrilico però, il pH è calato a 3. L'aggiunta di L-ascorbato di sodio, infine, ha fatto precipitare immediatamente tutta l'emoglobina. Non si è proceduto in questa fase ad ottimizzare la composizione della miscela di polimerizzazione per lavorare ad un pH prestabilito, poiché si è preferito valutare la possibilità di estendere le polimerizzazioni biocatalizzate a sistemi di tipo grafting from, come descritto nella sezione successiva.



Spettro 18: Idrogel dopo due ore di polimerizzazione

Si può vedere che in seguito alla polimerizzazione è aumentato relativamente di intensità il picco a $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$, che si può attribuire allo stretching del legame C-H saturo (quindi del metile e all'interno della catena polimerica). A 1700 cm^{-1} c'è un nuovo picco che si può attribuire allo stretching del legame C=O. La banda a 1100 cm^{-1} è data dalla somma degli stretching simmetrici e asimmetrici del legame C-O dell'etere. Questo legame è però presente anche all'interno del polisaccaride, e infatti si vede anche nello spettro 17, con un'intensità però relativamente minore. Pertanto, si può affermare che Hb può essere utilizzata per crescere catene polimeriche da substrati funzionalizzati con siti di iniziazione ATRP. Inoltre, Hb è compatibile con un processo di tipo SI-photoATRP che usa luce rossa e che permette di fare polimerizzazioni senza degasare l'ambiente di reazione.

5. CONCLUSIONI

Le polimerizzazioni condotte in questa tesi mostrano che emoglobina e mioglobina sono in grado di agire da attivatori di bromuri alchilici, grazie alla presenza di siti di Fe(III) che, in presenza di un agente riducente, vengono ridotti a Fe(II), il quale è in grado di attivare i legami C-Br. Questo avviene quando il pH delle soluzioni è pari a 5, mentre a pH inferiori il processo non risulta efficace. Sebbene i complessi di Fe(III) potrebbero agire da disattivatori dei radicali propaganti, i polimeri ottenuti hanno mostrato pesi molecolari più alti dei valori attesi e dispersità elevata. Questo indica che la disattivazione è scarsamente efficace, probabilmente dovuto all'ingombro sterico dato dalla proteina stessa sui siti di Fe(III) che sfavorisce il trasferimento di alogeno tra il metallo e le specie radicaliche.

La capacità di questi biocatalizzatori di attivare legami C-Br in condizioni blande è stata poi sfruttata per far crescere catene polimeriche direttamente da un idrogel di chitosano opportunamente modificato, quindi con una strategia di tipo grafting from. La polimerizzazione di OEGMA è stata effettuata sotto irradiazione di luce rossa, che ha elevata capacità di penetrazione e bassa energia. Inoltre, il processo è stato condotto senza bisogno di degasare l'ambiente di reazione. Queste condizioni di reazione rendono il processo scalabile e adatto alla funzionalizzazione di biomateriali al fine di modificarne le proprietà interfacciali tramite la crescita di diversi polimeri.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Silva, T. B.; Spulber, M.; Kocik, M. K.; Seidi, F.; Charan, H.; Rother, M.; Sigg, S. J.; Renggli, K.; Kali, G.; Bruns, N. Hemoglobin and Red Blood Cells Catalyze Atom Transfer Radical Polymerization. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (8), 2703–2712.
- (2) *Surface-Initiated Controlled Radical Polymerization: State-of-the-Art, Opportunities, and Challenges in Surface and Interface Engineering with Polymer Brushes | Chemical Reviews*. (accessed 2024-09-07).
- (3) Yan, C.-N.; Xu, L.; Liu, Q.-D.; Zhang, W.; Jia, R.; Liu, C.-Z.; Wang, S.-S.; Wang, L.-P.; Li, G. Surface-Induced ARGET ATRP for Silicon Nanoparticles with Fluorescent Polymer Brushes. *Polymers* **2019**, *11* (7), 1228.
- (4) Li, R.; Kong, W.; An, Z. Enzyme Catalysis for Reversible Deactivation Radical Polymerization. *Angew. Chem.* **2022**, *134* (26), e202202033.
- (5) Lorandi, F.; Fantin, M.; Wang, Y.; Isse, A. A.; Gennaro, A.; Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization of Acrylic and Methacrylic Acids: Preparation of Acidic Polymers with Various Architectures. *ACS Macro Lett.* **2020**, *9* (5), 693–699.
- (6) Hu, X.; Szczepaniak, G.; Lewandowska-Andralojc, A.; Jeong, J.; Li, B.; Murata, H.; Yin, R.; Jazani, A. M.; Das, S. R.; Matyjaszewski, K. Red-Light-Driven Atom Transfer Radical Polymerization for High-Throughput Polymer Synthesis in Open Air. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145* (44), 24315–24327.