



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Tesi di Laurea Triennale in Ingegneria Biomedica
Laurea Triennale DM 270/04 - Indirizzo Biomedica

**SINTESI, FUNZIONALIZZAZIONE E
CARATTERIZZAZIONE DI NANOPARTICELLE
MAGNETICHE DA DECOMPOSIZIONE TERMICA DI
FERRO (III) ACETILACETONATO**

Relatore: Dott. Paolo Sgarbossa
Correlatore: Dott.ssa Elisabetta Sieni

Laureando: MARTINO GUIDOLIN

ANNO ACCADEMICO 2013 - 2014

*Alla mia famiglia, agli amici e ai miei colleghi
per averci creduto e avermi sostenuto nel mio percorso.*

Indice

1	Introduzione	1
2	Magnetismo nei materiali	3
2.1	Generalità	3
2.2	Nanoparticelle e superparamagnetismo	6
2.3	Rilassamento e riscaldamento delle nanoparticelle	7
2.4	Materiali per sintesi di nanoparticelle	8
3	Utilizzo delle nanoparticelle in ambito biomedico	13
3.1	Multimodal imaging	13
3.2	Nanoparticelle come vettori per il trasporto di farmaci	14
3.3	Ipertermia magnetofluida	15
3.3.1	Le cellule tumorali	15
3.3.2	Riscaldamento delle cellule tumorali	16
4	Sintesi e funzionalizzazione di nanoparticelle	19
4.1	Metodi di sintesi	19
4.1.1	DECOMPOSIZIONE TERMICA	19
4.1.2	COPRECIPITAZIONE	20
4.1.3	METODO SOLVOTERMALE - IDROTERMALE	21
4.1.4	SINTESI PER RIDUZIONE DI METALLI	22
4.1.5	SINTESI SONOCHIMICA:	23
4.2	Metodi di funzionalizzazione	24
4.3	Analisi delle nanoparticelle	25
5	Sintesi di nanoparticelle: parte sperimentale	31
5.1	Strumentazione	32
5.2	Sintesi delle nanoparticelle	33
5.2.1	Prima fase: sintesi di nanoparticelle da 4 nm	33
5.2.2	Caratterizzazione delle nanoparticelle da 4 nm	35

5.2.3	Seconda fase: accrescimento	38
5.2.4	Caratterizzazione delle nanoparticelle accresciute	38
5.2.5	Terza fase: funzionalizzazione	41
5.2.6	Caratterizzazione delle nanoparticelle funzionalizzate	41
6	Conclusioni	43

Sommario

La presente tesi descrive i risultati ottenuti nella sintesi e funzionalizzazione di nanoparticelle magnetiche di ossidi ferro per l'applicazione nel trattamento di ipertermia magnetofluida.

Si è scelto di operare attraverso la decomposizione controllata di un precursore organometallico, l'acetilacetionato di ferro(III) [$Fe(acac)_3$], in presenza di opportune molecole stabilizzanti. Tutte le nanoparticelle prodotte sono state caratterizzate attraverso tecniche spettroscopiche (FT-IR) e microscopiche (TEM) per determinare la composizione e la morfologia.

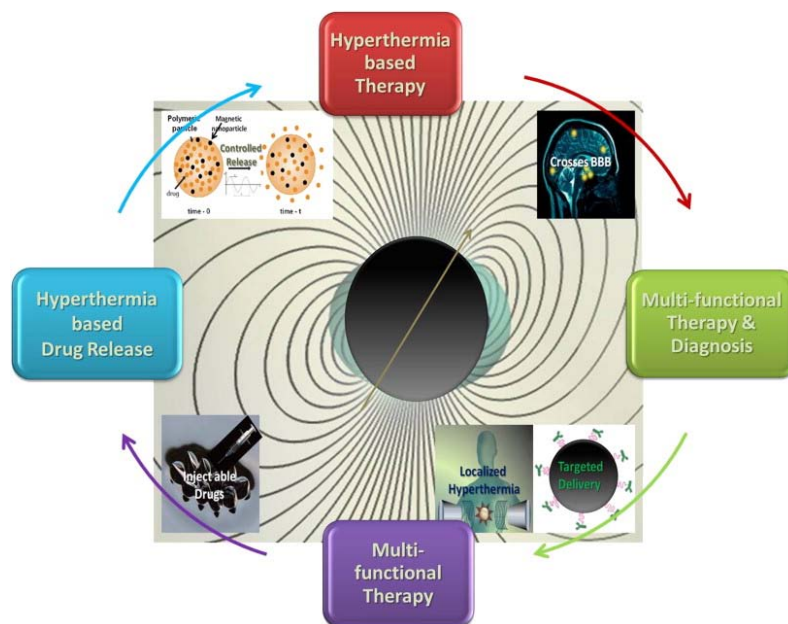
I risultati verranno introdotti da una breve trattazione delle caratteristiche dei materiali magnetici, della tecnica di ipertermia e dei principali metodi alternativi per la produzione di nanoparticelle magnetiche.

Capitolo 1

Introduzione

La seguente tesi si propone di descrivere la sintesi di un possibile magneto fluido utilizzabile nella **magnetofluidoipertermia**. Questo nuovo tipo di terapia consiste *nell'immissione di nanoparticelle magnetiche di opportune dimensioni all'interno del sito tumorale* che successivamente sono sottoposte a campo magnetico alternato per ottenere un *riscaldamento locale che porti alla morte per apoptosi delle cellule malate*.

Le prime applicazioni sperimentali di questo tipo di trattamento risalgono alla fine degli anni '50, quando Gilchrist et al. [1] utilizzarono nanoparticelle di maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) da 20-100 nm sottoposte ad un campo magnetico a 1.2 MHz per scaldare dei campioni di tessuto organico.



Dalla letteratura è noto che le nanoparticelle magnetiche possono essere utilizzate in diverse applicazioni biomedicali, sia come **vettori per il trasporto di farmaci**,

sia come **mezzo di contrasto** per tecniche di imaging come la risonanza magnetica, sia come **elementi riscaldanti** nel trattamento di cellule tumorali [2].

Questo elaborato si compone di due parti: la prima si occuperà di dare una panoramica generale sulla definizione di magnetofluidoipertermia, sui principi di funzionamento e sui materiali utilizzati; la seconda si occuperà della parte sperimentale svolta e sulle tecniche di sintesi e funzionalizzazione delle nanoparticelle.

Capitolo 2

Magnetismo nei materiali

2.1 Generalità

Il magnetismo può essere definito come *l'insieme di fenomeni che avvengono quando un dato materiale viene esposto a un campo magnetico*. Una prima classificazione dei materiali si basa sulla magnetizzazione $\mathbf{M}$ del materiale e sulla sua suscettività magnetica χ . Infatti, dato un campo magnetico esterno $\mathbf{H}$, l'induzione magnetica $\mathbf{B}$ all'interno di un materiale è data da

$$B = \mu_0(H + M) \quad (2.1)$$

in cui μ_0 è la costante di permeabilità magnetica nel vuoto. Sapendo inoltre che $M = \chi H$, con χ la suscettività magnetica del materiale, la (1) diventa:

$$B = \mu_0 H(\chi + 1) \quad (2.2)$$

A seconda del valore di χ (una costante adimensionale) si possono distinguere i seguenti casi:

- **diamagnetismo:** i materiali diamagnetici presentano una suscettività magnetica negativa nell'intervallo $-10^{-6} \div -10^{-1}$; il segno negativo giustifica il fatto che quando questi materiali vengono esposti a un campo magnetico, essi vengono debolmente respinti. Materiali di questo tipo sono l'acqua, il mercurio, l'oro o il rame.
- **paramagnetismo:** si dicono paramagnetiche le sostanze caratterizzate da una suscettività magnetica compresa nell'intervallo $10^{-6} \div 10^{-1}$, quindi sempre piccola ma positiva; in questo caso nel materiale i diversi momenti di dipolo magnetico sono orientati casualmente ma in presenza di un campo magnetico

esterno si allineano con esso. È il caso di materiali come alluminio, magnesio, calcio o platino.

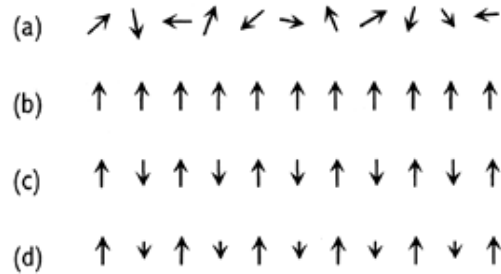


Figura 2.1: disposizione dei dipoli magnetici nei diversi materiali: a) paramagnetismo; b) ferromagnetismo; c) antiferromagnetismo; d) ferrimagnetismo

- **ferromagnetismo:** si osserva che la suscettività magnetica è pari a circa 10^3 e materiali di questo tipo (esempi di questo tipo di materiali sono il ferro, il nickel, il cobalto o loro leghe) quando vengono esposti a un campo esterno tendono a **mantenere la magnetizzazione acquisita**. Questo fenomeno avviene finché la temperatura di tali materiali rimane sotto una certa soglia detta *temperatura di Curie*, oltre la quale essi assumono comportamento paramagnetico.

La magnetizzazione dei materiali ferromagnetici può essere rappresentata in funzione del campo magnetico H .

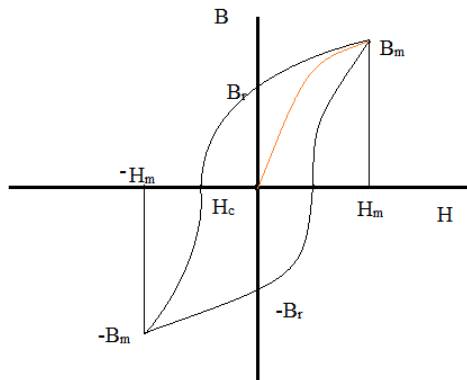


Figura 2.2: Grafico di un ciclo di isteresi: $\pm H_m$ sono i campi massimi che possono essere assorbiti, B_r è la *magnetizzazione residua* a campo nullo e $\pm H_c$ (campo coercitivo) è il campo da applicare per rimuovere tale magnetizzazione.

Il **ciclo di isteresi** [figura 2.2], mette in relazione l'intensità del campo magnetico esterno H e il campo di induzione magnetica B : ipotizzando un materiale

ferromagnetico a magnetizzazione iniziale interna nulla, all'aumentare del valore del campo esterno esso acquisisce e mantiene un'induzione magnetica interna fino a un valore massimo B_m oltre il quale non può andare. Successivamente al decrescere di tale campo esterno decresce anche il campo di induzione magnetica; a questo punto, per H nullo, B vale B_r che è diverso da zero: tale valore è detto **magnetizzazione residua**; per rimuovere tale magnetizzazione è necessario applicare un campo esterno con polarità invertita di valore H_c , detto **valore di campo coercitivo**. Oltre tale valore si può magnetizzare il materiale ferromagnetico fino ad arrivare ad un campo di induzione magnetica di valore $-B_m$, valore che può crescere a $-B_r$ riportando nuovamente H a zero. Anche in questo caso, per ottenere nuovamente B pari a zero è necessario applicare un campo coercitivo di segno positivo, oltre il quale si può portare nuovamente B al suo valore massimo B_m , chiudendo il ciclo. Il primo tratto (la linea contenuta nel ciclo) è detto **curva di prima magnetizzazione** poiché viene percorso soltanto all'applicazione del primo campo esterno; di conseguenza dopo la prima magnetizzazione non è più possibile avere un campo di induzione magnetica nullo applicando un campo magnetico esterno nullo.

- **antiferromagnetismo:** se la suscettività magnetica è compresa nell'intervallo $0 \div 10^{-2}$ il materiale si dice antiferromagnetico; in questo caso i momenti di dipolo magnetico presenti nel materiale tendono ad allinearsi in maniera antiparallela l'uno con l'altro, dando così origine a un campo magnetico totale nullo, sia in presenza che in assenza di campo magnetico esterno. Materiali di questo tipo sono il cromo, il manganese e alcuni tipi di ossidi.
- **ferrimagnetismo:** il ferrimagnetismo (o antiferromagnetismo scompensato) è quel fenomeno per il quale i momenti di dipolo sono disposti in maniera antiparallela l'uno con l'altro, ma una direzione ha modulo maggiore rispetto all'altra, dando così origine a un campo magnetico totale non nullo. Appartengono a questa classe la magnetite e altri tipi di ferriti.

2.2 Nanoparticelle e superparamagnetismo

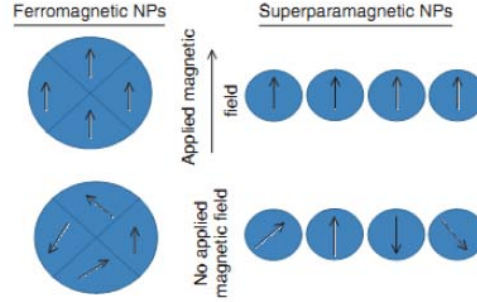


Figura 2.3: comportamento dei domini singoli e multipli delle nanoparticelle ferromagnetiche e superparamagnetiche

Il **superparamagnetismo** è quel fenomeno magnetico tipico di materiali ferromagnetici le cui dimensioni sono talmente ridotte da poter essere paragonate alla dimensione di un **dominio magnetico**, ovvero ad una *regione di materiale all'interno della quale i dipoli sono tutti allineati lungo la stessa direzione*.

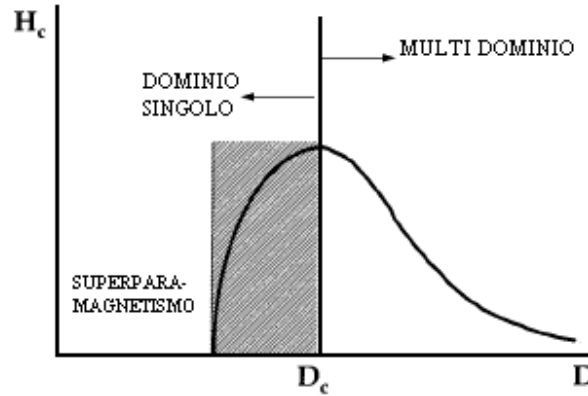


Figura 2.4: andamento tipico della coercitività delle nanoparticelle in funzione del loro diametro.

Affinché una nanoparticella si ritrovi nelle condizioni di singolo dominio il raggio del suo diametro critico deve essere pari o inferiore a

$$R_{sd} = \frac{36\sqrt{AK}}{\mu_0 B_s^2} \quad (2.3)$$

dove A è la costante di scambio, K è la costante di anisotropia e B_s è la magnetizzazione di saturazione. Ciò si traduce in un diametro mediamente attorno ai 10-20 nm circa [3]. In tali condizioni si può osservare come un materiale ferromagnetico

possa avere proprietà simili a quelle di materiali paramagnetici **pur rimanendo al di sotto della temperatura di Curie**. Il grafico dimostra inoltre che oltre un determinato diametro le nanoparticelle che non presentano più singoli domini diventano multi-dominio, presentando un picco del campo coercitivo in corrispondenza del diametro critico. Va aggiunto che il comportamento magnetico di tali particelle dipende anche dalla loro temperatura: *...le nanoparticelle magnetiche mostrano un'alto livello di saturazione magnetica a temperatura ambiente in un campo magnetico esterno ma esso scompare quando viene rimosso dall'agitazione termica*. [2] Ciò è dovuto ad un altro parametro importante che caratterizza i materiali per nanoparticelle magnetiche, ovvero la **temperatura di Néel**: essa viene definita come la temperatura oltre la quale i domini magnetici perdono il loro ordinamento rendendo quindi il materiale paramagnetico.

2.3 Rilassamento e riscaldamento delle nanoparticelle

Le nanoparticelle sottoposte a un campo magnetico tempo-variante con frequenza adeguata si scaldano grazie a due principali fenomeni: il primo, il **rilassamento di Néel**, è legato alla rotazione del momento del dipolo magnetico e permette di rilasciare l'energia assorbita tramite rilassamento dei momenti magnetici mentre il secondo, il **rilassamento Browniano**, si verifica quando la frequenza del campo magnetico è più alta del periodo di rilassamento magnetico della particella e provoca la rotazione dell'intera nanoparticella.

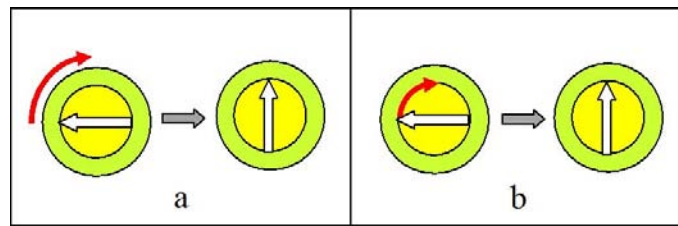


Figura 2.5: a) rilassamento browniano b) rilassamento di Néel

I diversi tempi di rilassamento della particella sono dati dalle seguenti relazioni:

$$\text{(rilassamento di Néel)} \quad \tau_N = \tau_0 e^{\frac{KV_M}{kT}} \quad (2.4)$$

$$\text{(rilassamento Browniano)} \quad \tau_B = \frac{3\eta V_H}{kT} \quad (2.5)$$

$$\text{(tempo di rilassamento totale)} \quad \tau = \frac{\tau_N \tau_B}{\tau_N + \tau_B} \quad (2.6)$$

dove τ_0 vale $10^{-9}s$, K è la costante di anisotropia, V_M è il volume della particella senza coating, k è la costante di Boltzmann, T è la temperatura, η è la viscosità e V_H , detto volume idrodinamico, è dato da:

$$V_H = \left(1 + \frac{\delta}{r}\right)^3 V_M \quad (2.7)$$

con r uguale al raggio della nanoparticella e δ lo spessore del coating. Conoscere i diversi tempi di rilassamento torna utile poiché è possibile conoscere la potenza prodotta dal rilassamento delle nanoparticelle e la conseguente densità di potenza prodotta. Conoscendo le caratteristiche delle particelle e della sorgente del campo è possibile stimare la densità di potenza prodotta utilizzando la seguente formula:

$$P = \pi\mu_0 H_0^2 \chi'' f \quad [W/m^3] \quad (2.8)$$

con μ_0 costante di permeabilità magnetica nel vuoto, χ'' parte immaginaria della suscettività, H ampiezza del campo magnetico e f la sua frequenza. χ'' può essere calcolato come:

$$\chi'' = \frac{\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \chi_0 \quad (2.9)$$

con χ_0 detta suscettività in equilibrio.

Da ciò può essere utile calcolare lo **Specific Absorption Rate** (S.A.R.), ovvero la quantità di energia che può assorbire un corpo esposto a un campo elettromagnetico; esso è definito come

$$S.A.R. = \frac{P}{\rho\varphi} \quad [W/kg] \quad (2.10)$$

con φ pari alla concentrazione di nanoparticelle e ρ pari alla densità del tessuto.

2.4 Materiali per sintesi di nanoparticelle

Di seguito verranno elencati alcuni dei materiali eligibili per l'utilizzo nell'ambito della magnetofluidoipertermia. Affinché tali materiali possano essere utilizzati devono avere alcuni importanti requisiti quali:

- minima tossicità per l'organismo
- buone proprietà magnetiche
- buona lavorabilità (facilità di sintesi e funzionalizzazione)

Normalmente per la prima caratteristica vengono impiegati **ossidi di metalli** poiché l'ossido che normalmente si forma da tali metalli funziona sia da protezione

dalla corrosione (si dice che il metallo si passiva) sia da interfaccia con l'ambiente circostante - essendo poco reattivo previene un'eccessiva risposta del sistema immunitario tramite infiammazione; le nanoparticelle sono dunque solitamente interamente costituite da ossido metallico opportunamente rivestito. Certi strati di ossidi vengono spesso utilizzati in campo biomedico per esempio nell'ambito protesico, dove ossidi come il TiO_2 non solo risultano biocompatibili ma addirittura, nel caso di protesi endossee, favoriscono il legame con l'osso stesso. Per quanto riguarda le proprietà magnetiche delle nanoparticelle si fa uso preferibilmente di metalli come ferro, nickel, cobalto o loro leghe, ma per le proprietà specificate sopra vengono utilizzati maggiormente gli ossidi di tali metalli.

METALLI - Fe, Ni, Co: il **nickel** è un metallo estraibile da minerali come la *limonite nichelifera* ($NiO(OH)$) o la *garnierite*¹, presenta un colore argenteo ed è duttile, resiste bene a corrosione e lavorazioni ad alte temperature; purtroppo in diverse occasioni è stato constatato che soggetti a diretto contatto con il nickel abbiano sviluppato una reazione allergica a tale metallo, motivo che ha portato al suo progressivo abbandono. Più utilizzati sono invece **ferro** e **cobalto**, entrambi con temperatura di Curie molto elevata ($T_c > 1000$ K) e con note proprietà ferromagnetiche; il ferro in particolare viene maggiormente utilizzato per la sua facile reperibilità e lavorazione. Il problema più importante nella sintesi di nanoparticelle puramente metalliche consiste nella lavorazione senza che esse si ossidino o vengano corrose dall'ambiente circostante; inoltre i metalli puri sono estremamente più reattivi, motivo per cui si preferisce utilizzare gli ossidi metallici.



(a) Nickel



(b) Cobalto



(c) Ferro

¹Minerale a composizione non ben definita, corrispondente alla struttura del talco ($H_2Mg_3(SiO_3)_4$ oppure $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$) con una parziale sostituzione degli ioni Mg^{2+} con ioni Ni^{2+}

LEGHE METALLICHE: tra le diverse leghe metalliche utilizzabili per la sintesi di nanoparticelle si citano:

- Ferro - Cobalto: è una lega ferromagneticamente dura² spesso utilizzata nella creazione di magneti a bassa rimanenza; nel caso delle nanoparticelle la saturazione magnetica raggiunge il valore massimo col 40% di cobalto. Particelle di questo tipo hanno un momento magnetico più intenso, quindi pur in concentrazioni minori possono scaldare similmente a delle nanoparticelle costituite da ossidi di ferro [6].
- Ferro - Nickel: queste leghe possono essere paramagnetiche o meno a seconda delle quantità utilizzate dei due materiali, solitamente con il 37% di nickel e il 63% di ferro si hanno magneti morbidi. Nanoparticelle costituite di questa lega presentano bassa temperatura di Curie e bassa saturazione magnetica, motivo per cui possono operare in un ampio intervallo di temperatura.
- Ferro - Platino: la lega ferro-platino ha trovato recentemente moltissime applicazioni nei dispositivi elettronici (ad esempio supporti di memoria) poiché leghe di questo tipo presentano un campo coercitivo molto alto che può essere mantenuto anche ad alte temperature; solitamente le nanoparticelle ottenibili con questa lega hanno un campo coercitivo e una saturazione magnetica tali da poter essere usate efficacemente anche per diametri molto ridotti in genere superiori ai 6 nm.

OSSIDI DI FERRO: le nanoparticelle in ossidi di ferro sono le più sfruttate in ambito biomedico per le molte caratteristiche che le contraddistinguono:

- controllabilità del processo di sintesi (allo scopo di ottenere particelle di dimensioni omogenee)
- biocompatibilità
- ottime proprietà magnetiche

Generalmente questo tipo di particelle si divide in due categorie, le **Ultra Small Paramagnetic Iron-Oxide Nanoparticles** (USPION) per nanoparticelle con diametro inferiore ai 40 nm e le **Small Paramagnetic Iron-Oxide Nanoparticles** (SPION) per nanoparticelle di diametro superiore [2]. I composti prediletti nella sintesi sono principalmente due, la **magnetite** (Fe_3O_4) e la **maghemite** ($\gamma\text{-}Fe_2O_3$).

²Si definisce duro un materiale ferromagnetico con un alto valore di coercitività (≥ 10.000 A/m)

La **maghemite** ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) è un ossido di colore variabile dal grigio-blu al bianco o al marrone e si forma per *meteorizzazione*, un processo di formazione delle rocce simile alla sedimentazione con la differenza che i sedimenti vengono alterati chimicamente. Ha comportamento ferromagnetico e un'alta temperatura di Néel (circa 950 K), caratteristiche che assieme all'alta biocompatibilità la rendono uno dei materiali ottimi per la realizzazione di nanoparticelle.

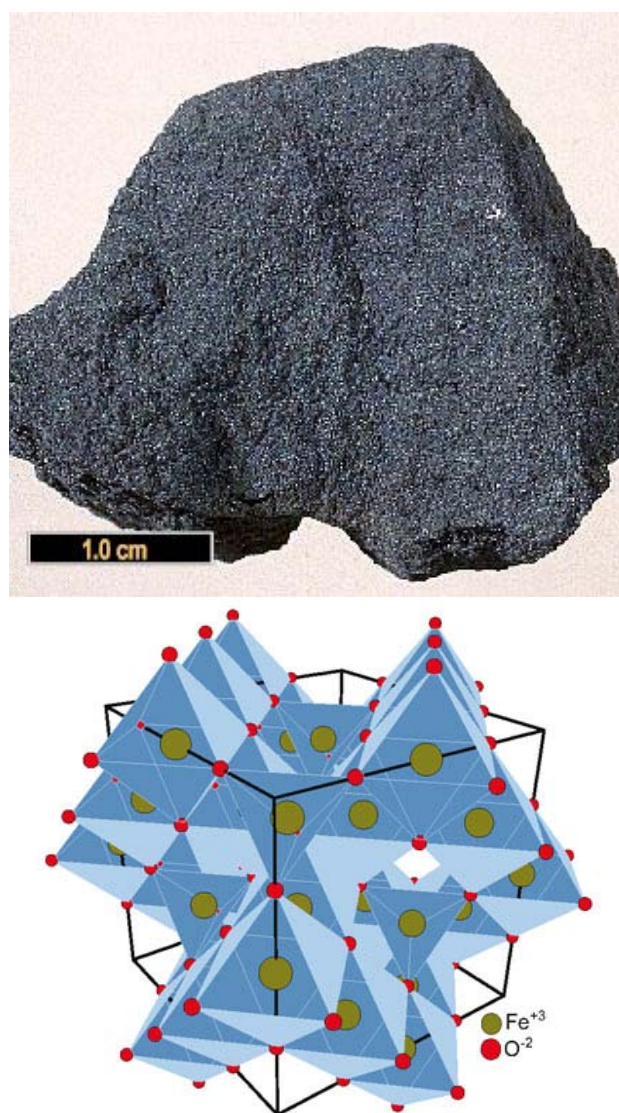


Figura 2.7: una roccia in maghemite e la sua struttura cristallina.

Solitamente le nanoparticelle in maghemite si ottengono tramite un processo detto coprecipitazione: tale processo consiste nel portare a 200°C - 300°C una soluzione di FeCl_3 e FeCl_2 idrati e idrossido d'ammonio NH_4OH . Dopo aver opportunata-

mente essiccato e trattato il prodotto per renderlo idrosolubile si ottengono delle particelle molto solubili in acqua ma insufficientemente magnetiche e quindi con scarso potere scaldante.

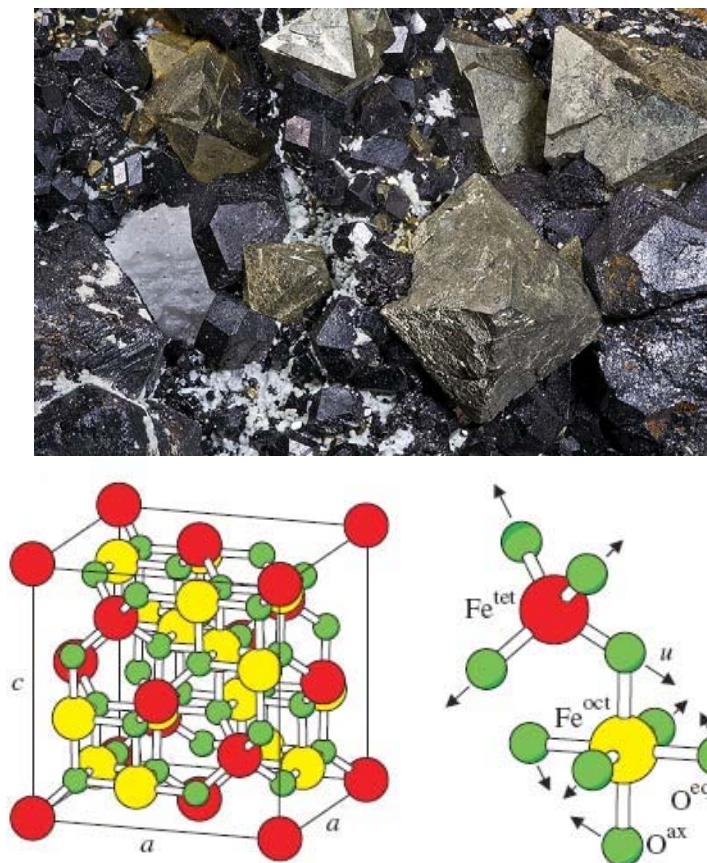


Figura 2.8: una roccia in magnetite e la sua struttura cristallina.

Anche la **magnetite** (Fe_3O_4) è un ossido diffuso ed uno dei più utilizzati in ambito siderurgico per l'estrazione del ferro. Presenta un colore grigiastro e si trova in agglomerati ottaedrici, come in fig. 2.8.

Come si evince dal nome stesso, ha carattere ferromagnetico e una temperatura di Curie di circa 858 K. Viene utilizzata spesso nella preparazione di nanoparticelle magnetiche poiché la produzione di nanoparticelle con questo composto porta solitamente ad ottenere un prodotto di buona qualità con ottime proprietà superparamagnetiche e con alto potere scaldante.

Capitolo 3

Utilizzo delle nanoparticelle in ambito biomedico

3.1 Multimodal imaging

Uno degli ambiti di utilizzo delle nanoparticelle consiste nell'*analisi non-invasiva della materia tramite risonanza magnetica* o **MRI** (Magnetic Resonance Imaging), basata sul rilassamento dello spin dei protoni quando questi vengono investiti da un campo magnetico a radiofrequenza.

Hyeon et al. [7] hanno sintetizzato delle nanoparticelle in ossido di ferro opportunamente ricoperte di *polietilenglicole* (PEG) e successivamente iniettate come mezzo di contrasto in una cavia da laboratorio con un melanoma, ottenendo un'immagine più definita del tumore.

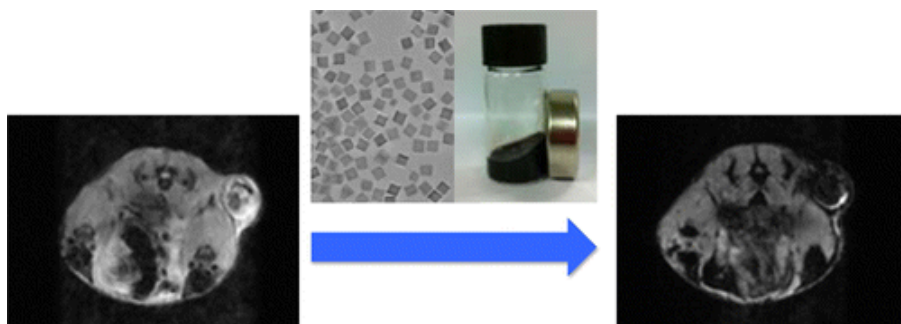


Figura 3.1: l'immissione di nanoparticelle migliora notevolmente la definizione dell'immagine

Uno dei problemi che si presenta nell'ambito dell'imaging biomedico consiste nel prevenire la **formazione di aggregati** di nanoparticelle in zone localizzate dei tessuti ad opera del *sistema reticolo endoteliale* mentre invece si desidera una più

uniforme distribuzione delle nanoparticelle nel tessuto interessato.

Per ovviare a questo problema Cheng et al. [8] hanno sviluppato delle particolari micelle composte da nanoparticelle magnetiche ricoperte in PEG e poli(3-caprolattone) funzionalizzate con acido folico affinché queste si legassero alla massa tumorale sfruttando il processo di infiammazione sviluppato da essa, distribuendosi uniformemente sulla neoplasia e migliorando notevolmente la qualità dell'immagine, implicando quindi una migliore diffusione delle micelle nel sito tumorale (figura 2.2).

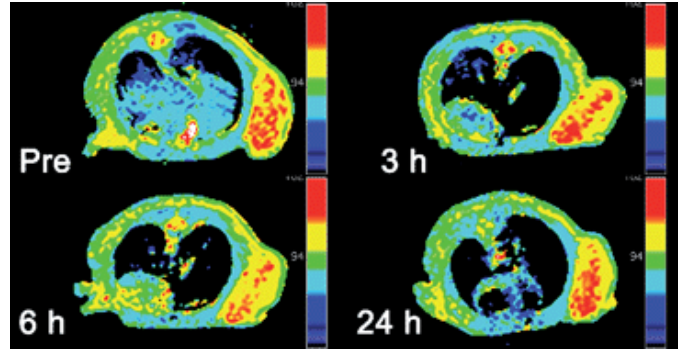
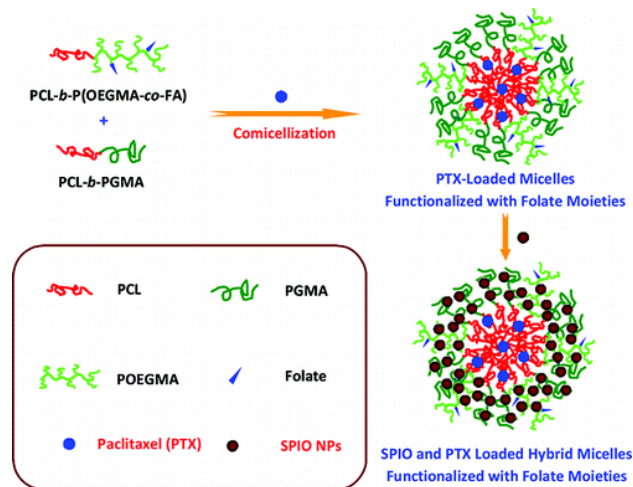


Figura 3.2: miglioramento dell'immagine tramite USPIO ricoperte con PEG, poli(3-caprolattone) e acido folico.

3.2 Nanoparticelle come vettori per il trasporto di farmaci

Un secondo ambito di applicazione delle nanoparticelle magnetiche è quello dei vettori per il trasporto di farmaci.

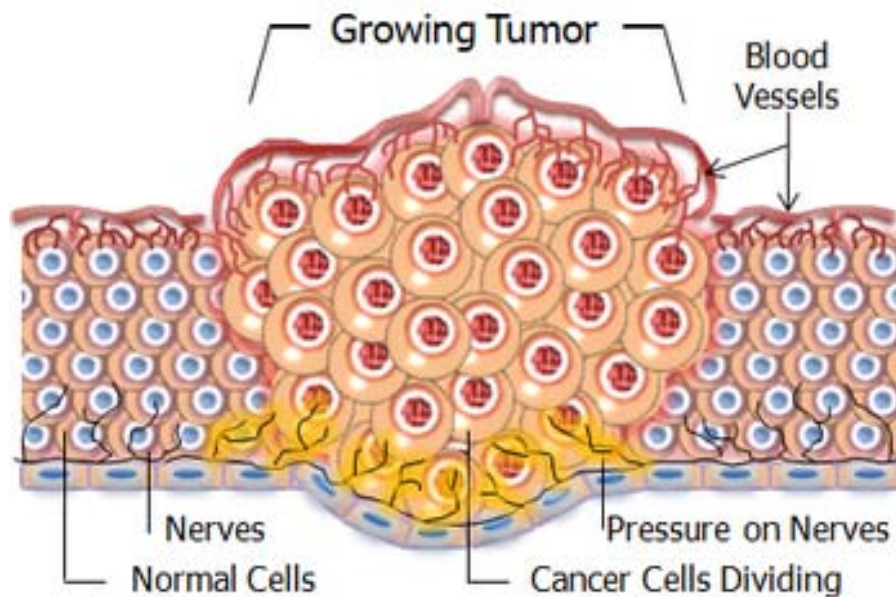


Analogamente a come avviene nella risonanza magnetica, le nanoparticelle possono essere opportunamente funzionalizzate con gruppi atti a farle riconoscere dal sito malato e con molecole biologicamente attive (farmaci) per il suo trattamento. Le nanoparticelle magnetiche fungono da mezzo per facilitare il trasporto e il deposito delle molecole attive attraverso la guida generata tramite un campo magnetico esterno opportunamente calibrato.

3.3 Ipertermia magnetofluida

3.3.1 Le cellule tumorali

Un terzo ed importante ambito di utilizzo delle nanoparticelle consiste nel trattamento delle **neoplasie** attraverso la tecnica dell'ipertermia magnetofluida. Generalmente, ciò che distingue le cellule tumorali dalle cellule sane è la loro **crescita incontrollata**: il meccanismo che regola la loro morte e riproduzione viene alterato (da cause esterne o meno) portando così a un accumulo di cellule malate [5].



Questo accumulo può portare patologie dovute alla pressione dei tessuti circostanti il tumore od occlusioni e, nel caso alcune delle cellule finiscano nel flusso sanguigno, queste possono dare origine a nuove masse tumorali.

Si possono distinguere due tipi di tumore, benigno e maligno. Nel caso di un **tumore benigno** le cellule malate conservano gran parte delle funzionalità originarie, sono facilmente localizzabili, incrementano la funzionalità dell'organo colpito (*iperfun-*

zionalità) e nella maggior parte dei casi quando vengono asportate si ripresentano difficilmente. I **tumori maligni** invece sono più difficili da localizzare poiché tendono a diffondersi rapidamente nell'organismo, le loro cellule perdono quasi tutte le funzionalità originarie - portando quindi in questo caso a *ipofunzionalità* - e si ripresentano spesso anche dopo la loro asportazione. Solitamente, i trattamenti per le neoplasie prevedono l'utilizzo di farmaci come il cisplatino (**chemioterapia**), l'utilizzo di radiazioni ionizzanti (**radioterapia**) o l'asportazione chirurgica; in alcuni casi i trattamenti normalmente utilizzati in clinica possono essere coadiuvati dal riscaldamento della massa tumorale (**ipertermia**).

3.3.2 Riscaldamento delle cellule tumorali

Il trattamento termico dei tumori è una pratica relativamente recente che ha cominciato a svilupparsi ampiamente nel XX secolo e si classifica a seconda dell'ampiezza della regione trattata in ipertermia locale, ipertermia regionale e whole-body.

Nell'**ipertermia locale** viene interessato solamente il tessuto della neoplasia: in questo caso si ricorre a microonde o ad onde radio per scaldare la massa tumorale; in particolare, se essa si trova in superficie allora si può parlare di **ipertermia superficiale** mentre se è necessario l'utilizzo di sonde o aghi allora si parla di **ipertermia interstiziale**.

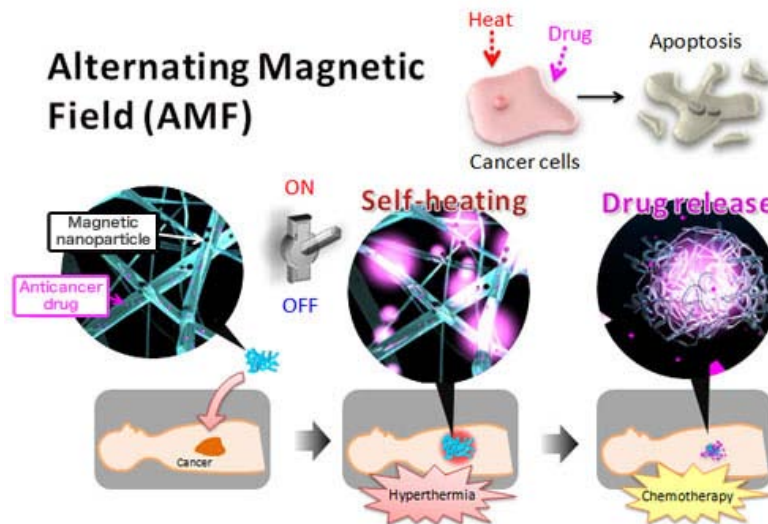


Figura 3.3: Un paziente sotto trattamento per ipertermia regionale

Nel caso dell'**ipertermia regionale** si innalza anche la temperatura della zona circostante la neoplasia, come ad esempio l'intero organo interessato o l'arto. Le modalità di riscaldamento possono essere le stesse dell'ipertermia locale oppure si può operare mediante **perfusione**, ovvero si estrae una moderata quantità di sangue, la si riscalda e la si inietta nella zona di interesse.

Infine c'è la cosiddetta **whole-body hyperthermia**, ovvero si riscalda l'intero corpo del paziente tramite apposite coperte o altre sorgenti di calore; questo tipo di trattamento è utilizzato spesso nel caso di metastasi multiple diffuse nel corpo e quindi complesse da trattare singolarmente.

I trattamenti descritti sono tutti della durata di alcune ore.

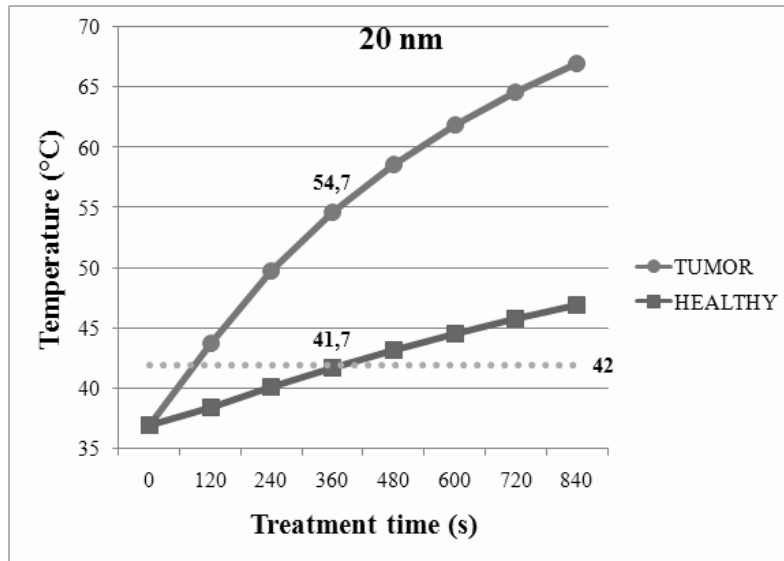


captionil seguente grafico mostra i diversi andamenti della temperatura in funzione della durata del trattamento e a seconda del tipo di cellula.

Il principio su cui si basa il trattamento consiste nella diversa reazione delle cellule tumorali ad alte temperature rispetto alle cellule sane: queste ultime infatti se scaldate oltre la normale temperatura corporea (circa 37°C) riescono a smaltire efficacemente il calore in eccesso tramite la loro struttura vascolare interna.

Questa struttura vascolare nelle cellule malate è invece alterata, di conseguenza il riscaldamento eccessivo delle stesse porta ad **apoptosi**, un processo naturale delle cellule che le porta a una morte programmata. Il vantaggio e la differenza rispetto alla morte traumatica delle cellule (**necrosi**) è che l'apoptosi porta la cellula a disgregarsi in piccoli frammenti detti frammenti apoptotici che possono essere fagocitati e smaltiti più facilmente dai fagociti. Normalmente il processo di apoptosi avviene attorno ai 41°C - 46°C , mentre a temperature più elevate le cellule vanno incontro a necrosi termica.

L'innovazione portata dal riscaldamento tramite nanoparticelle consiste nella estrema localizzazione del riscaldamento al solo punto interessato, poiché come già detto le nanoparticelle possono essere trattate non solo per essere rese idrosolubili ma anche per **riconoscere e legarsi esclusivamente con le cellule malate ignorando le cellule sane**.



Il trattamento tramite nanoparticelle può essere multiplo: assieme a esse può essere legato un farmaco per il trattamento della neoplasia, così da sfruttare contemporaneamente chemioterapia e ipertermia; normalmente questo tipo di trattamento si affianca sempre alle altre già citate terapie.

Capitolo 4

Sintesi e funzionalizzazione di nanoparticelle

4.1 Metodi di sintesi

Per la sintesi di nanoparticelle esistono diverse possibili tecniche, le più diffuse delle quali sono:

- co-precipitazione
- decomposizione termica
- microemulsione
- sintesi idrotermale
- sonochimica

Di seguito verranno analizzate alcune di queste.

4.1.1 DECOMPOSIZIONE TERMICA

La decomposizione termica si basa sulla **pirolisi di complessi metallici**¹ utilizzati come precursori trattati in presenza di acido oleico e oleilammina². Tale procedura porta spesso alla produzione di nanoparticelle di alta qualità, monodisperse e di dimensioni facilmente regolabili in fase di produzione; la buona riuscita

¹Solitamente si utilizza $[\text{Me}(\text{acac})_x]$, ovvero un metallo acetilacetato; è possibile utilizzare composti come $[\text{Me}(\text{CO})_x]$ ovvero complessi carbonilici metallici per delle nanoparticelle di qualità superiore, però tali composti sono pericolosi da utilizzare perché tossici.

²Tali composti servono a prevenire l'aggregazione delle nanoparticelle.

di questo metodo dipende da quella che viene definita come *nucleazione controllata in una soluzione supersatura*, ottenibile tramite parametri come il controllo della temperatura di reazione e velocità di riscaldamento.

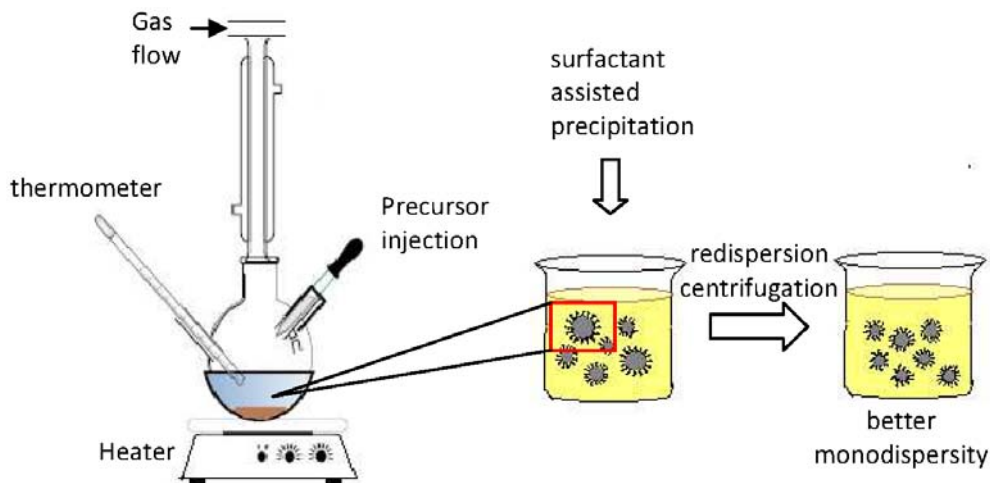


Figura 4.1: schema per sintesi tramite decomposizione termica.

Per quanto riguarda la velocità di riscaldamento esistono due diversi approcci: uno consiste nell'iniezione del complesso metallico nella soluzione di base già calda, l'altro consiste nel riscaldare gradualmente tutti i componenti della soluzione; quest'ultimo approccio richiede maggiori attenzioni poiché per la buona riuscita risulta necessario miscelare attentamente la soluzione e soprattutto innalzare con precisione la temperatura senza sbalzi eccessivi. Durante la procedura è importante portare la miscela a riflusso, ovvero applicare un condensatore ad acqua per evitare che evapori il solvente dalla soluzione.

4.1.2 COPRECIPITAZIONE

Il metodo di sintesi per coprecipitazione porta alla produzione di nanoparticelle di forma prevalentemente sferica; solitamente si miscelano **sali metallici** (per esempio cloruro ferrico (FeCl_3) e cloruro ferroso (FeCl_2)) in una **soluzione acquosa alcalina** (per esempio idrossido d'ammonio NH_4OH) e si fanno precipitare così le nanoparticelle che vengono poi tirate a secco. Tale procedura richiede un attento controllo del pH, del rapporto molare delle sostanze usate e dell'ambiente in cui sono messe a miscelare: infatti in un ambiente troppo ricco di ossigeno tali particelle tendono a ossidarsi nel più stabile $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. La coprecipitazione è attualmente l'opzione più scelta nella produzione industriale di nanoparticelle idrosolubili poiché presenta molti vantaggi pratici quali rapidità di produzione, condizioni di reazione,

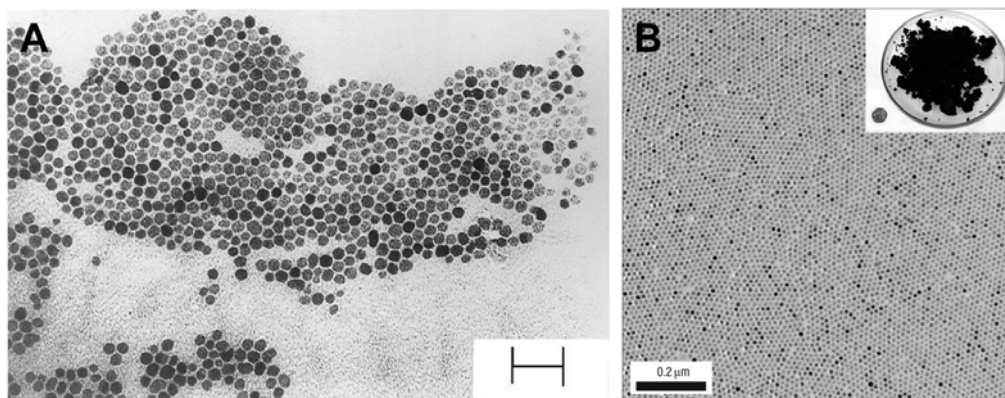


Figura 4.2: immagini al TEM di nanoparticelle per coprecipitazione.

rapporto qualità-prezzo e scalabilità per sistemi industriali³.

Le nanoparticelle ottenute in queste condizioni in genere mancano di un'adeguata protezione e possono subire facilmente ossidazione richiedendone l'utilizzo in tempi ridotti dalla sintesi.

4.1.3 METODO SOLVOTERMALE - IDROTERMALE

Questo particolare processo si pone l'obiettivo di dissolvere sostanze a bassa solubilità in una soluzione acquosa ad alta temperatura e a pressioni elevate. Solitamente si utilizzano solventi organici quali **polialcoli** e la soluzione viene posta in un autoclave e portata fino a 200°C per diversi giorni; durante questo processo l'alta temperatura porta ad un aumento di pressione che favorisce la solubilità, la cristallinità e la reattività delle nanoparticelle prodotte. Per produrre nanoparticelle per via solvotermale si utilizzano sempre sali metallici (come il prima citato cloruro ferrico) fatti reagire con **etilene glicole** e **acetato di sodio** per prevenire la formazione di aggregati di nanoparticelle; il prodotto risulta essere altamente solubile in acqua e facilmente trattabile per la copertura tramite peptidi, proteine o acidi nucleici. Gli svantaggi di questa procedura consistono principalmente nella necessità di dover usufruire di apposite apparecchiature resistenti ad alte temperature e pressioni (autoclave), nel difficile controllo della temperatura, nella lentezza di produzione e nell'ottenimento di nanoparticelle relativamente grandi (mediamente, il diametro si aggira attorno 200 - 800 nm).

³Per scalabilità si intende la capacità di un sistema di crescere o decrescere a seconda delle esigenze.

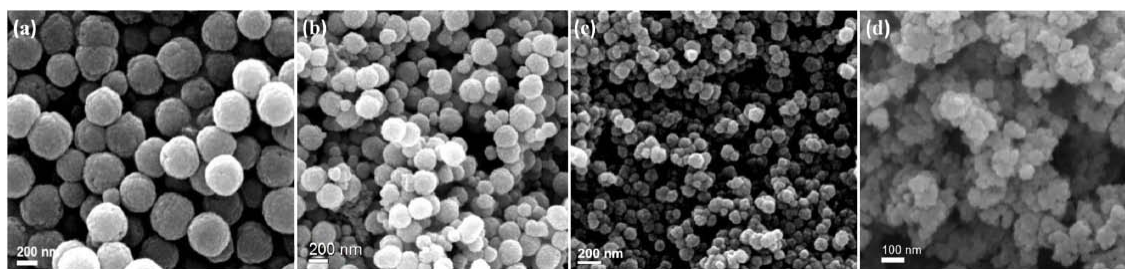


Figura 4.3: immagini TEM di nanoparticelle ottenute con metodo solvotermale.

4.1.4 SINTESI PER RIDUZIONE DI METALLI

Mentre nella decomposizione termica vengono utilizzati precursori organometallici piuttosto instabili, nella sintesi per riduzione vengono invece utilizzati **precursori stabili** quali ossidi, nitrati, cloruri o acetati; per tali composti si utilizzano come agenti riducenti sostanze come il sodio boroidruro (NaBH_4).

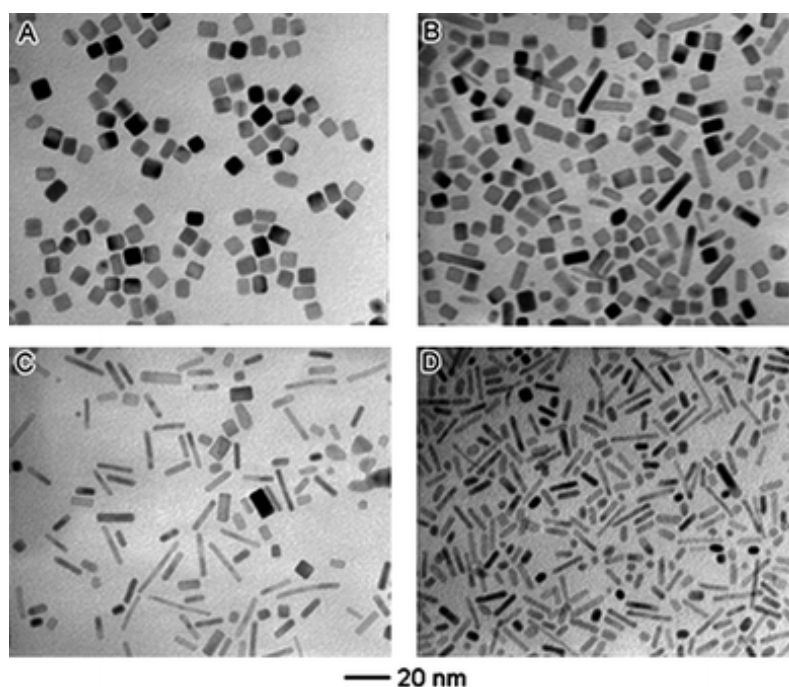


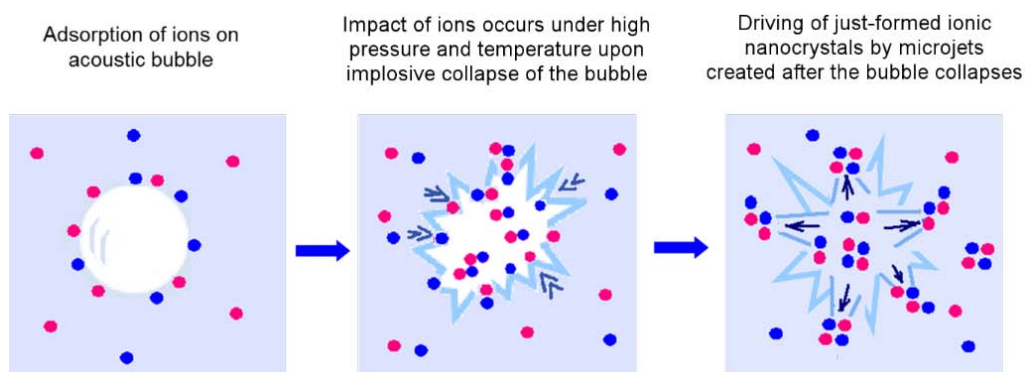
Figura 4.4: Alcuni esempi di nanoparticelle sintetizzate tramite riduzione.

Questo tipo di reazione ha suscitato parecchio interesse di recente poiché può essere utilizzato nella produzione di materiali ferromagnetici utilizzati per la produzione di magneti duri ad alta efficienza composti da leghe con terre rare come ad esempio cobalto e samario, SmCo_5 ; si rivela poi particolarmente interessante l'utilizzo di polialcoli perché tale classe di sostanze dimostra una certa versatilità sia come tensioattivo, sia come agente riducente, sia come solvente.

Combinando la sintesi per riduzione e la termodecomposizione è possibile produrre nanoparticelle in lega, ad esempio ferro-platino, portando contemporaneamente il ferro pentacarbonile ($[\text{Fe}(\text{CO})_5]$) a decomposizione per termolisi e il platino acetilacetato ($[\text{Pt}(\text{acac})_2]$) alla riduzione in presenza di 1,2-esadecanediolo. Il risultato sono delle nanoparticelle con un diametro che va dai 20 ai 200 nm, diametro che può essere parzialmente regolato dosando opportunamente il ferro pentacarbonile.

4.1.5 SINTESI SONOCHIMICA:

la sintesi sonochimica prevede l'utilizzo di ultrasuoni in un liquido per causare un fenomeno noto come **cavitazione**, ovvero la formazione e l'implosione di piccole bolle. All'interno di queste bolle è stato osservato che tramite compressione o generazione di onde d'urto si riesce a raggiungere (anche se per breve tempo) temperature fino a 5000 K e pressioni di 1800 atm [10]. Questo procedimento, seppur facilmente realizzabile in tempi brevi (qualche ora), porta alla produzione di nanoparticelle di qualità non troppo elevata con basso potere scaldante.



4.2 Metodi di funzionalizzazione

Le caratteristiche chimiche e fisiche comuni ai diversi tipi di nanoparticelle (dimensione, composizione, densità di energia prodotta, ...) le rendono ideali per l'utilizzo in ambito biomedico, però essendo spesso stabilizzate da tensioattivi apolari come l'acido oleico e l'oleilamina esse risultano essere **idrofobe**. Ciò costituisce un grosso problema per un'altra importante caratteristica delle nanoparticelle, ovvero la loro solubilità in soluzioni acquose come l'ambiente biologico umano.

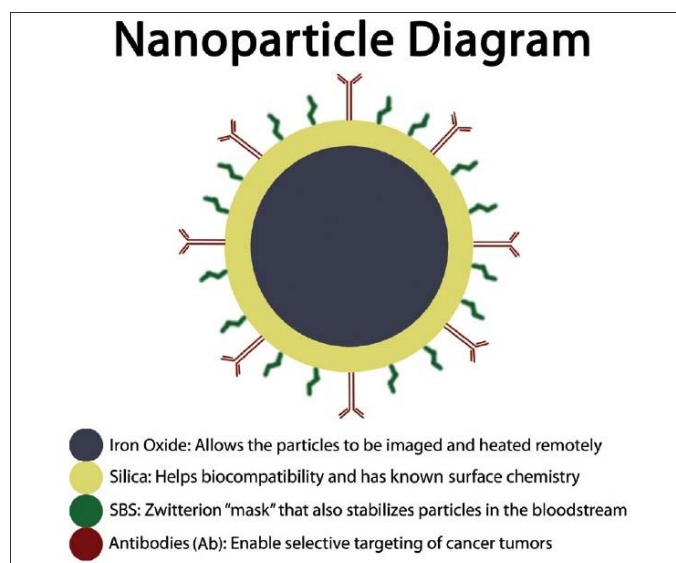


Figura 4.5: Uno schema di nanoparticella funzionalizzata: attorno al nucleo di ossido di ferro vi è uno strato protettivo in silice altamente biocompatibile con degli anticorpi specifici per legarsi alle cellule tumorali.

Per ovviare a questo problema si ricorre quindi a un processo detto **funzionalizzazione** che consiste nel trattare ulteriormente le nanoparticelle con sostanze che vi si leghino rendendole **idrofile**. Tali molecole devono quindi essere dotate di una parte idrofoba per interagire con il coating idrofobo già presente e dei gruppi polari esterni che la rendano idrofila. La funzionalizzazione **additiva** si ottiene tramite l'assorbimento di tensioattivi anfipatici⁴, formando quindi un doppio strato idrofobo sulla superficie e uno idrofilo esterno a contatto con l'ambiente circostante la nanoparticella, mentre la funzionalizzazione **sostitutiva** riesce a rimuovere molecole di tensioattivo dalla superficie legandosi quindi con il materiale stesso che compone la nanoparticella. Esistono diversi materiali che possono essere utilizzati per il coating: solitamente si utilizzano lipidi, proteine, destrani, PEG o acido dimercaptosuccinico

⁴Una sostanza è detta anfipatica quando presenta un'estremità polare e una apolare; ne sono un esempio i fosfolipidi che compongono la membrana cellulare

(DMSA). In particolare, è stato osservato che nanoparticelle in lega ferro-cobalto ricoperti di grafite si legano in maniera ottimale al PEG, portando quindi a un prodotto altamente biocompatibile, solubile e con un elevato momento magnetico.

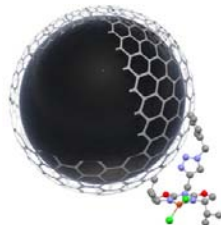


Figura 4.6: Schema di una nanoparticella ricoperta di grafite e PEG

4.3 Analisi delle nanoparticelle

L'analisi accurata delle nanoparticelle è uno degli aspetti più importanti nel loro processo di sintesi delle nanoparticelle perché permette di ottenere tutte le informazioni necessarie alla caratterizzazione fisica e chimica delle stesse.

Per quanto riguarda le informazioni circa le dimensioni si utilizza un **microscopio a trasmissione elettronica** (o **TEM**): si tratta di uno strumento ad alto voltaggio (l'ordine di grandezza va dai 50 ai 200 kV circa) le cui immagini sono ottenute grazie all'opacità dei materiali agli elettroni; essendo l'aria stessa opaca ai fasci di elettroni si rivela quindi necessaria una **camera a vuoto** nella quale porre il campione in esame che verrà poi investito dal fascio di elettroni. [11]

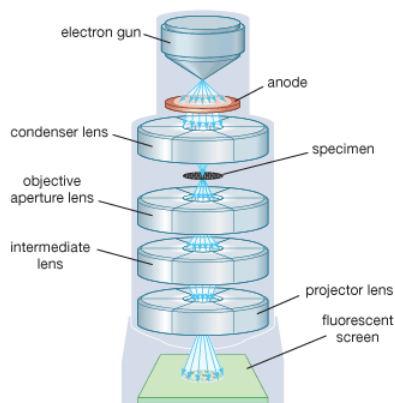


Figura 4.7: Schema e immagine di un TEM: nella figura a destra, di fianco alla camera per il vuoto, viene inserito un serbatoio riempito di azoto liquido per raffreddare lo strumento

I campioni di nanoparticelle da analizzare vanno prima diluiti in un solvente (nel caso di nanoparticelle ricoperte di DMSA, il solvente è l'acqua), poi si preleva una piccola goccia e la si deposita su un reticolo circolare in rame ricoperto con un sottile film di carbonio e si lascia asciugare il solvente. Il portacampioni viene poi inserito in un supporto che viene collocato nella camera a vuoto: a questo punto una pompa genera il vuoto spinto all'interno della camera e viene indirizzato un fascio di elettroni da un apposito cannone verso un anodo che spinge gli elettroni attraverso il campione e in una serie di lenti. Queste lenti sono solitamente dei **campi elettromagnetici** opportunamente calibrati per far divergere o convergere il fascio verso uno schermo sensibile ai fotoni.

Questo strumento è in grado di raggiungere i 200.000 ingrandimenti, fino a raggiungere una risoluzione spaziale di poche decine di *nm*. Opportune barre di riferimento nelle immagini permettono di stimare le dimensioni degli oggetti presi in esame.

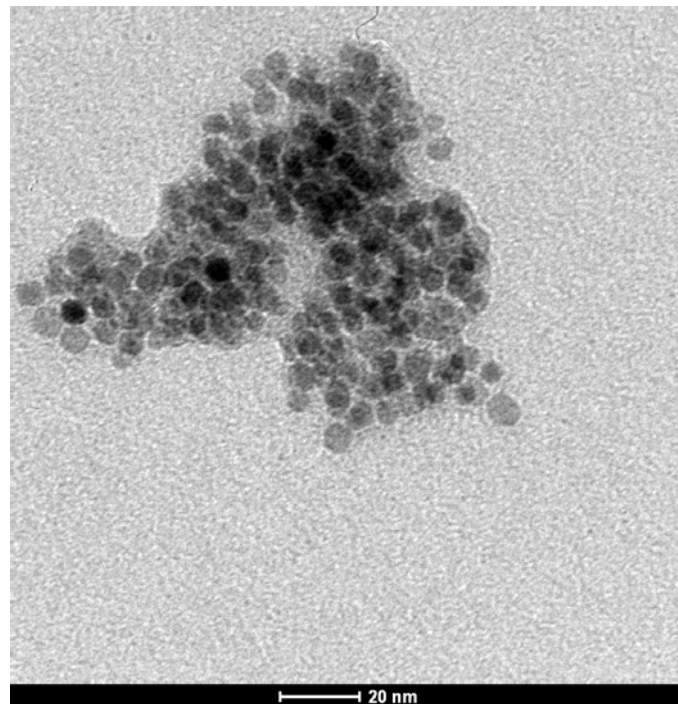


Figura 4.8: Un esempio di immagine al TEM.

Per l'analisi chimica invece viene utilizzata la **spettroscopia a raggi infrarossi** (o **spettroscopia FT-IR**). In questa tecnica il campione può essere analizzato tal quale o può essere disperso in una matrice trasparente ai raggi infrarossi. In quest'ultimo caso solitamente si macina il campione da analizzare con un'opportuna quantità di bromuro di potassio (KBr) preparando una pastiglia per compressione della miscela ottenuta.

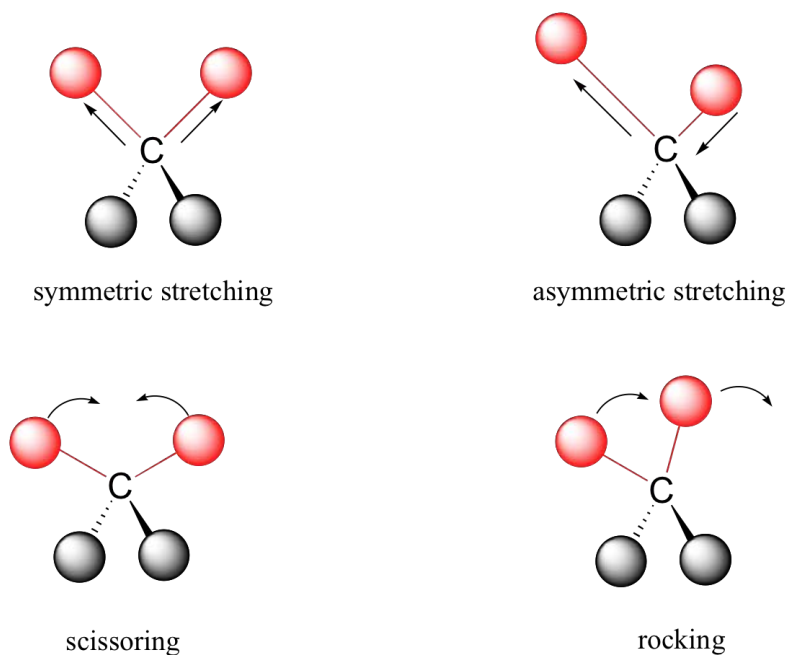


Figura 4.9: Diversi tipi di stretching in una molecola di metano

I raggi infrarossi, con una lunghezza d'onda inferiore a quella dello spettro della luce visibile, possono essere assorbiti dalle sostanze **eccitando i legami presenti tra gli atomi** e visualizzando i modi vibrazionali di questi. L'assorbimento da parte di un composto di particolari lunghezze d'onda può essere rivelato da un apposito sistema di lettura posto al di là del supporto della pastiglia.

Esistono diversi modi di vibrazione dei legami, come lo stretching simmetrico e asimmetrico, lo scissoring e rocking, ma la cosa più importante è che **ogni tipo di composto genera segnali diversi a seconda dei legami e degli elementi che lo compongono** come una sorta di impronta digitale. In figura 4.9 sono rappresentati alcuni modi vibrazionali nel caso della molecola di metano (CH_4): la radiazione infrarossa può provocare uno stiramento simmetrico o asimmetrico dei legami lungo l'asse oppure può provocare una rotazione attorno all'atomo di carbonio. In figura 4.10 invece viene raffigurato un esempio dell'attrezzatura utilizzata:



Figura 4.10: Uno spettroscopio a raggi infrarossi e la strumentazione utilizzata per la preparazione del supporto in KBr.

a sinistra c'è uno spettroscopio con collegato un pc per l'elaborazione dei dati, a destra invece c'è l'attrezzatura utilizzata per la preparazione della pastiglia.

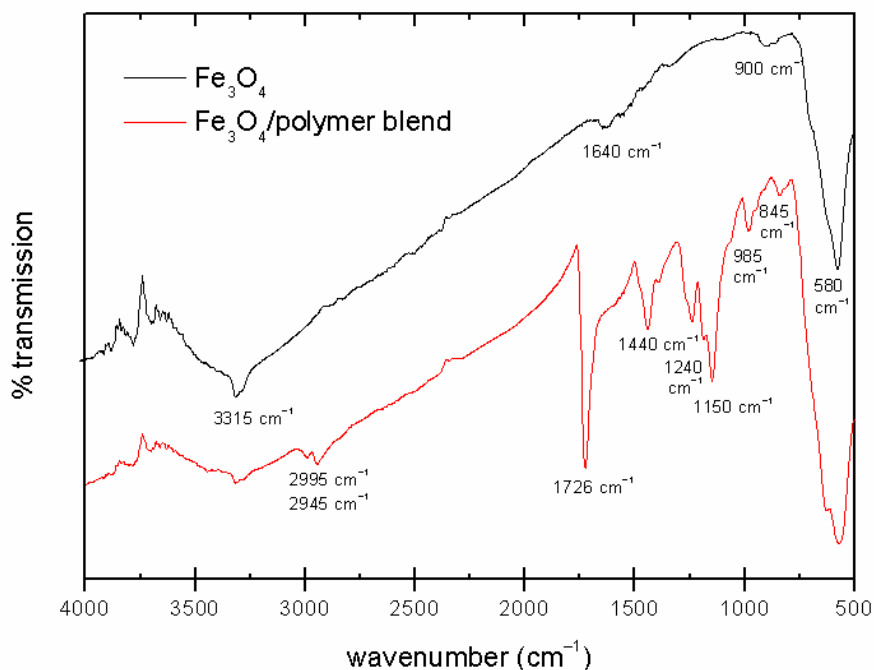


Figura 4.11: esempio di spettro FT-IR di nanoparticelle in magnetite (in ascissa abbiamo il **numero d'onda**, in ordinata la **trasmissione**).

In figura 4.11 viene riportato un esempio di spettro FT-IR di nanoparticelle in magnetite con e senza rivestimento: ogni picco rappresenta un particolare legame che reagisce in maniera unica alla radiazioni IR. Il picco a 580 cm^{-1} è tipico dei legami Fe-O, mentre il picco a 1726 cm^{-1} è tipico del doppio legame C=O. Ogni picco presente nell'analisi IR è quindi riconducibile a dei particolari legami che permettono di riconoscere la sostanza posta in esame. Sull'asse delle ascisse viene riportato il **numero d'onda** relativo alla radiazione emessa da un legame mentre

sull'asse delle ordinate viene riportata la **trasmittanza** che viene così definita:

$$T = \frac{I_o}{I_i} \quad (4.1)$$

con I_o l'intensità del fascio in uscita e I_i l'intensità del fascio in entrata. Alternativamente, è possibile avere invece l'**assorbanza** caratteristica delle sostanze; essa è definita come:

$$A = \log(I_o) - \log(I_i) \quad (4.2)$$

Capitolo 5

Sintesi di nanoparticelle: parte sperimentale

Di seguito viene riportato l'elenco dei solventi e dei reagenti utilizzati in fase sperimentale:

Tabella 5.1: Elenco dei composti utilizzati

Nome Composto	Formula	Peso Molecolare	Purezza	Produttore
Ferro acetilacetato	$\text{Fe}(\text{acac})_3$	353.17 g/mol	97%	Sigma-Aldrich
Acido Oleico	$\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}$	267.49 g/mol	$\geq 65\%$	Sigma-Aldrich
Difenil Etere	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}$	170.21 g/mol	$\geq 98.5\%$	Sigma-Aldrich
1,3-tetradecanediolo	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	282.46 g/mol	$\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Oleilamina	$\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{O}_2$	230.39 g/mol	90%	Sigma-Aldrich
DMSA	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{S}_2$	182.22 g/mol	$\geq 97.5\%$	Sigma-Aldrich
DMSO	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	78.13 g/mol	$\geq 99.5\%$	Sigma-Aldrich
Metanolo	CH_3OH	32.04 g/mol	$\geq 99.90\%$	Sigma-Aldrich
Etanolo	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	46.07 g/mol	$\geq 99.8\%$	Sigma-Aldrich
Esano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	86.18 g/mol	$\geq 94.5\%$	Sigma-Aldrich

Reagenti e solventi sono stati utilizzati direttamente come forniti dal produttore, senza ulteriori purificazioni.

5.1 Strumentazione

Gli spettri FT-IR sono stati effettuati con uno spettrofotometro FT-IR Perkin-Elmer Spectrum 100 ricavando una pastiglia per compressione di un campione slido di nanoparticelle disperse in bromuro di potassio (KBr).

L'analisi TEM stata effettuata con uno strumento TEM FEI Tecnai G12 operante a 100 kV dal Dott. Fabrizio Caicci presso il Laboratorio di Microscopia Elettronica (LME) del Dipartimento di Biologia. I campioni sono stati preparati depositando una goccia di sospensione contenente le nanoparticelle su retini di tipo "carbon coated" di rame da 400 mesh.

5.2 Sintesi delle nanoparticelle

Seguendo la procedura descritta da Sun et al. [9] si procede alla sintesi di nanoparticelle per decomposizione termica di ferro(III) acetilacetionato in presenza di acido oleico e oleilammina e loro successivo ingrandimento. Le nanoparticelle così ottenute sono successivamente trattate con acido dimercaptosuccinico per aumentarne l'idrofilicità secondo quanto descritto da Cheon et al [13]. Di seguito riportiamo nel dettaglio le procedure sperimentali e i risultati della caratterizzazione.

5.2.1 Prima fase: sintesi di nanoparticelle da 4 nm

In un pallone a tre colli da 500 ml munito di ricadere a bolle e termometro sono stati sciolti 2.83 g di $[Fe(acac)_3]$ in 80 ml di difenil-etere. Dopo aggiunta di 9.21 g di 1,3-tetradecanediolo, 7.62 ml ($d = 0.89$ g/ml) di acido oleico e 7.90 ml ($d = 0.813$ g/ml) di oleilammina si riscalda la miscela con isomantello a 200°C per 2 ore sotto agitazione meccanica. Successivamente si porta il sistema a riflusso (260°C) in atmosfera inerte di azoto per un'ora. Si lascia raffreddare la miscela marrone scuro fino a temperatura ambiente.



Figura 5.1: Reattore per la sintesi di nanoparticelle da 4 nm.

La miscela fredda è stata lavata ripetutamente con acqua distillata, etanolo, metanolo ed esano per rimuovere tracce di precursore non reagito e altri reagenti in eccesso. Le nanoparticelle così ottenute sono state essiccate sotto vuoto.



Figura 5.2: sopra nanoparticelle disperse in esano, sotto nanoparticelle essiccate

5.2.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle da 4 nm

Le nanoparticelle sintetizzate risultano perfettamente disperdibili in solventi apolari quali *n*-esano ed etere dietilico mentre risultano completamente insolubili in acqua come si vede dalla figura 5.3.



Figura 5.3: Nella figura abbiamo USPION disperse in acqua (a sx) e in esano (a dx)

Le micrografie al TEM delle nanoparticelle mostrano buona uniformità morfologica e dimensionale con diametri medi di circa 4.5 nm come mostrato in figura 5.4.

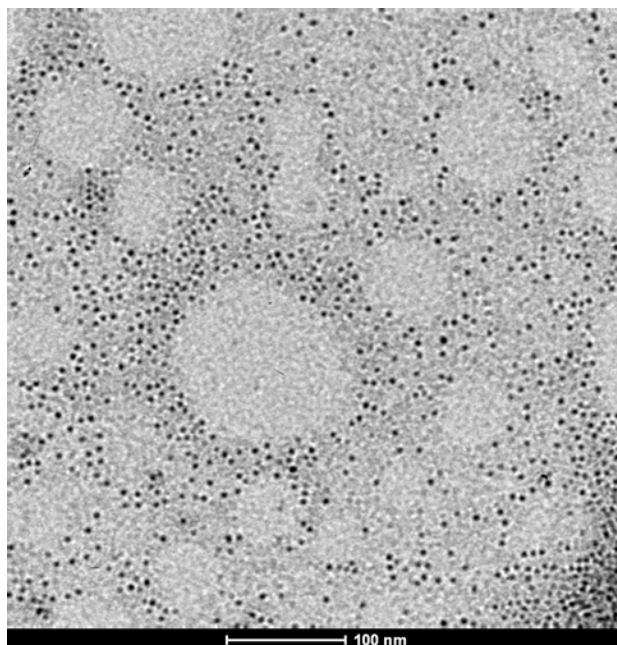
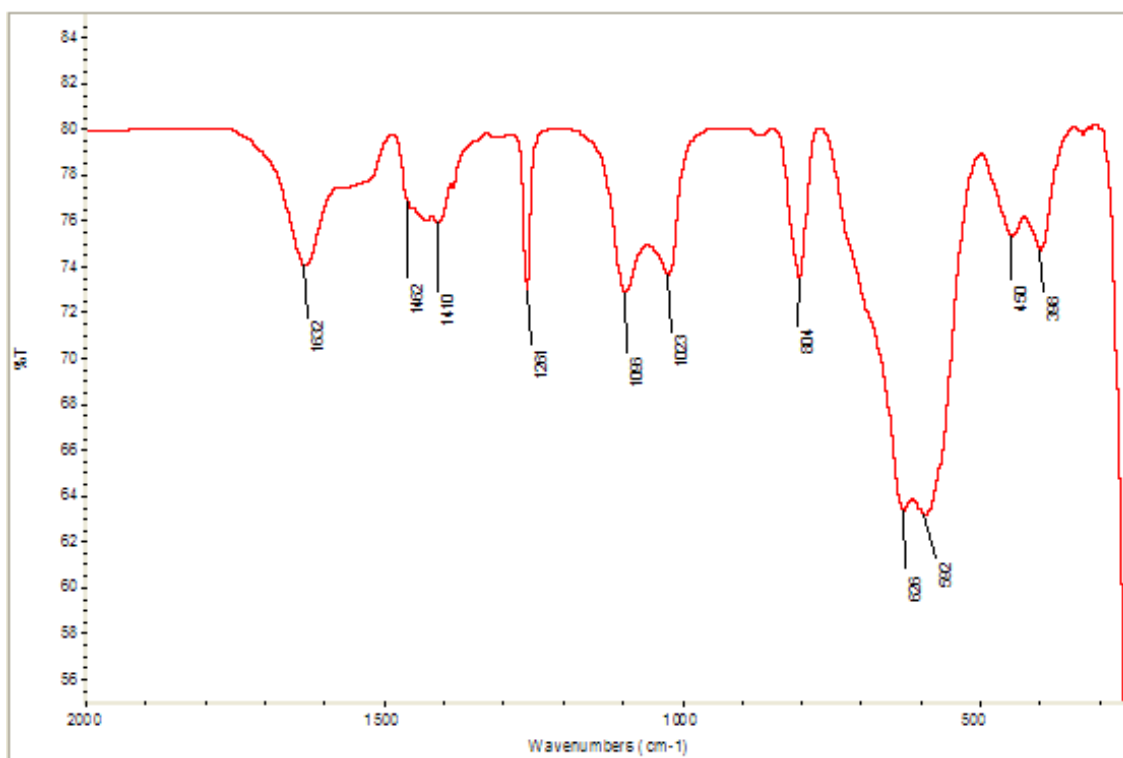


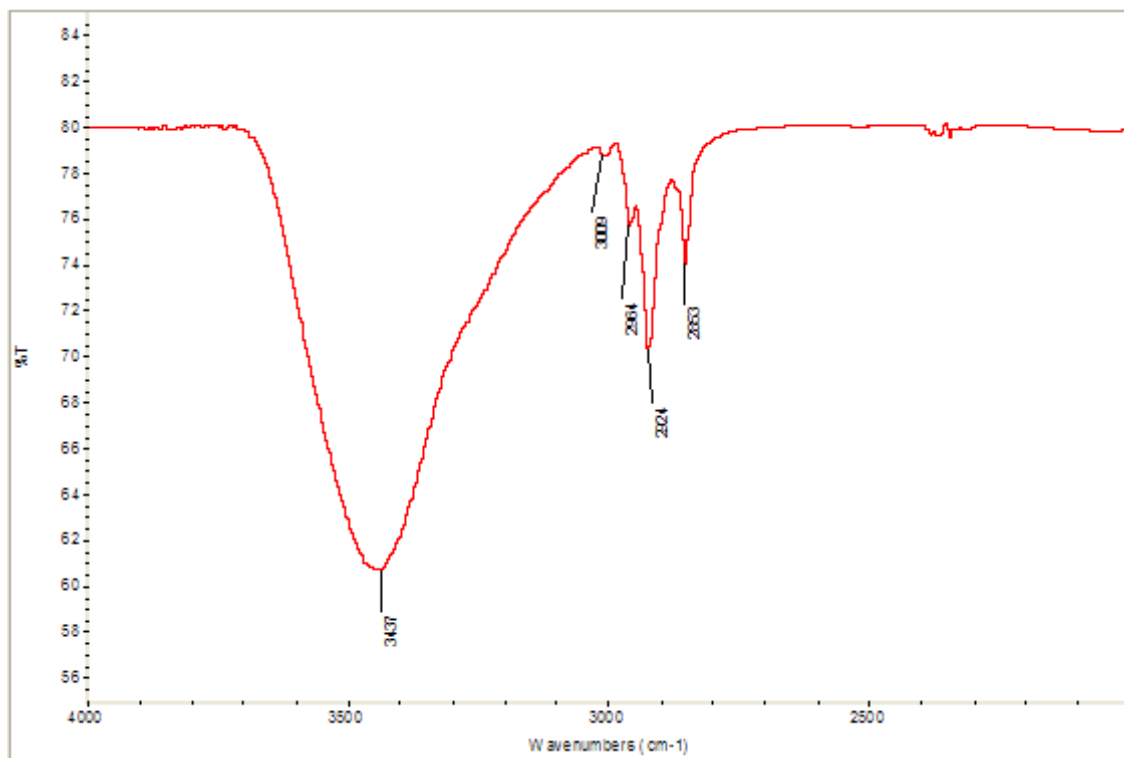
Figura 5.4

L'analisi spettroscopica infrarossa delle nanoparticelle mostra i legami relativi alla magnetite mentre i picchi a 1443 e 1532 cm^{-1} (corrispondenti ai gruppi carbossiliati -COO^-) confermano la presenza di molecole di oleato sulla superficie delle nanoparticelle, così come il picco a 1712 cm^{-1} relativo allo stretching del doppio legame $\text{C}=\text{C}$.

La seguente immagine riporta il risultato dell'analisi spettrografica delle nanoparticelle sintetizzate senza copertura in DMSA; a 633 cm^{-1} si può osservare un picco caratteristico dei legami Fe-O presenti nella magnetite mentre i picchi a 1443 e 1532 cm^{-1} (corrispondenti ai gruppi carbossiliati -COO^-) confermano la presenza di molecole di oleato sulla superficie delle nanoparticelle, così come il picco a 1632 cm^{-1} relativo allo stretching del doppio legame $\text{C}=\text{C}$.



Nella sezione di spettro tra 2200 e 4000 cm^{-1} si osserva la presenza dei segnali relativi alle molecole di oleato con i picchi a 2854 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , 2952 cm^{-1} e 3007 cm^{-1} relativi rispettivamente agli stretching simmetrico e asimmetrico dei gruppi CH_2 , lo stretching asimmetrico dei gruppi CH_3 e infine dello stretching dei legami C-H sul doppio legame.



La banda allargata a 3436 cm^{-1} di stretching del legame O-H è dovuta alla presenza di molecole d'acqua adsorbite sulle nanoparticelle.

5.2.3 Seconda fase: accrescimento

In un pallone da 500 ml munito di ricadere a bolle e termometro si sono sciolti 0.71 g di $[Fe(acac)_3]$, 2.3 g di 1,3-tetradecanediolo, 0.63 ml di acido oleico e 0.66 ml di oleilammina in 20 ml di etere benzilico. Alla miscela sono state poi aggiunti 85 mg di nanoparticelle da 4 nm disperse in 4 ml di *n*-esano.

Si è riscaldato il sistema in bagno di olio a 200°C per un'ora sotto agitazione meccanica, dopodiché si è portato a riflusso sotto azoto (300°C). Dopo aver lasciato raffreddare a temperatura ambiente si è proceduto al lavaggio ed essiccazione delle nanoparticelle come visto nella fase precedente.

5.2.4 Caratterizzazione delle nanoparticelle accresciute

Le nanoparticelle accresciute mantenendo una funzionalizzazione lipofila risultano insolubili in acqua e si disperdono completamente in *n*-esano come mostrato nella figura seguente



(a)



(b)

Figura 5.5: a) Nanoparticelle accresciute in acqua (a sx) e in *n*-esano (a dx) b) Effetto di un magnete sul ferrofluido

Le nanoparticelle accresciute sono state analizzate al microscopio elettronico mostrando una migliore uniformità nella morfologia e nelle dimensioni rispetto alle nanoparticelle originali. In particolare, le immagini permettono di determinare una distribuzione stretta dei diametri intorno a 7.5 nm.

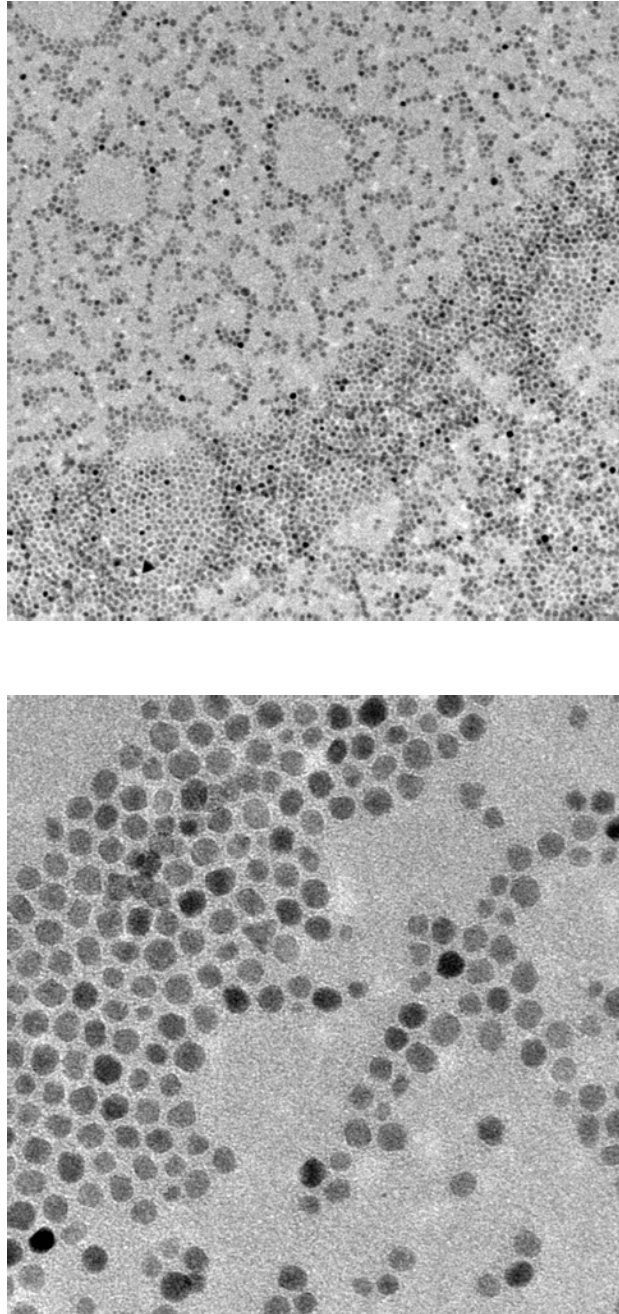
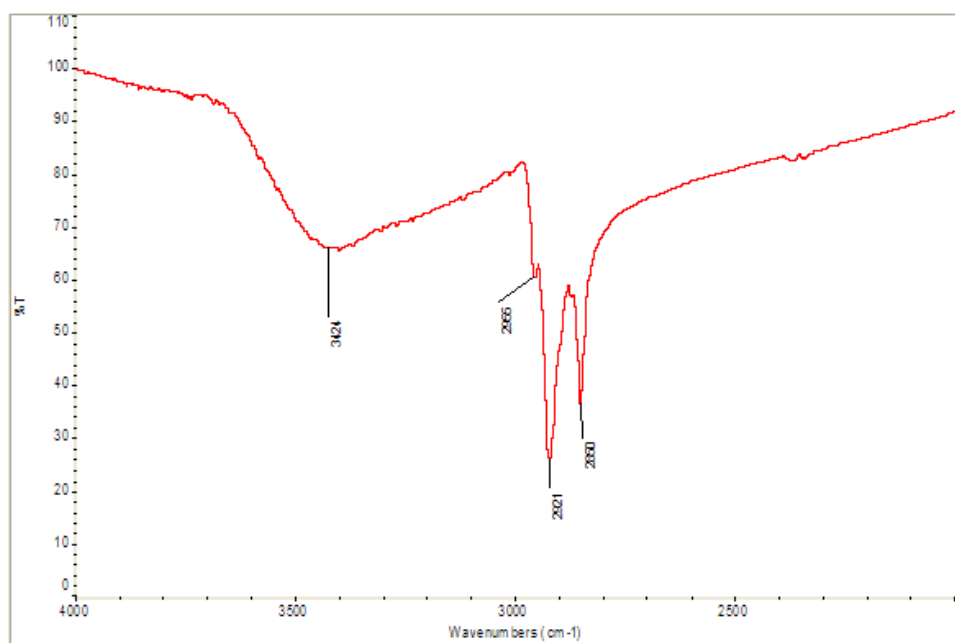
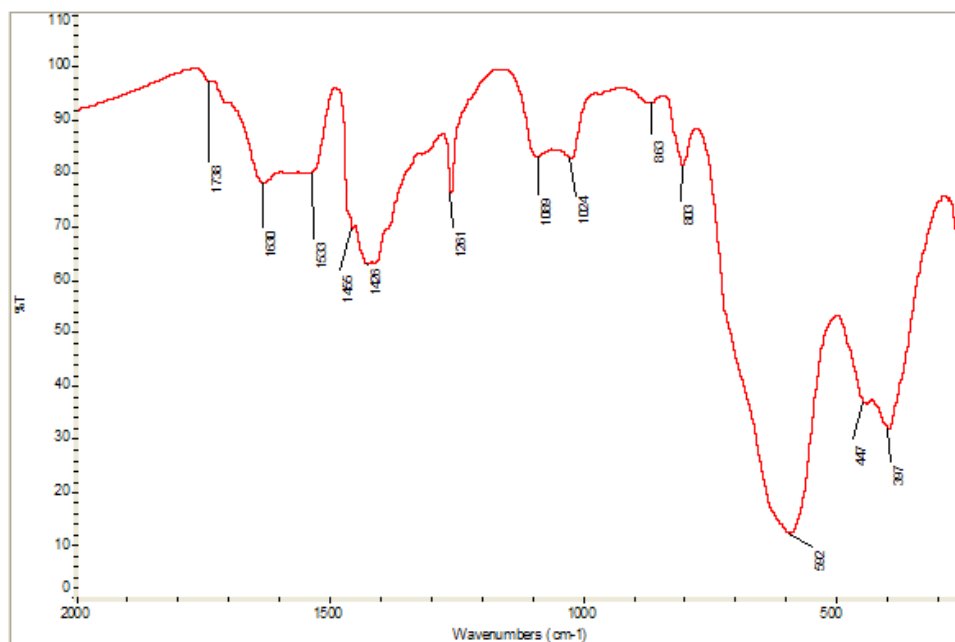


Figura 5.6: Immagini TEM delle nanoparticelle accresciute a ingrandimento progressivo.

Gli spettri FT-IR delle nanoparticelle accresciute confermano i dati di composizione rilevati per le nanoparticelle più piccole con la presenza di segnali relativi ai legami Fe-O a circa a 600 cm^{-1} ed i picchi dai 1426 ai 1533 cm^{-1} dovuti ai gruppi carbossilato -COO^- delle molecole di oleato.



Osservando lo spettro tra 2000 e 4000 cm^{-1} ritroviamo i segnali attesi per gli stretching simmetrico e asimmetrico dei gruppi CH_2 a 2850 e 2921 cm^{-1} e lo stretching asimmetrico dei gruppi CH_3 a 2955 cm^{-1} .

5.2.5 Terza fase: funzionalizzazione

In un pallone da 100 ml si miscelano 10 mg di nanoparticelle accresciute disperse in 1 ml di toluene con 10 mg di acido meso-2,3-dimercaptosuccinico dispersi in 1 ml di dimetilsolfossido. Il sistema viene quindi messo a reagire per 10 ore in sonificatore a temperatura ambiente. Successivamente si risciacqua la miscela più volte con *n*-esano e si portano le nanoparticelle a secchezza in essiccatore sottovuoto.

5.2.6 Caratterizzazione delle nanoparticelle funzionalizzate

Le analisi TEM dimostrano che le nanoparticelle funzionalizzate mantengono omogeneità dimensionale e morfologica ma hanno maggiore tendenza all'aggregazione dovuta probabilmente alle interazioni tra i gruppi polari sulla superficie delle nanoparticelle in fase di evaporazione del solvente durante la preparazione dei campioni per la microscopia.

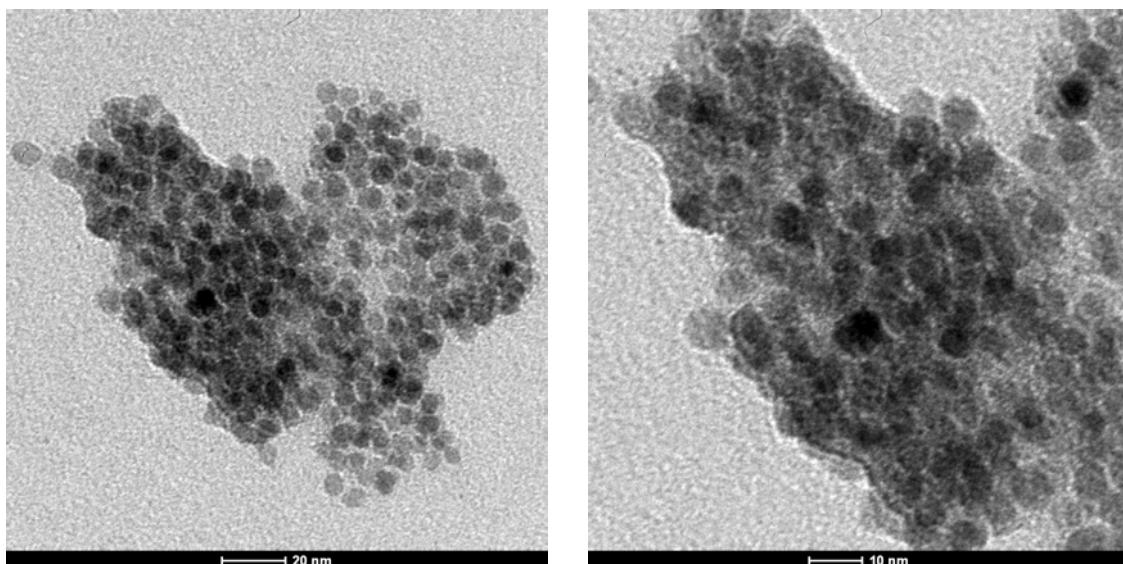


Figura 5.7: Immagini al TEM delle nanoparticelle rivestite in DMSA.

Questo è confermato dallo spettro IR che mostra una banda molto intensa a circa 3400 cm^{-1} dovuta allo stretching O-H dei gruppi carbossilici liberi del DMSA e di molecole d'acqua con essi interagenti.

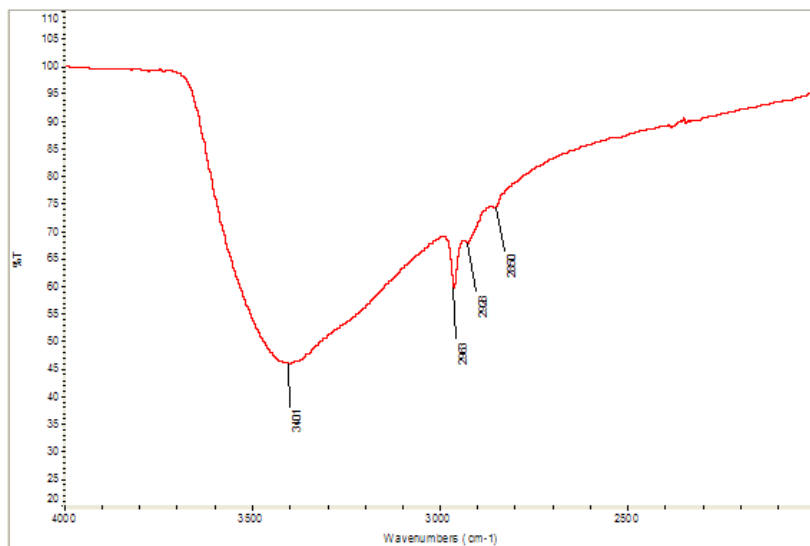


Figura 5.8: Spettroscopia delle nanoparticelle funzionalizzate in un intervallo dai 2000 ai 4000 cm^{-1}

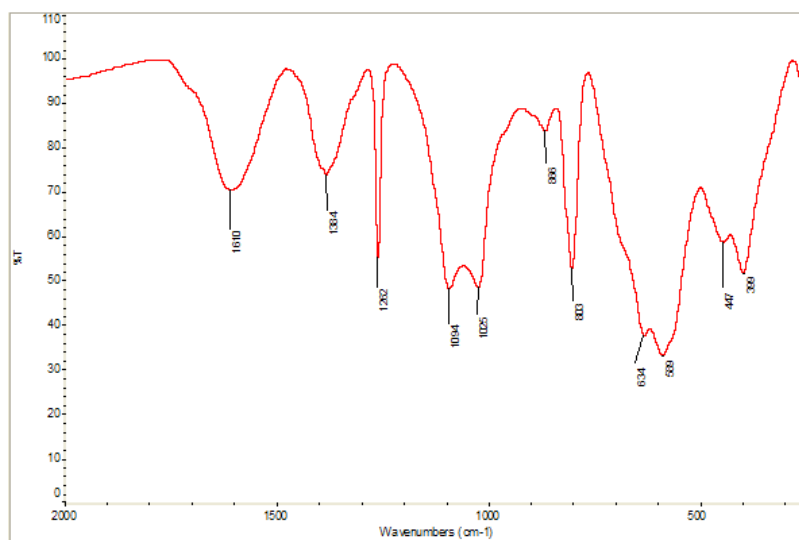


Figura 5.9: Spettroscopia delle nanoparticelle funzionalizzate in un intervallo dai 250 ai 2000 cm^{-1}

Capitolo 6

Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha compreso la sintesi e lo studio di nanoparticelle magnetiche per applicazioni biomediche, campo di ricerca attualmente in rapido sviluppo e con possibili ampi margini di miglioramento. In particolare, sono state prese in considerazione le tecniche di sintesi di nanoparticelle di ossido di ferro (magnetite), di modifica delle loro dimensioni e di funzionalizzazione superficiale. E' noto che le proprietà magnetiche delle nanoparticelle dipendano dalla loro composizione, dimensione e morfologia, influenzando l'effetto su di esse di un campo magnetico esterno.

La tecnica di sintesi studiata consiste nella produzione ed ingrandimento di nanoparticelle di magnetite per decomposizione termica del complesso organometallico $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$ e la sua parziale riduzione in soluzione ad opera di un alcool a lunga catena (1,2-tetradecandiolio).

Operando in solvente non acquoso (etere difenilico o dibenzilico) si può raggiungere la temperatura di decomposizione del complesso precursore (300°C) alla quale si hanno i processi di nucleazione (formazione di un numero elevato di cristalli in sospensione) ed accrescimento (aumento delle dimensioni delle nanoparticelle). La presenza in soluzione di acido oleico e oleilammina permette la stabilizzazione superficiale delle nanoparticelle così formate e ne impedisce l'aggregazione. Operando in condizioni simili ma in presenza di nanoparticelle preformate è possibile ottenere l'aumento delle dimensioni. Si sono così ottenute nanoparticelle di magnetite monodisperse di circa 7.5 nm e forma molto regolare come evidenziato dalla caratterizzazione microscopica condotta al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). La funzionalizzazione per sostituzione di parte delle molecole di oleato con acido dimercaptosuccinico (DMSA) ha permesso di ottenere nanoparticelle idrofile e quindi solubili in solventi organici polari o soluzioni acquose. La composizione e la natura dello strato di funzionalizzante sono stati confermati dall'analisi spettroscopica in-

frarossa (FT-IR) che mostra i segnali tipici dei modi vibrazionali di Fe_3O_4 e delle molecole dello stabilizzante organico.

Nel futuro, questo lavoro potrà prevedere diversi sviluppi, tra i quali ricordiamo almeno:

- lo studio di sintesi di nanoparticelle di dimensioni maggiori
- lo studio delle proprietà magnetiche di tutte le nanoparticelle ottenute
- lo studio della viscosità dei ferrofluidi ottenuti
- lo studio del riscaldamento dei ferrofluidi ottenuti con le nanoparticelle

Nonché lo studio di processi di produzione più semplici e con migliori rese e possibilmente una maggiore controllabilità della morfologia delle nanoparticelle in fase di sintesi allo scopo di migliorare la loro efficienza nel trattamento per riscaldamento delle neoplasie.

Bibliografia e riferimenti

- [1] R. C. Hanselma, J. C. Parrott, C. B. Taylor, R. K. Gilchrist, W. D. Shorey, *Annals of Surgery*, 1957, 146, 596
- [2] K. Yan, P. Li, H. Zhu, Y. Zhou, J. Ding, J. Shen, Z. Li, Z. Xu, P. K. Shu, *RSC Advances*, 2013, 3, 10598
- [3] A. Lu, E. L. Salabas, F. Schüt, *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46, 1222
- [4] R. E. Rosensweig, *Journal of Magnetic Materials*, 2002, 252, 370
- [5] K. H. Cowan, J. A. Moscow, *Goldman's Cecil Medicine*, cap. 185, A. I. Schafer ed., Ed. Saunders Elsevier, 2012
- [6] A. H. Habib, C. L. Oudeck, P. Chaudhary, M. R. Bockstaller, M. E. McHenry, *Journal of Applied Physics*, 2008, 103, 3
- [7] N. Lee, Y. Choi, Y. Lee, M. Park, W. K. Moon, S. H. Choi, T. Hyeon, *Journal of American Chemical Society*, 2012, 12, 3127
- [8] D. Cheng, G. Hong, W. Wang, R. Yuan, H. Ai, J. Shen, B. Liang, J. Gao, X. Shuai, *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21, 4796
- [9] S. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, G. Li, *Journal of American Chemical Society*, 2004, 126, 273
- [10] J. H. Bang, K. S. Suslick, *Journal of American Chemical Society*, 2007, 129, 2242
- [11] Z. Chen, G. Hong, H. Wang, K. Welsher, S. M. Tabakman, S. P. Sherlock, J. T. Robinson, Y. Liang, H. Dai, *Journal of American Chemical Society*, 2012, 6, 1094
- [12] J. H. Richardson, R. V. Peterson, *Systematic materials analysis*, Ed. Elsevier, 2012

[13] Y. Jun, Y. Huh, J. Choi, J. Lee, H. Song, S. Kim, S. Yoon, K. Kim, K. Shin, J. Suh, J. Cheon, *Journal of American Chemical Society*, 2005, 127, 5732