

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione  
Corso di Laurea Triennale in Biomedica

Elaborato Finale

## **Analisi della relazione tra processo di sintesi e morfologia nella produzione di nanoparticelle per Magneto Fluido Ipertermia**

*Relatore:* Ch.mo Prof. Paolo Sgarbossa (Dip. di Ingegneria Industriale)  
*Correlatore:* Dott. Ing. Elisabetta Sieni (Dip. di Ingegneria Industriale)

*Laureando:* Rudi Gaspardo

Anno Accademico 2013 – 2014



*A mio papà*

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare il Dott. Federico Caicci del Laboratorio di Microscopia Elettronica (LME) del Dipartimento di Biologia per le immagini TEM presentate in questo elaborato.

Ringrazio vivamente la Dott.sa Sieni e il Prof. Sgarbossa per la loro pazienza e disponibilità.

Ringrazio infine mia moglie Monica per l'incoraggiamento e il supporto in tutti questi anni e le mie figlie Angelica e Maddalena alle quali spero di non aver sottratto troppo tempo.



## Sommario

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RINGRAZIAMENTI .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1 INTRODUZIONE .....</b>   | <b>5</b>  |
| 1.1 Premessa .....  | 5         |
| 1.2 Ingegnerizzazione delle Nanoparticelle Ferromagnetiche .....                    | 6         |
| 1.3 Strumenti per la caratterizzazione delle Nanoparticelle .....                   | 8         |
| <b>2 TEM .....</b>  | <b>10</b> |
| 2.1 Breve storia del TEM .....  | 10        |
| 2.2 Parti del TEM e principi di funzionamento .....                                 | 10        |
| 2.2.1 Campione, aspetti fisici e interazioni degli elettroni .....                  | 12        |
| 2.2.2 Scattering e Diffrazione elettronica.....                                     | 13        |
| 2.2.3 Formazione dell'immagine .....  | 15        |
| <b>3 Caratterizzazione della misura e della morfologia.....</b>                     | <b>18</b> |
| 3.1 Metodi Software per la misura delle nanoparticelle.....                         | 18        |
| 3.2 Modelli di Intensità TEM - Software Pebbles .....                               | 19        |
| 3.2.1 Teoria alla base dei modelli di intensità.....                                | 20        |
| 3.2.2 Modalità di utilizzo Pebbles e guida alla caratterizzazione .....             | 22        |
| 3.2.2.1 Pebbles - Modalità Manuale.....   | 24        |
| 3.2.2.2 Pebbles - Modalità Semi-Automatica.....                                     | 27        |
| 3.2.2.3 Pebbles- Modalità Automatica. ....  | 29        |
| 3.2.2.4 Analisi dei dati e statistiche da output Pebbles .....                      | 31        |
| 3.3 ImageJ-Fiji.....  | 32        |
| 3.3.1 Verifiche della qualità delle immagini TEM.....                               | 33        |
| 3.3.2 Segmentazione .....   | 34        |
| 3.3.2.1 Metodo di segmentazione RATS (Robust Automatic Thresold Selection) 35       |           |
| 3.3.2.2 Metodo di segmentazione OTSU .....  | 38        |
| 3.3.2.3 Misurazione delle dimensioni con “Analyze Particles” delle NP segmentate 39 |           |
| 3.3.2.4 Considerazioni sui metodi di Thresholding utilizzati.....                   | 42        |
| 3.3.2.5 Misurazione Manuale e ROI .....   | 42        |
| 3.3.2.6 Analisi dei dati e statistiche da “Measure” di ImageJ .....                 | 46        |
| 3.4 Stima dell'incertezza per il problema specifico di misura da immagine.....      | 48        |
| 3.4.1 Incertezza nella quantizzazione.....  | 48        |
| 3.5 Indicatori statistici della distribuzione delle NP.....                         | 49        |
| 3.6 Esempio per l'analisi comparata dei metodi.....                                 | 50        |
| 3.6.1 Software Fiji-ImageJ - Metodo di Segmentazione : Otsu .....                   | 50        |
| 3.6.2 Software Fiji-ImageJ - Metodo di Segmentazione : RATS .....                   | 53        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.6.3    | Software Pebbles – Metodo automatico – prima esecuzione.....  | 55        |
| 3.6.3.1  | Software Pebbles – Metodo automatico – Prova A.....           | 55        |
| 3.6.3.2  | Software Pebbles – Metodo automatico – Prova B .....          | 56        |
| 3.6.3.3  | Software Pebbles – Metodo automatico – Prova C .....          | 57        |
| 3.6.4    | Software Fiji-ImageJ – Metodo Manuale (ROI manager) .....     | 58        |
| 3.6.5    | Considerazioni e raffronto metodi.....                        | 60        |
| 3.7      | Comparazione e considerazioni sui metodi di misura .....      | 61        |
| <b>4</b> | <b>Sintesi delle particelle.....</b>                          | <b>62</b> |
| 4.1      | Metodi di produzione delle NP.....                            | 62        |
| 4.2      | Coprecipitazione e Termo-Decomposizione .....                 | 62        |
| 4.2.1    | Sintesi di nanoparticelle C2.....                             | 65        |
| 4.2.2    | Sintesi di nanoparticelle C21.....                            | 66        |
| 4.2.3    | Sintesi di nanoparticelle C9, C14.....                        | 66        |
| 4.2.4    | Sintesi nanoparticelle C8.....                                | 66        |
| 4.2.5    | Sintesi nanoparticelle C13.....                               | 67        |
| 4.2.6    | Sintesi nanoparticelle C22.....                               | 67        |
| 4.2.7    | Sintesi nanoparticelle C1.....                                | 67        |
| 4.2.8    | Sintesi nanoparticelle C12.....                               | 68        |
| 4.2.9    | Sintesi nanoparticelle C11.....                               | 68        |
| 4.2.10   | Sintesi nanoparticelle C10, C15 .....                         | 68        |
| 4.2.11   | Sintesi nanoparticelle C19 .....                              | 69        |
| 4.2.12   | Sintesi di nanoparticelle C17 .....                           | 69        |
| 4.2.13   | Sintesi di nanoparticelle C20.....                            | 69        |
| 4.2.14   | Sintesi di nanoparticelle C16.....                            | 70        |
| 4.2.15   | Sintesi di nanoparticelle C18.....                            | 70        |
| <b>5</b> | <b>Analisi TEM delle serie e risultati sperimentali .....</b> | <b>72</b> |
| 5.1      | Immagini C2.....  | 72        |
| 5.2      | Immagini C1 .....   | 74        |
| 5.3      | Immagini C13 .....  | 77        |
| 5.4      | Immagini C11 .....  | 78        |
| 5.5      | Immagini C12 .....  | 81        |
| 5.6      | Immagini C10/C15 .....  | 85        |
| 5.7      | Immagini C19 .....  | 87        |
| 5.8      | Immagini C17 .....  | 91        |
| 5.9      | Immagini C16.....   | 95        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 5.10     | Immagini C18 .....                        | 98         |
| 5.11     | Immagini C20 .....                        | 101        |
| 5.12     | Immagini C0 .....                         | 103        |
| <b>6</b> | <b>Conclusioni .....</b>                  | <b>105</b> |
| <b>7</b> | <b>Tabella riassuntiva Risultati.....</b> | <b>1</b>   |
| <b>8</b> | <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>                 | <b>1</b>   |





# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Premessa

In questo elaborato ci si è prefissi di indagare in modo sistematico la relazione tra processo di sintesi e morfologia delle nanoparticelle (NP). Le NP prese in considerazione sono state sintetizzate per l'utilizzo in applicazioni di magneto fluido ipertermia che è una possibile applicazione dell'ipertermia alla cura di alcuni tipi di tumore. Tale tecnica, infatti, sta assumendo negli ultimi anni un crescente interesse, pur essendo da parecchio tempo presente nella letteratura scientifica.

Il presente lavoro partirà dall'introdurre quali siano le caratteristiche cercate nella produzione e ingegnerizzazione delle NP ferromagnetiche, passando poi ad elencare le modalità di caratterizzazione che ci permettono di stabilire in modo puntuale se quanto ottenuto dalla produzione sia in linea con le aspettative.

Nella caratterizzazione delle NP ci si soffermerà principalmente sull'aspetto morfologico, cioè dimensione (valutandone anche la distribuzione della misura delle NP) e forma.

Si indagherà anche se sussiste una relazione tra caratteristiche geometriche trovate e il metodo di produzione usato, focalizzandosi su due metodi molto noti in letteratura che sono la *Co-precipitazione* e *Decomposizione Termica*. Come base di partenza, ci si è avvalsi di alcuni papers che descrivono questi metodi di sintesi e i relativi risultati ottenuti. Di questi, si riporteranno il dettaglio delle procedure di sintesi e i risultati delle caratterizzazioni effettuate per poi confrontarli con quelle effettuate dal laboratorio di sintesi metallorganica del dipartimento di Ingegneria industriale dell'università di Padova.

Lo strumento principale usato per la caratterizzazione morfologica è il *TEM* (*Transmission Electron Microscopy*). Oltre alle immagini ottenute con il TEM si forniranno, per le produzioni di laboratorio analizzate, tabelle e grafici delle distribuzioni delle dimensioni delle particelle osservate fornendo inoltre considerazioni di carattere morfologico e qualitativo.

Vista la centralità dello strumento TEM, si sono riportate alcune note di approfondimento, oltre che dell'aspetto tecnico, anche dei fenomeni fisici che rendono possibile la formazione dell'immagine.

Date le immagini TEM di alcuni campioni di nanofluido (acquisite con CCD in formato elettronico 1024X1059 con 256 livelli di grigio) ci si è posti il problema di quali potessero essere i metodi a disposizione per la misurazione e caratterizzazione morfologica delle NP. Si sono, pertanto, indagati tre filoni di metodologie informatiche a supporto. Il primo è molto comune e frequente nell'ambito dell'elaborazioni delle immagini biomedicali ed è la *Segmentazione* (con l'ausilio del software *ImageJ*), il secondo, più specifico e aderente al modello di intensità del TEM, si basa su un metodo proprietario sviluppato con l'applicativo *Pebbles*[6] e terzo ma non ultimo in importanza, sono stati indagati degli strumenti software che possano essere di supporto alla misura delle NP dell'immagine con intervento dell'operatore e che permettano di generare output di misura facilmente manipolabili e utilizzabili al fine dell'elaborazione.

## 1.2 Ingegnerizzazione delle Nanoparticelle Ferromagnetiche

Per comprendere quali siano le esigenze della caratterizzazione delle NP Ferromagnetiche, vale la pena passare in rassegna gli aspetti che ne guidano la produzione e che ne regolano prestazioni e funzioni specifiche. L'approccio ingegneristico che sta alla base della caratterizzazione dei nanofluidi deve tener conto di alcune linee guida che sono tradotte in processi e metodi di verifica della qualità di produzione. Come ben delineato in [8], si possono identificare i seguenti aspetti:

- **Processo chimico di sintesi.** Sono moltissimi i processi chimici sviluppati per la produzione di nanoparticelle che si sono nel tempo perfezionati man mano che apparivano le molteplici applicazioni industriali di questi nanofluidi. Basti vedere la Tab. 1-1 che riporta in maniera non esaustiva alcuni dei processi più conosciuti. In questo lavoro, ci si occuperà in particolare delle particelle Ferromagnetiche per Ipertermia e si caratterizzeranno NP ottenute con il metodo di *Co-precipitazione* e quello di *Decomposizione Termica*. I risultati della caratterizzazione morfologica ottenuti analizzando le NP prodotte nel laboratorio di sintesi metallorganica del dipartimento di Ingegneria industriale dell'università di Padova sono stati confrontati con quelli tratti dai diversi autori che hanno utilizzato lo stesso metodo di sintesi.

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>Precipitazione</b>               | Precipitazione Omogenea<br>Co-precipitazione<br>Idrolisi<br>Idrolisi Ossidativa<br>Precipitazione Riduttiva<br>Riduzione Elettrochimica |
| <b>Reazioni ad alta temperatura</b> | Idrotermica<br>Decomposizione Termica   |
| <b>Condensazione</b>                | Sol-gel<br>Chimica Macro-molecolare   |
| <b>Vaporizzazione</b>               | Spray-drying<br>Spray-pyrolysis<br>Freeze-drying<br>Aerosol   |
| <b>Template</b>                     | Sintesi in microemulsione<br>Precipitazione con surfattanti   |
| <b>altri</b>                        | Reazioni Sonochimiche<br>Pirolisi Laser   |

Tabella 1-1

- **Stabilizzazione o Funzionalizzazione delle Nanoparticelle Ferromagnetiche.** E' fondamentale che i ferrofluidi siano stabili, non risentano di effetti di aggregazione, sia nel mezzo biologico, sia nel mezzo di sospensione. In altre parole, deve essere creata la condizione per un equilibrio tra le forze di repulsione e di aggregazione. Si ricordi, infatti, che, sulla superficie delle nanoparticelle stesse, possono essere presenti cariche in grado di dar luogo ad un potenziale (*potenziale Z*) che, aggiunto alle forze di Van der Waals, possono creare instabilità. La funzionalizzazione consiste di solito nell'aggiungere un rivestimento delle NP con materiali organici o inorganici che favoriscano la stabilità. I materiali inorganici utilizzati permettono alle NP di esser inerti e biocompatibili (Au,Si,Ti). Molto spesso, sono ossidi di metallo che permettono stabilità in aria. Per quanto riguarda i materiali funzionalizzanti di tipo organico, possono essere utilizzati comunemente dei tensioattivi (es. Acido oleico) o surfattanti, polimeri (es.PEG), molecole biologiche.
- **Metodi per la "Vettorizzazione".** Uno degli aspetti che costituiscono sicuramente una sfida fondamentale, sia nell'ambito della diagnostica (es. MRI), sia per la terapia dell'Ipertermia, rimane quello della progettazione di NP che riescano a raggiungere il "target" prefissato. Per questo, può essere utile, come avviene nella ricerca farmacologica, ricoprire le NP con sostanze che "riconoscano" direttamente il "target". Tuttavia, questo rivestimento non deve compromettere la stabilità in

ambiente biologico e possibilmente deve poter essere mantenuto attivo e funzionale per un tempo sufficiente all'attività per cui sono preposte le NP. Un metodo di "grafting", ossia di mettere a disposizione una copertura delle particelle ferromagnetiche che possa essere utile per agganciare dei sistemi di trasporto, e' il DMSA (Acido 2,3-dimercaptosuccinico). In [8] sono messe in evidenza molto bene le potenzialità e la versatilità del DMSA.

Bisogna, poi, ricordare che il ricoprimento usato per la funzionalizzazione deve essere biocompatibile e quindi, non deve essere riconosciuto dal sistema immunitario come tossico.

- **Caratterizzazione Strutturale e Fisico-Chimica.** In [9] sono analizzate (con modelli matematici) le caratteristiche fisiche, magnetizzazione e dimensione che influenzano l'efficienza di riscaldamento di nanofluidi per l'applicazione di ipertermia. L'ipotesi fatta è quella che le particelle dal punto di vista magnetico siano a "singolo dominio". Nel caso specifico questa condizione solitamente si raggiunge con diametro inferiore a 30 nm. Quest'aspetto è importante per sfruttare in modo ottimale l'effetto di riscaldamento dovuto ai movimenti delle NP immerse in un campo magnetico temporaneamente noti come rilassamento di Brown e di Neel. Rosensweig dimostra sperimentalmente che il rilassamento Browniano si impone su quello di Neel per particelle con dimensioni superiori a 8 nm, che risultano essere anche le più interessanti per l'applicazione di ipertermia. In [9] sono evidenziate le relazioni tra velocità di riscaldamento ( $\Delta\text{Temperatura}/\Delta\text{tempo}$  [ $^{\circ}\text{K/s}$ ]) in funzione del raggio delle NP e della viscosità del fluido, sono inoltre indagate al variare dell'intensità o frequenza del campo e della dispersione della distribuzione delle dimensioni delle NP. Altre caratteristiche da considerare sono la dimensione che deve essere tale da ottimizzare il fattore idrodinamico e di movimento: infatti, il rapporto Area/volume deve essere alto per controllare la tensione superficiale che potrebbe creare fenomeni di aggregazione (questo aspetto può essere risolto anche con la funzionalizzazione). Da molti paper risulta che la distribuzione ideale della dimensione delle NP per ottimizzare la dissipazione di potenza sia quella di tipo gaussiana molto stretta attorno ad un valore medio ideale ( monodispersione del diametro delle NP ).

Volendo ottenere una produzione industriale di NP occorre che il nanofluido abbia le seguenti caratteristiche:

- La **riproducibilità**, ossia, a parità di parametri noti si devono ottenere NP con le stesse dimensioni e forma.
- Il processo deve richiedere **poco dispendio di energia / risorse**.
- **Alto livello di rendimento** in termini di quantità prodotta a parità di quantità di reagenti.
- L'utilizzo di precursori, solventi ecc. **facilmente reperibili** e possibilmente poco costosi.
- Dovrebbero essere richieste poche fasi, limitare prelaborazioni o processi di filtraggio.
- **Tempi di produzione ridotti**.
- Componenti utilizzati **non inquinanti** o nocivi nelle varie fasi libere della produzione.

- Possibilmente, si dovrebbe valutare l'utilizzo di composti/prodotti già autorizzati da enti (es. Food and Drug Administration) che ne abbiano accertato l'utilizzabilità in vivo.
- **Biocompatibilità** ossia la capacità della sostanza di essere metabolizzata dall'organismo che la riceve ed eventualmente essere espulsa senza creare effetti dannosi per l'organismo.

### 1.3 Strumenti per la caratterizzazione delle Nanoparticelle

Per la caratterizzazione delle NP ferromagnetiche dal punto di vista fisico-chimico occorre determinare:

- Magnetizzazione
- Stato della funzionalizzazione / vettorizzazione / copertura
- Potenziale di superficie (potenziale Z)
- Composizione chimica del campione con studio della morfologia anche a livello di reticolo.
- Dimensione e forma.

e nel caso le NP siano destinate alla produzione di magnetofluidi per il trattamento di Ipertermia occorre caratterizzare il rendimento termico associato ad un campo magnetico tempo-variante con :

- misure di viscosità del ferrofluido.
- misure calorimetriche di dissipazione di potenza ed efficienza del processo termico (es. SAR)

da ultimo, ma non meno importante devono essere effettuati dei test di compatibilità biologica.

Caratterizzare, nella maggior parte dei casi significa avere della strumentazione ad-hoc che permetta la quantificazione degli aspetti sopracitati. Di seguito si riportano i nomi e qualche riferimento degli strumenti che vengono spesso nominati in letteratura con una breve spiegazione dell'ambito di applicabilità.

- **TGA : Thermogravimetric analysis** e' un metodo di analisi termica che permette di mettere in relazione le modifiche chimico-fisiche che possono intervenire su un materiale sottoposto ad un processo di riscaldamento con aumenti di temperatura fissati e per tempi prestabiliti. Ad esempio e' molto utile la verifica e **misura delle variazioni di massa** di un composto nelle varie fasi della produzione in funzione della temperatura. Quindi, e' possibile valutare la cosiddetta Termostabilità ossia quanto il materiale possa modificare le sue caratteristiche chimico-fisiche al variare della temperatura. Queste informazioni, possono essere molto utili in quanto le variazioni della massa sono di solito associabili a processi che modificano le caratteristiche delle NP. Nel caso specifico, questo metodo, ci permetterebbe una valutazione quantitativa, per esempio, dello stato ossidativo.

- **VSM (Vibrating sample magnetometer)** questo strumento permette la misurazione delle **caratteristiche magnetiche** delle particelle. E' molto importante che siano mappati i valori di magnetizzazione in funzione del campo applicato. Questo strumento permette anche di verificare l'ampiezza del ciclo d'isteresi, che ci si aspetta essere molto stretto, idealmente simile a quello riportato in Figura1-1.

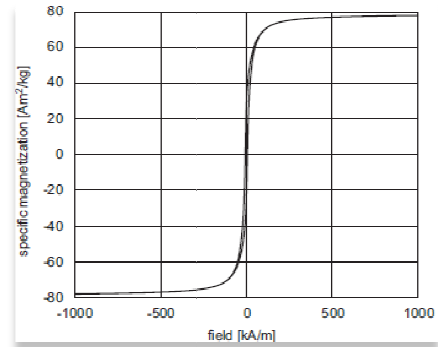


Figura 1-1

- **FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy):** sfrutta lo spettro di assorbimento nell'infrarosso unito alla trasformata di fourier. Questo strumento viene utilizzato per verificare lo **stato della superficie** del materiale e nello specifico anche della funzionalizzazione delle nanoparticelle. Per la comprensione delle informazioni del grafico bisogna riconoscere i picchi che di solito individuano dei legami specifici es -OH, Fe-O (figura1-2).

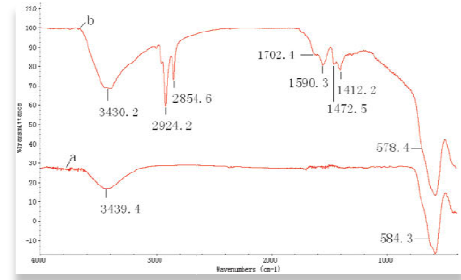


Figura 1-2

- **Mossbauer** e' uno strumento che sfrutta l'effetto omonimo utilizzando l'assorbimento per risonanza dei raggi  $\gamma$  senza rinculo nucleare. Nello studio dei processi di sintesi delle nanoparticelle risulta essere uno strumento utilissimo, sia nelle fasi intermedie di produzione, perché è possibile verificare gli stati ossidativi del ferro ( $Fe^{2+} / Fe^{3+}$ ) sia per l'individuazione per esempio della maghemite (come nel caso di figura 1-3), o la presenza di altre forme allotropiche del ferro. Si possono vedere anche lo stato di funzionalizzazione con particolari e dettagli iperfini superiori al FT-IR.

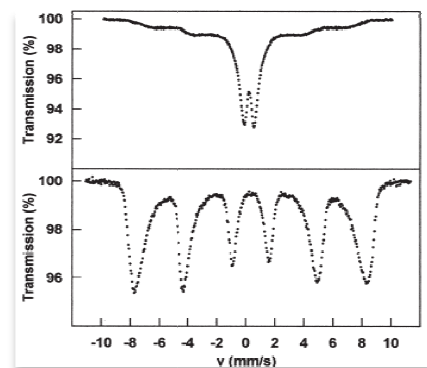


Figura 1-3

- **Diffrattometria XDR** è uno degli strumenti per l'analisi dei materiali cristallini che ne permette, oltre che l'individuazione del tipo di cristallo, anche di valutarne le caratteristiche del reticolo.
- **TEM – HRTEM (High resolution TEM)** e **SAED (Selected Area Electron Diffraction)**. Queste tecniche di microscopia che permettono il tipo di analisi morfologica e caratterizzazione presentata in questo lavoro, verranno discusse nei prossimi paragrafi.

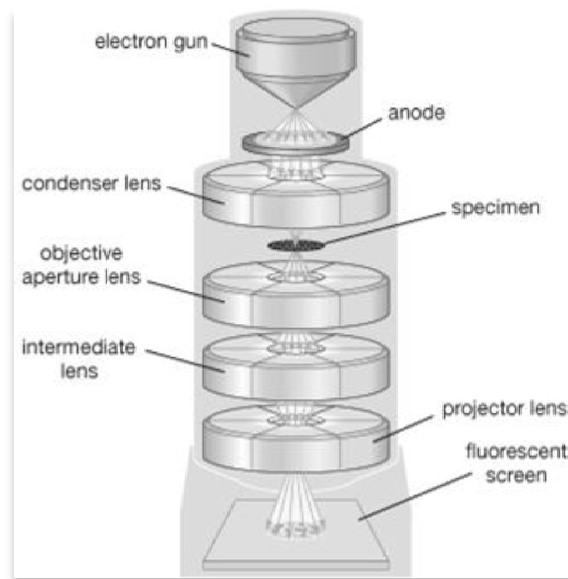
## 2 TEM

### 2.1 Breve storia del TEM

Fin da quando Ernest Karl Abbe nel 1873 pubblicò nelle sue ricerche la formula<sup>1</sup> che esprimeva il limite estremo per un microscopio ottico, in molti cominciarono a porre il quesito se si potesse andare oltre utilizzando delle fonti di raggi con lunghezze d'onda inferiori a quelli della luce. Questa tesi sembrò ulteriormente avvalorata quando De Broglie nel 1927 propose la sua celeberrima ipotesi nella visione duale dell'elettrone, ossia non solo come particella, ma anche come onda. Si diffuse pertanto tra la comunità scientifica l'opinione che utilizzare un fascio di elettroni potesse essere la soluzione per arrivare a risoluzioni vicine alle dimensioni atomiche. Fu Ruska nel 1932 che cominciò a lavorare alla costruzione del primo TEM (Transmission Electron Microscopy) che vide una prima forma commerciale nel 1939. Tuttavia a causa della seconda guerra mondiale e della perdita di vari ricercatori che seguivano i progetti di sviluppo di questo strumento, ci furono notevoli complicazioni nella diffusione di questa metodica. Un'ulteriore complicazione, almeno nella fase iniziale, la si può attribuire alla difficoltà di poter preparare il campione con dimensioni tali da poter essere osservato. La strada però era tracciata ed il TEM è oggi uno degli strumenti principe per lo studio delle nanotecnologie. La risoluzione degli attuali TEM è nell'ordine di 0,2 nm ma esistono versioni di HRTEM (High-Resolution TEM) che possono spingersi a risoluzioni fino a 0,050 nm.

### 2.2 Parti del TEM e principi di funzionamento

Di seguito si riporta la descrizione delle parti che compongono un TEM che, hanno nomi molto familiari e comuni alla microscopia ottica classica. Nei paragrafi successivi saranno chiariti quali siano i principi fisici di funzionamento di questo strumento.



<sup>1</sup> Formula di Abbe, che esprime il limite  $d$  di diffrazione della luce con lunghezza d'onda  $\lambda$  :  $d = \frac{\lambda}{2(n \sin \theta)}$  dove  $n$  è l'indice di rifrazione del mezzo dove si trova la lente (es. aria  $n = 1.00$ ) e  $\theta$  è il semiangolo di luce catturata dalla lente.

**Figura 2-1 –TEM, schema di funzionamento e lenti**

Facendo riferimento alla figura 2-1 si possono distinguere:

**Sorgente elettronica (electron gun):** nei TEM moderni possono essere presenti principalmente due tipi di emettitori di elettroni: a filamenti (di tungsteno, o di  $\text{LaB}_6$ <sup>2</sup>) o i cosiddetti Field Emission Guns. In generale la differenza nella scelta dell'emettitore di elettroni risiede nei valori di corrente che attraversano i materiali della sorgente stessa e determinano l'intensità del fascio di elettroni. Questo influisce direttamente sulla luminosità resa disponibile per il TEM. Ci sono anche altri fattori che influenzano la scelta di emettitore, ossia la presenza o meno di filtri di energia (EFTEM Energy-filtered transmission electron microscopi) nei quali solo alcuni elettroni con particolari caratteristiche di riflessione ed energia sono usati per fornire informazioni sul campione, vedi a tal proposito Figura 2-6 [5]. Il TEM utilizzato nelle analisi del nostro elaborato è un Tecnai G2 che monta un  $\text{LaB}_6$  a 100KeV.

**Sistema Tubo a Vuoto (Vacuum System):** Gli elettroni generati dalla sorgente per essere opportunamente accelerati richiedono un alto potenziale elettrico (di solito in un range 100KeV-300KeV), che permette di stabilirne la lunghezza d'onda e quindi anche la capacità risolutiva e di penetrazione. La necessità di un tubo con un vuoto di buona qualità (dell'ordine  $10^{-4}$  Pa ai  $10^{-7}$  Pa per HRTEM) oltre a quella di evitare scariche che potrebbero rovinare l'apparato, è quella di evitare il fenomeno di scattering degli elettroni prima che essi raggiungano il campione.

**Lenti/Ottiche elettroniche e diaframma (Electron Lenses and apertures):** Il TEM dispone di lenti "magnetiche" che in generale sono dispositivi disegnati per rendere possibile la convergenza del fascio di elettroni con un angolo regolabile modificando la corrente del circuito di comando. Analogamente si può intervenire sull'apertura del diaframma per raccogliere gli elettroni con un certo angolo d'interesse. Una delle maggiori sfide nella costruzione del TEM sta nella correzione delle aberrazioni di vario tipo. Le aberrazioni, infatti, limitano le risoluzioni teoriche a cui si potrebbe arrivare. Di seguito un piccolo dettaglio delle tipologie di lenti e diaframma che sono utilizzate e le loro funzioni.

- **Lente Obiettivo (Objective Lense):** Questo tipo di lente si trova immediatamente sotto il campione. E' sicuramente una delle più importanti perché la risoluzione di solito dipende pesantemente dalla sua qualità e dal suo livello di aberrazione.
- **Objective Aperture(s):** viene posizionata nel piano focale dell'immagine generata dalla lente obiettivo e permette di selezionare aree specifiche dell'immagine da visualizzare, (parte destra della figura 2-2).
- **Selected Area Aperture:** E' utilizzata per rendere possibile la selezione di una porzione specifica del raggio diffratto e viene posizionata nella parte inferiore del piano focale della lente obiettivo. Si veda in figura 2-2 lo schema di sinistra

---

<sup>2</sup> Esaboruro di Lantanio

- che riporta la “selected Area Aperture” che permette la formazione e successiva visualizzazione del pattern di diffrazione.
- **Lenti Intermedie (Intermediate Lenses):** Sotto la lente obiettivo possono essere presenti più lenti intermedie che servono per la visualizzazione in modalità immagine (image mode) o nella modalità Pattern di diffrazione (diffraction Pattern). Queste lenti permettono di cambiare ingrandimento o parametri per la diffrazione.
  - **Projector Lens:** è una particolare lente intermedia che permette la proiezione dell'immagine o del pattern di diffrazione sul sistema di visualizzazione/registrazione (CCD, schermo fluorescente, ecc)

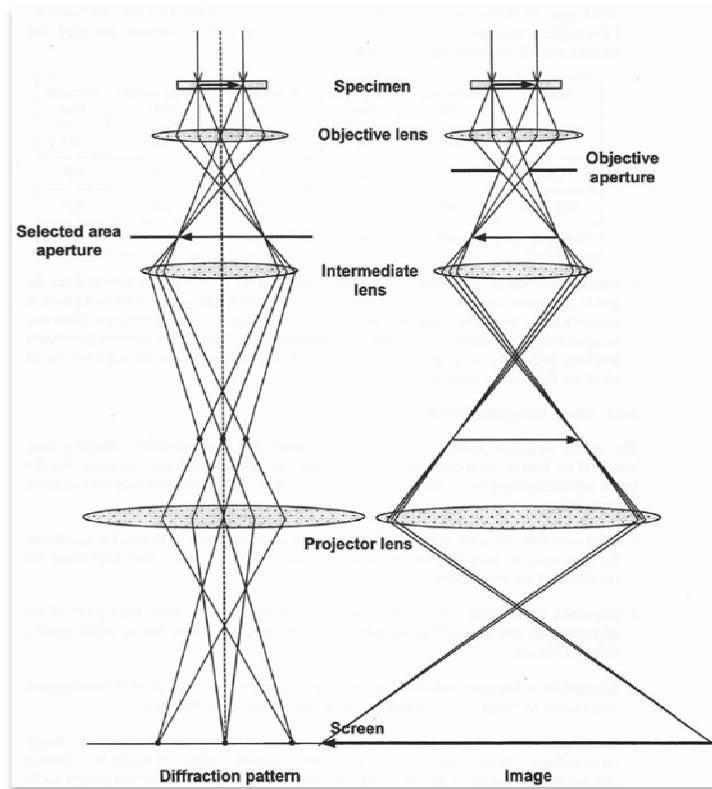


Figura 2-2- Le 2 modalità di visualizzazione del TEM : immagine e pattern di diffrazione.

## Electron Spectrometers.

**Energy Filters:** Sono dei filtri che catturano solo particolari processi di scattering per elettroni che hanno subito specifiche perdite di energia ecc.

**Visualizzatore/registratore.** Per la visualizzazione e la registrazione delle immagini ci possono essere vari metodi. Sono molto utilizzati sensori a CCD e le telecamere. Le immagini che verranno utilizzate in questa tesi sono di formato 1024X1024 a cui di solito viene aggiunta una barra in basso che riporta la scala in nm. Ogni immagine ha 256 livelli di grigio.

### 2.2.1 Campione, aspetti fisici e interazioni degli elettroni .

La microscopia TEM, come visto, si basa su un fascio di elettroni che incide sul campione da visualizzare. Il TEM può essere uno strumento molto versatile, infatti, con



opportune giustapposizioni di lenti magnetiche e diaframmi/aperture, può essere utilizzato sia in modalità di *visualizzazione dell'immagine*, che permette la visione delle NP con dettagli di pochi nm, sia per la modalità di *visualizzazione del pattern di diffrazione* con dettaglio addirittura superiore a XRD.

Questa versatilità dello strumento e le sue peculiarità fanno del TEM uno strumento ideale per lo studio e la caratterizzazione delle NP.

Prima di passare all'approfondimento sulla modalità di visualizzazione e formazione dell'immagine, per completezza e per necessità di comprensione dei meccanismi e terminologie che stanno alla base del TEM, si descrivono concetti di Scattering e Diffrazione elettronica.

### 2.2.2 Scattering e Diffrazione elettronica

Per comprendere come sia possibile la formazione dell'immagine nel TEM devono essere introdotti *scattering e diffrazione elettronica*. L'elettrone, come noto, può essere trattato sia per la sua natura corpuscolare che come onda. Fu De Broglie nel 1924 che ipotizzò l'elettrone come onda, fornendo la formula (2.1), poi confermata sperimentalmente, che esprime la lunghezza d'onda in funzione dell'energia dell'elettrone accelerato .

$$\lambda_e \approx \frac{h}{\sqrt{2m_0E \left(1 + \frac{E}{2m_0c^2}\right)}}$$

*Formula di De Broglie* :  $\lambda_e$  rappresenta la lunghezza d'onda,  $h$  e' la costante di Plank,  $m_0$  e' la massa dell'elettrone,  $E$  l'energia dell'elettrone accelerato e  $c$  la velocità della luce ( $3 \times 10^8$  m/s) (2.1)

Il parametro di lunghezza d'onda è fondamentale per caratterizzare la risoluzione del TEM. Esso esprime la capacità di "separare" e quindi distinguere due oggetti. Il TEM utilizzato per questo elaborato ha voltaggio a 100KV che permette quindi una lunghezza d'onda dell'elettrone pari a 3,70pm (esistono TEM a 300KV: 1,96pm).

Un elettrone diretto verso un campione, essendo portatore di carica negativa, ha un comportamento differente da quello di un fotone o dei raggi X (che non subiscono interazioni coulombiane con l'atomo del campione). Il fenomeno dello *scattering* varia a seconda della modalità con cui l'elettrone incidente interagisce con l'atomo del campione e a seconda delle parti dell'atomo del campione coinvolte (nucleo o elettroni, Figura 2-3). Ci potranno essere pertanto delle interazioni di tipo coulombiano che portano alla deviazione della direzione dell'elettrone oppure veri e propri urti.

Gli *Urti* possono essere a loro volta di tipo:

- *Elastici*: non c'è perdita o trasferimento di energia dell'elettrone incidente
- *Anelastici*: avviene una effettiva variazione di energia dell'elettrone.

Anche la lunghezza d'onda dell'elettrone può subire delle variazioni nell'urto, e in questo caso si parla di :

- *Scattering Coerente*: quando la lunghezza d'onda dell'elettrone non subisce variazioni
- *Scattering incoerente*: quando la lunghezza d'onda dell'elettrone subisce variazioni

Si veda a tal proposito Figura 2-3 e Figura 2-4 che mostrano i vari tipi di interazione.

L'interazione può inoltre essere *singola* o *multipla* potendo cioè coinvolgere più atomi.

La Figura 2-5 mette in evidenza come, dato il fascio di elettroni coerente che incide sul campione, si possano verificare vari tipi di scattering (es *scattering incoerente*

*anelastico*, ecc). Nella Figura 2-6 vengono messi in relazione le tecniche e relativi strumenti di acquisizione per la cattura dei casi particolari del fenomeno di scattering, traendone informazioni importanti del campione. Nel presente elaborato ci si focalizzerà solo sul TEM.

La **diffrazione elettronica** è un fenomeno reso possibile dalla natura ondulatoria dell'elettrone. E' noto infatti che, l'incidenza di un'onda, ad esempio la luce, con un corpo solido nel quale siano praticate una o più fessure di misura comparabile con la lunghezza d'onda stessa, crei delle figure cosiddette di diffrazione (o Pattern di Diffrazione). La diffrazione elettronica avviene perché l'elettrone incidente interagisce con il reticolo di atomi del campione che, analogamente a quanto avviene per le fessure nel caso della luce, permettono il formarsi di figure di diffrazione. L'aspetto molto interessante è che le figure di diffrazione forniscono informazioni di carattere strutturale del reticolo del campione. La trattazione della corrispondenza tra struttura del reticolo e relativi pattern di diffrazione richiederebbe l'introduzione di concetti come la condizione di Bragg e reticoli di Bragg che esulano dallo scopo del presente elaborato, si rimanda pertanto per l'approfondimento ad altri testi.

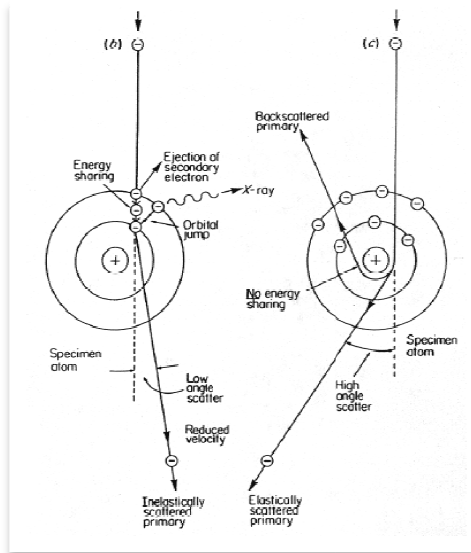


Figura 2-3- interazione elettrone e atomo campione con relativi tipi di scattering

Interactions of electrons in a solid

|                    | Interaction of electron with                 |                                     | Interaction of electron with             |                  |                |
|--------------------|--|-------------------------------------|--|------------------|----------------|
|                    | 1 electron                                   | Many electrons                      | 1 nucleus                                | Many nuclei      |                |
| Type of scattering | Inelastic                                    | Inelastic                           | (Quasi) elastic                          | Elastic          | Inelastic      |
| Scattering effect  | Electron Compton effect, electron excitation | Plasmon excitation, Cerenkov effect | Rutherford scattering, phonon scattering | Bragg scattering | Bremsstrahlung |

Figura 2-4 – classificazioni di tipi di scattering

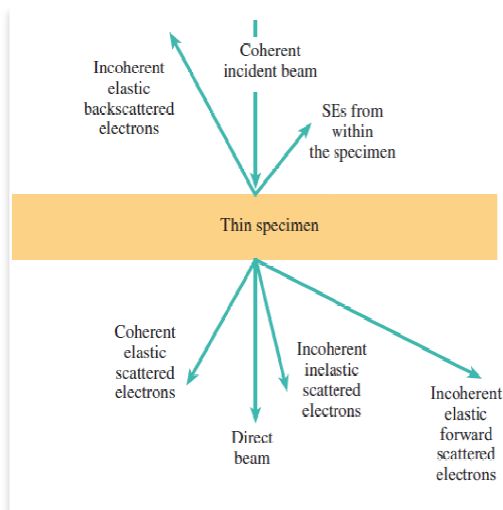


Figura 2-5 – tipi di scattering e relativi angoli tipici rispetto al campione.

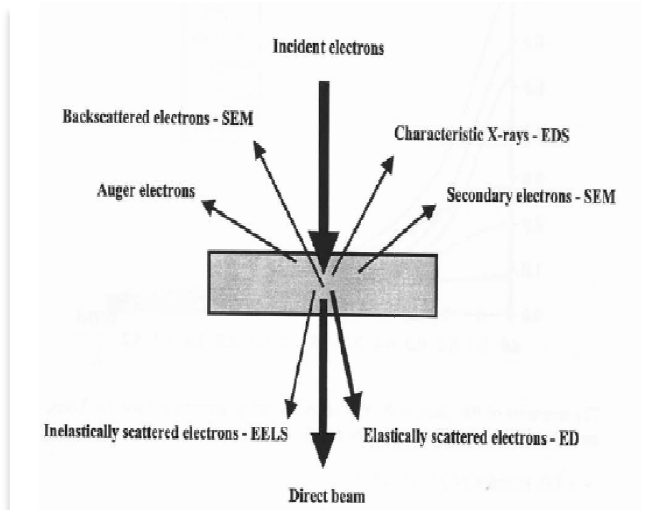


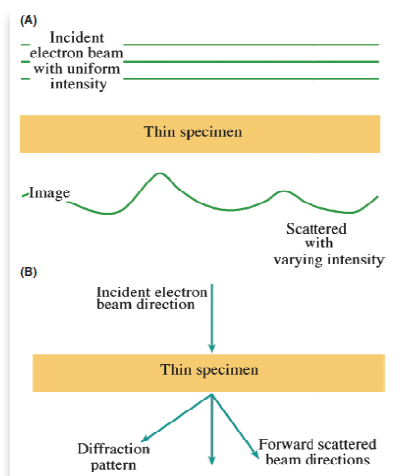
Figura 2-6 – Strumenti per la rilevazione di particolari tipi di scattering

### 2.2.3 Formazione dell'immagine

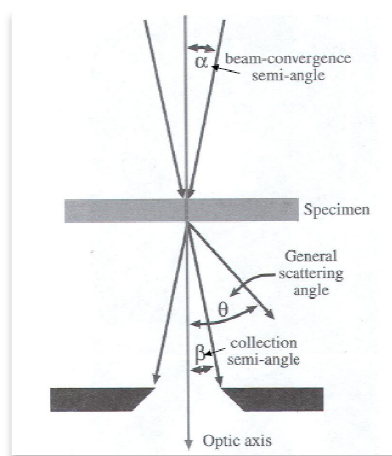
Si descrive di seguito come sia resa possibile la formazione dell'immagine TEM.

Come si vede in fig. 2-7(A) un fascio di elettroni con uniforme intensità viene fatto incidere sul campione. Il singolo elettrone, potrà passare il campione senza subire variazioni di percorso o energia, oppure subire vari tipi di scattering. Si supponga di selezionare solamente gli elettroni che non subiscono deviazioni e per farlo dovremmo imporre un'apertura a valle del campione con un angolo molto stretto. Questo, nel TEM, viene fatto dall' "objective aperture" (vedi fig.2-2 destra) che si noti essere collocato in prossimità della lente focale obiettivo. Il TEM, quindi, una volta selezionati gli elettroni che attraversano il campione senza deviazione o comunque con una deviazione nell'ordine di pochi milliradiani (vedi fig.2.8) farà rilevare sul dispositivo che raccoglie gli elettroni (detector), una intensità tanto maggiore quanto il campione risulti essere

meno spesso (o meno denso a parità di spessore)<sup>3</sup>. Infatti, parlando in termini statistici, le parti meno spesse (o meno dense) forniscono una probabilità più alta di un passaggio indenne dell'elettrone che non subisce scattering.<sup>4</sup>

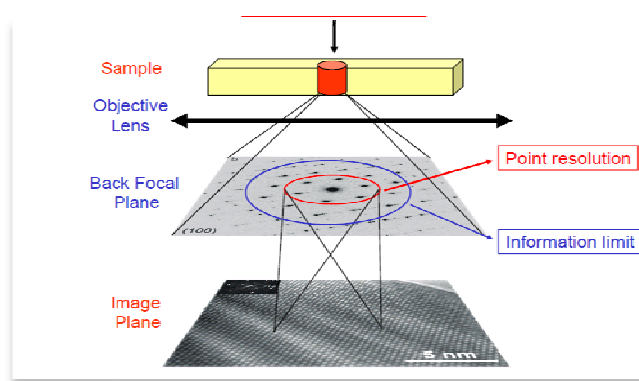


**Figura 2-7-** Schema (A) image mode (B) diffraction mode semplificato



**Figura 2-8** – angoli raccolta immagine e di diffrazione

Il TEM permette un'altra modalità di visualizzazione che è quella del *pattern di diffrazione* (vedi Figura 2-2 sinistra) ed è ottenuta da quegli elettroni (in Figura 2-7 sono appunto indicati come “diffraction pattern”) che hanno un angolo di scattering superiore a quello accettato dall'apertura (si vadano angoli  $\beta$  e  $\theta$  in Figura 2-8). Si noti sempre in Figura 2-2 di sinistra che l'apertura di “selected area” sia al di sotto della focale, appena prima delle altre lenti intermedie che hanno la funzione di ingrandimento del pattern. In Figura 2-9 viene mostrato schematicamente il piano dove è formato il *pattern di diffrazione* (back focal) e il piano immagine.

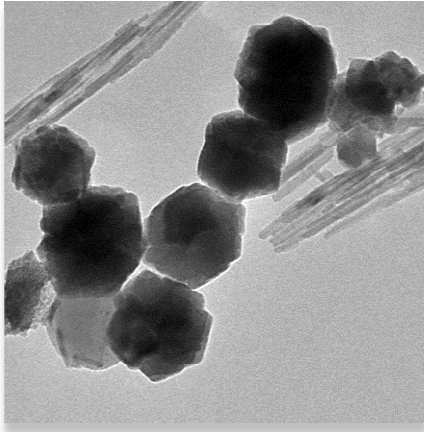


**Figura 2-9** – Piano immagine e “back focal plane” per il “pattern di diffrazione”

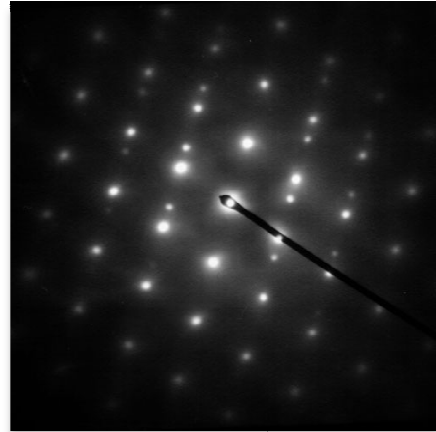
<sup>3</sup> Modalità di visualizzazione, che viene usato anche in questo lavoro, è Bright-Filed, ossia il campo senza campione e' in fondo bianco, esiste anche la modalità Dark-field.

<sup>4</sup> Ad essere rigorosi bisognerebbe sempre tener conto della variazione di densità del materiale, ma ponendoci nell'ipotesi abbastanza frequente nell'analisi di NP di uniformità di densità, la traduzione a spessore è lecita e immediata. In ogni caso l'intensità non permetterà di misurare la terza dimensione della NP, per questo sono necessarie altre tecniche.

In Figura 2-10 viene riportata una immagine TEM, si noti come si possano rilevare nelle NP zone piu' chiare e quindi meno spesse, che ci permettono di avere una generale informazione sul tipo di morfologia. La Figura 2-11 e' un pattern di diffrazione della Austenite  $\gamma\text{Fe}$  uno degli allotropi del Ferro.<sup>5</sup>



**Figura 2-10-** Immagine TEM



**Figura 2-11 -** pattern di diffrazione della Austenite  $\gamma\text{Fe}$  (uno degli allotropi del Ferro)

---

<sup>5</sup> Il pattern di diffrazione e' uno strumento importante per stabilire per esempio quale allotropo del ferro e' presente nella NP e questo e' possibile perche' sono noti i pattern di molti materiali che hanno regolarità di reticolo. In generale questo tipo di analisi detta anche Selected Area Electron Diffraction permette di focalizzare su una singola NP a differenza dell'XRD che lo fa per esempio per le polveri. Inoltre, capire se la NP sia composta da un singolo cristallo o sia frutto di accrescimenti successivi e' molto importante come informazione per chi deve controllare la produzione delle NP in quanto puo' far capire se le fasi previste sono state rispettate.

### 3 Caratterizzazione della misura e della morfologia

#### 3.1 Metodi Software per la misura delle nanoparticelle

Di seguito saranno analizzati i vari approcci che possono essere utilizzati per la caratterizzazione della dimensione e della morfologia delle NP.

La valutazione della forma e delle dimensioni delle NP di un'immagine TEM può essere fatta in modo manuale (es. con un righello su stampa cartacea), richiedendo però parecchio tempo e con qualità che dipenderà molto dall'operatore che effettua le misurazioni. Per ovviare a questi inconvenienti di discrezionalità e tediosità dell'operazione, si sono cercate soluzioni software dalle quali poter ottenere le informazioni interessate, in modo più rapido e con una precisione maggiore.

Le metodologie software individuate per la caratterizzazione della morfologia e delle dimensioni delle NP e sono:

- **Modelli di Intensità TEM:** Si basano su modelli d'intensità caratteristici del metodo di acquisizione della Microscopia TEM. Partendo dalla quantizzazione in livelli di grigio delle immagini acquisite, permettono l'identificazione degli oggetti presenti nell'immagine e la loro caratterizzazione morfologica.
- **Metodi di Segmentazione:** Utilizzano algoritmi per rendere distinguibili dal fondo (o rumore) oggetti presenti nell'immagine, rispettandone nel modo più fedele possibile i contorni, morfologia e quindi misura.
- **Metodi misura assistita:** Le misure sono effettuate manualmente dall'operatore ma con l'ausilio di software direttamente sull'immagine. Il software in generale dovrà permettere facilità e supporto nelle operazioni di misurazione e memorizzazione, oltre che la semplicità di elaborazione delle informazioni di misura effettuate.

Nella descrizione delle metodologie software si cercherà di mettere in evidenza la capacità di riconoscimento di ciascun metodo e relative incertezze.

Per l'analisi delle immagini mediante **Modelli di Intensità TEM**, ci si è avvalsi di un software di nome **Pebbles** [6] che permette di analizzare solamente immagini di Nanoparticelle ottenute con TEM.

**Pebbles** è presentato come un software user-friendly, che implementa un metodo accurato, obiettivo, riproducibile e veloce per misurare i parametri morfologici di una popolazione di NP da immagini TEM. I parametri morfologici della forma NP, si ottengono applicando modelli d'intensità all'immagine TEM. Pebbles, possiede sia una modalità automatica, in cui il riconoscimento della forma delle NP è eseguita in modo affidabile con minimo intervento umano, sia una modalità semiautomatica e manuale in cui l'utente ha il pieno controllo delle operazioni di validazione.

Per utilizzare i **Metodi di Segmentazione** e **Metodi di Misura assistita**, ci si avvarrà di un software molto diffuso, **ImageJ** (supportato dalla distribuzione Fiji).

I **Metodi di Segmentazione**, a differenza di quelli d'intensità, sono applicabili a qualsiasi tipo d'immagine e sono basati su tecniche che saranno approfondite nel paragrafo dedicato alla segmentazione. *ImageJ* mette a disposizione delle funzionalità per eseguire il metodo di segmentazione scelto e poi effettuare conteggi ed analisi sull'immagine segmentata tramite lo strumento "*analyze particle*" che fornisce a sua volta in output le tabelle delle misure e altre informazioni che risultano facilmente manipolabili.

La **Misura assistita**, resa possibile da opportuni strumenti software di *ImageJ*, e' particolarmente utile nei casi in cui non possano essere applicati metodi di intensità e segmentazione, ossia tipicamente, in presenza di agglomerati e sovrapposizioni e irregolarità di forma. In questo caso la misura e' effettuata direttamente sulla immagine TEM ed il tutto poi fornito in output in formato tabellare.

In tutti i casi, una volta arrivati ad un output con le informazioni rilevate delle NP misurate, sarà possibile analizzare la distribuzione con relative informazioni di diametro medio, dispersione dei diametri ecc. Queste informazioni saranno confrontate con quelle presenti in letteratura a parità di metodo di sintesi.

### 3.2 Modelli di Intensità TEM - Software Pebbles

Il software Pebbles utilizza un approccio legato al metodo di acquisizione delle immagini TEM. Questo metodo si basa su modelli di intensità che derivano dal funzionamento della microscopia TEM.

Pebbles, oltre alla misura in 2D della NP è in grado di riconoscere delle forme 3D di NP che con una certa frequenza possono essere trovate nelle produzioni.

Prima di passare all'introduzione dei modelli d'intensità, ricordando quanto descritto nel paragrafo 2.2.3 dedicato alla formazione dell'immagine TEM, è immediato comprendere come una NP cubica o sferica (Figura 3-1A) attraversata dal fascio elettronico in un TEM nel quale siano stati opportunamente selezionati gli elettroni con scattering praticamente nullo (grazie ad apertura di pochi milliradiani), possa fornire una immagine con scala di grigio come in Figura 3-1B. Infatti, nell'ipotesi che il livello di grigio sia in relazione diretta con lo spessore<sup>6</sup>, è possibile comprendere anche la relazione tra lo spessore della NP (Figura 3-1C<sup>7</sup>) e  $J(x,y)$  (Figura 3-1D) che rappresenta invece il valore del modello di intensità adottato da Pebbles per trarre informazioni dell'immagine<sup>8</sup>. Si vedrà pertanto che questa interpretazione apparentemente intuitiva ha una spiegazione puntuale nei modelli d'intensità spiegati nel prossimo paragrafo.

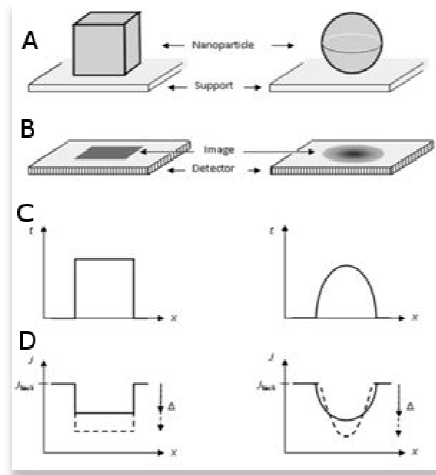
Gli algoritmi che stanno alla base di questo software, sono presentati ed analizzati in [6]. Ne viene fatta anche una verifica per il solo caso di NP di forma sferica arrivando a dimostrare che la precisione della stima del diametro e' vicina al 1% .

---

<sup>6</sup> piu' scuro equivale a piu' spessore in quanto meno elettroni riescono a passare senza subire scattering

<sup>7</sup>  $t$  sta per thickness ossia profondità, nell'ipotesi di NP con densità uniforme cosa che nel caso cristallino di solito e' accettabile.

<sup>8</sup> Modello di intensità puo' essere lineare disegnato in linea continua, modello quadratico con linea tratteggiata



**Figura 3-1** – (A) NP campione, (B) Immagine della NP in scala di grigio, (C) Spessore, (D) modello di intensità

### 3.2.1 Teoria alla base dei modelli di intensità

In [6] sono introdotti alcuni concetti che servono a comprendere su cosa siano basati i modelli di intensità.

Si parte dal creare una mappa dell'intensità del fascio,  $I(x,y)$ , che sarà:

$$I(x,y) = I_0 T_{supp} T_{NP}[t(x,y)] = I_{BACK} T_{NP}[t(x,y)] \quad (3.2)$$

dove  $I_0$  è l'intensità del fascio di elettroni incidente sul campione,  $T$ , la **Trasmittanza** (trasmittance)  $T = \frac{I_1}{I_0}$  dove  $I_1$  è l'intensità del raggio che ha attraversato il campione.  $T_{NP}$  e  $T_{supp}$  sono rispettivamente la trasmittanza della NP e del supporto (se ne esiste uno),  $t$  è la funzione bivariata che esprime lo "spessore" della NP, e  $I_{BACK}$  è l'intensità dello sfondo percepito dal rivelatore. Per semplicità, si assuma che la NP sia omogenea, quindi  $T_{NP}$  dipende dallo spessore  $t$  della posizione  $(x,y)$ , (il trattamento può essere facilmente esteso a NP disomogenee).  $T_{NP}$  descrive come lo spessore della NP venga tradotto in variazione di contrasto dell'immagine.

Nel paper vengono poi spiegate quali siano le espressioni della trasmittanza per il caso scattering di tipo incoerente<sup>9</sup>, dimostrando come la dipendenza sia di tipo esponenziale rispetto spessore nella posizione  $(x,y)$ :

$$T = e^{[-n\sigma(E0, \beta)t(x,y)]} = e^{\frac{-t(x,y)}{\Lambda(E0, \beta)}} \quad (3.3)$$

Dove  $n = N_A \rho t / W$  è il numero di atomi nel campione di peso atomico  $W$ , di densità  $\rho$ , di spessore  $t$  e  $N_A$  è il numero di Avogadro,  $\sigma(E0, \beta)$  è l'effetto cross-section per uno specifico processo di scattering che si sta prendendo in esame. A questo punto poiché avvengono più processi di scattering in contemporanea, considerandoli da un punto di vista probabilistico come processi indipendenti, si avrà che la trasmittanza di un processo

<sup>9</sup> Si veda paragrafo 2.2.2 Scattering e Diffrazione elettronica



di scattering e' valutabile mediante la moltiplicazione dei contributi dei singoli eventi di scattering :

$$T_{incoerente} = T^{(1)}T^{(2)}..T^{(M)} = e^{-\frac{t(x,y)}{\Lambda_{eff}}} \quad \Lambda_{eff} = [1/\Lambda^{(1)} + 1/\Lambda^{(2)} + .. + 1/\Lambda^{(M)}]^{-1} \quad (3.4)$$

Dove  $\Lambda_{eff}$  è lunghezza totale effettiva del valore medio del cammino del processo di scattering. L'analisi procede per arrivare alla formulazione della Trasmittanza del processo di diffrazione che sfrutta un'espressione nota come equazione Howie-Whelan :

$$T_{diffract} = 1 - (s_{eff}\xi_g)^{-2} [\sin(\pi t s_{eff})]^2 \quad (3.6)$$

Dove  $\xi_g$  "extinction distance" è una lunghezza caratteristica del composto e piani di diffrazione ,  $s$  e' la deviazione dalla condizione di diffrazione e  $s_{eff} = (s^2 + 1/\xi_g^2)^{-1/2}$ .

L'interpretazione di questa formula, per il caso ideale della NP che non abbia difetti, dice che la forza della diffrazione degli elettroni che hanno subito scattering dipende sempre dallo spessore  $t$  dell'oggetto. La combinazione della (3.6) con la (3.4) è proprio l'espressione della trasmittanza cercata. L'espressione che ne deriva (nel software viene definita come formula "Expo\_Sine") e' particolarmente complessa e difficilmente applicabile ad algoritmi di ottimizzazione che dovrebbero portare a ricavare valori ottimi di  $\Lambda_{eff}$ ,  $\xi_g$ ,  $s_{eff}$ .

In [6] viene dimostrato che si può arrivare a descrivere la trasmittanza utilizzando due modelli, uno di tipo lineare (3.7) e uno di tipo quadratico (3.8) che sono del tutto consistenti con quanto sopraesposto e permettono un ottimo livello di approssimazione.

$$T = 1 - p_1 t \quad (3.7)$$

$$T = 1 - p_1 t - p_2 t^2 \quad (3.8)$$

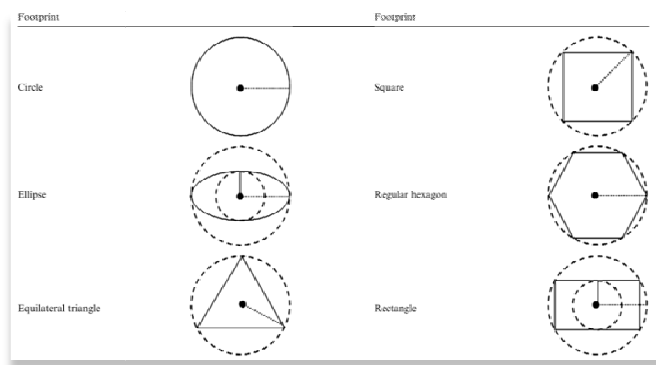
L'algoritmo che permette di ricavare i valori dei parametri  $p_1$  e  $p_2$ <sup>10</sup> (quindi dei semplici coefficienti di un polinomio) sfrutta l'algoritmo del semplice utilizzando come funzione obiettivo da minimizzare che viene indicata come GOF "Goodness Of Fit" (ossia bontà della stima della forma), la somma del valore assoluto dei residui  $|J_{exp} - J_{calc}|$ . Gli autori giustificano quest'ultima scelta ritenendo che il dato sperimentale (l'immagine) in realtà non sia soggetto a fluttuazioni statistiche che possano essere esprimibili con la consueta formula Gaussiana degli errori. Una volta effettuati i calcoli del centro e del diametro delle NP, Pebbles fornisce la migliore stima e ne mostra il risultato a video. Oltre che il cerchio che delimita la particella (caso sfera) vengono anche mostrati dei grafici 3D che ben rappresentano anche visivamente la differenza tra il modello trovato e la reale immagine della NP. Si vedano in seguito degli esempi di funzionamento.

<sup>10</sup> Il modello per di trasmittanza per una NP cristallina e'  $T_{cryst} = 1 - \left(\frac{1}{\Lambda_{eff}}\right) t - \left[\left(\frac{\pi}{\xi_g}\right)^2 - \left(\frac{1}{2\Lambda_{eff}^2}\right)\right] t^2$  dalla quale sono evidenti i valori di  $p_1$  e  $p_2$  se comparata alla (3.8).

Pebbles sarà quindi usato per la misura delle dimensioni delle NP in 2D e si potrà anche capire, con ampio margine di sicurezza la forma 3D della NP analizzata. Tuttavia, non si potranno avere misure dello spessore le quali non sono derivabili da una sola immagine TEM.

Si descrive ora come possa essere possibile per Pebbles “riconoscere” qualitativamente una serie di forme 3D che si presentano molto frequentemente .

Nella Figura 3-1°, come già evidenziato in precedenza, viene mostrato come venga interpretata una nanoparticella di forma cubica e una di forma sferica dal TEM Figura 3-1B. In Figura 3-1C viene riportato il grafico dello spessore (Tickness) dell’oggetto in funzione della dimensione spaziale x. In Figura 3-1D J indica l’intensità drcpmdo il modello scelto. L’operazione di “fitting” ossia di riconoscimento della forma della NP e dei relativi parametri di misura, avviene per mezzo di un modello di trasmittanza di tipo lineare ( $T = 1 - p_1t$ ) o quadratico ( $T=1- p_1t-p_2t^2$ ) di cui si chiarirà in seguito la consistenza<sup>11</sup>



**Figura 3-2 - misure caratteristiche per alcune forme regolari in Pebbles**

Pebbles possiede una libreria molto completa di forme 3D es. Piramidi e prismi con diversi tipi di base (in Figura 3-2 vengono rappresentate le misure caratteristiche per alcune forme regolari) che siano posizionati in piedi, distesi ecc. Il software permette di visualizzare in modo intuitivo l’operazione di fitting per far comprendere all’operatore se effettivamente la particella si avvicini alla forma 3D che si sta provando.

Nel caso specifico delle immagini analizzate in questo elaborato e’ stato possibile affermare che alcune nanoparticelle analizzate che presentavano una forma triangolare fossero piatte, ossia dei piccoli prismi e non fossero per esempio tetraedri.

### 3.2.2 Modalità di utilizzo Pebbles e guida alla caratterizzazione

Di seguito si propone una guida all’utilizzo di Pebbles per l’analisi delle caratteristiche morfologiche delle NP<sup>12</sup>. Data un’immagine TEM, si vogliono individuare le nanoparticelle in essa presenti, misurarne il diametro e la variabilità. Pebbles prevede tre tipi di modalità di funzionamento:

- **Modalità Manuale:** l’operatore e’ in grado di interagire con il programma in tutti gli aspetti di caratterizzazione della misurazione, ossia sceglie la forma delle NP tra quelle messe a disposizione, decide il centro delle NP, e prova a

<sup>11</sup> Esiste anche il modello Expo\_Sine che sarà chiaro alla fine di questo paragrafo.

<sup>12</sup> Pebbles è sviluppato in Matlab®, si immagina che l’operatore sia in grado di eseguire il pacchetto scaricato dal sito <http://pebbles.istm.cnr.it/>

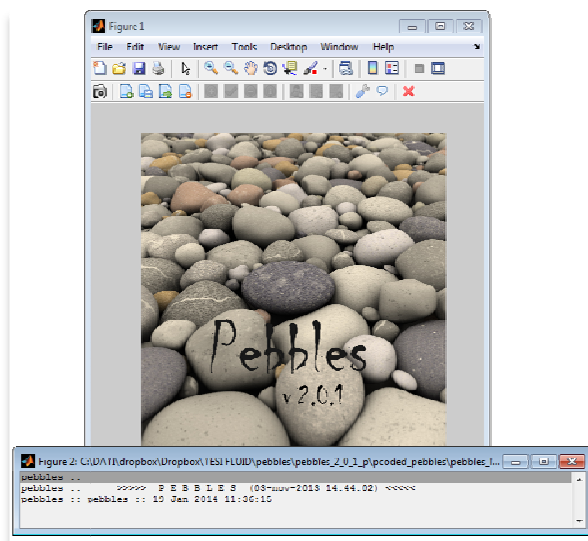
identificarne la misura (es. tracciandone il raggio nel caso della sfera), sarà poi il programma stesso che proporrà una misurazione e permetterà all'utente (tramite dei grafici) di stabilirne la bontà. Questa modalità è sempre propedeutica alla altre, permette infatti, la stima di parametri richiesti nelle misurazioni di tipo automatico. Tutti i risultati della caratterizzazione vengono mostrati in una finestra di log che appare assieme alla finestra principale di Pebbles.

- **Modalità Semi-automatica:** Per utilizzare questa modalità, occorre aver già scelto una forma per le NP e conoscere una stima della dimensione media della NP. Questo viene fatto con la modalità Manuale. La modalità semiautomatica prevede che l'operatore indichi solamente il centro della nano particella e il programma in automatico decide la dimensione (es. del raggio per la sfera). In ogni caso, vengono proposti dei grafici per permettere all'utente di verificare la bontà del "fit" e quindi validarne o meno la misura.
- **Modalità automatica:** In questa modalità, come in quella semi-automatica, si dovranno scegliere all'inizio una forma accettabile e una stima della dimensione media delle NP. Vengono inoltre richiesti: *Delta* (che è funzione del minimo valore di grigio che può essere riconosciuto appartenente ad un oggetto NP) e un parametro di "spacing" per poter creare una struttura di punti (ad alveare) che sovrapposta all'immagine permetta di individuare i centri delle NP (la spaziatura sarà inferiore alla misura del diametro proposto). In questa modalità non ci saranno fasi di accettazione da parte dell'utente e l'avanzamento verrà visualizzato nel log con il riconoscimento delle particelle che man mano saranno evidenziate in giallo sull'immagine.

Viene riportata di seguito una utile guida all'utilizzo delle varie modalità di funzionamento.


### 3.2.2.1 Pebbles - Modalità Manuale

Lanciando l'applicazione Pebbles, appariranno 2 finestre (Figura 3-3)

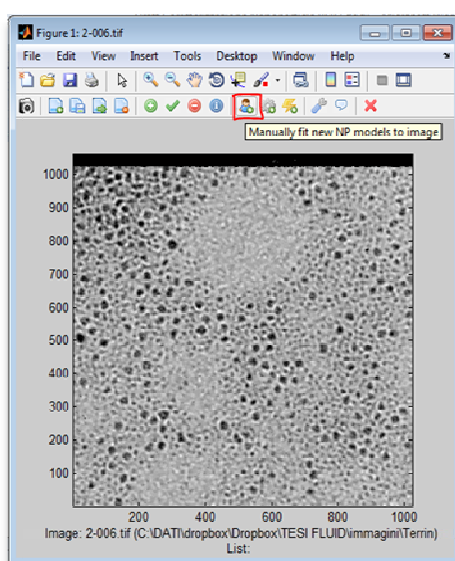


**Figura 3-3** – Finestra principale applicazione Pebbles e finestra di LOG

La finestra principale (“Figure 1”) mette a disposizione un menu’ multifunzione e due barre di tools. La finestra di LOG (“Figure 2”) fornirà informazioni sulle operazioni che vengono eseguite dall’operatore o in automatico dal software.

Per iniziare un’analisi e’ necessario caricare l’immagine. Per questo e’ possibile utilizzare la scorciatoia premendo il bottone con “macchina fotografica”  presente nel toolbar inferiore della finestra principale.


A questo punto apparirà la foto TEM (al posto della foto dei ciottoli) (Figura 3-4).

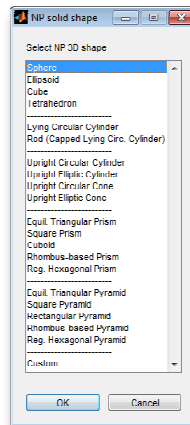


**Figura 3-4** – Finestra di Pebbles ed evidenziato nel tool bar il bottone per il fit Manuale

Si notino 2 cose. Innanzitutto l'immagine subisce un pretrattamento, cioè l'immagine rovesciata e la banda contenente la scala è posizionata in alto (questo per comodità di elaborazione delle coordinate nell'immagine). Si noti inoltre che appaiono nel toolbar inferiore, 3 bottoni che indicano rispettivamente la modalità manuale, semiautomatica e

manuale  .

Pertanto, per far partire la procedura manuale, basterà cliccare sul bottone  . A questo punto si aprirà il pannello riportato in Figura 3-5:



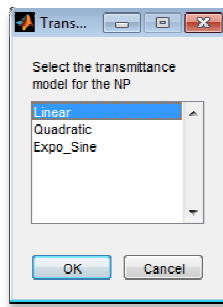
**Figura 3-5 – Pannellino per selezione della forma 3D della NP**

in cui sono selezionabili da parte dell'operatore le forme 3D che si crede siano quelle delle NP che si stanno analizzando.

Vengono messi a disposizione dell'operatore vari modelli 3D di NP. I principali sono Sfere, Ellissoidi, Cubi, Tetraedri. Sono poi presenti anche Cilindri, piramidi con base triangolare, quadrata, rettangolare, Prismi con diverse basi regolari. Vengono inoltre proposte anche le varianti in cui le particelle non siano disposte sulla base ma possano essere "distese" (es. "Lying Circular Cylinder"). Esiste anche una modalità "custom" con la quale possono essere specificate forme non esistenti nell'elenco.

In questo elaborato, per i casi analizzati con Pebbles, si è per lo più utilizzato la forma 3D a Sfera. In un caso è stato fondamentale l'utilizzo di Pebbles per capire la morfologia delle NP cioè in un caso le NP avevano forma triangolare ed esagonale, ma non era immediato, ad ispezione ottica, capire se si trattasse di prismi o piramidi (con base triangolare o esagonale). Come si vedrà si è potuto stabilire con ottima approssimazione che si trattasse di prismi molto piatti.

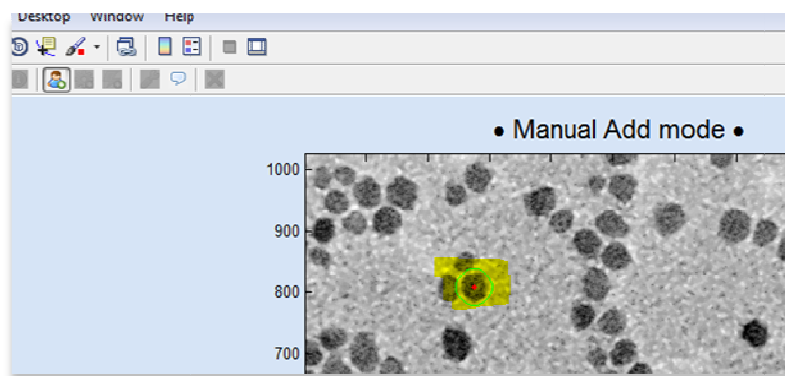
Una volta scelta la forma delle NP, appare il pannello di fig. 3-6 per la selezione del modello di Trasmittanza che deve essere utilizzato per le NP. Come già esposto in precedenza i modelli a disposizione sono : *Lineare, Quadratico e Expo\_Sine*



**Figura 3-6** – Selezione del modello di trasmittanza

Si supponga di selezionare il modello lineare. Premendo Ok nel pannello di Figura 3-6 ritorna alla finestra principale. Per la caratterizzazione in modalità manuale della singola NP avverrà con le seguenti operazioni (Figura 3-7):

- puntare il centro della particella cliccando con tasto sinistro: apparirà punto rosso<sup>13</sup>.
- scegliere il raggio della particella: appare un cerchio verde che segue il puntatore del mouse (Figura 3-7). Sarà sufficiente ricliccare il tasto sinistro del mouse in prossimità del bordo per iniziare il processo di misurazione della dimensione della particella<sup>14</sup>.



**Figura 3-7-** evidenziata in giallo la NP con puntatore centrale e cerchio impostato manualmente

A questo punto appariranno i 4 grafici in Figura 3-8 che sono:

- A) e' il grafico che mostra in 3D i livelli di grigio della particella derivati dall'immagine TEM (in Blu) e quelli ipotizzati dal modello che descrive la forma 3D scelta (ocra) per agevolarne il confronto.
- B) mostra il cosiddetto "fit" in 2D ossia il contorno individuato da Pebbles e di conseguenza la relativa misura del raggio.
- C) E' il grafico 3D che mostra quanto i livelli di grigio reali si discostino dalla forma 3D scelta (viene applicata la differenza).
- D) Rappresenta la differenza in 2D tra i livelli di grigio e la particella calcolata da Pebbles.

Questi 4 grafici permettono, quindi, all'operatore, di capire quanto sia buono il "fit" in 2D che fornisce la misura della NP (es. i diametro nel caso sfera ) e il "fit" in 3D che

<sup>13</sup> Non occorre essere precisi nel trovare il centro, sarà Pebbles che si occuperà di proporlo dopo l'elaborazione

<sup>14</sup> Anche per il raggio come nel caso del centro non occorre essere precisi sarà Pebbles che cercherà il raggio migliore.

permette di validare la scelta dell'ipotetica forma 3D indicata come possibile per la nanoparticella dell'immagine. Le immagini C e D, infatti, forniscono una buona visualizzazione del GOF ossia "goodness of fit" che come visto par 20 è uguale alla somma del valore assoluto dei residui  $|J_{exp} - J_{calc}|$  (intensità Tem e intensità calcolata). Un valore basso di GOF indica un "fit" migliore.

Una volta che il risultato sia considerato soddisfacente per l'operatore basterà che prema "Yes" nel pannellino che chiede: "Accept NP fit result?" posto nel centro dei 4 grafici.

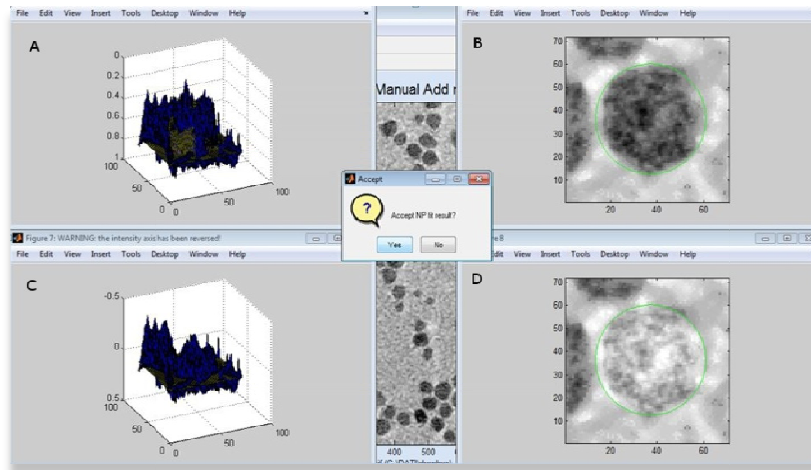


Figura 3-8 – grafici per la validazione della bontà di fit

Una volta accettato il "fit" proposto da Pebbles sarà possibile ricominciare da capo tutta la procedura di misurazione con una nuova NP. Nella finestra di LOG (Figura 3-9) sono riportati:

- forma 3D scelta,
- le coordinate del centro della NP,
- GOF (goodness o "fit", piu' basso indica fit migliore),
- Delta (che e' funzione del minimo valore di grigio che puo' essere riconosciuto come parte di NP)
- il valore di Trasmittanza (valori percentuali piu' alti indicano particelle piu' dense/spesse)

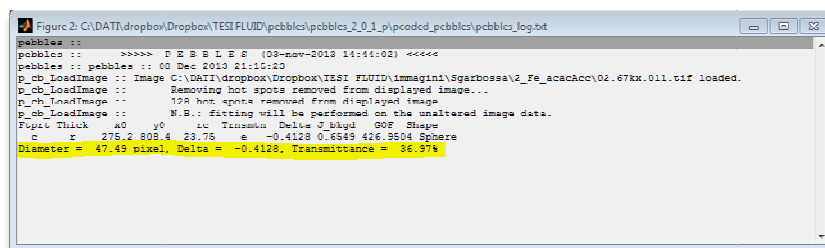



Figura 3-9 – log con informazioni dopo una misurazione di NP

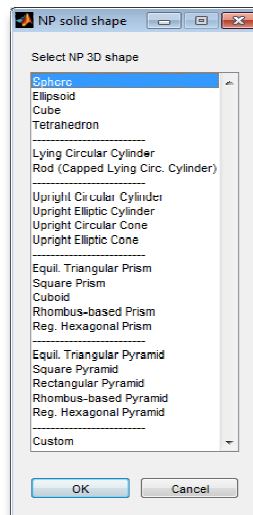
### 3.2.2.2 Pebbles - Modalità Semi-Automatica

La modalità semiautomatica, presuppone che si siano fatte alcune prove di "fit" con la procedura manuale. Si parte dal presupposto che si stiano analizzando NP che abbiano

stessa forma 3D (es. tutte sfere, tutti cilindri distesi, ecc) e si sia ottenuto un buon fit manuale anche per quanto riguarda la misura della dimensione (es. del diametro) della NP.

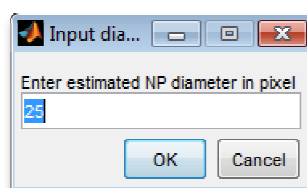
L'immagine TEM e' gia' caricata in quanto si sono effettuati precedentemente delle operazioni di fit manuali. Pertanto si e' nella condizione simile a quella di Figura 3-4 in cui verranno evidenziate in verde le particelle di cui si sono trovate le dimensioni.

Sempre nel toolbox inferiore si proceda cliccando il tasto  per iniziare il fit semi-automatico. Come in precedenza apparirà la scelta della forma (Figura 3-10):



**Figura 3-10** Pannellino per selezione della forma 3D della NP

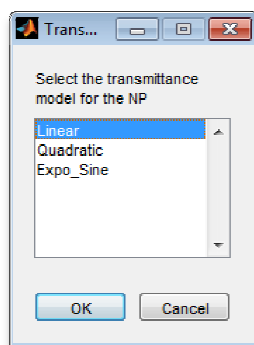
supponendo di continuare a scegliere “Sphere” come forma 3D, si procede premendo “Ok” e apparirà pannellino di Figura 3-11 che chiede in input un diametro “stimato” delle NP. Andrà benissimo porre per esempio quello ricavato dall’ispezione con la modalità manuale e che si ricava dalla finestra di LOG (la misura e’ in pixel).



**Figura 3-11** – immissione del diametro stimato della NP

Premendo “Ok” si passa alla scelta del modello di trasmittanza, esattamente come nel caso manuale (es: modello lineare).






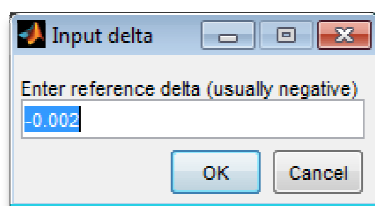
**Figura 3-12** - Selezione del modello di trasmittanza

A questo punto la modalità semi-automatica permette di fare una misurazione semplicemente indicando in modo approssimato quello che si ritiene essere il punto centrale della nanoparticella. Sarà il software stesso che troverà il fit corretto indicando centro e diametro. Effettuata l'analisi, verranno proposte sempre le 4 finestre di Figura 3-8 e verrà chiesto se risultato possa essere soddisfacente. Il passaggio successivo è quello che permette di utilizzare la procedura semi-automatica su tutta l'immagine.

Si tenga presente che, se la distribuzione dei diametri delle NP dovesse essere molto larga, l'impostazione del valore del raggio potrebbe essere vincolante e portare allo scarto di alcune particelle (appare una crocetta rossa sul centro delle NP scartate). È infatti frequente che si debba rilanciare la procedura semiautomatica con un valore del raggio stimato inferiore (o superiore).

### 3.2.2.3 Pebbles- Modalità Automatica.

La modalità automatica si poggia interamente su quanto visto sulla modalità Manuale e semi-automatica. Selezionando l'icona  si percorrono esattamente gli stessi passi visti con la modalità semi-automatica, ossia nell'ordine la scelta della forma della NP, del diametro e del modello di trasmittanza. Viene aggiunto il valore "Delta" (che si ricorda rappresentare il minimo valore di grigio che può essere riconosciuto come parte di una NP, Figura 3-13) che di solito va impostato come la metà del valore che viene ricavato dai log delle misurazioni manuali.



**Figura 3-13** – Impostazione del parametro Delta

Non essendoci, a differenza della modalità semi-automatica, l'operatore che indica il centro della NP, la modalità adottata da Pebbles per "cercare" automaticamente i centri consiste nel creare una serie di punti a distanza regolare da sovrapporre all'immagine, disposti secondo un pattern simile a quello di un alveare. Come si vede in Figura 3-14 occorre scegliere "lo spacing", ossia lo spazio tra un punto di centro e quello successivo che di solito viene proposto pari alla metà del diametro della NP.

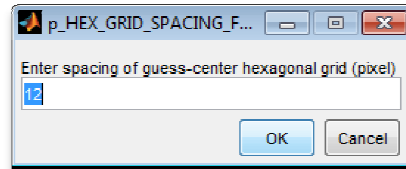


Figura 3-14 – Impostazione dello spacing

Viene poi messo a disposizione una funzionalità molto utile che puo' diminuire drasticamente il tempo di elaborazione, ossia la possibilità di limitare la ricerca o escludere dalla ricerche delle zone dell'immagine semplicemente delimitando gli spazi con delle spezzate (Figura 3-15).

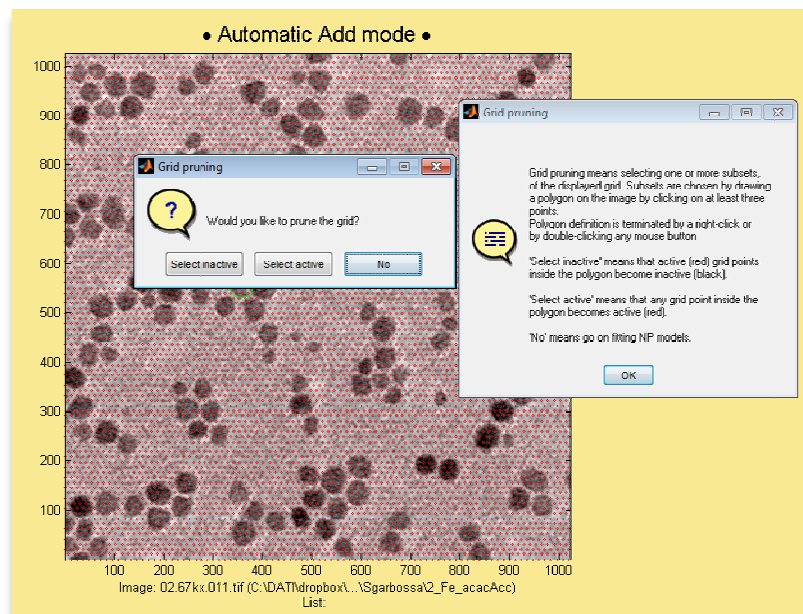




Figura 3-15 – finestra con evidenziato il pattern ad alveare


Si tenga presente che viene calcolato il fit con il modello prescelto ripetendolo per ogni punto “dell'alveare” senza che sia richiesta di validità della bontà del fit. E' chiaro che questo sia time consuming, per questo dove possibile si dovrebbe evitare di includere zone non di interesse o per le quali non ci siano particelle da misurare. Man mano che la procedura avanza si vedono le particelle individuate evidenziate da contorno giallo. Per alcune sono evidenti anche alcuni fit sovrapposti e di poco traslati. C'e' comunque un algoritmo che elimina fit di poco traslati o sovrapposti ( non e' documentato nel paper). Nei log, in effetti, viene riportato quante sono state le NP rilevate e quante sono state cancellate e viene anche messo in evidenza la posizione dell'ultima particella individuata.

Si tenga presente che l'elaborazione parte dal basso dell'immagine e procede verso l'alto e da sinistra verso destra. In questo modo, grazie alle coordinate delle ultime particelle ci si puo' rendere conto a che punto possa essere l'elaborazione (non esiste uno stato di avanzamento).

### 3.2.2.4 Analisi dei dati e statistiche da output Pebbles

Esiste un software aggiuntivo a Pebbles, che si chiama Pebbles-Juggler che riceve in input i dati delle misurazioni delle particelle effettuate con Pebbles e propone un grafico a barre della distribuzione. Per vari motivi si preferisce esportare i dati in formato testo e poi elaborarlo da foglio elettronico.

Sempre a partire dalla schermata principale di Pebbles (Figura 3-4) nel toolbar inferiore, tramite il tasto  si possono salvare le liste di oggetti individuati e misurati con i vari metodi. Verrà prodotto un file con estensione .mat che puo' essere ricaricato e ripreso in qualsiasi momento con il tasto .

Con l'icona  e' invece possibile esportare su file testo i seguenti campi(vedi Figura 3-16) :

- *File* : e' il file con estensione mat dell'elaborazione effettuata da Pebbles
- *3D Shape* : e' la forma 3D riconosciuta.
- *2D Shape*: e' la forma della base riconosciuta
- *Transmittance* : modello di trasmittanza utilizzato
- *Center\_x* : coordinata x del centro
- *Center\_y* : coordinata y del centro
- *Circum\_radius,in\_radius,equiv\_radius* : misure del diametro (dipende dalla forma 2D della base)
- *Azimuth* : angolo dell'asse principale rispetto alla immagine TEM
- *Area*: della particella 2D
- *Delta*: funzione del minimo valore di grigio tra i possibili che indicano che un oggetto dell'immagine e' una NP.

|   | A                          | B        | C        | D           | E             | F         | G          | H             | I         | J       | K            | L           | M         |
|---|----------------------------|----------|----------|-------------|---------------|-----------|------------|---------------|-----------|---------|--------------|-------------|-----------|
| 1 | file                       | 3D shape | 2D shape | thickness   | transmittance | center_x  | center_y   | circum_radius | in_radius | azimuth | equiv_radius | area        | delta     |
| 2 | 02.67kx.002_passate finale | Sphere   | circle   | square-root | linear        | 1,740224  | 853,939771 | 22,055842     |           | 0       | 22,055842    | 1528,259666 | -0,270307 |
| 3 | 02.67kx.002_passate finale | Sphere   | circle   | square-root | linear        | 46,330015 | 674,055837 | 20,365221     |           | 0       | 20,365221    | 1302,951068 | -0,282969 |
| 4 | 02.67kx.002_passate finale | Sphere   | circle   | square-root | linear        | 38,531621 | 825,149047 | 24,271093     |           | 0       | 24,271093    | 1850,668125 | -0,31323  |

Figura 3-16 – colonne dati Pebbles importati in excel

Si tenga presente che i valori delle misure sono sempre in pixel quindi dovranno essere fatte le dovute conversioni per ottenere le misure nel sistema metrico decimale (nm). In generale basta trovare coefficiente nm/pixel, in questo modo moltiplicando il valore in pixel per questo coefficiente si avrà la misura richiesta in nm.

### 3.3 ImageJ-Fiji

ImageJ e' un software di pubblico dominio sviluppato in Java che permette operazioni di image processing. Esiste anche una distribuzione che permette di mantenere sia il codice dell'applicativo ImageJ, sia tutti i plugin a corredo allineati all' ultima release. La distribuzione si chiama Fiji <sup>15</sup>.

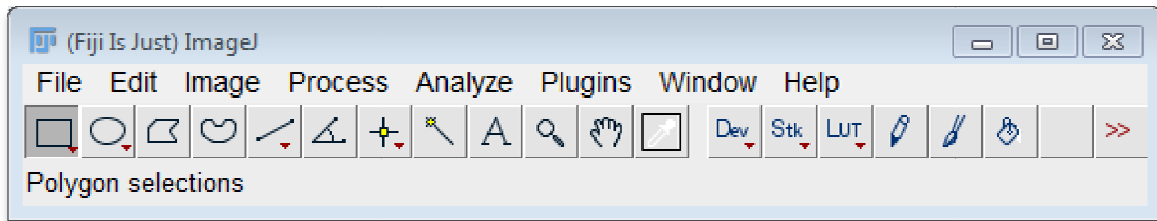


Figura 3-17 – finestra iniziale Fiji - Imagej

Pertanto Fiji, come distribuzione di ImageJ, oltre a rendere piu' facile l'installazione e il mantenimento aggiornato di ImageJ permette di ottenere una serie di plugin che sono particolarmente utili in molti campi in cui sono necessarie pesanti e specifiche elaborazioni di immagini, avremo modo di vederne alcune in questo elaborato. Alcune caratteristiche di ImageJ sono:

- **Multipiattaforma:** ImageJ e' scritto in Java, gira su Linux, Mac OS X e Windows, 32-bit e 64-bit.
- **Open Source:** scritto in java e i suoi sorgenti sono free e pubblici.
- **User Community:** ImageJ ha una comunita' worldwide di sviluppatori e utilizzatori.
- **Macros:** E' possibile creare delle automatizzazioni delle attivita' repetitive creando delle macro direttamente da ImageJ che possono essere gestite anche da chi non sa programmare
- **Plugins:** Sono estensioni di ImageJ che possono essere sviluppate in Java con un editor built-in. I plugin sono i piu' disparati e sono piu' di 500.
- **Toolkit:** La forza di ImageJ sta nel suo insieme di feature che permettono molti aspetti di image processing potendo anche sviluppare applets, servlets o applicazioni.
- **Data Types:** 8-bit grayscale or indexed color, 16-bit unsigned integer, 32-bit floating-point and RGB color.
- **File Formats:** Open e save: TIFF (uncompressed) o come raw data. Open and save GIF, JPEG, BMP, PNG, PGM, FITS e ASCII. Open DICOM. E' possibile anche l'apertura da URL. Altri tipi personalizzati possono essere utilizzati con altri plugin sviluppati ad hoc.
- **Selections:** Permette la selezione di aree rettangolari ellittiche e in generale di forma irregolare. Si aggiungono poi la selezione con linea, e selezione automatica. Filtri "Draw, fill, clear, filter" o selezione per la misura.
- **Image Enhancement:** Tra le manipolazioni piu' utili smoothing, sharpening, edge detection, median filtering and thresholding sia in scale di grigio che RGB
- **Geometric Operations:** Crop, scale, resize and rotate. Flip vertical o orizzontale.
- **Analysis:** Misura di area, media, standard deviation, min and max di una selezione di un' immagine. Misura lunghezze ed angoli. Puo' utilizzare unita' di misura impostabili nelle scale. Genera istogrammi e grafici.
- **Color Processing:** Permette lo Split a 32-bit immagini a colori RGB o HSV.
- **Stacks:** Permette la visualizzazione dei cosiddetti "stack" di immagini correlate e raggruppandole in unica finestra. Permette l'apertura direttamente di folder contenenti immagini e permette di salvarli in vari formati Process an entire stack using a single command.

<sup>15</sup> Non occorre Per una presentazione generale di Fiji vedere il sito <http://fiji.sc/Fiji>

*Fiji is an image processing package. It can be described as a distribution of ImageJ (and ImageJ2) together with Java, Java3D and a lot of plugins organized into a coherent menu structure. Fiji compares to ImageJ as Ubuntu compares to Linux. The main focus of Fiji is to assist research in life sciences.*

### 3.3.1 Verifiche della qualità delle immagini TEM

ImageJ permette di effettuare delle verifiche sulle immagini TEM per valutarne la qualità. E' noto [5] che per queste immagini possono essere riscontrati dei problemi di messa a fuoco, di astigmatismo e di impostazione del contrasto che possono inficiare la nitidezza dell'immagine.

C'e' uno strumento molto facile da utilizzare che permette di stabilire a valle dell'osservazione se le immagini sono state acquisite con fuoco e contrasto corretti. E' sufficiente produrre una FFT (Fast Fourier Transform) dell'immagine (in Fiji/ImageJ, menu' Process e FFT). Le figure che seguono tratte da [5] descrivono tramite FFT le casistiche che possono presentarsi e permettono una facile identificazione dei problemi di messa a fuoco. In particolare in Figura 3-18 vengono evidenziate delle immagini con vari tipi di sottoesposizione (underfocus), in Figura 3-19 sono riportati problemi di sovraesposizione (overfocus) e di minimo contrasto. Nella Figura 3-20 sono riportate delle immagini con varie tipologie di astigmatismo.

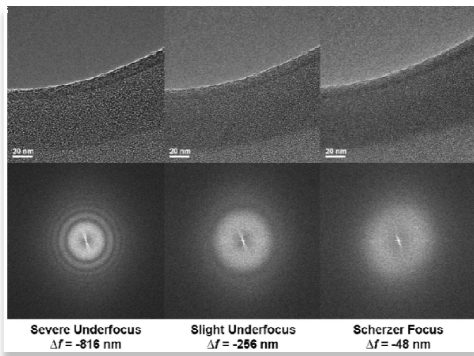


Figura 3-18 – immagini sottoesposte (under focus)

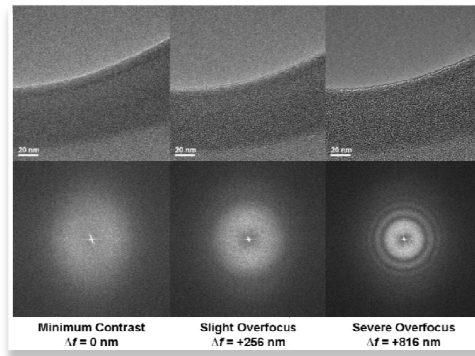


Figura 3-19- immagini sovraesposte (over focus)

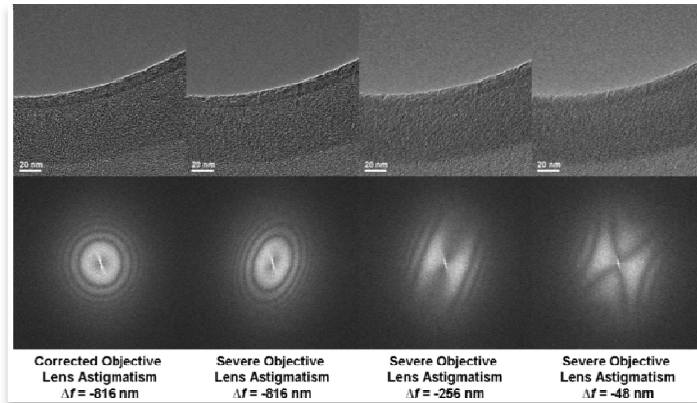


Figura 3-20- immagini con problemi di astigmatismo

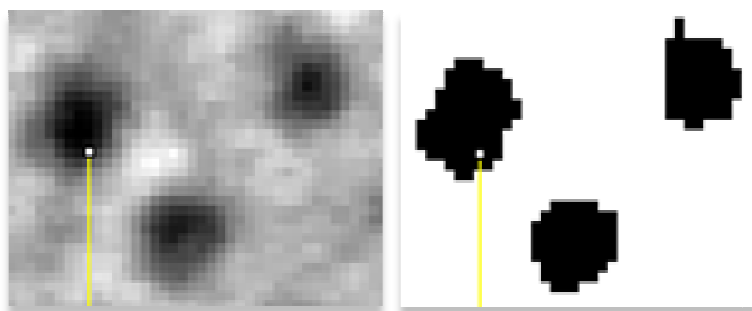
### 3.3.2 Segmentazione

Ora si introdurrà il concetto di segmentazione che, nel presente lavoro, sarà applicato grazie all'ausilio di ImageJ e permetterà l'identificazione delle NP nell'immagine TEM.

La segmentazione è uno dei processi di manipolazione delle immagini che permettono di individuare delle porzioni di immagine rispetto al fondo e comunemente chiamate Region of interest (ROI),

Nel caso delle NP c'è l'esigenza di un algoritmo che, fornita un'immagine, permetta con il minor intervento in termini di verifiche e controllo, di separare le NP dal fondo. Si avrà cioè in input un'immagine a 256 grigi e si vorrà in uscita un'immagine con solo due colori bianco e nero che riporti esattamente il profilo delle NP (le ROI d'interesse).

Nella stima delle dimensioni delle NP si desidera un algoritmo che possa essere, nei limiti di accuratezza accettabili, il più automatico possibile; che produca una segmentazione che non falsi le misure (limitare cioè che le particelle siano "erose"). Il tipo di segmentazione si serve della tecnica nota come "edge detecting".



**Figura 3-21-** Zoom di Immagine TEM a basso ingrandimento(sinistra) e particolare di immagine segmentata(destra)

Per trovare il profilo senza eroderlo o falsarlo, si è reputato che la tecnica più adatta fosse quella del "Thresholding", ossia del calcolo di un livello di soglia per il quale si riconosca la NP, ovvero un valore di grigio minimo: tutto ciò che sta al di sotto di tale valore diventerà nero e al di sopra bianco.

Una volta effettuata la segmentazione si deve passare alla misurazione degli oggetti individuati. Per fare questo, si usa uno strumento già implementato in ImageJ-Fiji che si chiama "Analyze Particles". È molto versatile, configurabile e permette di ricavare tutte le informazioni necessarie.

In questo elaborato saranno utilizzati due tipi di metodi che operano la segmentazione e verranno descritti i plugin che li implementano all'interno di ImageJ. I metodi proposti sono:

- RATS Robust Automatic Threshold Selection [11]
- OTSU [12]

### 3.3.2.1 Metodo di segmentazione RATS (Robust Automatic Threshold Selection)

#### Teoria e spiegazione dell'algoritmo RATS[11]

L'algoritmo di Robust Automatic Threshold Selection (RATS) permette, un approccio nel calcolo delle soglie di grigio per la segmentazione che innanzitutto non sia di tipo globale, ossia basato su tutta l'immagine, ma sia computato per una griglia di porzioni d'immagine, grandi a piacere. L'algoritmo ha quindi la particolarità di poter trattare anche immagini che siano rumorose e non omogenee in luminosità ecc.

Il plugin messo a disposizione da Fiji/ImageJ si basa sulla descrizione in [11].

In questa implementazione, invece di calcolare il gradiente dell'immagine utilizzando gli operatori di "Edge detection" di tipo Sobel che vengono calcolati come in (3.9),

$$G_{x,y} = \sqrt{\Delta_x^2 + \Delta_y^2}$$

(3.9)  $\Delta_x$  e  $\Delta_y$  sono il risultato della convoluzione tra le matrici 3X3 di Sobel e l'immagine.  $G_{x,y}$  viene calcolato per ogni punto dell'immagine.

Wilkinson in [11] mostra che eliminando la radice quadrata (3.10) si producono risultati migliori con il solo costo computazionale di una scansione dell'immagine in più per calcolare la radice alla fine .

$$g_{x,y} = G_{x,y}^2 = \Delta_x^2 + \Delta_y^2 \quad (3.10)$$

I Pixel con gradienti che non superano una soglia utente specificata,  $\lambda\sigma$ , sono scartati, dove  $\sigma$  rappresenta una stima del rumore (che è la deviazione standard del fondo) e  $\lambda$  è un fattore di scala (3 è un ottimo valore di partenza). La stima del rumore è effettuata selezionando una porzione dello sfondo di immagine e utilizzando ImageJ per determinare la deviazione standard dei valori di grigio di questa regione (si veda più avanti come sia possibile).

L'operazione di suddivisione in griglia dell'immagine utilizza la tecnica Quadtree, ossia una particolare struttura ad albero con ogni nodo che rappresenta una porzione di immagine che può essere suddiviso in quattro nodi figlio (4 sotto immagini). Questo procedimento può andare avanti a piacimento. All'interno di ciascuna delle subregioni, una soglia di tipo "locale",  $T_R$ , viene calcolata come la somma pesata dei gradienti dei pixel,  $P$ .

$$T_R = \frac{\Sigma(g_{x,y} \cdot P_{x,y})}{\Sigma(g_{x,y})} \quad (3.11)$$

Può succedere sporadicamente che la soglia locale fallisca nella somma dei pesi (il denominatore in particolare), in questo caso, la soglia locale è sostituita dalla soglia della sua Quadtree genitore (se la soglia del genitore a sua volta esiste). Può succedere molto raramente che tutti i livelli gerarchici di soglia falliscano nel qual caso una stessa soglia viene applicata a tutte le regioni esattamente come se si applicasse una soglia globale. Una volta che le soglie locali sono calcolate, vengono interpolate (interpolazione bilineare) attraverso l'intera immagine producendo una mappa della soglia.

L'utente può controllare il parametro della minima dimensione della regione Quadtree tramite il parametro “*Min Leaf Size*”. Anche in questo caso, come per la stima del rumore  $\sigma$  e il fattore di scala  $\lambda$ , la dimensione minima della Quadtree si può adeguare con alcuni esperimenti.

### Metodo Rats – Utilizzo con Fiji-ImageJ

Il metodo appena descritto è disponibile come plugin (java) nella distribuzione Fiji di ImageJ. Si descrivono le operazioni da effettuare per la segmentazione di un'immagine con RATS:

- 1) Caricare l'immagine tramite il menu' principale “*File*”, “*Open*”.
- 2) Si “inverte” l'immagine con “*Edit*” e “*Invert*” (o *Ctrl+Maiusc+I*)<sup>16</sup>
- 3) Selezionare il menu' “*Plugins*”, la voce “*Segmentation*” e quindi “*Robust Automatic Threshold Selection*”. Come mostrato in Figura 3-22

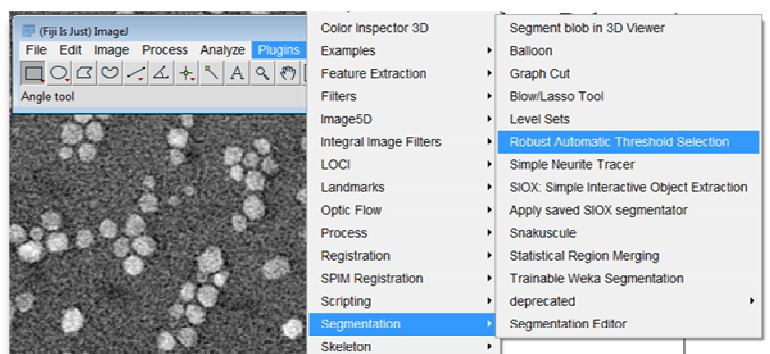


Figura 3-22- Selezione del Plugin RATS

A questo punto appare un pannello come in Figura 3-23:

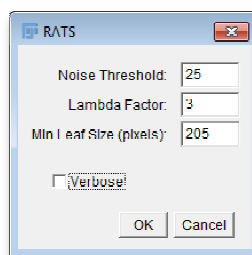



Figura 3-23 – Parametri di RATS

Che richiede di impostare alcuni valori che sono:

- **Noise Threshold:** rappresenta la stima del rumore di fondo. Per fare questo è sufficiente dal pannello degli strumenti di ImageJ premere  per la selezione di una regione rettangolare (in Figura 3-24 selezionata in giallo). A questo punto dal menu' selezionare “*Analyze*” e la voce “*Histogram*” che proporrà

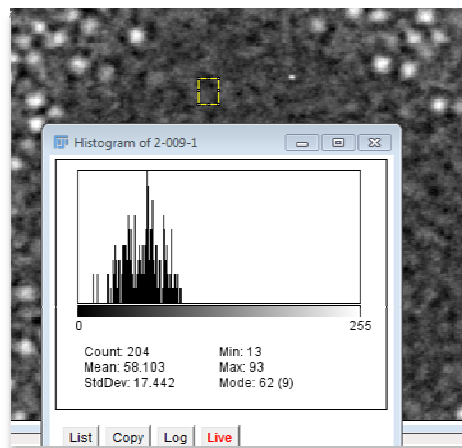
<sup>16</sup> Questo è necessario poiché le immagini sono di tipo “Bright Field”, ossia fondo chiaro e particelle scure, mentre Rats chiede il contrario. Questo tipo d'inversione è invariante ai fini dell'informazioni contenute dall'immagine poiché c'è una complementazione mantenendo i 256 livelli di grigio, ci si può convincere facendo una doppia inversione che porta esattamente all'immagine originale.



qualcosa di simile alla Figura 3-24. Il bottone “live” permette la visione dinamica dell’istogramma man mano che si modifica l’area selezionata. Un valore consigliabile da utilizzare e’ tra “min” e il valore “Mean”.

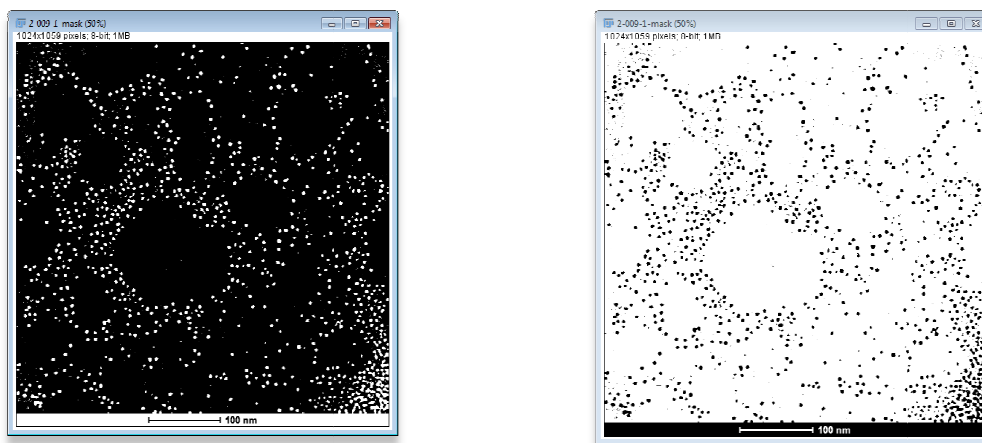
- **Lambda Factor**: è consigliato partire da un valore 3 (si ricorda che questo vuol dire scartare quello al di fuori di  $3\sigma$  )
- **Min Leaf Size(pixels)** : si specifica la grandezza della sub regione che determina anche il numero di suddivisioni dell’immagine. Per trovare il valore piu’ adatto si possono effettuare più prove. Dal software viene proposto un valore automatico calcolato in base alla grandezza dell’immagine e di solito costituisce una buona partenza.
- **Verbose** permette di avere in output una serie d’informazioni utili per capire le varie fasi e il debug di eventuali errori, in situazioni normali puo’ tranquillamente rimanere non selezionato.

Questo plugin ha anche il pregio di proporre in automatico dei valori per tutti i campi che sono una buona partenza per una prima esecuzione e affinamenti successivi.



**Figura 3-24** – ImageJ – Istogramma in modalità “live” di porzione di immagine per ricavare i valori di “Noise Threshold”

Dando ok si ottiene un’immagine in bianco e nero che poi dovrà essere invertita in modo da avere particelle Nere su fondo bianco ( come visto in precedenza con “Edit” e “Invert” o *Ctrl+Maiusc+I* ) (Figura 3-25)



**Figura 3-25-** Immagine NP bianche su sfondo nero come output della segmentazione di RATS e inversione.

Da questo punto in poi e' sufficiente lanciare "Analyze particles", che permetterà la misura delle particelle, si veda a tal proposito il paragrafo dedicato alla spiegazione del funzionamento di "Analyze Particles".

### 3.3.2.2 Metodo di segmentazione OTSU

#### Teoria e spiegazione dell' algoritmo OTSU [12]

Il metodo descritto di seguito è proposto nell'articolo [12] e disponibile su ImageJ e sembra essere particolarmente promettente per la segmentazione delle particelle. Essendo un algoritmo che sfrutta un metodo di Thresholding globale, non possiede la particolarità della località come RATS, ma possiede la singolarità di essere "clustering-base". Questo vuol dire che si presta alla segmentazione d'immagini composte da un fondo, che ha quindi un suo tipico istogramma dei valori di grigio e oggetti ben distinguibili dal fondo con istogramma di valori di grigio comune.

Come prima cosa l'algoritmo trova la classe, gruppo, di livelli di grigio che compongono gli oggetti da individuare. Ciascuna classe sarà individuata da un valore medio e una deviazione standard.

Il metodo calcola la soglia finale per il Threshold minimizzando la varianza tra le classi che viene definita come la somma pesata delle varianze delle due classi [12]

$$\sigma_w^2(t) = \omega_1(t)\sigma_1^2(t) + \omega_2(t)\sigma_2^2(t) \quad (3.12)$$

Dove  $\omega_i$ <sup>17</sup> sono le probabilità che le due classi siano separate dalla soglia  $t$  e  $\sigma_i^2$  sono le varianze di ciascuna classe. Otsu dimostra come sia duale sfruttare la massimizzazione o minimizzazione delle varianze delle intraclassi:

$$\sigma_b^2(t) = \sigma^2 - \sigma_w^2(t) = \omega_1(t)\omega_2(t) [\mu_1(t) - \mu_2(t)]^2 \quad (3.13)$$

espressa in termini di probabilità di classe  $\omega_i$  e media della classe  $\mu_i$ .

La probabilità della classe 1 che verrà indicata come  $\omega_1(t)$  e' calcolata dall'istogramma corrispondente come segue:

$$\omega_1(t) = \sum_0^t p(i) \quad (3.14)$$

come anche la sua media  $\mu_1$

$$\mu_1(t) = \left[ \sum_0^t p(i) x(i) \right] / \omega_1 \quad (3.15)$$

Dove  $x(i)$  e' il valore al centro dell'i-esimo istogramma e  $p(i)$  e' la probabilità che il pixel  $i$  appartenga alla classe 1.

L'impostazione iterativa si presta per un algoritmo efficiente che produca alla fine dell'esecuzione, la soglia di grigio desiderata.

#### Metodo OTSU – Utilizzo con Fiji-ImageJ

Il metodo di segmentazione OTSU e' molto semplice e di seguito sono riportati i passi per il suo utilizzo:

- 1) Caricare l'immagine TEM da segmentare ( al Menu' principale, *File, Open...*)
- 2) Selezionare il Menu *Image, Adjust, Threshold* come in Figura 3-26

<sup>17</sup> -i indica l'indice della classe, se si pensa a 2 classi NP e fondo ci saranno solo  $\omega_1, \omega_2$

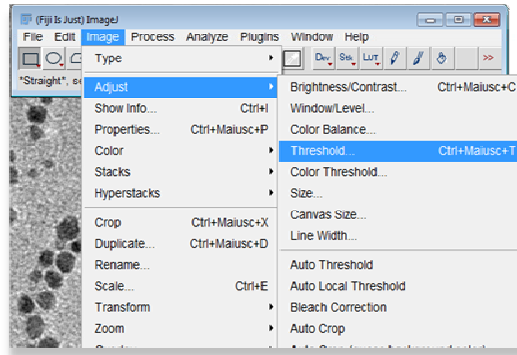


Figura 3-26-ImageJ – selezione Threshold

3) Apparirà un pannello come in Figura 3-27:

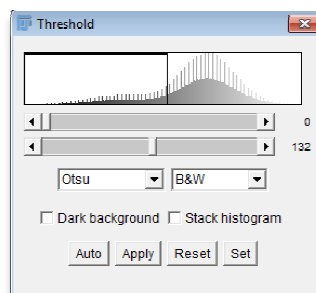


Figura 3-27- ImageJ – Threshold Otsu

4) Nel pannello Threshold (Figura 3-27) deve essere selezionato nel menu' a tendina a sinistra "Otsu". Tutte le altre impostazioni possono essere lasciate come di default in Figura 3-27. Si noti che nel caso in figura il livello di Thresholding appare in automatico ed è indicato dalla linea che divide l'istogramma e indica il valore di grigio 132 , questo è il valore usato per la segmentazione , sotto 132 i pixel dell'immagine saranno considerati neri, sopra bianchi.

A questo punto basta applicare la procedura di "Analyze Particles", per la misura effettiva delle NP, si veda a tal proposito il paragrafo dedicato alla spiegazione del funzionamento di "Analyze Particles".

### 3.3.2.3 Misurazione delle dimensioni con "Analyze Particles" delle NP segmentate

ImageJ/Fiji mette a disposizione vari modi effettuare la segmentazione dell'immagine, tra questi, sono stati presi in considerazione gli algoritmi Otsu e RATS. A questo punto l'immagine bicromatica in bianco e nero deve essere trattata con il tool "Analyze Particles" che permette la misura delle dimensioni e il conteggio delle NP individuate con la segmentazione.

Riassumendo i passi di una sessione per ottenere la dimensione delle NP con ImageJ sono:

- 1) Segmentazione – con il metodo che si e’ deciso di utilizzare
- 2) “Set Scale” – per il settaggio della scala (vedi “Taratura della scala” prossimo paragrafo) delle dimensioni
- 3) “Analyze particles” – per il conteggio e l’analisi degli oggetti segmentati.
- 4) L’analisi numerica per la valutazione della distribuzione – applicabile sia da ImageJ che da strumenti esterni come un foglio di calcolo.

Tornando al dettaglio di “analyze particle”, di seguito si riportano le istruzioni per effettuare la misura delle dimensioni dell’NP precedentemente segmentate.

- 1) Selezionare dal Menu’ principale “Analyze” e dal menu’ a tendina “Analyze Particles...” come indicato in Figura 3-28:

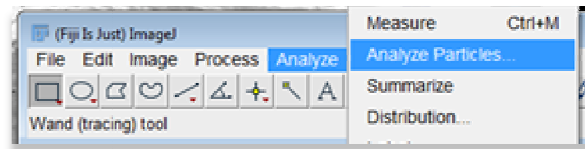


Figura 3-28- ImageJ – Selezione Analyze Particles

- 2) Apparirà un pannello come in fig. 3-29.

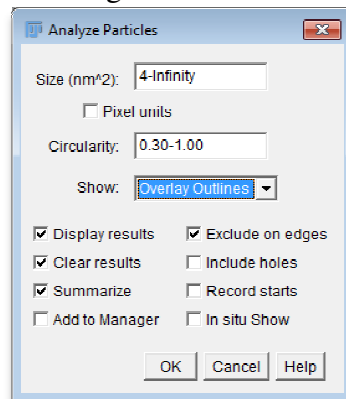


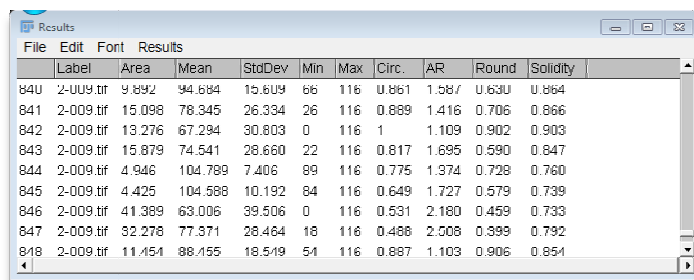
Figura 3-29- ImageJ – Parametri Analyze Particles

- 3) I parametri fondamentali da impostare nella finestra di Figura 3-29 sono:
  - i. **Size:** rappresenta un range all’interno del quale sono contenute le possibili dimensioni delle NP. Si faccia molta attenzione alla scala indicata tra parentesi. In questo esempio e’ nm<sup>2</sup>. La misura e’ definita come area, quindi se volesse escludere le particelle con diametro inferiore a 2nm dovremmo impostare  $A = \pi r^2 = 3.14 * (2/2)^2 = 3.14 \text{ nm}^2$ . Nell’esempio viene dato 4nm<sup>2</sup> come estremo inferiore e infinito come estremo superiore ( ma si puo’ limitare anche superiormente per eventuali artefatti o parti che non interessano).
  - ii. **Circularity:** rappresenta una funzione che ci permette di stabilire quanto una forma sia vicino alla circolarità ed e’ espressa dalla formula (3.16) e vale 1 per un cerchio perfetto, mentre assume valori minori di 1 se ci si allontana dalla circolarità. Il valore di questo parametro impostato nelle misurazioni effettuate è pari a 0.3. Quest’ultimo e’ un buon valore per non essere troppo restrittivo, ma sufficiente a scartare agglomerati che possono formarsi dalla sovrapposizione di piu’ NP. Nelle immagini che saranno

proposte per le prove effettuate apparirà evidente l'esclusione di alcune zone particolarmente agglomerate e quindi inservibili per la misurazione.

$$\frac{4\pi \cdot Area}{[perimetro]^2} \quad (3.16)$$

- iii. **Show** : Si selezioni la voce **“Overlay lines”** (che permette di evidenziare solo il bordo delle particelle riconosciute e un'etichetta numerica).
- iv. Di tutte le possibili voci , si consiglia di selezionare quelle indicate in Figura 3-29 (consultare **“Help”** per la spiegazione del resto delle voci).
  - a. *Display results* permette di ottenere una schermata come in Figura 3-30;
  - b. *Clear Results* permette di cancellare risultati di eventuali operazioni precedenti;
  - c. *Summarize* mette a disposizione il conteggio delle NP oltre che i valori medi di tutti i campi analizzati in Results;
  - d. *Exclude on edges* elimina le particelle poste sui bordi dell'immagine ( che potrebbero essere tagliate).
- v. Per ottenere i risultati in Results premere **“OK”**. Le colonne di *Results* possono essere personalizzate per estrarre solo le informazioni desiderate, (nel caso di Fig. 3-30 sono state lasciate le impostazioni di default). Le colonne possono essere personalizzate ma in genere i parametri di interesse sono:
  - a. **Area** che appunto fornisce l'area della particella,
  - b. **Circ.** che e' il parametro di Circularity.



| Label         | Area   | Mean    | StdDev | Min | Max | Circ. | AR    | Round | Solidity |
|---------------|--------|---------|--------|-----|-----|-------|-------|-------|----------|
| 840 2-009.tif | 9.692  | 94.684  | 15.609 | 66  | 116 | 0.881 | 1.587 | 0.630 | 0.864    |
| 841 2-009.tif | 15.098 | 78.345  | 26.334 | 26  | 116 | 0.889 | 1.416 | 0.706 | 0.866    |
| 842 2-009.tif | 13.276 | 67.294  | 30.803 | 0   | 116 | 1     | 1.109 | 0.902 | 0.903    |
| 843 2-009.tif | 15.879 | 74.541  | 28.660 | 22  | 116 | 0.817 | 1.695 | 0.590 | 0.847    |
| 844 2-009.tif | 4.946  | 104.789 | 7.406  | 89  | 116 | 0.775 | 1.974 | 0.728 | 0.760    |
| 845 2-009.tif | 4.425  | 104.588 | 10.192 | 84  | 116 | 0.649 | 1.727 | 0.579 | 0.739    |
| 846 2-009.tif | 41.389 | 63.006  | 39.506 | 0   | 116 | 0.531 | 2.180 | 0.459 | 0.733    |
| 847 2-009.tif | 32.278 | 77.371  | 28.464 | 18  | 116 | 0.488 | 2.508 | 0.398 | 0.792    |
| 848 2-009.tif | 11.154 | 88.155  | 18.519 | 51  | 116 | 0.887 | 1.103 | 0.906 | 0.851    |

**Figura 3-30** – ImageJ – Visualizzazione **“Results”** dei dati misurati

- vi. Per ottenere un output in file testo separato da Tab basta fare *File, Save As..* sul pannello di *Results*. In Figura 3-31 e' riportato un esempio del file aperto con notepad di windows

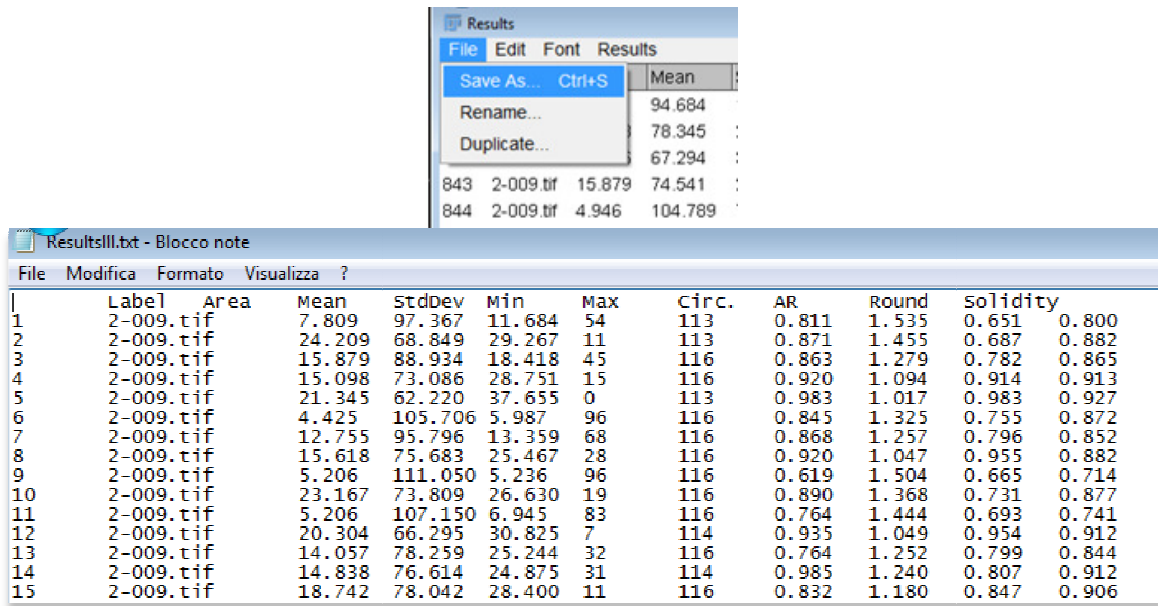


Figura 3-31- ImageJ- Salvataggio dei risultati in formato testo

Avendo a disposizione il file in formato testo e' possibile importarlo in un foglio di calcolo e fare tutte le elaborazioni necessarie. Si noti che la misurazione fornita da questo tool e' un'area quindi il diametro delle NP (nell'ipotesi che siano di forma sferica ) deve essere derivato usando la formula (3.17):

$$d = 2 \cdot \sqrt{\frac{A}{\pi}} \quad (3.17) \text{ dove } A \text{ e' l'area della NP e } d \text{ il diametro.}$$

### 3.3.2.4 Considerazioni sui metodi di Thresholding utilizzati

I due metodi Otsu e RATS utilizzano entrambi, seppur con le dovute differenze, la varianza della distribuzione dei valori di grigio come strumento principale di identificazione di un oggetto rispetto al fondo. Si vedrà, in effetti che, i due metodi sono molto simili come risultato.

Segue un paragrafo che spiega uno strumento per la misurazione laddove metodi come Pebbles o di segmentazione non siano idonei per i motivi che saranno chiari nel proseguo delle analisi delle immagini.

### 3.3.2.5 Misurazione Manuale e ROI

In questo paragrafo si spiega come sia possibile utilizzare Fiji/ImageJ per creare delle misurazioni di Region Of Interest – ROI che nel caso in esame possono essere le singole nanoparticelle, oppure degli agglomerati per i quali si vogliono effettuare delle misurazioni. Ci sono 2 fasi fondamentali che saranno descritte:

- a. Taratura della scala dell'immagine
- b. Misura delle ROI

Come prima cosa si apre l'immagine su cui effettuare le misurazioni da ImageJ/Fiji.



### Taratura della Scala dell'immagine

Sul fondo dell'immagine dovrà essere riportata la scala dell'immagine che si sta analizzando ossia qualcosa di simile alla Figura 3-32. (una barretta con bordi e un numero che indica appunto il valore di scala e l'unità di misura "nm", detta anche scala nanometrica)



Figura 3-32- scala nanometrica di immagine TEM

Per l'impostazione:

- 1) Nella ToolBar si selezioni la lente di ingrandimento  e si ingrandisca l'immagine il piu' possibile in modo che sia visibile scala e barretta della scala.
- 2) Si selezioni sempre dalla ToolBar il disegnatore di Linee  si proceda a disegnare una linea da bordo a bordo della barretta<sup>18</sup>. Ci si ritrova quindi in una situazione con una linea gialla sulla barretta come in Figura 3-33.

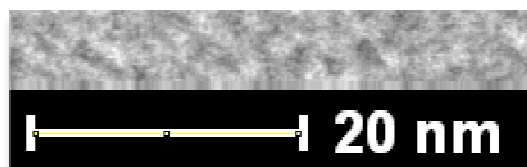


Figura 3-33-ImageJ- linea sulla scala nanometrica per Settaggio scala in ImageJ

- 3) A questo punto occorre impostare la scala. Per fare questo, come riportato in Figura 3-34, dal Menu' principale selezionare "Analyze" e dal menu' a tendina la voce "Set Scale..."

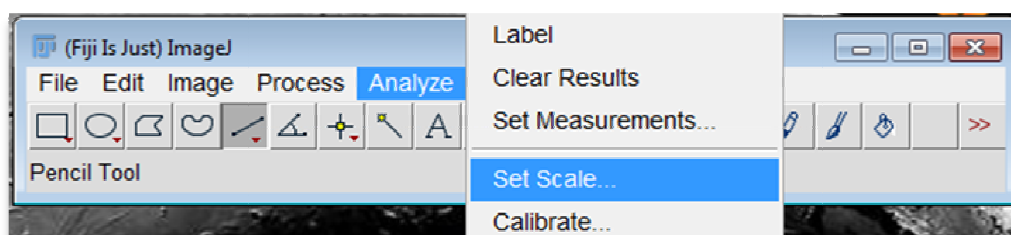


Figura 3-34 – ImageJ- Selezione "Set Scale" per il settaggio della scala

<sup>18</sup> Attenzione. Sotto la Tool bar appaiono le misure in tempo reale, accertarsi che "angle" sia a 0.00, così facendo si ha la sicurezza di effettuare una misura con linea perfettamente orizzontale e non inclinata.

4) Apparirà la finestra di dialogo in Figura 3-35:

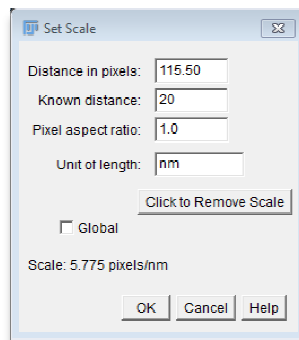


Figura 3-35 – ImageJ- Impostazioni di “Set Scale”

I campi vanno interpretati come segue:

- i. **Distance in pixels** : viene compilato in automatico con la misurazione della barretta del passo precedente.
- ii. **Known distance**: deve contenere il valore di scala, ossia proseguendo con l'esempio della barretta di Figura 3-33 dovrà essere impostato a 20.
- iii. **Pixel aspect ratio**: va tenuto come proposto a 1.0, non si applicano distorsioni all'immagine
- iv. **Unit of Length** : va impostata con l'unità di misura della scala, nell'esempio a nm (nanometri).
- v. **Global**: e' utile se si usano immagini con la stessa scala e si voglia pertanto estendere l'impostazione della scala a tutte le immagini aperte da ImageJ.

Sulla parte bassa della Figura 3-35 apparirà in automatico il campo “Scale” che rappresenta ratio pixels/nm.

5) premere “OK” e la scala sarà correttamente impostata, ossia tutte le misure faranno riferimento all'unità di misura impostata e alla calibratura effettuata.

## Misura delle ROI

Fiji/ImageJ dispone di un tool che permette di salvare, modificare e visualizzare le misure effettuate di diverse ROI. Nel caso in esame una ROI puo' essere rappresentata da una NP, oppure dalla copertura di una NP, da un agglomerato di NP ecc. Basterà procedere come segue:

- 1) Dal Menu' Principale (Figura 3-36) selezionare “Edit” dal primo menu' a tendina selezionare “Selection” e nel secondo menu' a tendina “Add to manager” (la scorciatoia , vista l'importanza della funzione e' **CTRL-T**)



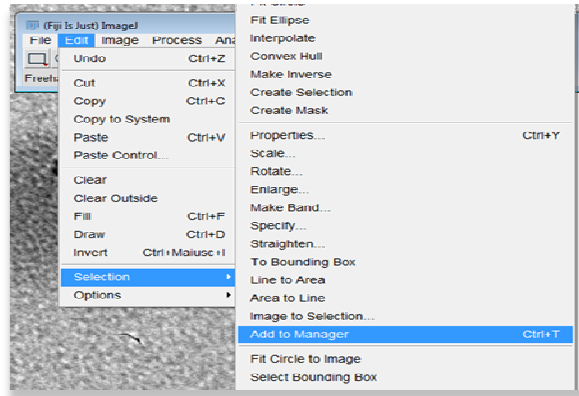


Figura 3-36- ImageJ- aggiunta del Roi manager

2) Apparirà il la finestra in Figura 3-37 detta “ ROI Manager”.

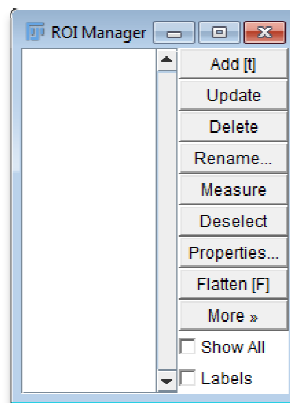




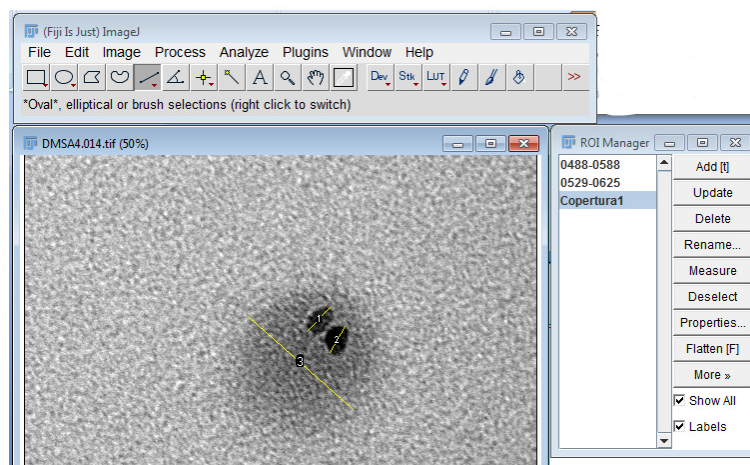
Figura 3-37- Imagej – Roi Manager

Questo pannello permette la completa gestione degli oggetti ROI che si stanno misurando. Le funzioni principali che sono di pratico utilizzo sono:

- i. **Add** : Permette di aggiungere una misura di una ROI (vedi in seguito come si effettua)
- ii. **Update** : permette su una ROI precedentemente inserita di ri-effettuare l'operazione di misura.
- iii. **Delete**: cancella una ROI esistente
- iv. **Rename...** : permette di rinominare con nomi a piacere delle ROI specifiche (es. “copertura1” come in Figura 3-38)
- v. **Measure**: e' fondamentale e permette di fornire una finestra contenente tutti i valori delle misure delle ROI salvate nel ROI Manager.
- vi. **More>>**: mette a disposizione moltissime altre funzioni, su tutte le più importanti sono “Save” e “Open” che permettono di salvare e caricare intere sessioni di misurazioni di ROI.
- vii. **ShowAll,Label** : questi due checkboxes se selezionati (e si consiglia di farlo) servono a lasciare traccia della misura effettuata e delle label.

3) Per eseguire la misurazione delle dimensioni delle NP si utilizzano lo strumento linea  ( si suppone di voler effettuare una misurazione lineare ad es. una

lunghezza, un diametro) e di zoom  (per aumentare la precisione). Sarà sufficiente tracciare una linea sulla ROI (esempio NP) che apparirà come una linea gialla che potrà essere modificata fino ad ottenere la misura desiderata, dopo di che si preme il tasto “Add” sul Roi Manager (o “t” sulla tastiera, utile scorciatoia). Se la misura effettuata non dovesse essere soddisfacente per qualche motivo la si può selezionare (sia da Roi Manager che dall’immagine) e rimuovere con il tasto “Delete”. In fig.3-38 si vede che è stata effettuata la misura di 2 NP e di una possibile copertura delle NP che nel Roi Manager è stata rinominata come Copertura1.



**Figura 3-38** – ImageJ – sessione di misurazione assistita con ROI manager

- 4) Finita la sessione di misurazione si può decidere di estrarre i risultati (“results” vedi fig. 3-39 e spiegazione nel paragrafo successivo) premendo il tasto “Measure”, oppure procedere con il salvataggio della sessione (che creerà un file .ROI) premendo nel Roi manager “More>>” e poi “Save”.

### 3.3.2.6 Analisi dei dati e statistiche da “Measure” di ImageJ

Da una sessione di misurazione di ROI manager premendo il tasto “Measure” apparirà una finestra “Results” simile a quella in Figura 3-39.

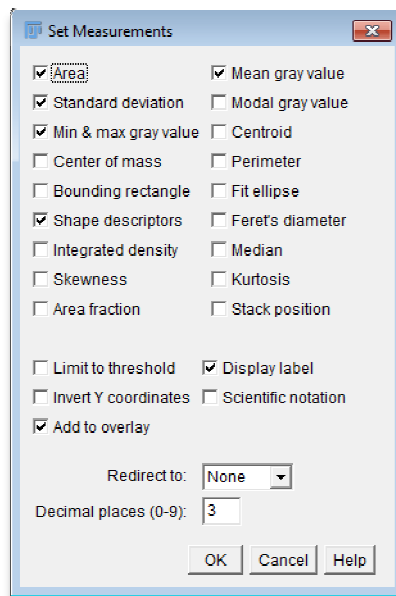
| Label                      | Area  | Mean    | StdDev | Min    | Max     | Angle   | Circ. | AR | Round | Solidity | Length |
|----------------------------|-------|---------|--------|--------|---------|---------|-------|----|-------|----------|--------|
| 1 DMSA4.014.tif:0488-0588  | 1.949 | 35.778  | 25.249 | 0.012  | 117     | 46.273  | 0.202 | 0  | 0     | NaN      | 11.023 |
| 2 DMSA4.014.tif:0529-0625  | 1.829 | 10.384  | 19.414 | 0      | 88      | 60.018  | 0.213 | 0  | 0     | NaN      | 10.395 |
| 3 DMSA4.014.tif:Copertura1 | 8.366 | 118.741 | 24.748 | 66.993 | 193.724 | -41.496 | 0.045 | 0  | 0     | NaN      | 48.087 |

**Figura 3-39-** ImageJ- “Results” , misurazioni in tabella degli oggetti misurati con ROI manager

Nel caso di misura della sola lunghezza, es. del diametro di una NP, può essere interessante per esempio il solo campo “length” evidenziato in Figura 3-39.

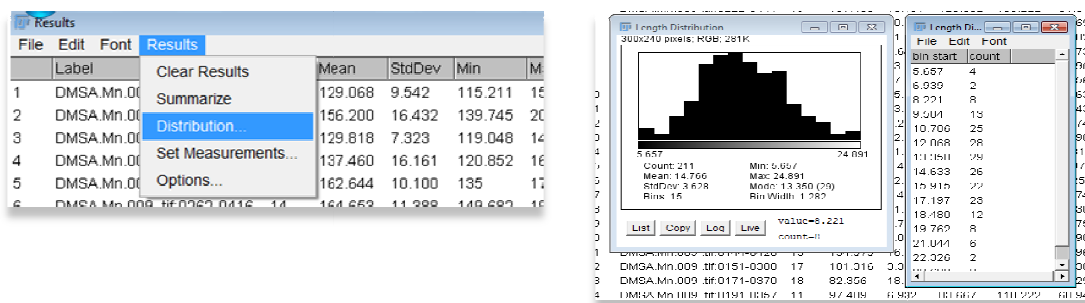
Per una certa ROI può essere necessaria anche una misurazione di area, perimetro e altri valori tipici dell’immagine. In Figura 3-40 viene riportata la finestra di Dialogo “Set Measurement” che permette la selezione dei campi che saranno resi disponibili come valori nel “Results”. Se ne citano alcuni che possano essere di interesse per le NP:

- “Area”,
- “Perimeter”
- “Angle”: utile con particelle per le quali se ne voglia verificare un orientamento preferenziale.
- “Min & Max gray value”, minimo e massimo valori di grigio nella ROI
- “shape descriptor” o “circularity” :



**Figura 3-40-** ImageJ – Parametri di “Set Measurement” per la personalizzazione delle informazioni di misurazione

La finestra “Results” ha un menu’ che permette il salvataggio dei dati in formato testo, la visualizzazione della distribuzione delle misure e altre funzionalità. In Figura 3-41è riportato il risultato ottenuto con la funzione “Distribution” che permette la visualizzazione di un grafico a barre con il dettaglio delle frequenze della distribuzione delle misure effettuate (Tasto “List” dal grafico a Barre).



**Figura 3-41-** ImageJ – Modalità di visualizzazione della distribuzione con “Distribution”

In generale pero’, come detto sopra, per effettuare operazioni e modifiche con piu’ facilità si preferisce esportare le misure in un file di testo. Per fare questo basta dal Menu’ di “Results” scegliere “File” e poi “Save as...” e permetterà di salvare il tutto in formato .txt. I dati poi possono essere facilmente caricati i un foglio di lavoro excel.

### 3.4 Stima dell'incertezza per il problema specifico di misura da immagine

Sono state già affrontate nel par 3.3.1 parte delle considerazioni fatte nel paper [5] che mettono in evidenza quali sono gli errori che si possono commettere nella misurazione:

- Scorretta impostazione del microscopio (TEM ecc) che puo' essere dovuta a:
  - Scorretta taratura dell'ingrandimento
  - Condizioni di cattiva messa a fuoco
  - Aberrazione
  - Astigmatismo di vario genere : (objective lens, condenser lens, coma, ecc)
- Quantizzazione non conforme all'esigenza di precisione o scorretto ingrandimento (si veda a tal proposito par. 3.4.1).
- Errori Casuali

#### 3.4.1 Incertezza nella quantizzazione

Altro aspetto molto importante, come in tutte le misure digitali, e' la quantizzazione. Di seguito si cerca di capire come possa tutto questo influire sulla misura. In generale una immagine TEM e' del tipo 1024X1024. L'interpretazione di "bordo" della NP, ossia la decisione di inserire o non inserire un solo pixel, aggiunge un errore alla stima che impatta in generale nei valori cosiddetti di "posizione" (media, moda, mediana) della statistica della distribuzione. In [5] viene riportato un grafico che descrive questo aspetto riportando il contributo di incertezza di un pixel in funzione dell'ingrandimento e del diametro delle NP misurate. E' chiaro che man mano che l'ingrandimento sale l'incertezza relativa diminuisce. In [5] viene messo in evidenza che per un JEOL-2010F che produce immagini a 1024 pixelx1024 pixel a 200kx ingrandimenti, il valore in lunghezza di un pixel e' 0.12 nm. Per una particella di 5nm un solo pixel pesa all'incirca 2,4%, questo peso sale al 12% se si cerca di caratterizzare qualcosa con dimensioni all'incirca di 1 nm. Nel Figura 3-42 è indicato a seconda del diametro della NP quanto pesa sulla misura il contributo di un solo pixel in funzione dell'ingrandimento.

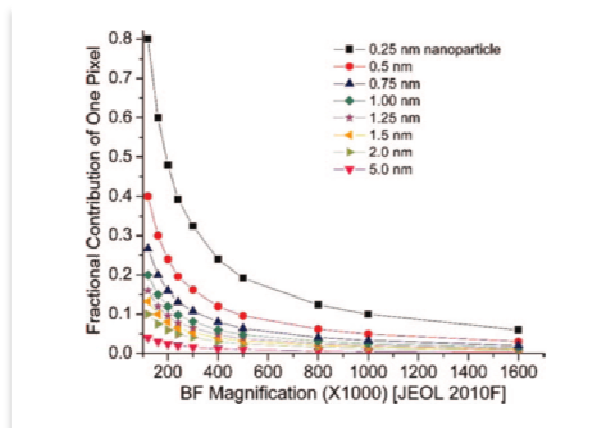


Figura 3-42 – grafico che mostra a seconda del diametro della NP quanto pesa sulla misura il contributo di un solo pixel in funzione dell'ingrandimento.

### 3.5 Indicatori statistici della distribuzione delle NP

Nello studio della distribuzione delle dimensioni delle NP verranno forniti una serie di indicatori che sono riportati in Tab. 3.1

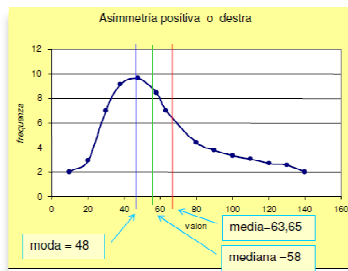
Gli indicatori possono essere suddivisi in tre categorie:

- 1) **Posizione** che indica un valore in nm e nello specifico:
  - a. **Media** : Media aritmetica delle misure delle NP
  - b. **Moda**: Il valore di diametro che corrisponde al 50% della frequenza cumulativa percentuale<sup>19</sup>
  - c. **Mediana** : E' il valore di diametro alla sinistra del quale stanno il 50% delle frequenza cumulativa
- 2) **Dispersione**: sono indici di quanto la distribuzione sia larga e dispersa rispetto al valore medio:
  - a. **Varianza**
  - b. **Deviazione standard** ossia l'indice di dispersione attorno alla media (radice quadrata della Varianza)
  - c. **Range** Intervallo dei valori possibili tra il minimo e il massimo
- 3) **Forma**: forniscono informazioni su forma della distribuzione e simmetrie:
  - a. **Asimmetria** *L'asimmetria positiva* indica una distribuzione con una coda asimmetrica che si estende verso i valori più positivi (  $media < mediana < moda$  Figura 3-43) . *L'asimmetria negativa* indica una distribuzione con una coda asimmetrica che si estende verso i valori più negativi. ( $moda < mediana < media$  Figura 3-44).
  - b. **Curtosi** indica quanto "stretta" sia la distribuzione rispetto alla distribuzione normale (Figura 3-45)  
 Se il coefficiente di curtosi è:  
 $> 0$  la curva si definisce leptocurtica, cioè più "appuntita" di una distribuzione normale.  
 $< 0$  la curva si definisce platicurtica, cioè più "piatta" di una distribuzione normale.  
 $= 0$  la curva si definisce normocurtica, cioè "piatta" come una distribuzione normale

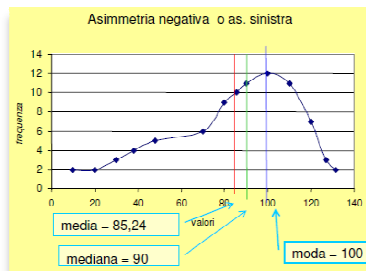
| Posizione [nm] |  | Dispersione [nm] |  | Forma      |  |
|----------------|--|------------------|--|------------|--|
| Media          |  | Varianza         |  | Asimmetria |  |
| Moda           |  | Dev.St.          |  | Curtosi    |  |
| Mediana        |  | Range            |  | Numero NP  |  |

Tabella 3-1 – Indicatori di descrizione della distribuzione delle NP

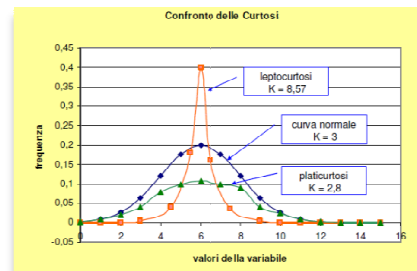
<sup>19</sup> La frequenza cumulativa percentuale vale 100% per la somma di tutte le frequenze per tutti i possibili diametri della distribuzione . Il cinquantesimo percentile, noto appunto come mediana, e' quel valore per il quale la somma delle frequenza cumulativa arriva al 50% del totale.



**Figura 3-43** - *asimmetria positiva*



**Figura 3-44** - *asimmetria negativa*

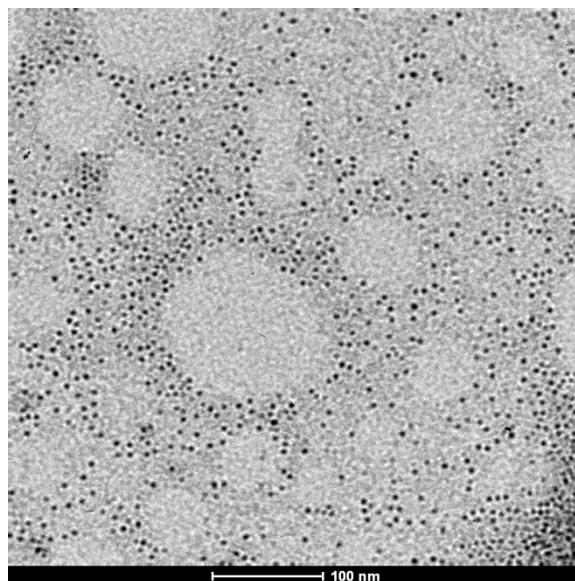


**Figura 3-45** – *esempi di curtosi*

### 3.6 Esempio per l'analisi comparata dei metodi

Per facilitare la comprensione dell'applicazione dei vari metodi di analisi e poterne confrontare risultati in questo paragrafo si analizza e caratterizza valutando la stabilità dei metodi di elaborazione e la sensibilità alle impostazioni iniziali. Inoltre saranno analizzate le differenze ottenute nelle misurazioni dei diametri delle NP con i vari metodi.

In fig. 3-45 viene riportata l'immagine TEM campione usata per tutte le elaborazioni.



**Figura 3-46-** *immagine campione utilizzata per le elaborazioni*

#### 3.6.1 Software Fiji-ImageJ - Metodo di Segmentazione : Otsu

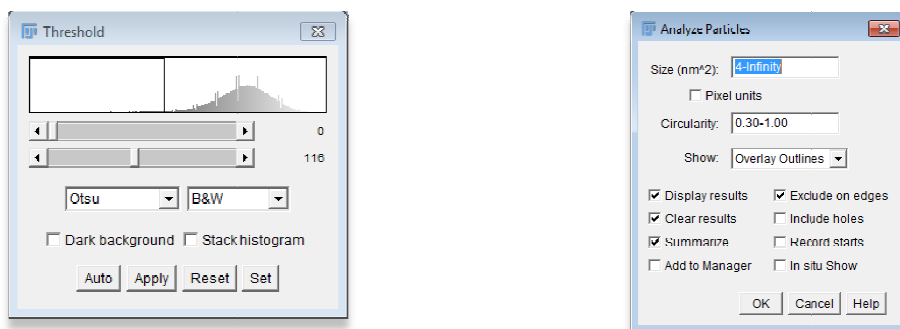
Di seguito le considerazioni sull'applicazione del metodo di segmentazione Otsu.

Livello di grigio individuato da OTSU:116(Figura 3-47a)

Misurazione NP con "Analyze Particle" ( Figura 3-47b)

Parametri: Size 4-Infinity;

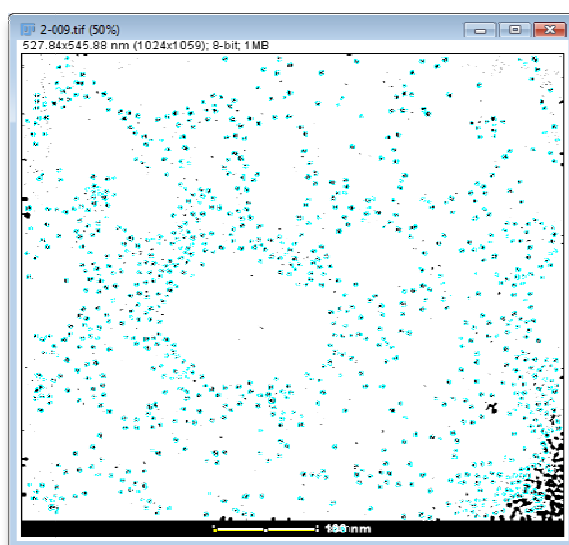
Circ:0.30-1.00;



a) Livello di grigio individuato da Otsu : 116      b) Impostazioni di “Analyze particles” dopo la segmentazione Otsu

**Figura 3-47**

Da “Analaze Particles” sono state rilevate 871 NP, (Figura 3-48).



**Figura 3-48** Immagine Segmentata a cui e' stato applicato “analyze particles” che ha individuato le NP evidenziandole in celeste. Si noti che ci sono delle zone che sono state scartate

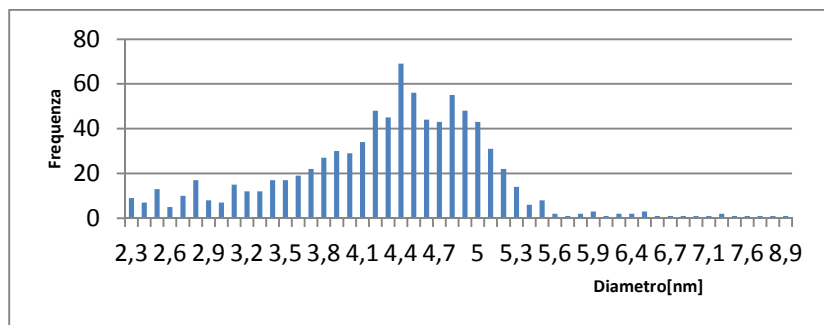
I parametri del software sono stati impostati in modo da scartare tutti gli oggetti che hanno circularity inferiore a 0.3. Per capire se questa fosse una scelta che inficia la misura si è andati a computare la media delle circolarità degli oggetti analizzati che è pari a 0.88. Ciò conferma che le particelle rilevate siano vicine alla forma sferica, ma soprattutto che siano molto lontani e dal valore 0.3 che ha permesso di scartare tutta la parte aggregata in basso sulla destra (essendo di forma molto irregolare e con molte particelle agglomerate, vedi fig.3-47).

In “Analyze Particles” è stato impostato un parametro di “Size” minimo in termini di area di  $4 \text{ nm}^2$  che ipotizzando oggetti sferici significa che tutti gli oggetti di diametro inferiore a 2 nm non siano NP, ma rumore o micelle ossia piccoli residui di acido oleico.

In Tabella 3-2 vengono riportati gli indicatori della distribuzione della misura dei diametri delle NP. Nel grafico 3-2 vengono mostrate le frequenze dei diametri delle NP in nm.

| Posizione [nm] |      | Dispersione [nm] |         | Forma      |      |
|----------------|------|------------------|---------|------------|------|
| Media          | 4,31 | Varianza         | 0,71    | Asimmetria | 0,25 |
| Moda           | 4,31 | Dev.St.          | 0,84    | Curtosi    | 2,27 |
| Mediana        | 4,4  | Range            | 2,4-7,6 | Num NP     | 871  |

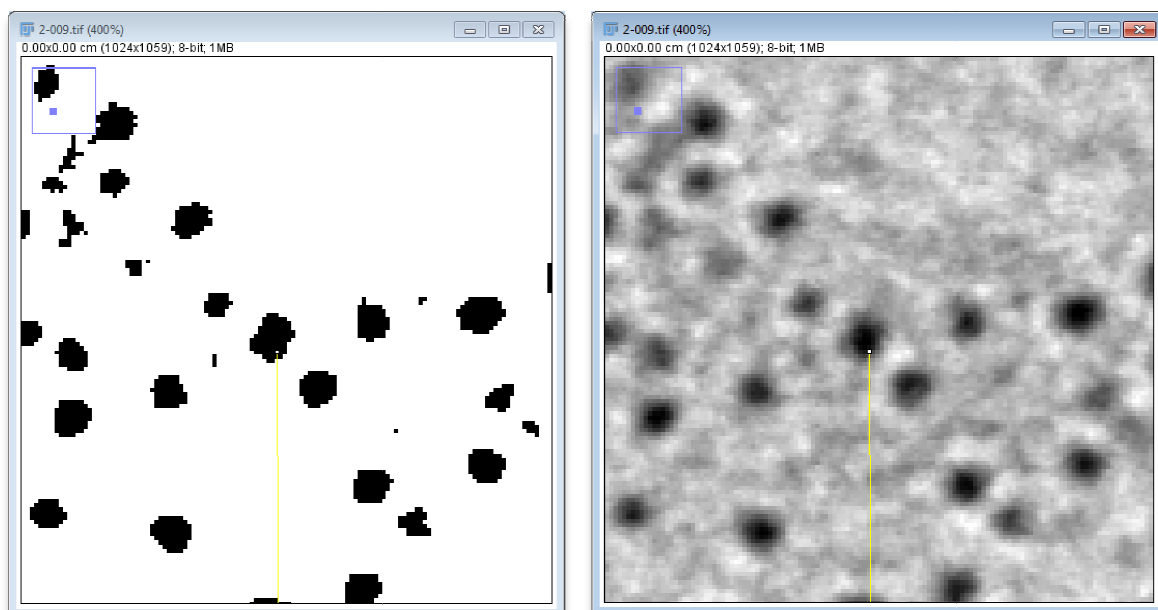
**Tabella 3-2**-indicatori della distribuzione di NP- metodo OTSU



**Figura 3-49** Metodo OTSU, grafico delle frequenze in funzione del diametro delle NP in nm

In questo caso la media è di 4,31nm e coincide con la moda, mentre la mediana si discosta solamente di un decimo di nm.

Con un range di valore che parte dal minimo di 2,4nm ad un massimo di 7,6 nm si noti che la distribuzione dei diametri delle NP è una normale centrata in 4,3 nm e con varianza 0,7 . L' asimmetria a sinistra, essendo dovuta ad oggetti al di sotto dei 2,9 nm fa ipotizzare che possano essere residui di lavorazione. Sui pochi oggetti che hanno diametro doppio rispetto a quello medio, si può pensare che siano NP aggregate e quindi non segmentate dal software.



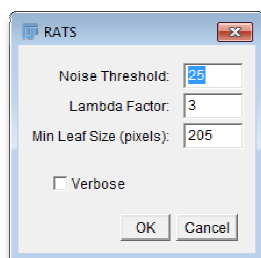
**Figura 3-50** immagine e relativa segmentazione (prima di analyze particle) con il Metodo OTSU



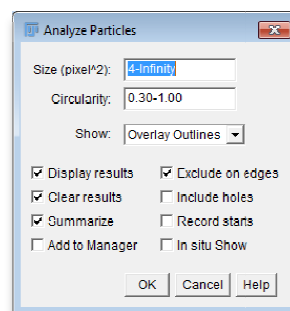
In Figura 3-50 vengono messi di fianco parte dell'immagine e relativa segmentazione (prima di analyze particle) con il Metodo OTSU. Si noti la presenza anche di particelle piu' piccole che possono essere scartate selezionando l'area minima e particelle che non hanno un rapporto di circolarità accettabile e che vengono perciò scartate.

### 3.6.2 Software Fiji-ImageJ - Metodo di Segmentazione : RATS

In Figura 3-51a si mettono in evidenza i Parametri di Rats e in Figura 3-51b quelli di Analyze particles utilizzati per analizzare l'immagine di Figura 3-46.



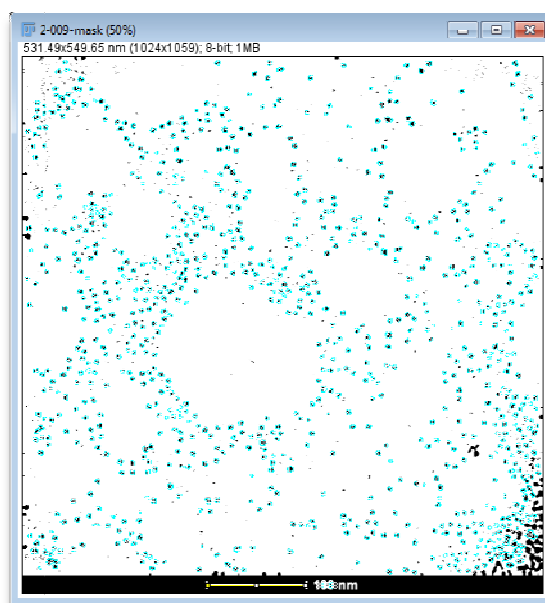
a) Parametri Rats selezionati in automatico



b) Si noti che si sono applicati gli stessi parameri Analyze particles usati per otsu

**Figura 3-51**

I parametri sono stati scelti come spiegato nel par. 3.3.2.1 dedicato a RATS, imputando la soglia di rumore "Noise Threshold" al valore di grigio 25, adottando un "lambda factor" pari a 3 (e' sempre un buon valore per iniziare) . Inoltre, una dimensione della griglia "Min Leaf Size" di 205 in pixel che, essendo l'immagine 1024X1024 permette di avere 5x5 sottoimmagini (qtree di partenza).



**Figura 3-52** –Immagine dopo segmentazione con RATS e Analyze particles.

Si noti che anche in questo caso impostando il vincolo di circolarità maggiore a 0,3 di “Analyze particles” vengono scartate le particelle agglomerate nel angolo in basso a destra come in precedenza.

| Posizione [nm] |      | Dispersione [nm] |      | Forma      |      |
|----------------|------|------------------|------|------------|------|
| Media          | 4,41 | Varianza         | 0,87 | Asimmetria | 0,71 |
| Moda           | 4,50 | Dev.St.          | 0,93 | Curtosi    | 5,09 |
| Mediana        | 4,5  | Range            | 8,60 | Num. NP    | 888  |

Tabella 3-3- indicatori della distribuzione di NP- metodo OTSU

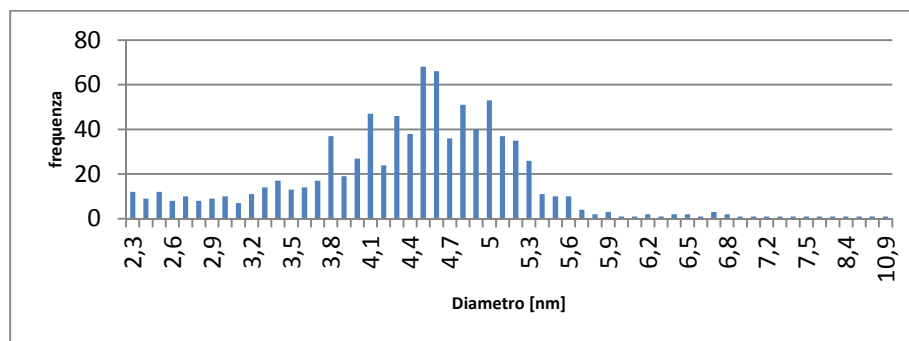


Figura 3-53- Metodo RATS, grafico delle frequenze in funzione del diametro delle NP in nm

La media del diametro individuato con questo metodo è 4,41 nm ed è molto simile a quella ricavata con OTSU (4,31nm) la varianza è 0,93 . La distribuzione delle misure, anche in questo caso, mostra una asimmetria a sinistra che avvalorerebbe le considerazioni fatte in precedenza sulle particelle con diametro inferiore a 2,9 nm identificandole come residui di produzione.

In Figura 3-54 è riportato un particolare della segmentazione.

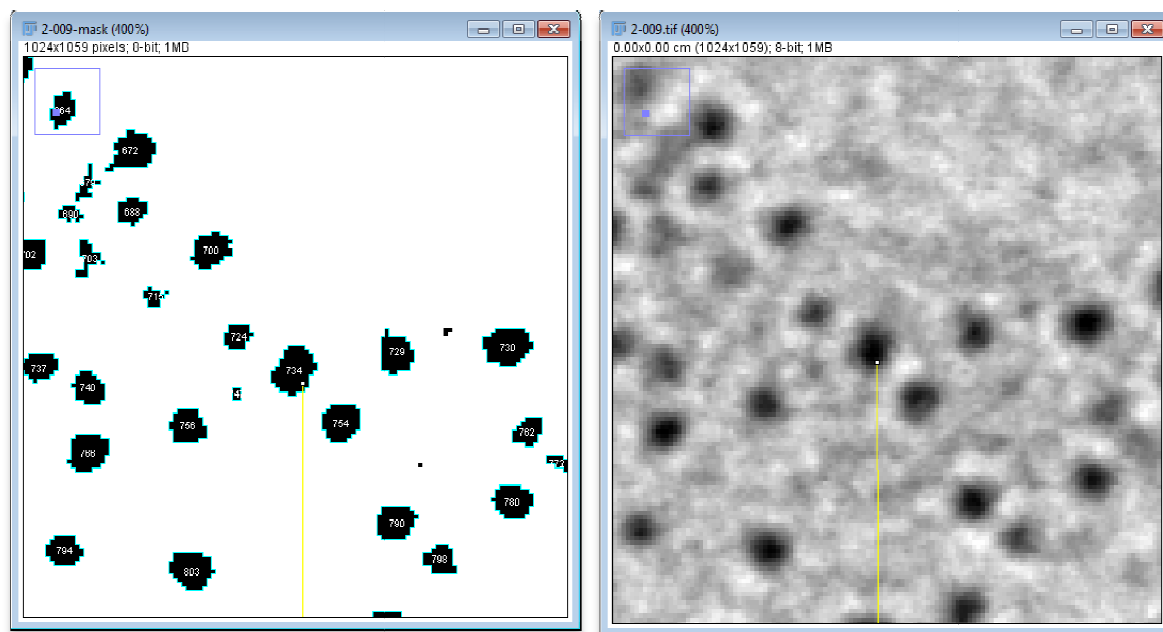


Figura 3-54 – particolare della segmentazione la linea gialla indica la stessa NP

### 3.6.3 Software Pebbles – Metodo automatico – prima esecuzione

L'elaborazione con Pebbles sembra essere molto sensibile ai parametri iniziali, si riportano di seguito i ottenuti applicando piu' volte il metodo come indicato in tabella 3-4<sup>20</sup>:

| Prova | Estimated NP diameter NP [nm] | Delta | Spacing (pixel) |
|-------|-------------------------------|-------|-----------------|
| A     | 15                            | -0.30 | 7               |
| B     | 13                            | -0.20 | 6               |
| C     | 9                             | -0.17 | 4               |

Tabella 3-4 – Pebbles- parametri caratteristici per 3 prove

#### 3.6.3.1 Software Pebbles – Metodo automatico – Prova A

Si riportano in figura 3-52 per le impostazioni della prova A come indicato in tab. 3-4.

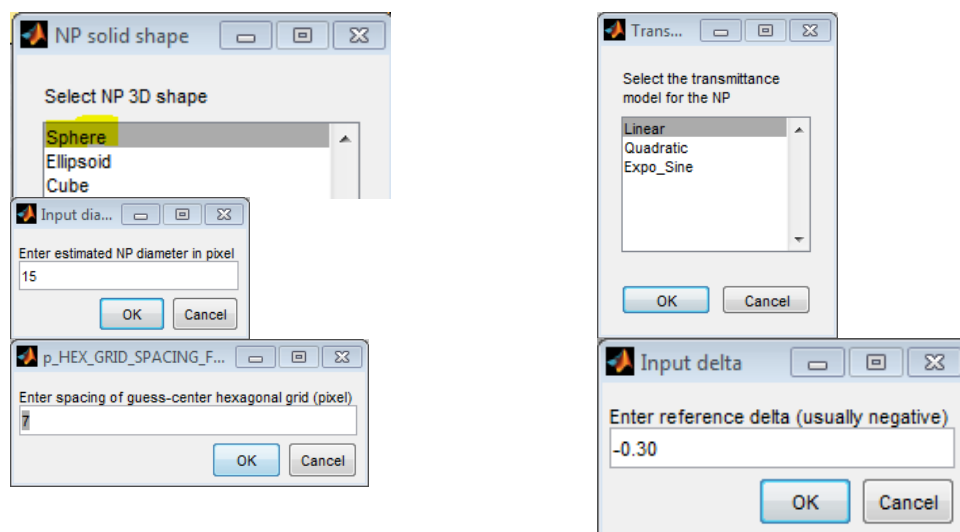
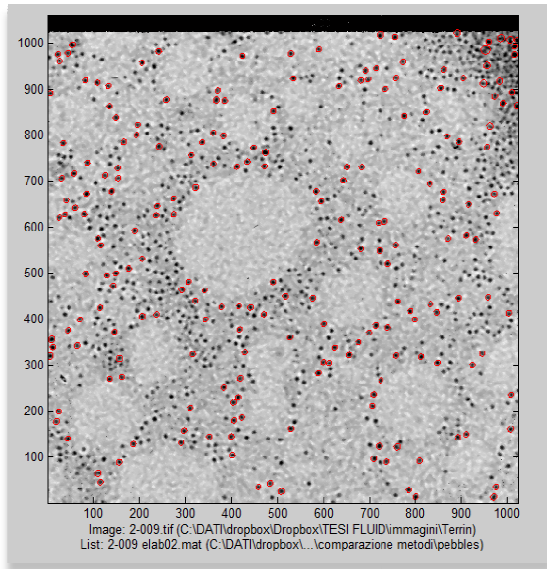
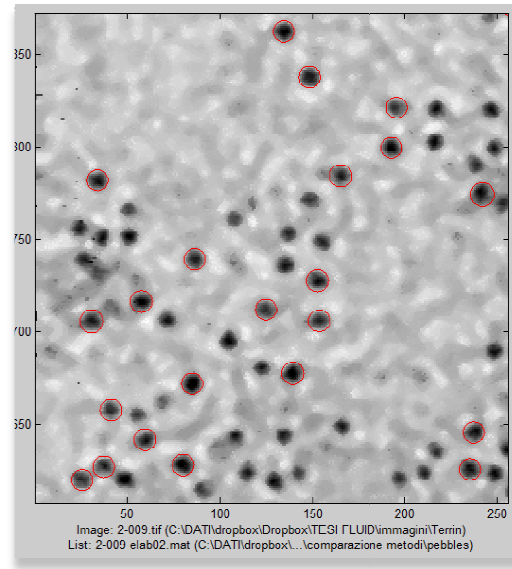


Figura 3-55 – Pebbles -Impostazioni prova A

<sup>20</sup> per tutti viene fatto il fit con forma Sfera e modello di trasmittanza lineare



**Figura 3-56 - segmentazione Pebbles Prova A**

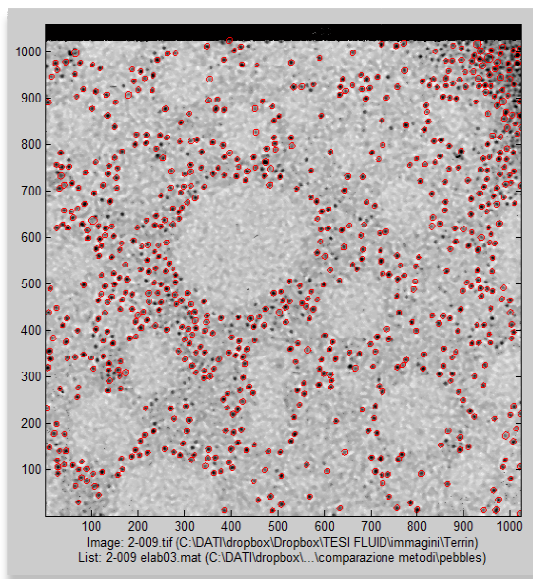


**Figura 3-57-segmentazione Pebbles Prova A Ingrandimento**

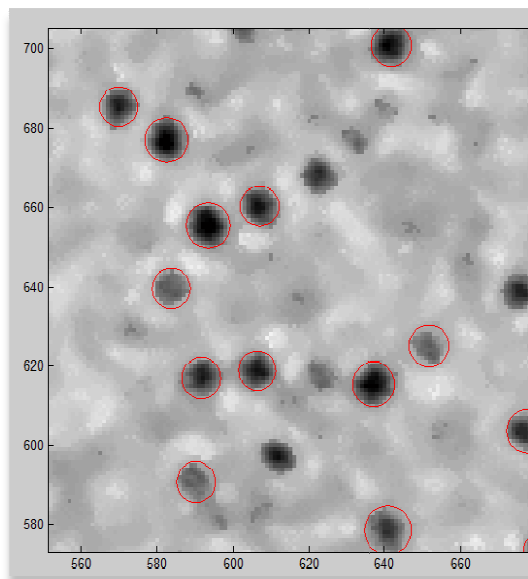
Si noti in Figura 3-57 che alcune NP sono state ignorate nonostante la dimensione del tutto comparabile a quella delle NP individuate. Nel paragrafo successivo vengono cambiati i parametri di partenza e si analizzano i risultati.

### 3.6.3.2 Software Pebbles – Metodo automatico – Prova B

Come indicato in Tabella 3-4 rispetto alla prova A, nella prova B, e' stato impostata una stima del diametro il diametro della NP a 13 nm abbassando anche il valore di Delta che come si vede dalla Figura 3-59 ha l'effetto di considerare particelle con dimensioni piu' piccole prima ignorate e particelle con un colore piu' chiaro.



**Figura 3-58 segmentazione Pebbles Prova B**



**Figura 3-59 segmentazione Pebbles Prova A Ingrandimento**

Si noti, anche in questo caso, come particelle di dimensioni molto simili a quelle trovate, probabilmente per la loro conformazione non troppo sferica, siano state ignorate.

### 3.6.3.3 Software Pebbles – Metodo automatico – Prova C

In questa prova si e' impostato il valore di diametro stimato a 9 pixel, Delta a -0,17 e lo spacing dell'alveare a 4 pixel.

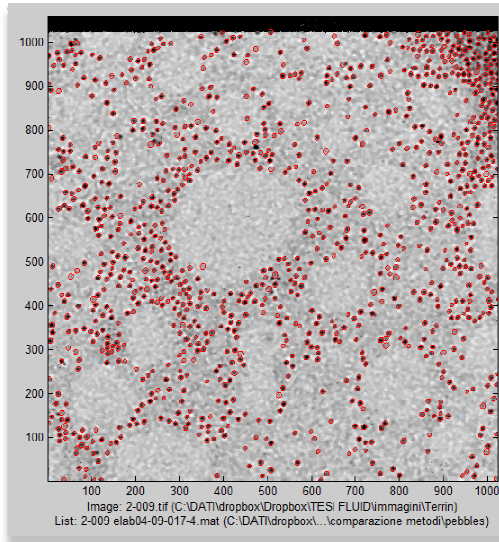


Figura 3-60 segmentazione Pebbles Prova B

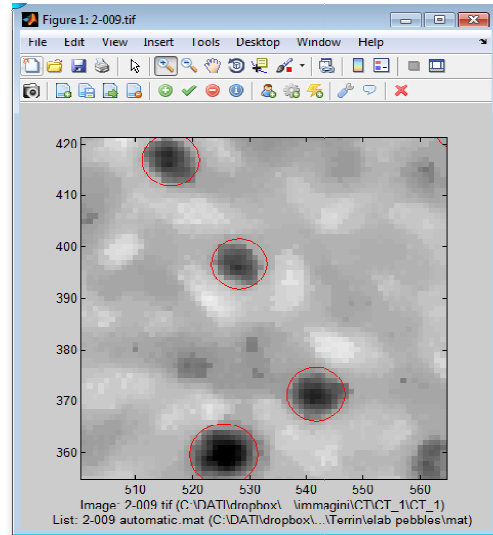


Figura 3-61 segmentazione Pebbles Prova A Ingrandimento

Si noti nel particolare di Figura 3-61 come Pebbles anche in questo caso sovrastimi l'area della NP.

Di seguito la tabella riassuntiva e grafico di questa esecuzione.

| Posizione [nm] |      | Dispersione [nm] |         | Forma             |      |
|----------------|------|------------------|---------|-------------------|------|
| <b>Media</b>   | 5,18 | <b>Varianza</b>  | 0,31    | <b>Asimmetria</b> | 0,56 |
| <b>Moda</b>    | 4,80 | <b>Dev.St</b>    | 0,55    | <b>Curtosi</b>    | 0,32 |
| <b>Mediana</b> | 5,1  | <b>Range</b>     | 3,6-6,9 | <b>Num. NP</b>    | 1043 |

Tabella 3-5 - indicatori della distribuzione di NP-Pebbles – Prova C

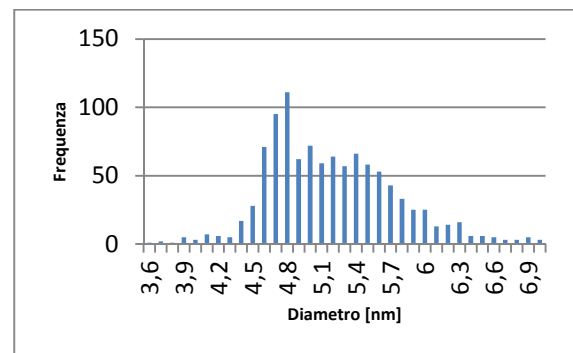


Figura 3-62- Metodo Pebbles, Prova C, grafico delle frequenze in funzione del diametro delle NP in nm

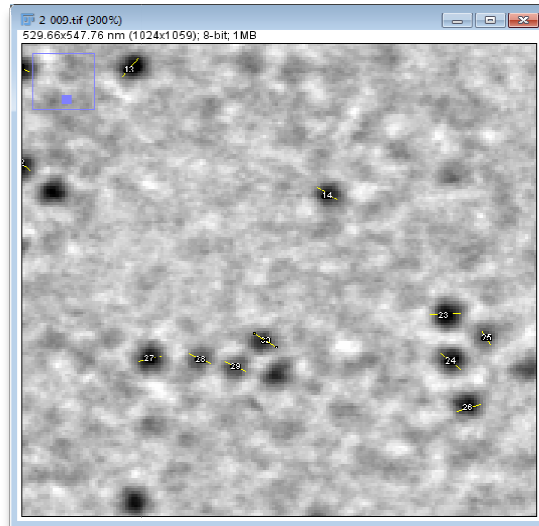
Si noti innanzitutto che il range e' molto stretto (3,38nm) rispetto ai metodi di segmentazione. Questo spiega molto bene il fatto che il valore che l'operatore inserisce limita molto il riconoscimento in un range del valore del diametro che può presentarsi largo. Il valore della media e' 5,18 nm con una Moda a 4,8 nm che come si vede ha

frequenza molto alta, superiore al 10% del totale delle NP analizzate. Questo fa ulteriormente avvalorare la considerazione sulla sovrastima dei diametri.

Da altre prove effettuate si è verificato che il processo di particelle più piccole avvicinandosi a 2 nm continua facendo anche a Pebbles scambiare probabilmente residui di acido oleico per NP.

### 3.6.4 Software Fiji-ImageJ – Metodo Manuale (ROI manager)

Si ricorda che questo metodo consiste nella misura che è sostanzialmente di tipo manuale effettuata particella per particella dall'operatore, assistita però dallo strumento Fiji a dal ROI manager.



**Figura 3-63-** *metodo manuale ROI Manager*

Si noti come il metodo manuale a basso ingrandimento e piccole NP rispetto l'immagine, possa essere affetto da incertezza nell'interpretare il bordo tenendo conto che il fattore di conversione tra pixel e nm è di 1,9pixel/nm. L'incidenza dell'errore può essere mitigato aumentando il numero di misure ripetute.

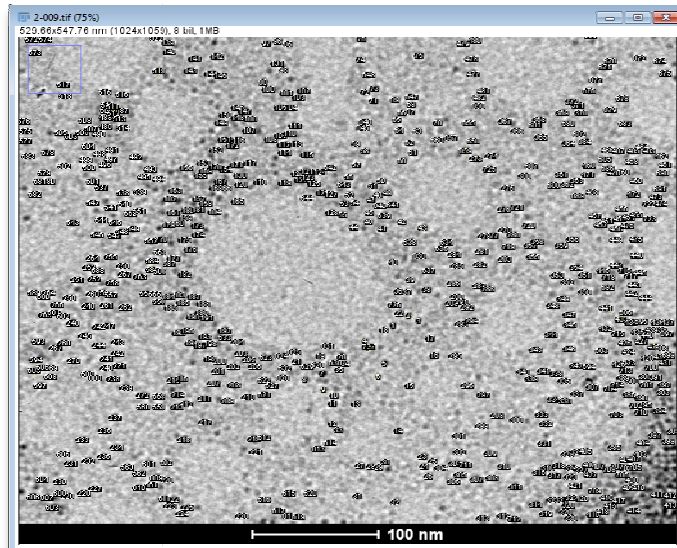


Figura 3-64- ROI Manager, tutte le NP misurate manualmente

In fig. 3-60 sono riportate tutte le particelle incluse nella misura per un totale. Totale di 727 NP.

| Posizione [nm] | Dispersione[nm] | Forma    |      |            |      |
|----------------|-----------------|----------|------|------------|------|
| Media          | 4,44            | Varianza | 0,63 | Asimmetria | 0,28 |
| Moda           | 4,48            | Dev.St.  | 0,80 | Curtosi    | 0,10 |
| Mediana        | 4,4             | Range    | 5,49 | Num. NP    | 727  |

Tabella 3-6 indicatori della distribuzione di NP- misurazioni con ROI Manager

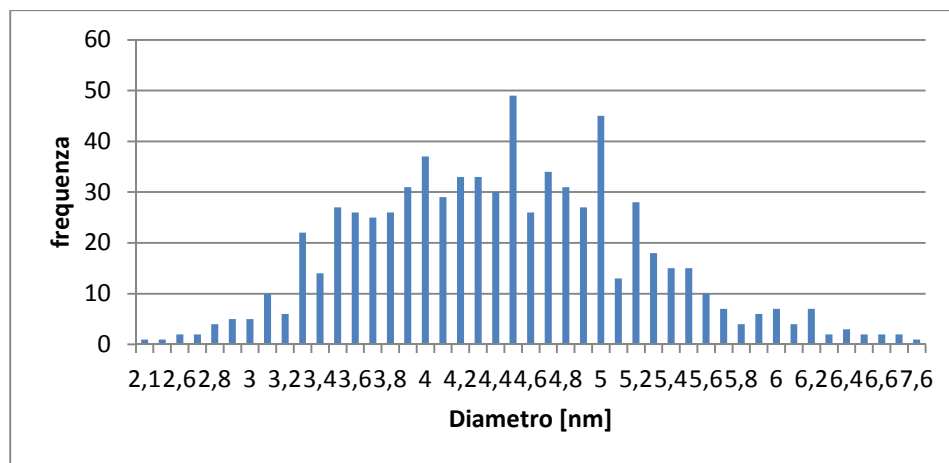


Figura 3-65- Metodo manuale ROI Manager, grafico delle frequenze in funzione del diametro delle NP in nm

Si noti in questo esempio che i risultati manuali sono piu' vicini a quelli di segmentazione che non a quello di Pebbles. Nel paragrafo che segue vengono comparati i risultati.

### 3.6.5 Considerazioni e raffronto metodi

Sono riportati di seguito i risultati ottenuti con i diversi metodi di analisi applicate alla stessa immagine TEM.

| Tecnica                    | Metodo             | Posizione |      |         | Dispersione |         |       | Forma      |         | Num NP |
|----------------------------|--------------------|-----------|------|---------|-------------|---------|-------|------------|---------|--------|
|                            |                    | Media     | Moda | Mediana | Varianza    | Dev.St. | Range | Asimmetria | Curtosi |        |
| Segmentazione              | OTSU               | 4,31      | 4,31 | 4,4     | 0,71        | 0,84    | 6,53  | 0,25       | 2,27    | 871    |
| Segmentazione              | RATS               | 4,41      | 4,5  | 4,5     | 0,87        | 0,93    | 8,6   | 0,71       | 5,09    | 888    |
| Modelli Intensità Tem      | Pebbles            | 5,18      | 4,8  | 5,1     | 0,31        | 0,55    | 3,38  | 0,56       | 0,32    | 1043   |
| Metodi di Misura assistita | Roi Manager ImageJ | 4,44      | 4,48 | 4,4     | 0,63        | 0,8     | 5,49  | 0,28       | 0,1     | 727    |

**Tabella 3-7** Misurazioni e indicatori distribuzione delle misure delle NP di Figura 3-46: metodi a confronto

Si noti in Tabella 3-7 come i metodi di segmentazione diano risultati del tutto comparabili e la misurazione manuale sia vicina ai risultati ottenuti con la segmentazione.

Si noti anche come la distribuzione in Pebbles sia l'unica che fornisce un valore di diametro medio maggiore rispetto agli altri metodi che per quanto visto in precedenza avvalorerebbe l'idea che stime per NP irregolari portino a sovrastima del diametro. Sempre per Pebbles, si è visto, anche dall'esempio e le varie prove effettuate, come il valore di stima del diametro iniziale imputato dall'operatore crei un range molto stretto della distribuzione, cosa non riscontrata nella segmentazione e misurazione manuale. D'altro canto, le misurazioni effettuate con la segmentazione risentono sicuramente dell'errore nel valutare le intensità di grigio attribuibili alla particella come invece appartenenti al fondo, creando leggere sottostime.

L'immagine di esempio analizzata e' l'ideale per metodi automatici, essendo composta da molte particelle con forma abbastanza regolare e non agglomerate. Si tenga presente però che a misure ingrandimenti di questo ordine (scala 100nm), ogni nm corrisponde a 1.9 pixel quindi, la misurazione effettuata manualmente deve essere il più accurata possibile e di sicuro aiuta effettuare un gran numero di ripetizioni.



### 3.7 Comparazione e considerazioni sui metodi di misura

In Tabella 3-8 sono riassunti pro e contro dei metodi utilizzati per l'analisi delle immagini TEM per ricavarne forma e dimensione delle NP.

| Metodo                                    | Vantaggi  | Svantaggi   |
|---|---|---|
| <b>Modelli di Intensità TEM (Pebbles)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• La decisione se il “fit” sia buono (GOF) e' misurabile da parametri oggettivi, valori numerici.</li> <li>• Il bordo della NP non viene identificato su base della percezione dell'operatore ma su modelli di intensità intrinsecamente legati alla tecnica della microscopia TEM</li> <li>• Permette di verificare la forma 3D della NP</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Per NP non regolari e' evidente come venga applicato sistematicamente l'arrotondamento per eccesso.</li> <li>• La caratterizzazione deve avvenire per tipologia di forma della NP (prima tutte sfere, poi tetraedri)</li> <li>• Nella misura automatica è sensibile ai valori di diametro “stimato” che è inserito dall'operatore.</li> <li>• Richiede parecchio tempo per elaborazione</li> <li>• Richiede piu' passate nel caso di forme diverse</li> <li>• Non è adatto in situazioni di agglomerati di NP</li> </ul> |
| <b>Modelli di segmentazione</b>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Non ci sono limitazioni sulla forma delle NP possono essere anche molto irregolari</li> <li>• La stima dell'area di una NP e' molto buona.</li> <li>• Velocità di elaborazione (ordine di pochi secondi anche per migliaia di NP)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• La qualità della segmentazione dipende dalla percezione dell'operatore.</li> <li>• Non sono adatti per situazioni di agglomerati di NP</li> </ul>  |
| <b>Metodi di Misura assistita</b>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Permettono una misura nei casi di agglomerati</li> <li>• Permettono misurazioni complesse per la discriminare la copertura e le NP.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Richiedono molto tempo</li> <li>• Sono soggetti a errori sistematici e casuali</li> <li>• Dipendono molto dall'operatore</li> </ul>  |

**Tabella 3-8** – Tabella riassuntiva metodi a confronto, pro e contro.

## 4 Sintesi delle particelle

### 4.1 Metodi di produzione delle NP

Il sempre maggiore interesse associato allo studio di nanoparticelle magnetiche ha prodotto, nel corso del tempo, svariati metodi di sintesi, come dimostrano le innumerevoli pubblicazioni scientifiche riportate in letteratura. I metodi di sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche includono tecniche quali: co-precipitazione, termo-decomposizione, sintesi idrotermica, microemulsione, sintesi sono-chimica, sintesi elettrochimica, pirolisi e sintesi batterica solo per citarne alcune[15]. Considerando l'elevato numero di tecniche di sintesi risulta quindi difficile poterne fare una classificazione generale, ma si può comunque considerare il fatto che per l'ottenimento di nanoparticelle ferromagnetiche utili per applicazioni in campo medico come la risonanza magnetica e la fluido ipertermia sono necessarie caratteristiche quali: ridotte dimensioni delle nanoparticelle sintetizzate (tali da poter garantire la proprietà di ferromagnetismo) e loro uniformità dimensionale. Le tecniche di sintesi maggiormente studiate e tali da permettere un elevato controllo su dimensione, forma e stabilità delle nanoparticelle ferromagnetiche sono la sintesi per co-precipitazione e la sintesi per decomposizione termica. Le nanoparticelle ferromagnetiche analizzate in questo lavoro di tesi sono state sintetizzate utilizzando queste due tecniche. In questo capitolo verranno descritte in dettaglio le procedure di sintesi utilizzate

### 4.2 Coprecipitazione e Termo-Decomposizione

Il metodo di sintesi per **co-precipitazione** è uno dei più utilizzati sia per la sua semplicità, in quanto utilizza condizioni di sintesi relativamente blande, sia per la buona resa quantitativa in termini di nanoparticelle prodotte, il che rende questo tipo di sintesi interessante anche per produzioni a livello industriale e non solo di laboratorio.

Gli ossidi di ferro, quali  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetite) o  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maghemite) vengono di solito preparati da una soluzione stechiometrica di sali ferrosi e ferrici in mezzo acquoso. La reazione chimica è riportata di seguito:



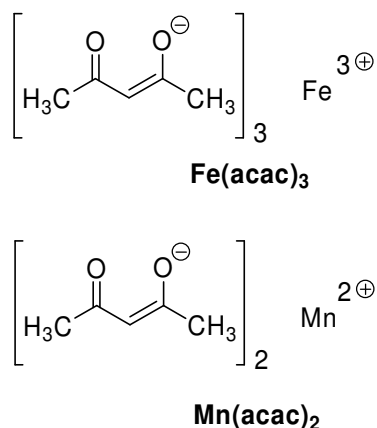
Il metodo consiste nell'introdurre, in ambiente altamente basico, le specie ioniche ferrose e ferriche  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  nel rapporto molare 1:2, ottenendo per precipitazione nanoparticelle di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  secondo quanto riportato nella reazione 1.1.

Lo svantaggio della sintesi per co-precipitazione è dovuto alla difficoltà di controllo delle dimensioni delle nanoparticelle che si presentano molto spesso disomogenee.

Le variabili che influenzano la sintesi per co-precipitazione sono il pH della soluzione, la forza ionica, la temperatura, la natura dei sali ferrici e ferrosi (cloruri, solfati e nitrati), il rapporto di concentrazione degli ioni  $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$  e la presenza di ossigeno nel sistema reagente.

La sintesi di nanoparticelle per **termo-decomposizione**, invece, consiste nella degradazione termica di una soluzione organica ed è una tecnica largamente utilizzata per la produzione di cristalli per semiconduttori. La termo-decomposizione si è rivelata un potente metodo per la produzione di nano cristalli ferromagnetici di ottima qualità dal punto di vista della cristallinità, delle proprietà ferromagnetiche e soprattutto per le strette distribuzioni delle dimensioni delle nanoparticelle. La sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche per termo-decomposizione solitamente avviene partendo da precursori che possono essere complessi metallici come *acetilcetonati*  $\text{M}(\text{acac})_n$  ( $\text{M} = \text{Fe}, \text{Co}, \text{Mn}, \text{Cr}, \text{Ni}$ ;  $n = 2, 3$ ; *acac* = acetilacetato) (Figura 4-1); in alternativa si possono usare anche  $\text{Fe}(\text{cup})_3$  (*cup* = *N*-nitrofenilidrossilammina), *carbonili* come ad esempio il ferro

penta carbonile  $\text{Fe}(\text{CO})_5$  oppure cloruri ferrici come ad esempio il cloruro ferrico esaidrato ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ).

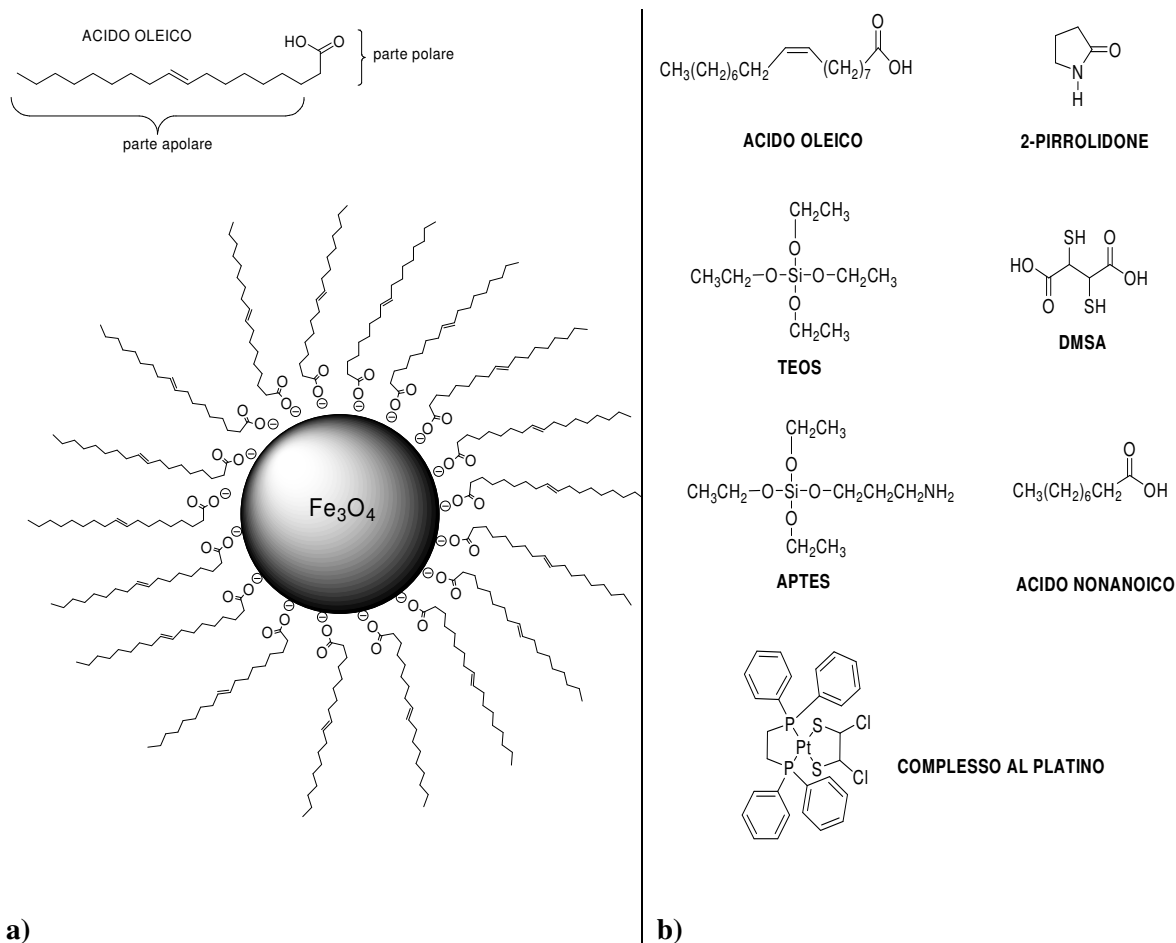


**Figura 4-1** Schema di struttura dei complessi *acetilacetionato* del ferro e manganese.

I precursori vengono degradati termicamente a seconda del tipo di solvente altobollente nel quale essi vengono sciolti, normalmente la temperatura di decomposizione è superiore ai 200 °C. Esempi di solventi che normalmente sono impiegati in questo tipo di reazioni sono l'etere benzilico, etere fenilico, 2-pirrolidone, etc..

Il grosso svantaggio nell'utilizzo di sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche per termo-decomposizione è dovuto al fatto che, normalmente, le nanoparticelle prodotte sono disperdibili solo in solventi non polari e questo ne impedisce l'utilizzo biologico, salvo un successivo trattamento di ricopertura delle nanoparticelle con particolari sostanze organiche in grado di aumentarne la liofilicità, come sarà descritto in seguito.

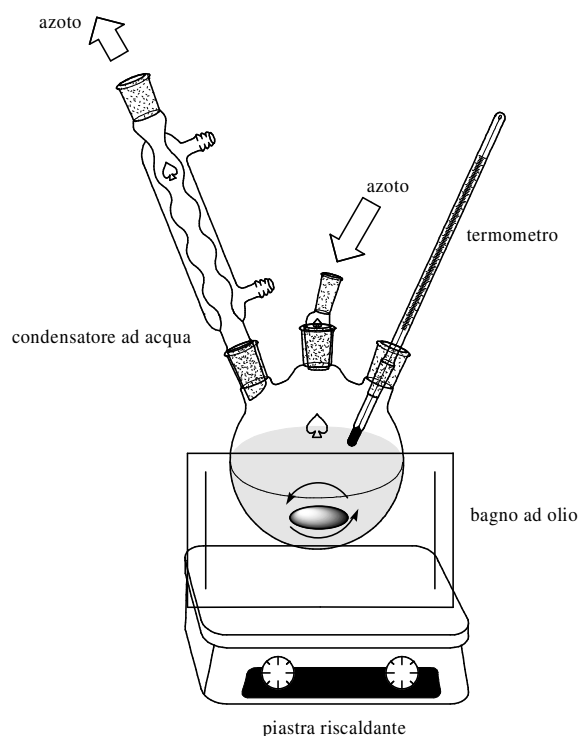
È importante sottolineare che, talvolta, durante la fase di sintesi delle nanoparticelle ferromagnetiche, sia che esse siano ottenute per sintesi per co-precipitazione sia per sintesi per termo-decomposizione, sono aggiunte delle sostanze organiche che non sono direttamente coinvolte nei processi di formazione delle nanoparticelle vere e proprie, ma fungono da agenti ricoprenti, modificando talvolta le caratteristiche chimiche superficiali delle nanoparticelle stesse. Perciò, al fine di proteggere le nanoparticelle ferromagnetiche da possibili ossidazioni (per esempio l'ossidazione da magnetite a maghemite) si utilizzano cosiddetti "agenti cappanti", ovvero sostanze ricoprenti che agiscono come una pellicola protettiva sulla superficie delle nanoparticelle, ma non solo. Infatti, queste sostanze, aggiunte in fase di reazione, sono anche in grado di prevenire l'aggregazione in cluster delle nanoparticelle favorendone la solubilità nel mezzo (Figura 4-2).



**Figura 4-2.** a) Esempio di ricopertura di una nanoparticella di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con acido oleico. La particolare disposizione della catena alchilica apolare sulla superficie della nanoparticella ne permette la dispersione solo in solventi apolari (es: esano); inoltre la ricopertura funge da mantello protettivo per la nanoparticella stessa impedendone l'aggregazione con le altre presenti nel sistema. b) Schemi di struttura delle ricoperture utilizzate nelle sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche di seguito descritte.

L'aggiunta di ammine, silani o polimeri alle nanoparticelle in fase di sintesi, oppure dopo averle già sintetizzate, permettono di modificarne la struttura superficiale, favorendo l'esposizione di gruppi funzionali sulla superficie delle stesse, allo scopo di migliorarne la liofilicità.

Di seguito si descriveranno i processi di sintesi per co-precipitazione e termodecomposizione utilizzati (Figura 4-3), specificando il tipo di sostanze utilizzate, le condizioni operative e i tipi di copertura utilizzati per preparare le nanoparticelle ferromagnetiche analizzate attraverso misure al TEM.



**Figura 4-3.** Schema generico della strumentazione di laboratorio utilizzata per le sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche.

#### 4.2.1 Sintesi di nanoparticelle C2

**Tipo di sintesi:** [16] sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche per co-precipitazione.

**Materiale:** cloruro ferrico esaidrato ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro ferroso tetraidrato ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), ammoniaca (25% aq.), acido oleico.

**Procedura di sintesi:** si preparano in due matracci tarati da 100 ml ciascuno una soluzione di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (13.52 g, 0.5 M) e una di  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (9.94 g, 0.5 M). In un pallone da 500 ml, dotato di condensatore, piastra riscaldante con bagno ad olio e agitatore meccanico si introducono rispettivamente 40 ml della soluzione di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 20 ml della soluzione  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  precedentemente preparate. Sempre sotto agitazione si introducono 15 ml di  $\text{NH}_3$ . Una volta aggiunta l'ammoniaca alla soluzione si ha un'immediata formazione di un precipitato nero. A questo punto, si aggiunge ancora una aliquota di ammoniaca sino al raggiungimento del pH della soluzione pari a 11. Infine, si aggiunge il 5% in volume di acido oleico e si scalda alla temperatura di 60 °C per 30 minuti.

Terminata la reazione si raffredda il sistema temperatura ambiente e si recuperano le nanoparticelle magnetiche lavandole più volte con acqua deionizzata fintanto che il liquido di scarto soprastante non diventa incolore. Le nanoparticelle recuperate vengono seccate sotto vuoto per tre ore alla temperatura di 40 °C, ottenendo una polvere nera.

## 4.2.2 Sintesi di nanoparticelle C21

**Tipo di sintesi:** [17] sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche per co-precipitazione.

**Materiale:** cloruro ferrico esaidrato ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro ferroso tetraidrato ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), ammoniaca (25% aq.).

**Procedura di sintesi:** in un pallone a tre colli da 500 ml si introducono 11.68 g di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (44 mmol), 4.30 g di  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (22 mmol) e 200 ml di acqua deionizzata. Si scalda la soluzione alla temperatura di 85 °C, utilizzando un bagno ad olio e una piastra riscaldante con agitazione magnetica. Il sistema, dotato di condensatore, viene mantenuto a riflusso di azoto. A questo punto vengono aggiunti 36 ml di ammoniaca, ottenendo un precipitato di colore scuro. Terminata la reazione si raffredda il sistema temperatura ambiente e si recuperano le nanoparticelle magnetiche lavandole più volte con acqua deionizzata fintanto che il liquido di scarto soprastante non diventa incolore. Le nanoparticelle recuperate vengono seccate sotto vuoto per tre ore alla temperatura di 40 °C, ottenendo una polvere nera.

## 4.2.3 Sintesi di nanoparticelle C9, C14

**Tipo di sintesi:** [17] ricopertura con tetraetossi silano (TEOS) delle nanoparticelle C21 sintetizzate precedentemente.

**Materiale:** nanoparticelle C21, tetraetossi silano (TEOS), glicerina, acido acetico glaciale.

**Procedura di sintesi:** in un matraccio da 100 ml vengono dispersi 4.00 g delle nanoparticelle precedentemente sintetizzate in acqua deionizzata. Da questa soluzione si prelevano 25 ml che vengono introdotti all'interno di un pallone da 250 ml dotato di condensatore, piastra riscaldante con agitatore magnetico e immerso in un bagno ad olio. Riflussando il sistema con azoto si introducono nel pallone 100 ml di soluzione acquosa al 10% di TEOS, 60 ml di glicerina e 4-5 pipettate di acido acetico glaciale finché la soluzione non raggiunge pH 5. La soluzione viene lasciata sotto agitazione a 85 °C per 2 ore, trascorse le quali si raffredda la soluzione a temperatura ambiente e si procede al recupero delle nanoparticelle come già precedentemente descritto, ottenendo una polvere scura.

## 4.2.4 Sintesi nanoparticelle C8

**Metodo:** [18] ricopertura con (3-amminopropil)-trietossisilano (APTES) delle nanoparticelle C21.

**Materiale:** nanoparticelle C21, (3-amminopropil)-trietossisilano (APTES), etanolo.

**Procedura di sintesi:** in un pallone a tre colli da 250 ml, dotato di condensatore, agitatore magnetico, piastra riscaldante e immerso in un bagno ad olio, vengono introdotti 75 ml di acqua, 75 ml di etanolo, 4.4 ml di APTES e 1.00 g di nanoparticelle ferromagnetiche C21. La soluzione viene riscaldata a 40 °C per 2 ore mantenendo un riflusso di azoto.

A fine reazione la soluzione viene raffreddata a temperatura ambiente. Le nanoparticelle ferromagnetiche ricoperte con APTES vengono recuperate con un magnete e lavate con etanolo e poi con acqua deionizzata per tre volte. Infine, dopo essiccazione sotto vuoto a 70 ° C per 4 ore si ottiene una polvere scura.

#### 4.2.5 Sintesi nanoparticelle C13

**Tipo di sintesi:** [19] sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche per co-precipitazione.

**Materiale:** solfato ferroso eptaidrato ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), nitrato sodico ( $\text{NaNO}_3$ ), idossido di potassio (KOH).

**Procedura di sintesi:** in un pallone a tre colli da 500 ml, dotato di condensatore, agitatore magnetico, piastra riscaldante e immerso in un bagno ad olio, vengono disciolti 17.71 g di  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,06 mol) in 200 mL di acqua. Nel sistema, a riflusso di azoto, vengono aggiunte una soluzione di nitrato di potassio (1 M, 100 mL) e di idrossido di potassio (0,5 M, 50 mL). La miscela di reazione è stata mantenuta a 90° C per 2 ore. A fine reazione si raffredda la miscela a temperatura ambiente e le nanoparticelle ferromagnetiche vengono recuperate con un magnete e lavate con etanolo e poi con acqua deionizzata per tre volte. Infine, dopo essiccazione sotto vuoto a 40° C per 4 ore si ottiene una polvere scura.

#### 4.2.6 Sintesi nanoparticelle C22

**Tipo di sintesi:** [18] ricopertura delle nanoparticelle C13 con (3-amminopropil)-trietossisilano (APTES).

**Materiale:** nanoparticelle C13, (3-amminopropil)-trietossisilano (APTES), etanolo.

**Procedura di sintesi:** in un pallone a due colli da 100 ml dotato di condensatore, agitatore magnetico, piastra riscaldante e immerso in un bagno ad olio, si introducono 0.5 g di nanoparticelle C13, 50 ml di toluene 0.5 ml di APTES. La soluzione viene riscaldata a 115 °C per 24 ore. A fine reazione si raffredda la miscela a temperatura ambiente e le nanoparticelle ferromagnetiche vengono recuperate con un magnete e lavate con etanolo e poi con acqua deionizzata per tre volte. Infine, dopo essiccazione sotto vuoto a 40° C per 4 ore si ottiene una polvere scura.

#### 4.2.7 Sintesi nanoparticelle C1

**Tipo di sintesi:** [20] sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche per termodecomposizione.

**Materiale:** 1,2-tetradecandiolo, oleilamina, acido oleico, ferro acetilacetato ( $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ), etere fenilico.

**Procedura di sintesi:** in un pallone a tre colli da 500 ml, dotato di condensatore, agitatore meccanico, riscaldato attraverso isomantello, vengono disciolti 2.30 g di 1,2-tetradecandiolo (10 mmol), 0.70 g di  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  (2 mmol), 0.56 g di acido oleico (2 mmol), 0.53 g di oleilamina (2 mmol) e 20 ml di etere fenilico. La soluzione sotto agitazione

meccanica e riflusso di azoto, viene portata alla temperatura di 200 °C per 30 minuti e a riflusso per altri 30 minuti (265 °C). A fine reazione si raffredda la soluzione a temperatura ambiente e con l'aiuto di un magnete si recuperano le nanoparticelle che vengono lavate ripetutamente con etanolo, acqua ed acetone e successivamente essiccate sotto vuoto a 80 °C per 24 ore, ottenendo una polvere scura.

#### 4.2.8 Sintesi nanoparticelle C12

**Tipo di sintesi:** [20] sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche per termodecomposizione.

**Materiale:** 1,2-tetradecandiolo, oleilamina, acido oleico, ferro acetilacetato ( $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ), etere benzilico.

**Procedura di sintesi:** in un pallone a tre colli da 500 ml, dotato di condensatore, agitatore meccanico, riscaldato attraverso isomantello, vengono disciolti 2.30 g di 1,2-tetradecandiolo (10 mmol), 0.70 g di  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  (2 mmol), 0.56 g di acido oleico (2 mmol), 0.53 g di oleilamina (2 mmol) e 20 ml di etere benzilico. La soluzione sotto agitazione meccanica e riflusso di azoto, viene portata alla temperatura di 200 °C per 30 minuti e a riflusso per altri 30 minuti (300 °C). A fine reazione si raffredda la soluzione a temperatura ambiente e con l'aiuto di un magnete si recuperano le nanoparticelle che vengono lavate ripetutamente con etanolo, acqua ed acetone e successivamente essiccate sotto vuoto a 80 °C per 24 ore, ottenendo una polvere scura.

#### 4.2.9 Sintesi nanoparticelle C11

**Tipo di sintesi:** [20] sintesi di accrescimento di nanoparticelle C1 da 4 a 6 nm.

**Materiale:** nanoparticelle C1, 1,2-tetradecandiolo, oleilamina, acido oleico, ferro acetilacetato ( $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ), etere benzilico.

**Procedura di sintesi:** in un pallone a tre colli da 500 ml, dotato di condensatore, agitatore meccanico, riscaldato attraverso isomantello, vengono mescolati 80 mg di nanoparticelle C1, 2.30 g di 1,2-tetradecandiolo (10 mmol), 0.70 g di  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  (2 mmol), 0.56 g di acido oleico (2 mmol), 0.53 g di oleilamina (2 mmol) e 20 ml di etere benzilico. La soluzione sotto agitazione meccanica e riflusso di azoto, viene portata alla temperatura di 200 °C per 30 minuti e a riflusso per altri 30 minuti (300 °C). A fine reazione si raffredda la soluzione a temperatura ambiente e con l'aiuto di un magnete si recuperano le nanoparticelle che vengono lavate ripetutamente con etanolo, acqua ed acetone e successivamente essiccate sotto vuoto a 80 °C per 24 ore, ottenendo una polvere scura.

#### 4.2.10 Sintesi nanoparticelle C10, C15

**Tipo di sintesi:** [21] sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche per termodecomposizione.

**Materiale:**  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2-pirrolidone, etanolo.



**Procedura di sintesi:** in un pallone a tre colli da 250 ml, dotato di condensatore, agitatore meccanico, riscaldato attraverso isomantello, vengono introdotti 2.70 g di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10 mmol) e 20 ml di 2-pirrolidone. Il sistema, tenuto a riflusso di azoto viene quindi scaldato a 260 °C per 24 ore. A fine reazione si raffredda la soluzione a temperatura ambiente e con l'aiuto di un magnete si recuperano le nanoparticelle che vengono lavate ripetutamente con etanolo, acqua ed acetone e successivamente essiccate sotto vuoto a 80 °C per 24 ore, ottenendo una polvere scura.

#### 4.2.11 Sintesi nanoparticelle C19

**Tipo di sintesi:** [22] copertura di nanoparticelle C11 con DMSA.

**Materiale:** nanoparticelle C11, etere etilico, acido meso-dimercaptosuccinico (DMSA), toluene, dimetilsolfossido (DMSO), etanolo.

**Procedura di sintesi:** in un tubo Schlenk si disperdono 10 mg di nanoparticelle C11 in 1 ml di toluene utilizzando un sonicatore. Successivamente si versa una soluzione composta da 10 mg di DMSA e 1 ml di DMSO. Si lascia reagire a temperatura ambiente per 10 ore, dopodiché si recuperano le nanoparticelle con un magnete lavandole ripetutamente con etere etilico e acetone. Le nanoparticelle ferromagnetiche vengono infine seccate a 50 °C sottovuoto per 5 ore, ottenendo una polvere nera.

#### 4.2.12 Sintesi di nanoparticelle C17

**Tipo di sintesi:** [22] copertura di nanoparticelle C11 con DMSA.

**Materiale:** nanoparticelle C11, etere etilico, acido meso-dimercaptosuccinico (DMSA), toluene, dimetilsolfossido (DMSO), etanolo.

**Procedura di sintesi:** la procedura di sintesi è la stessa utilizzata per la produzione di nanoparticelle C19 con l'unica differenza che si è introdotta una quantità di DMSA pari a quattro volte quella utilizzata nella precedente sintesi.

#### 4.2.13 Sintesi di nanoparticelle C20

**Tipo di sintesi:** [23] sintesi di nanoparticelle cubiche per termodecomposizione.

**Materiale:**  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ , acido nonanoico, etere benzilico.

**Procedura di sintesi:** in un pallone a tre colli da 250 ml, dotato di condensatore, agitatore meccanico, riscaldato attraverso isomantello, vengono mescolati 0.71 g di  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ , 1.4 ml di acido nonanoico, 50 ml di etere benzilico. Il sistema riflussato di azoto viene scaldato sino alla temperatura di 200 °C per un'ora. A fine reazione si raffredda la soluzione a temperatura ambiente e con l'aiuto di un magnete si recuperano le nanoparticelle che vengono lavate ripetutamente con etanolo, acqua ed acetone e successivamente essiccate sotto vuoto a 80 °C per 24 ore, ottenendo una polvere scura.

#### 4.2.14 Sintesi di nanoparticelle C16

**Tipo di sintesi:** [20] sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche per termodecomposizione.

**Materiale:** 1,2-tetradecandiolo, oleilamina, acido oleico, ferro acetilacetato ( $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ), manganese acetilacetato ( $\text{Mn}(\text{acac})_2$ ), etere benzilico.

**Procedura di sintesi:** in un pallone a tre colli da 250 ml, dotato di condensatore, agitatore meccanico, riscaldato attraverso isomantello, vengono disciolti 2.30 g di 1,2-tetradecandiolo (10 mmol), 0.70 g di  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  (2 mmol), 0.56 g di acido oleico (2 mmol), 0.53 g di oleilamina (2 mmol), 0.25 g di  $\text{Mn}(\text{acac})_2$  e 20 ml di etere benzilico. La soluzione sotto agitazione meccanica e riflusso di azoto, viene portata alla temperatura di 200 °C per 30 minuti e a riflusso per altri 30 minuti (300 °C). A fine reazione si raffredda la soluzione a temperatura ambiente e con l'aiuto di un magnete si recuperano le nanoparticelle che vengono lavate ripetutamente con etanolo, acqua ed acetone e successivamente essiccate sotto vuoto a 80 °C per 24 ore, ottenendo una polvere scura.

#### 4.2.15 Sintesi di nanoparticelle C18

**Tipo di sintesi:** ricopertura di nanoparticelle C11 con un complesso a base di platino.

**Materiale:** complesso a base di platino, dimetil solfossido (DMSO), nanoparticelle C11, toluene, etere etilico, acetone.

**Procedura di sintesi:** in un tubo Schlenk si disperdono 60 mg di nanoparticelle C11 e 60 mg di complesso al platino in 6 ml di toluene utilizzando un sonicatore. Si lascia reagire a temperatura ambiente per 10 ore, dopodiché si recuperano le nanoparticelle con un magnete lavandole ripetutamente con etere etilico e acetone. Le nanoparticelle ferromagnetiche vengono infine seccate a 50 °C sottovuoto per 5 ore, ottenendo una polvere nera.

Tabella 4-1- Riassunto delle sintesi di nanoparticelle ferromagnetiche sintetizzate e analizzate.

| nome     | tipo di sintesi      | ricopertura   |
|----------|----------------------|---------------|
| C2       | co-precipitazione    | acido oleico  |
| C21      | co-precipitazione    | nessuna       |
| C9, C14  | co-precipitazione    | TEOS          |
| C22      | co-precipitazione    | APTES         |
| C13      | co-precipitazione    | nessuna       |
| C8       | co-precipitazione    | APTES         |
| C1       | termo-decomposizione | acido oleico  |
| C11      | termo-decomposizione | acido oleico  |
| C12      | termo-decomposizione | acido oleico  |
| C10, C15 | termo-decomposizione | 2-pirrolidone |

|     |                      |                      |
|-----|----------------------|----------------------|
| C19 | termo-decomposizione | DMSA                 |
| C17 | termo-decomposizione | DMSA                 |
| C20 | termo-decomposizione | acido nonanoico      |
| C16 | termo-decomposizione | acido oleico         |
| C18 | termo-decomposizione | complesso al platino |

## 5 Analisi TEM delle serie e risultati sperimentali

In questo capitolo sono presentati i risultati della caratterizzazione morfologica di 16 serie di immagini TEM corrispondenti ai nanofluidi ottenuti da diverse sintesi.

### 5.1 Immagini C2

**ID :** C2

**Metodo:** Co-precipitazione

**Solubilità :** Peg/Acqua

**Ricoprimento:** Acido Oleico

**Metodo di caratterizzazione:** Utilizzando Pebbles in modalità automatica, utilizzando misure di raggio crescenti, i risultati non sono stati soddisfacenti (Figura 5-3) in quanto le particelle sono troppo agglomerate ed irregolari. Si è proceduto pertanto con l'analisi mediante ImageJ/fiji manuale (Figura 5-4).

**Considerazioni sulle Immagini TEM :** Sono state analizzate 12 immagini con varia scala, 10,50 e 100 nm. La l'analisi delle immagini è stata complicata dalla presenza di NP molto agglomerate. Questo crea un effetto di compensazioni di luminosità nel TEM che di solito penalizza l'attendibilità della misura andando ad "erodere" i bordi. Inoltre molte immagini all'analisi FFT hanno evidenziato problemi di messa a fuoco.

Si noti nelle immagini (Figura 5-1, Figura 5-2) come le NP non abbiano una forma regolare.

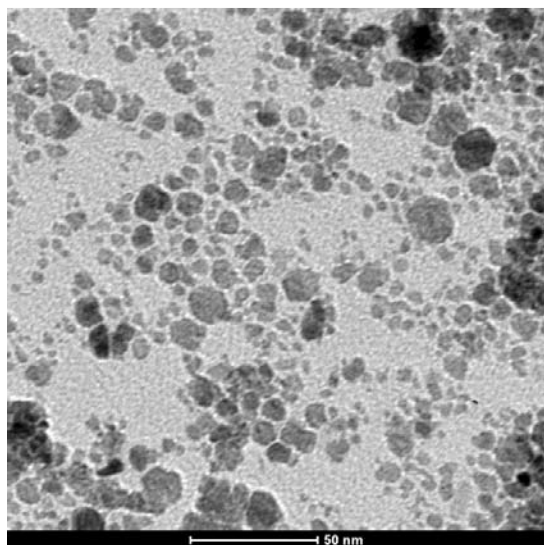


Figura 5-1- immagine con scala a 50nm C2

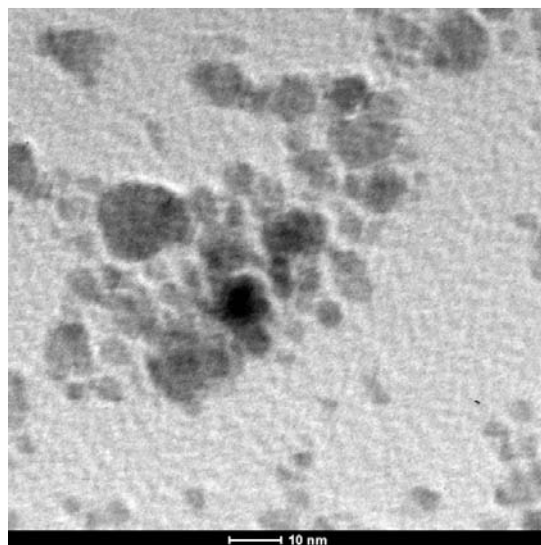


Figura 5-2 - immagine con scala a 10nm C2

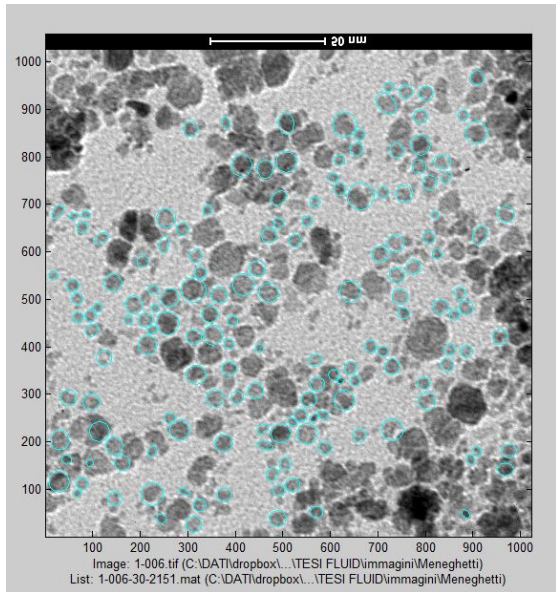


Figura 5-3 – Caratterizzazione NP C2 con Pebbles

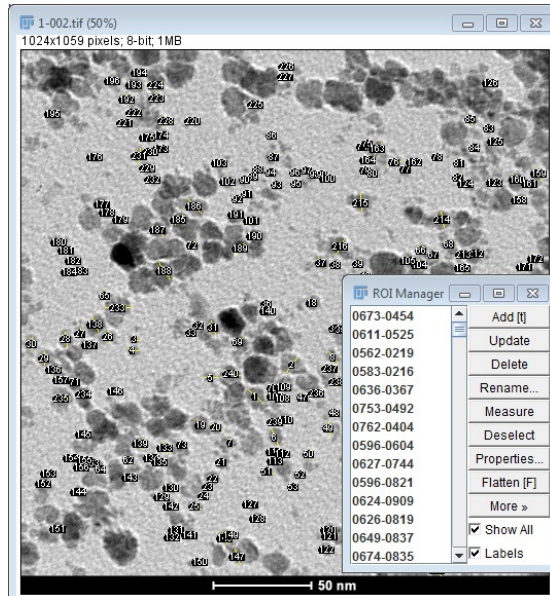


Figura 5-4 – Caratterizzazione NP C2 con ImageJ/Fiji manuale, si noti anche ROI manager

In Figura 5-5 riportiamo il grafico della distribuzione della misura delle NP C2.

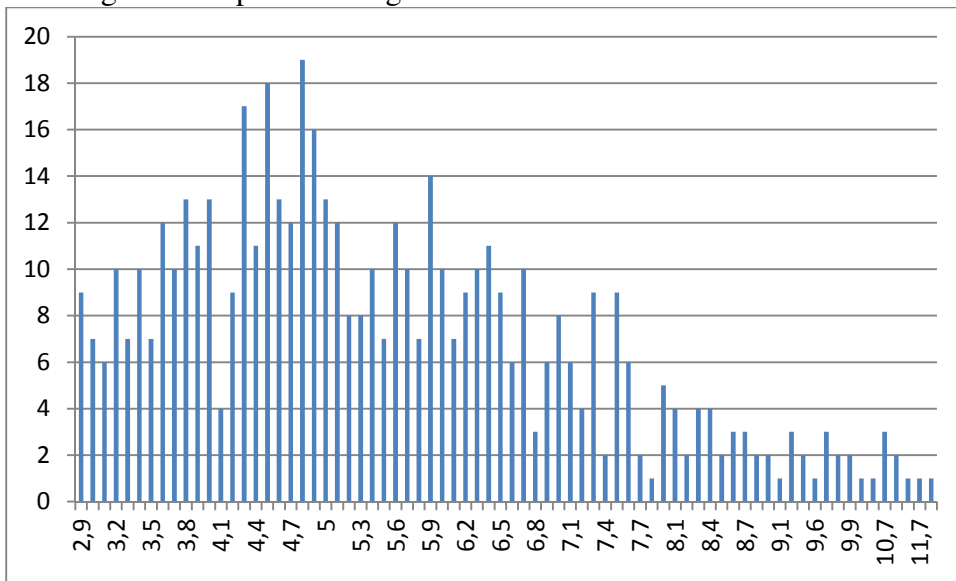


Figura 5-5- Grafico della distribuzione delle NP C2

**Risultati Dimensioni NP :** la distribuzione della dimensione del diametro delle NP è asimmetrica. Ta tabella Tabella 5-1 riporta gli indicatori della distribuzione.

| Posizione [nm] | Dispersione [nm] | Forma      |
|----------------|------------------|------------|
| Media          | 5,39             | Asimmetria |
| Moda           | 4,871            | Dev.St.    |
| Mediana        | 5,1              | Range      |
|                | 2,9-12           | Numero NP  |
|                |                  | 518        |

Tabella 5-1 Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C2

Il range dei diametri delle NP misurate va da 3nm fino a circa 12nm. Il valore della media è 5,39nm, moda è 4,8nm e si nota inoltre che le dimensioni piu' frequenti sono comprese tra 4,3 e 4,8 nm.

## 5.2 Immagini C1

**ID :** C1

**Metodo:** Termodecomposizione  $\text{Fe}(\text{acac})_3$

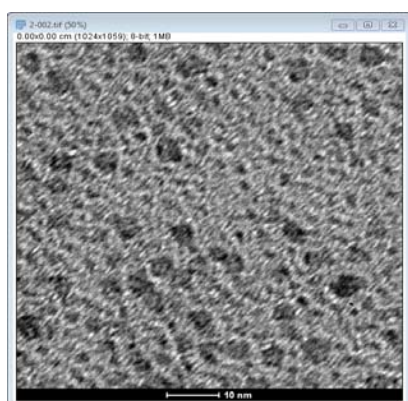
**Solubilità :** Esano

**Solvente:** difenil etere

**Ricoprimento:** Acido Oleico

**Considerazioni sulle Immagini TEM:** Le immagini TEM a disposizione erano 12 con barra dei riferimenti a 10,20,50,100 nm. Analizzare queste immagini e' stato molto problematico, si noti Figura 5-7 che rappresenta FFT dell'immagine di Figura 5-6<sup>21</sup> dimostri dei problemi di astigmatismo (si noti nel centro della FFT un ellisse, vedi analogia con fig. 3.20) e quindi probabile settaggio TEM. Nella Figura 5-8 si noti un miglioramento nell'astigmatismo, ma un problema di messa a fuoco (vedi analogia con fig. 3.19)

Infine osservando l'immagine di Figura 5-6 ad occhio e' difficile stabilire se gli oggetti con misura inferiore a 4 nm sono micelle o NP.

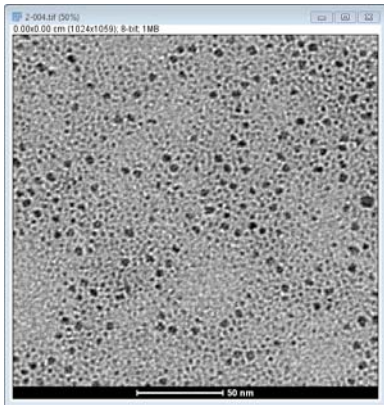


**Figura 5-6** – immagine con scala a 10nm C1



**Figura 5-7** – Fast Fourier Transform della immagine in Tabella 5-9

<sup>21</sup> Far riferimento al par. 3.3.1 per l'utilizzo della FFT per la verifica della qualità dell'immagine TEM



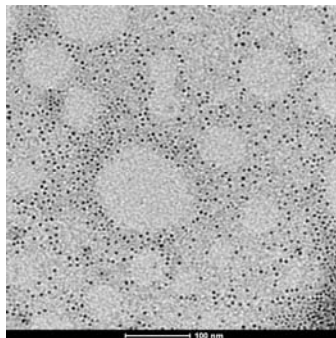
**Figura 5-8** – immagine con scala a 50 nm CI



**Figura 5-9** - Fast Fourier Transform della immagine in Tabella 5-12

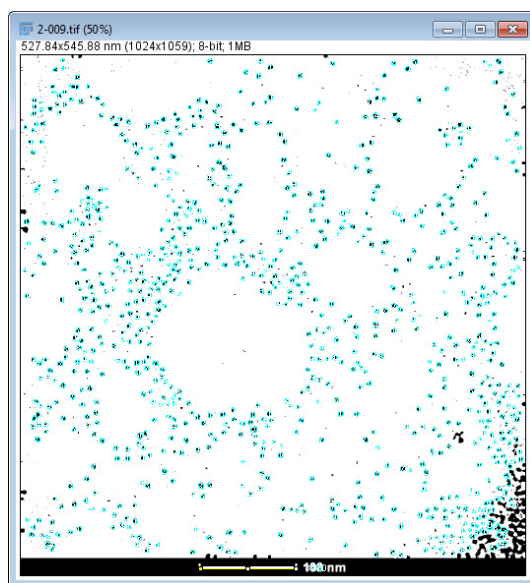
**Metodo di caratterizzazione:** Visti i problemi dell'immagine, Pebbles non è utilizzabile per l'analisi. Si è usato quindi con Fiji/imagej-RATS.

Per la caratterizzazione si è dovuto utilizzare una immagine (Figura 5-10) con una banda di misura corrispondente a 100nm che sembra non risentire dei problemi di astigmatismo e di messa a fuoco.



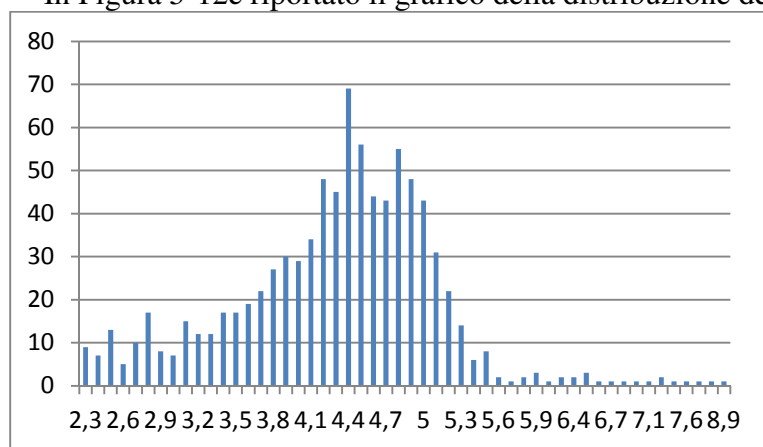
**Figura 5-10-** immagine a ingrandimento 100nm NP CI

L'immagine di Figura 5-10 è la stessa utilizzata per la comparazione dei metodi di caratterizzazione nel paragrafo 3.6 pertanto si riportano i dati ottenuti con Fiji/Imagej



**Figura 5-11-** immagine segmentata con RATS e misurata con Analyze particles di ImageJ delle NP C1 a scala 100nm

In Figura 5-12 è riportato il grafico della distribuzione dei diametri delle NP C1



**Figura 5-12 -** distribuzione delle NP C1

**Risultati Dimensioni NP:** In Tabella 5-2 sono riportati gli indicatori della distribuzione.

| Posizione[nm]  |      | Dispersione[nm] |         | Forma             |      |
|----------------|------|-----------------|---------|-------------------|------|
| <b>Media</b>   | 4,31 | <b>Varianza</b> | 0,71    | <b>Asimmetria</b> | 0,25 |
| <b>Moda</b>    | 4,31 | <b>Dev.St.</b>  | 0,84    | <b>Curtosi</b>    | 2,27 |
| <b>Mediana</b> | 4,4  | <b>Range</b>    | 2,3-8,9 | <b>Num NP</b>     | 871  |

**Tabella 5-2-** Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C1

Su queste misurazioni e' stata già fatta una discussione paragrafo 3.6 a cui si rimanda per un eventuale approfondimento.



### 5.3 Immagini C13

**ID :** C13

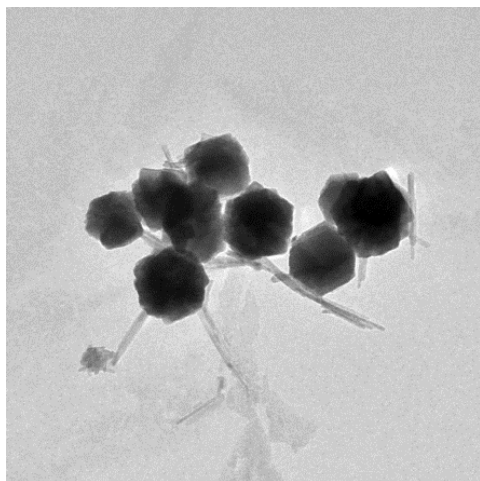
**Metodo:** Co-precipitazione

**Solubilità :** Peg/acqua

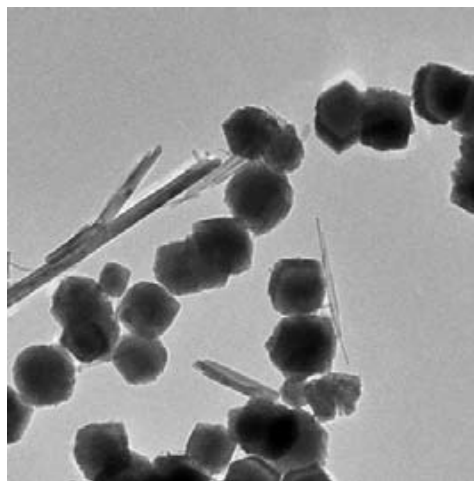
**Solvente:** toluene

**Ricoprimento:** nessuno

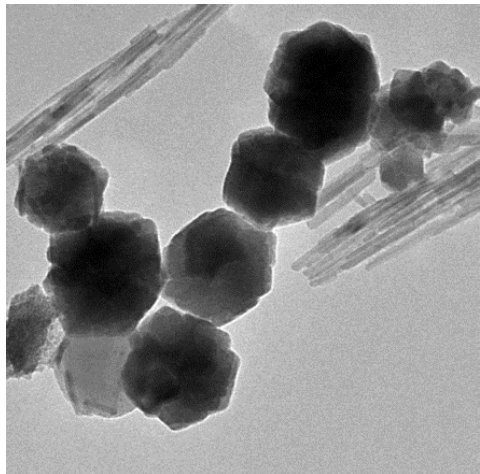
**Considerazioni sulle Immagini TEM:** Si avevano a disposizione 2 immagini a 6,5kx ingrandimenti, 14 a 11kx, una a 15kx, una a 21kx, le misurazioni sono state effettuate su tutte le immagini.



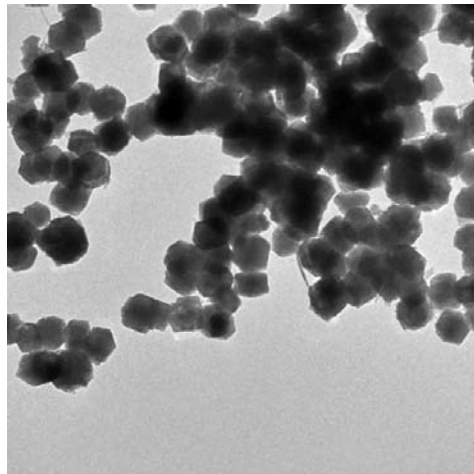
**Figura 5-13-** NP C13, 11kx ingr.



**Figura 5-14** NP C13, 11kx ingr.



**Figura 5-15** NP C13, 21kx ingr.



**Figura 5-16 -** NP C13, 6,5kx ingr

**Metodi di Caratterizzazione:** E' stato utilizzato ImageJ/Fiji con metodo di misura manuale particella per particella. La distribuzione delle dimensioni, come si puo' notare in Tabella 5-4, va da 50 nm a 155 nm. La distribuzione e' approssimabile ad una gaussiana.

**Forma:** La forma delle NP è a prisma esagonale per le NP inferiori alla dimensione media (114nm), mentre per dimensioni piu' grandi si puo' notare un aspetto piu' "gibboso".

Nelle immagini sono ben visibili delle strutture "aghiformi" cristalline che variano dai 150nm ai 450 nm in lunghezza per una larghezza tra 5nm e 7 nm che potrebbe far

pensare alla presenza di idrossido di ferro,  $\alpha$ -FeO(OH) (detto anche Goethite che potrebbe essere prodotto in qualche fase della produzione visto la presenza dell'idrossido di potassio, si veda sintesi par. 4.2.5). Un'indagine con SAED e XRD potrebbe darne conferma o meno.

Riportiamo in Figura 5-17 il grafico della distribuzione delle dimensioni e relativa Tabella 5-3

| Range [nm] | Freq |
|------------|------|
| 50         | 1    |
| 55         | 2    |
| 60         | 1    |
| 70         | 4    |
| 75         | 1    |
| 80         | 8    |
| 85         | 8    |
| 90         | 10   |
| 95         | 20   |
| 100        | 31   |
| 105        | 31   |
| 110        | 48   |
| 115        | 36   |
| 120        | 33   |
| 125        | 36   |
| 130        | 21   |
| 135        | 11   |
| 140        | 8    |
| 145        | 10   |
| 150        | 4    |
| 155        | 2    |
| Tot        | 326  |

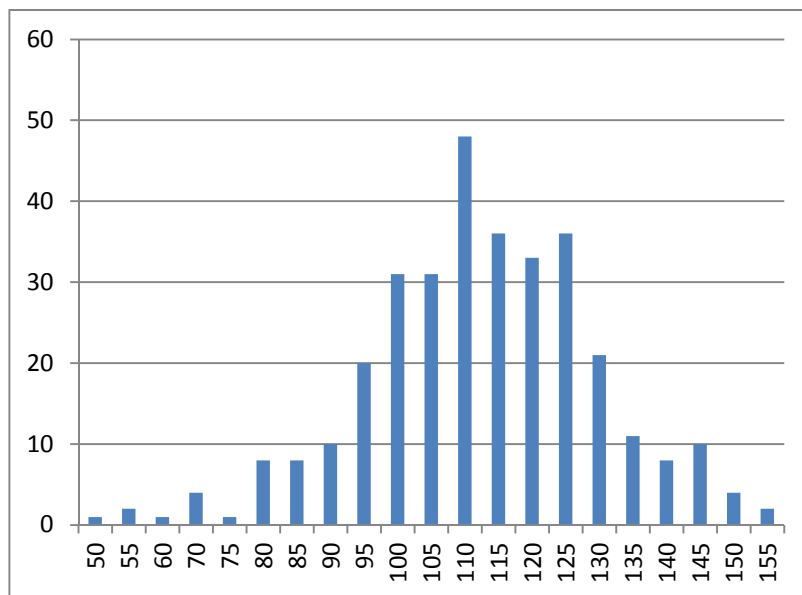


Figura 5-17 - distribuzione delle NP C13

Tabella 5-3 valori frequenze diametro NP C13

**Risultati Dimensioni NP:** in Tabella 5-4 vengono riportati gli indicatori della distribuzione analizzata.

| Posizione [nm] |         | Dispersione [nm] |         | Forma      |       |
|----------------|---------|------------------|---------|------------|-------|
| Media          | 114,49  | Varianza         | 307,03  | Asimmetria | -0,38 |
| Moda           | 123,814 | Dev.St.          | 17,52   | Curtosi    | 0,83  |
| Mediana        | 114,3   | Range            | 100-155 | Numero NP  | 326   |

Tabella 5-4 - Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C13

La distribuzione sembra ben approssimabile con una Normale.

## 5.4 Immagini C11

**ID :** C11

**Metodo:** termo decomposizione da NP già formate

**Solubilità :** Esano

**Solvente:** difenil etere

**Ricoprimento:**Acido Oleico

**Considerazioni sulle Immagini TEM:** si sono analizzate un'immagine a 15kx ingrandimenti e 10 a 67kx (Figura 5-18, Figura 5-19).

**Metodi di Caratterizzazione:** Vista la grande uniformità di forma e ridotto range di variabilità dei diametri, si è optato per la caratterizzazione con Pebbles in modalità automatica di tutte le immagini. Si è inoltre testato anche ImageJ/Fiji con metodo di segmentazione Otsu su immagine di Figura 5-19 per comparare i risultati. A tal proposito si vedano le tabelle e i grafici di distribuzione (Tabella 5-6, Figura 5-23). Si nota una forma e dimensione delle NP molto regolare.

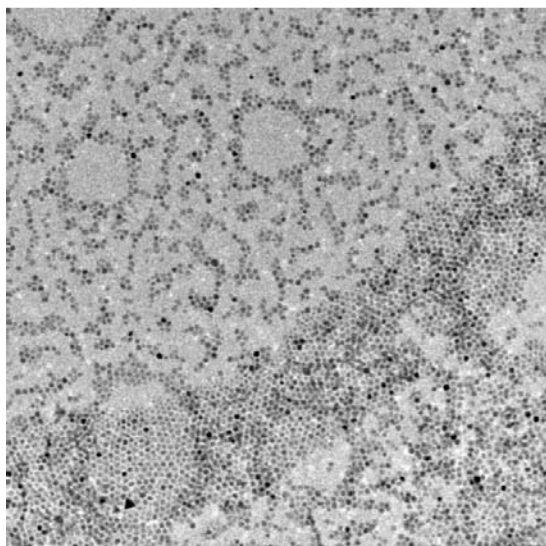


Figura 5-18 - Immagine 002 a 15K ingrandimenti NP C11

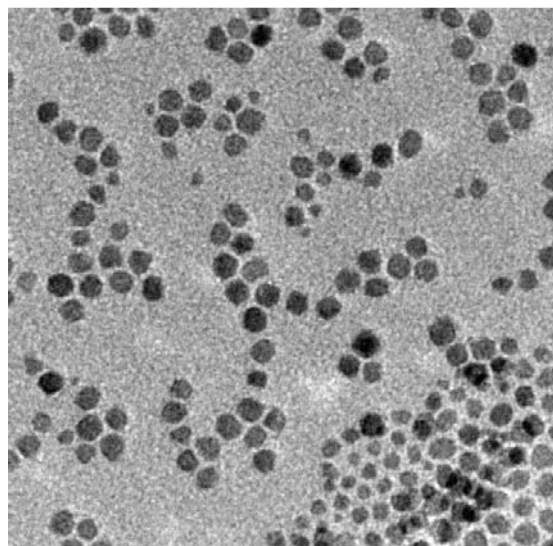


Figura 5-19 - Immagine a 67K ingrandimenti NP C11

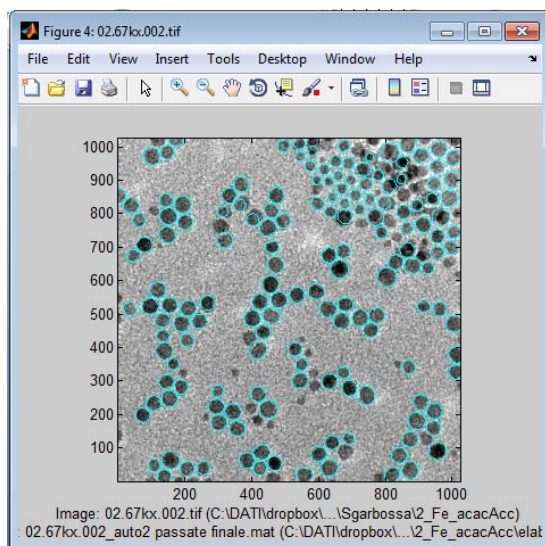


Figura 5-20- metodo automatico Pebbles di immagine Figura 5-19 (pebbles ribalta l'immagine)

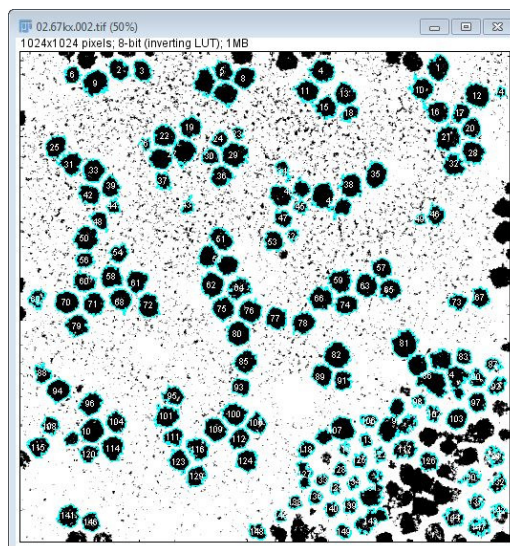
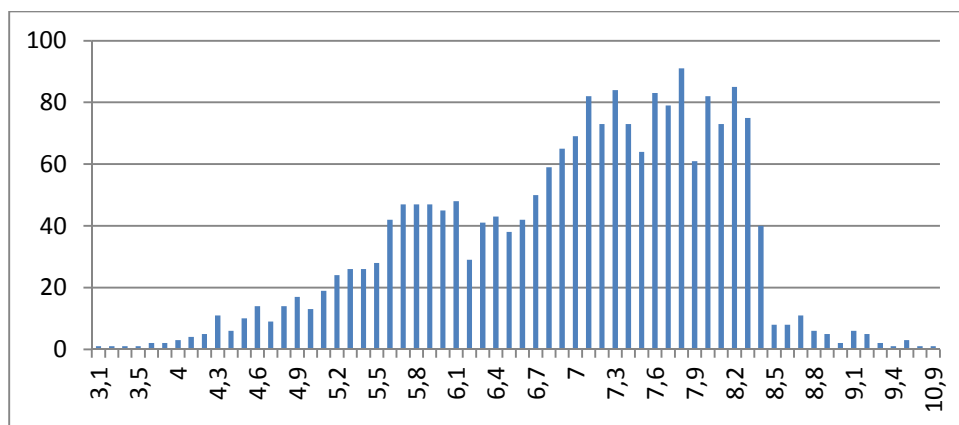


Figura 5-21 – segmentazione con ImageJ/Fiji metodo Otsu di immagine Figura 5-19

**Forma:** la forma è sferica e molto regolare, sono presenti delle NP particolarmente scure che indicano cioè maggiore densità. Pebbles come ImageJ mettono a disposizione campi per indagare anche sul valore medio di grigio della particella, che può essere utile qualora si voglia per esempio capire quante siano le NP con un valore di grigio più scuro di un livello scelto.



**Figura 5-22-** Grafico della distribuzione delle NP C11- metodo pebbles su tutte le immagini

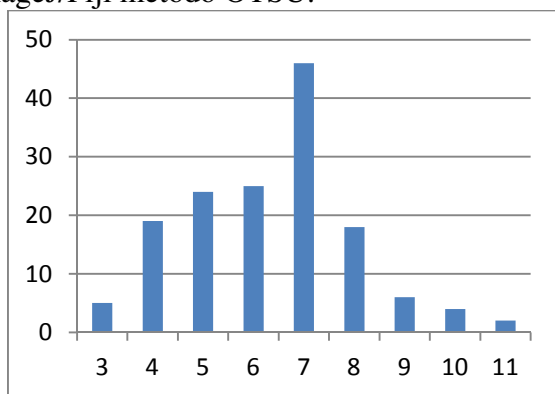
**Risultati Dimensioni NP:** In Tabella 5-5 seguito gli indicatori della distribuzione ricavati dalla caratterizzazione con Pebbles su tutte le immagini disponibili per un totale di 2053 NP.

| Posizione [nm] |      | Dispersione [nm] |         | Forma             |          |
|----------------|------|------------------|---------|-------------------|----------|
| <b>Media</b>   | 6,96 | <b>Varianza</b>  | 1,18    | <b>Asimmetria</b> | -0,53116 |
| <b>Moda</b>    | 7,80 | <b>Dev.St.</b>   | 1,09    | <b>Curtosi</b>    | -0,17369 |
| <b>Mediana</b> | 7,14 | <b>Range</b>     | 3,1-9,8 | Numero Np         | 2053     |

**Tabella 5-5 -** Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C11- metodo Pebbles

La distribuzione ha una media a 6,96 nm con moda e mediana spostata su valori più alti (7,8nm) il range di variazione e' tra 3 nm e 11nm. Le NP con diametro vicino a 3nm fanno ancora pensare a rumore o micelle.

Di seguito le informazioni della caratterizzazione effettuata sulla Figura 5-19 con ImageJ/Fiji metodo OTSU.



**Figura 5-23 -** Grafico della distribuzione delle NP C11- metodo ImageJ/Fiji con OTSU

| Posizione[nm]  |      | Dispersione[nm] |      | Forma             |        |
|----------------|------|-----------------|------|-------------------|--------|
| <b>Media</b>   | 6,35 | <b>Varianza</b> | 2,67 | <b>Asimmetria</b> | 0,23   |
| <b>Moda</b>    | 7,5  | <b>Dev.St.</b>  | 1,67 | <b>Curtosi</b>    | -0,001 |
| <b>Mediana</b> | 6,5  | <b>Range</b>    | 3-11 |                   |        |

**Tabella 5-6** Tabella della distribuzione delle NP C11- metodo ImageJ/Fiji con OTSU

**Risultati Dimensioni NP:** Si noti anche in questo caso come la stima dei diametri di Pebbles risulti essere superiore a quella di Otsu, soprattutto per la percentuale di NP con dimensione prossima a 8nm.

## 5.5 Immagini C12

**ID :** C12

**Metodo:** termodecomposizione

**Solubilità :** Esano

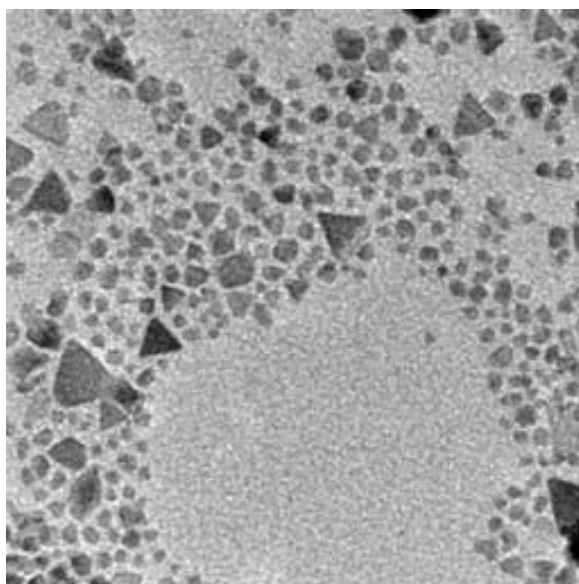
**Solvente:** difenil etere

**Ricoprimento:**acido oleico

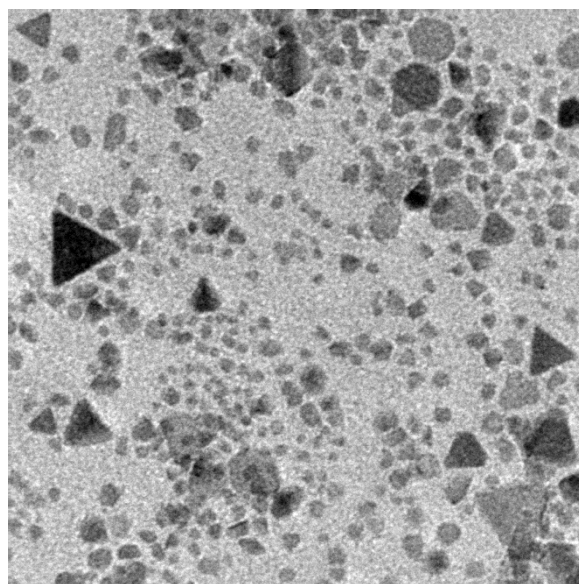
**Metodi di Caratterizzazione :** Pebbles

**Immagini analizzate:** 12 immagini a 67k ingrandimenti e 2 immagini a 15k.

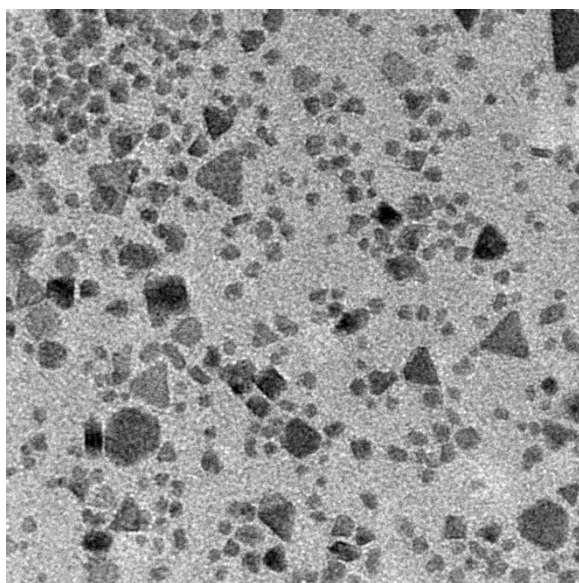
Tra le particolarità di queste NP si noti nelle immagini (Figura 5-24, Figura 5-25) a 67k ingrandimenti la presenza di triangoli e di esagoni oltre che spazi vuoti circolari con molta probabilità dovuti alla presenza di residui di acido oleico.



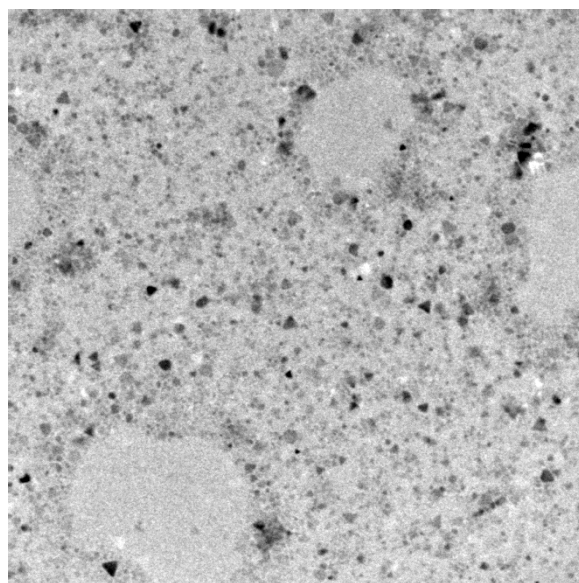
**Figura 5-24-** 67K ingrandimenti NP C12 – si noti la presenza di Np di forma triangolare.



**Figura 5-25** 67K ingrandimenti NP C12 – si noti la presenza di Np di forma triangolare.



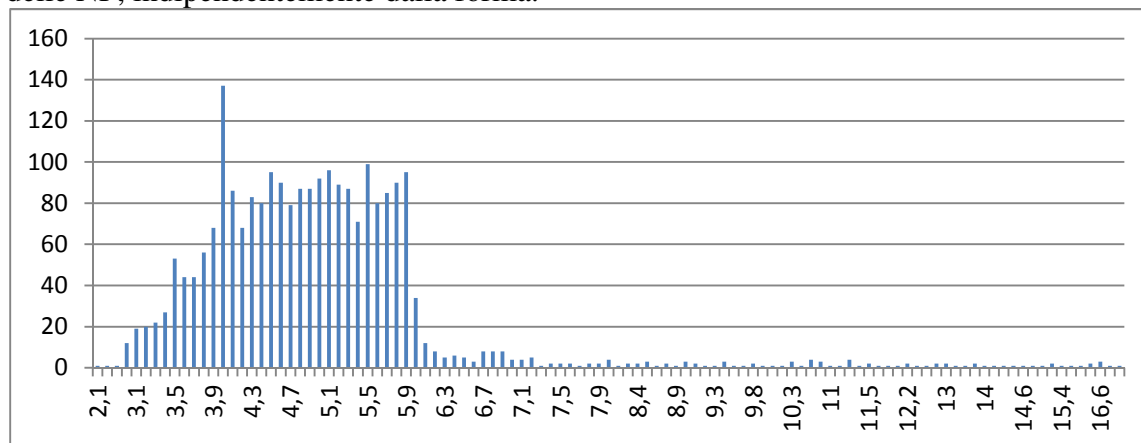
**Figura 5-26** 67K ingrandimenti NP C12



**Figura 5-27** 15K ingrandimenti NP C12

**Risultati Dimensioni NP** :Tutta l’elaborazione è stata effettuata con Pebbles, sia in modalità automatica sia manuale. Con Pebbles e’ stato anche possibile confermare (verificando l’alto valore di Fit) che le NP Triangolari ed esagonali fossero dei prismi con facce piane.

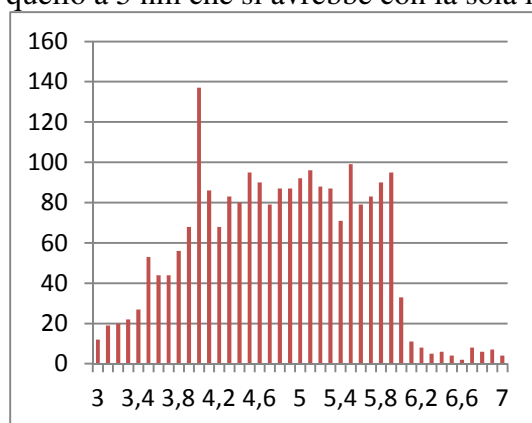
In Figura 5-28 viene riportato il grafico della distribuzione delle dimensioni stimate delle NP, indipendentemente dalla forma.



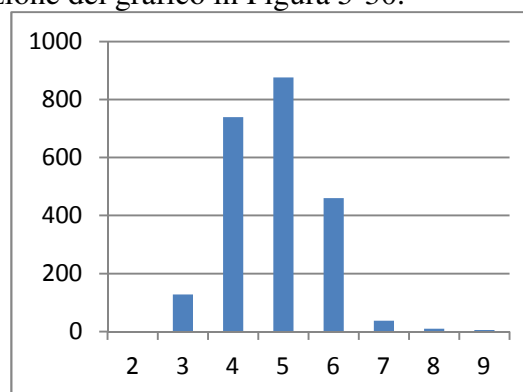
**Figura 5-28-** Grafico della distribuzione delle NP C12, precisione al decimo

Si noti che le dimensioni delle NP più frequenti sono comprese nel range 3-6,3nm che, come si vedrà, sono soprattutto NP di forma sferica, mentre le NP di dimensioni superiori hanno prevalentemente forma triangolare ed esagonale.

A questo punto si è provato a prendere in considerazione la distribuzione delle NP, selezionando solamente quelle sferiche (ossia privando la distribuzione delle NP triangolari ed esagonali). Il risultato e’ riportato nel grafico di Figura 5-29 e si noti come quest’ultimo sia sovrapponibile a quello di Figura 5-28 per dimensioni inferiori a 5,9 nm. Questo fa capire che, tutte le particelle triangolari ed esagonali sono in prevalenza di misura superiore e al di fuori della distribuzione delle NP sferiche ( vedi dettaglio in seguito). Riportiamo anche lo stesso grafico in Figura 5-30 con arrotondamento al nm, che sconsigliamo perché non permette, oltre che la precisione auspicabile, poter analizzare, come in questo caso, un picco significativo per la moda a 4,0 nm al posto di quello a 5 nm che si avrebbe con la sola ispezione del grafico in Figura 5-30.



**Figura 5-29-** Grafico della distribuzione delle sole NP sferiche, ossia togliendo Triangoli ed esagoni con precisione al decimo di nm



**Figura 5-30 -** Grafico della distribuzione delle sole NP sferiche, ossia togliendo Triangoli ed esagoni con precisione al nm

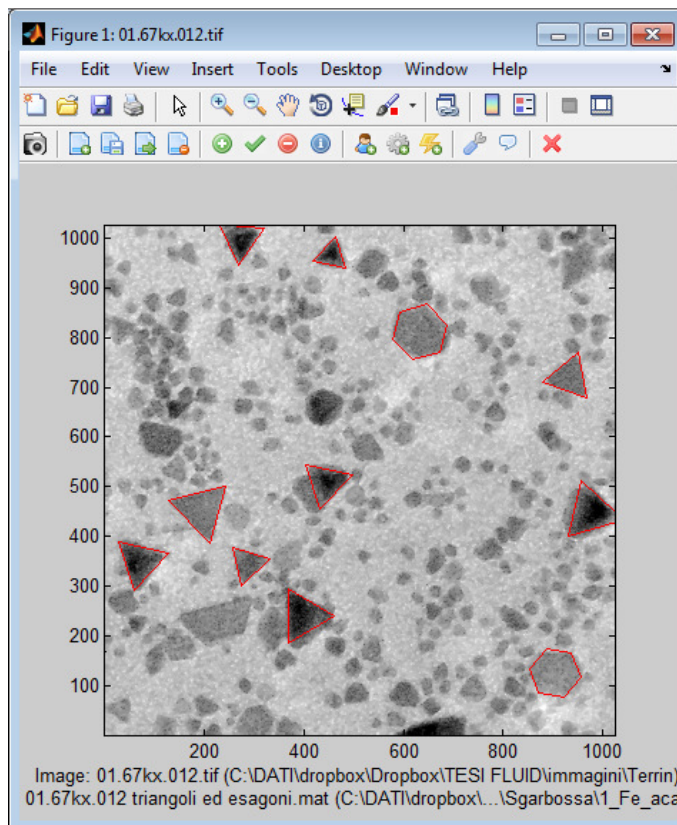
### Risultati Dimensioni NP:

Di seguito tabella riassuntiva di tutte le NP. Come e' possibile vedere si ha un valore di media a 5,05 nm pur avendo una moda come visto in precedenza a 4 nm. I parametri di curtosi e asimmetria ci fanno capire immediatamente quanto la distribuzione sia asimmetrica e sbilanciata per la coda di valori che si protraggono fino a 16,8nm che si e' visto essere quelli dei triangoli e degli esagoni

| Posizione[nm] |      | Dispersione[nm] |          | Forma      |       |
|---------------|------|-----------------|----------|------------|-------|
| Media         | 5,05 | Varianza        | 2,54     | Asimmetria | 3,67  |
| Moda          | 4    | Dev.St.         | 1,60     | Curtosi    | 19,29 |
| Mediana       | 4,9  | Range           | 2,5-16,8 | Numero NP  | 963   |

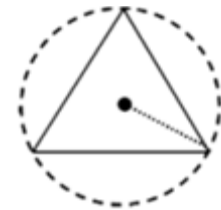
**Tabella 5-7** - Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C12

Vista la presenza di forme distinguibili (triangoli equilateri ed Esagoni) è stata fatta un'ulteriore verifica in tal senso caratterizzando le distribuzioni per questo tipo di NP. Pebbles tra i vari metodi analizzati è il più idoneo per effettuare il riconoscimento delle forme che in questo caso sono molto regolari, ossia triangolari ed esagoni. Si riporta in Figura 5-31 la sessione di Pebbles con i profili tracciati e riconosciuti.

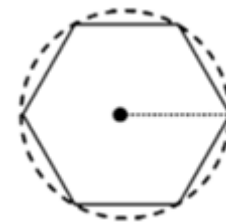


**Figura 5-31** – Caratterizzazione di esagoni e Triangoli con Pebbles

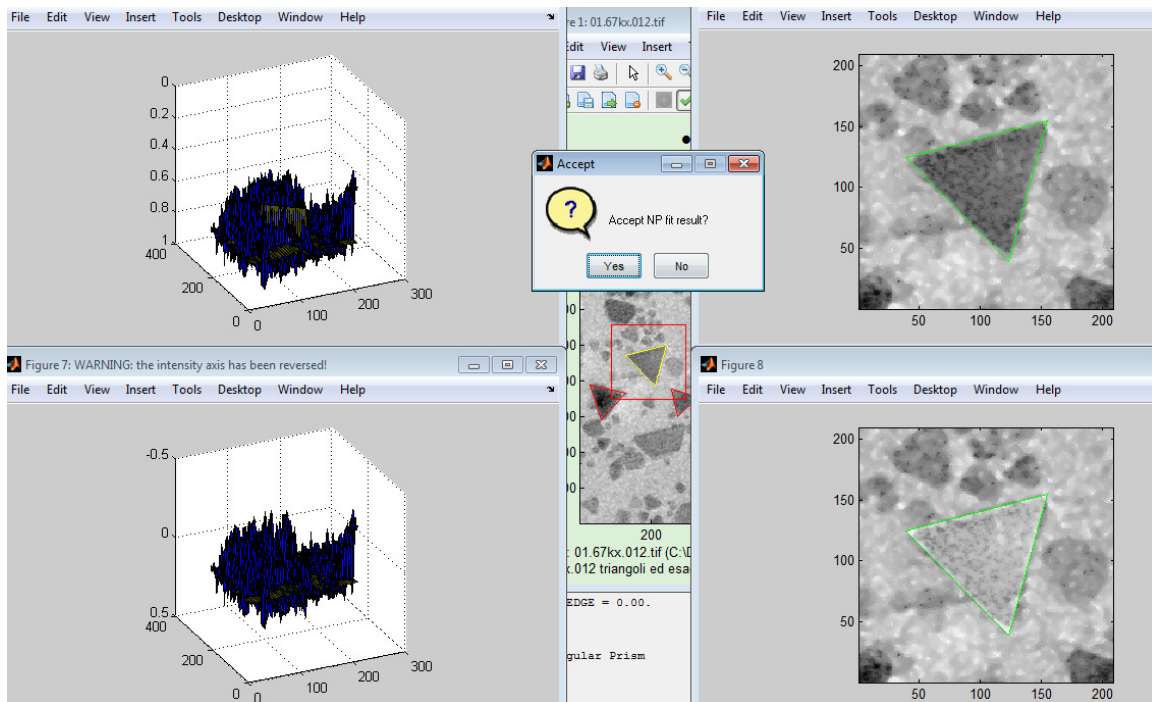
Un' ulteriore questione da chiarire era se le NP, nella fattispecie quelle a base triangolare, fossero dei tetraedri o dei prismi. La conferma ancora una volta viene dall'interfaccia di fit di Pebbles che come si vede in Figura 5-34 mostra nei profili 3D un fit con prisma molto basso e non un tetraedro.



**Figura 5-32** – misura di Pebbles in caso di NP a forma di Triangolo



**Figura 5-33**– misura di Pebbles in caso di NP a forma di Esagono



**Figura 5-34-** Fit in Pebbles di particella Triangolare. Si noti come il profilo sia definito con grande precisione e come sia possibile dai profili 3D capire che si tratta di un prisma e non un tetraedro.

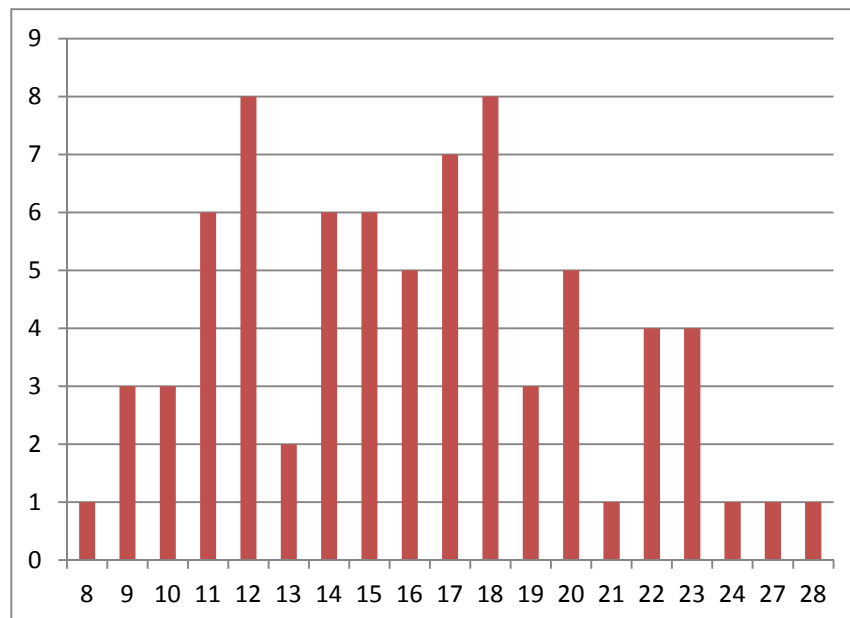
Il metodo che adotta Pebbles per la misura della base delle NP triangolare ed esagonale e' riportata rispettivamente in Figura 5-32 e in Figura 5-33.

In Figura 5-35 viene riportato il grafico della distribuzione delle dimensioni delle sole NP identificate da Pebbles come Triangoli, con relativa Tabella 5-8.

### Triangoli

| Diam. Equiv [nm] | Freq.     |
|------------------|-----------|
| 8                | 1         |
| 9                | 3         |
| 10               | 3         |
| 11               | 6         |
| 12               | 8         |
| 13               | 2         |
| 14               | 6         |
| 15               | 6         |
| 16               | 5         |
| 17               | 7         |
| 18               | 8         |
| 19               | 3         |
| 20               | 5         |
| 21               | 1         |
| 22               | 4         |
| 23               | 4         |
| 24               | 1         |
| 27               | 1         |
| 28               | 1         |
| <b>Tota</b>      | <b>75</b> |

**Tabella 5-8** – tabella frequenze misure NP triangolari



**Figura 5-35** – Grafico della distribuzione delle NP C12 a forma di Triangolo

### Esagoni



| Diam.Equiv.[nm]           | Freq      |
|---------------------------|-----------|
| 6                         | 1         |
| 7                         | 1         |
| 10                        | 1         |
| 11                        | 1         |
| 12                        | 1         |
| 13                        | 1         |
| 14                        | 2         |
| 15                        | 1         |
| 16                        | 1         |
| 17                        | 1         |
| 18                        | 6         |
| <b>Totale complessivo</b> | <b>17</b> |

**Tabella 5-9**– *tabella frequenze misure NP C12 di forma esagonale*

Sono state analizzate anche le NP a forma esagonale e ne viene riportata la Tabella 5-9.

Infine si è analizzato la frequenza delle NP di forma esagonale e triangolare rispetto a quella sferica e si è visto che su 963 NP prese in considerazione solo 75 erano di tipo triangolare e 17 di tipo esagonale.

| 963 | Tot. NP:  |    |
|-----|-----------|----|
| 75  | Triangoli | 8% |
| 17  | esagoni   | 2% |

**Tabella 5-10**- *tabella percentuale a confronto dei tipi di forma*

Di fianco e' riportata la tabella che mostra la percentuale di incidenza di NP di forma triangolare ed esagonale in un campione di 963NP(quello di cui e' stata fatta distinzione di forma). Si noti che i triangoli sono una parte sensibile con 8% delle 963NP mentre gli esagoni sono il 2%. .

## 5.6 Immagini C10/C15

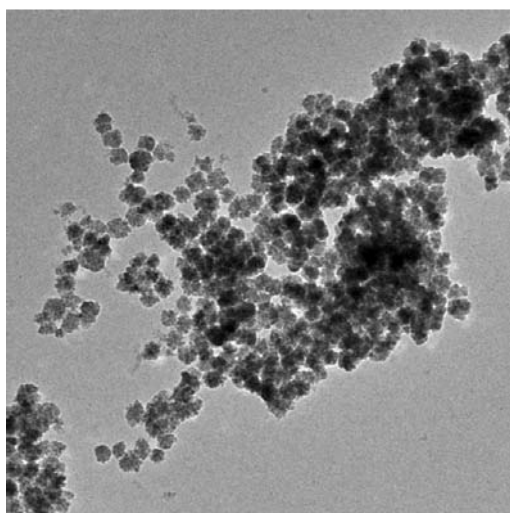
**ID :** C10

**Metodo:** termodecomp.

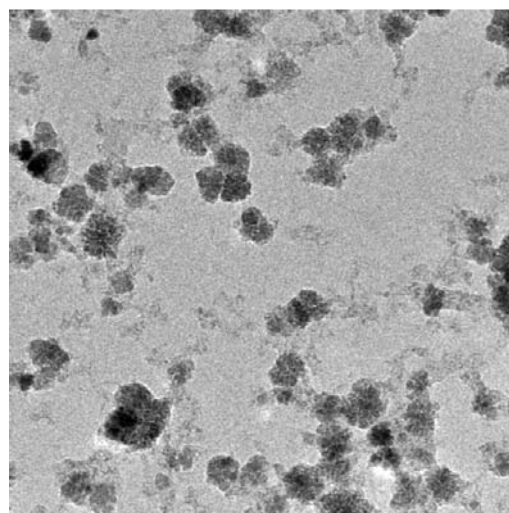
**Solubilità :** Peg/acqua

**Ricoprimento:** 2-pirrolidone

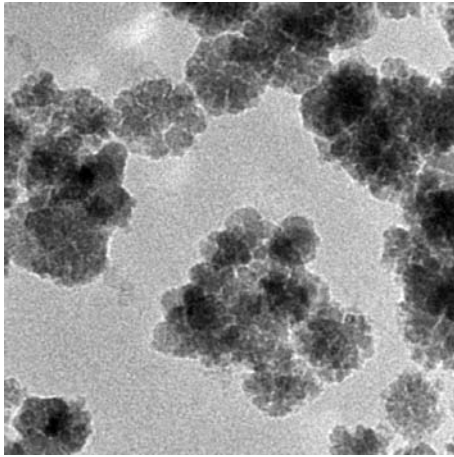
**Immagini analizzate:** 1 Immagine 15kx ingrandimenti, 10 a 30kx, 1 a 67kx, 2 a 110kx.



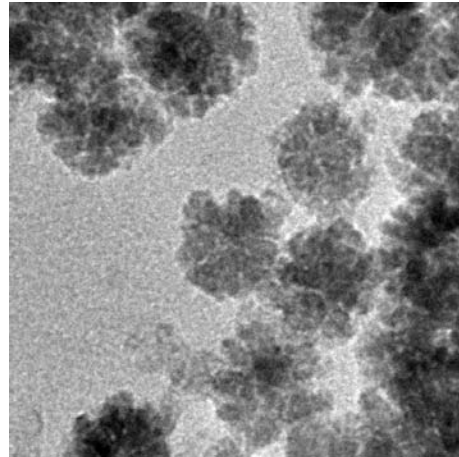
**Figura 5-36** – *15kx ingrandimenti NP C10-C15*



**Figura 5-37**- *30kx ingrandimenti NP C10-C15*



**Figura 5-38-** 67K ingrandimenti NP C10-C15

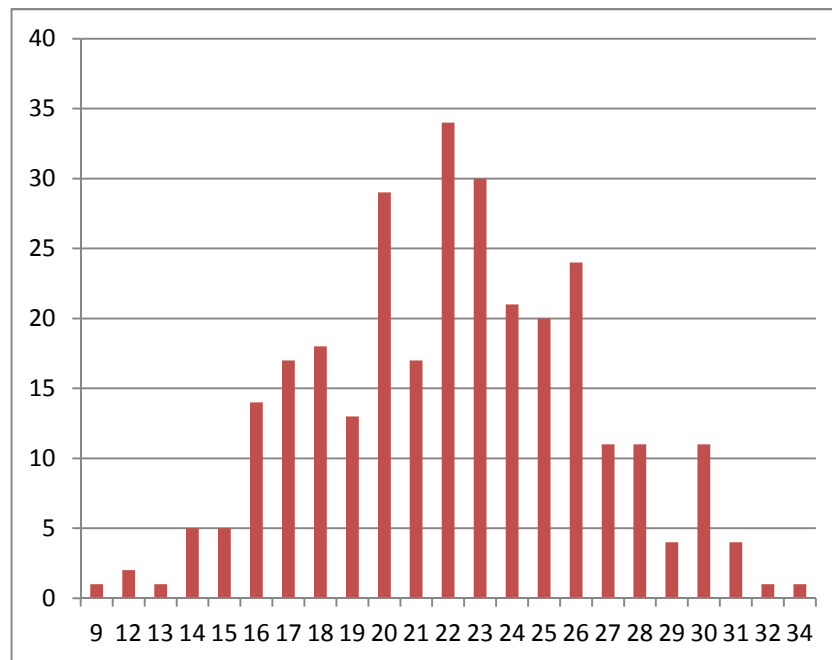


**Figura 5-39-** 110K ingrandimenti NP C10-C15

Si noti come la forma sia molto irregolare a “fiorellino” o “popcorn”. L’immagine di Figura 5-37 evidenzia come il processo di termo-decomposizione abbia portato alcune NP a disgregarsi. Si noti come, ad ingrandimenti superiori, siano evidenti le fessurazioni in particolare per le NP con dimensioni maggiori.

**Metodi di Caratterizzazione** : per la particolarità della struttura molto variegata e per lo stato molto agglomerato, l’unica tecnica utilizzabile per la misura e’ stata quella manuale utilizzando gli strumenti di ImageJ-Fiji.

| Diam. [nm]    | Freq       |
|---------------|------------|
| 9             | 1          |
| 12            | 2          |
| 13            | 1          |
| 14            | 5          |
| 15            | 5          |
| 16            | 14         |
| 17            | 17         |
| 18            | 18         |
| 19            | 13         |
| 20            | 29         |
| 21            | 17         |
| 22            | 34         |
| 23            | 30         |
| 24            | 21         |
| 25            | 20         |
| 26            | 24         |
| 27            | 11         |
| 28            | 11         |
| 29            | 4          |
| 30            | 11         |
| 31            | 4          |
| 32            | 1          |
| 34            | 1          |
| <b>Totale</b> | <b>294</b> |



**Figura 5-40** – grafico della distribuzione delle NP C10-C15

**Tabella 5-11-**  
Tabella frequenze  
diametri NP C10-  
C15

**Risultati Dimensioni NP** : di seguito riportiamo in Tabella 5-12 gli indicatori della distribuzione delle dimensioni delle NP C10/C15

| Posizione[nm]  |        | Dispersione[nm] |       | Forma             |       |
|----------------|--------|-----------------|-------|-------------------|-------|
| <b>Media</b>   | 22,16  | <b>Varianza</b> | 18,17 | <b>Asimmetria</b> | 0,01  |
| <b>Moda</b>    | 22,039 | <b>Dev.St.</b>  | 4,26  | <b>Curtosi</b>    | -0,20 |
| <b>Mediana</b> | 22,2   | <b>Range</b>    | 8-34  | Numero NP         | 294   |

**Tabella 5-12** - Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C10-C15

## 5.7 Immagini C19

**ID** : C19

**Metodo**: termodecomposizione

**Solubilità** : Peg/Acqua

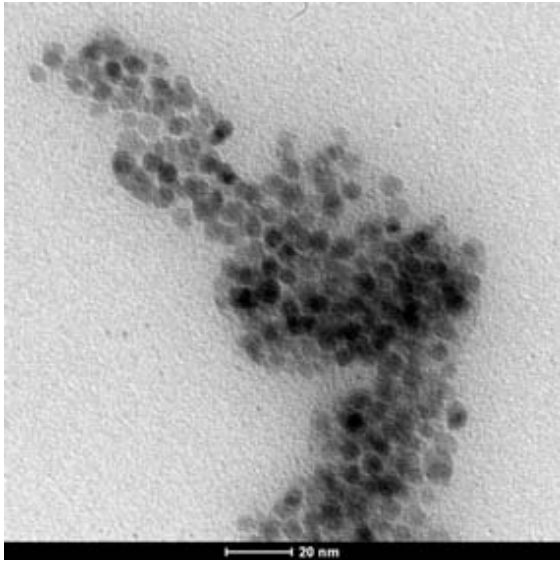
**Solvente**: toluene/DMSO

**Ricoprimento**: acido oleico +DMSA (C11+DMSA)

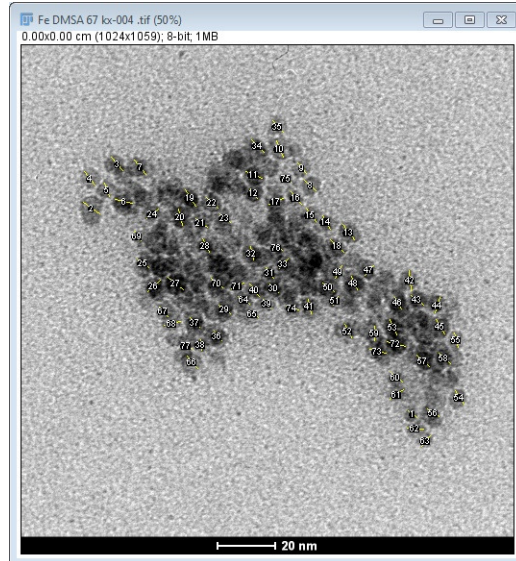
**Metodo di Caratterizzazione** : ImageJ Manuale (esempio in Figura 5-44, Figura 5-48)

**Immagini analizzate**: Sono state prese in considerazione 2 zone, che abbiamo mantenuto separate solo per un controllo incrociato della qualità della misurazione. Zona A con 7 immagini scala 20nm, e una zona B 8 immagini con scala 10 e 20 nm. Le caratterizzazioni sono state fatte su tutte le immagini.

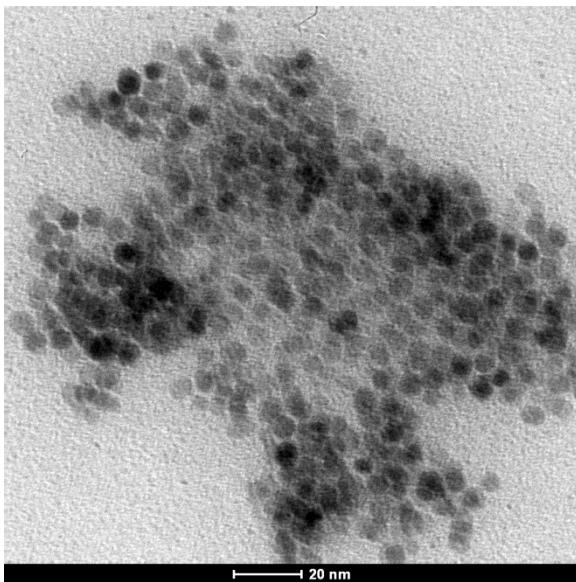
**Copertura**: Su queste immagini era interessante capire lo stato della funzionalizzazione ossia della copertura delle NP. Sarebbe stato utile misurare lo strato di DMSA che era appunto la sostanza che costituiva la copertura . La qualità delle immagini non risulta essere eccellente (presenta alla verifica di qualità con FFT dei difetti di astigmatismo) condizione necessaria per poter individuare core e shell (particella e copertura). E' chiaro comunque guardando la Figura 5-47, per esempio, che la funzionalizzazione non sembra sulla singola NP ma sembra essere su tutto l'agglomerato. Anche dall'immagine di Figura 5-46 sembra esserci un alone attorno a tutto l'agglomerato di NP.



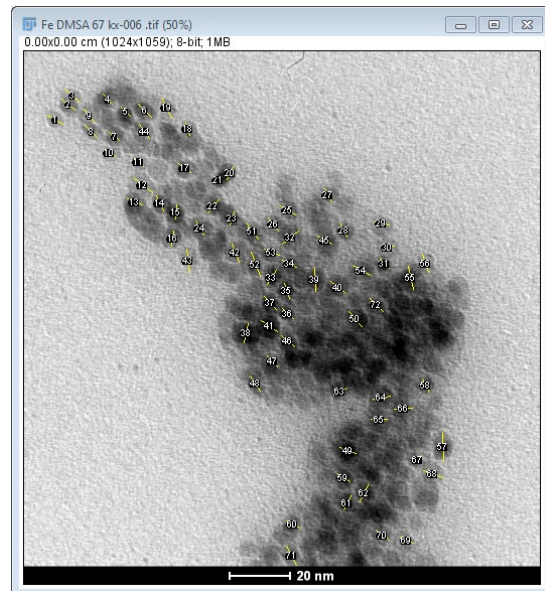
**Figura 5-41** Immagini NP C19 (scala 20nm) – Zona A



**Figura 5-42** - Immagini NP C19 (scala 20nm) con caratterizzazione manuale ImageJ- Zona A



**Figura 5-43-** Immagini NP C19 (scala 20nm) – Zona A



**Figura 5-44-** Immagini NP C19 (scala 20nm) con caratterizzazione manuale ImageJ- Zona A

| Diametro [nm] | Freq |
|---------------|------|
| 2,8           | 1    |
| 3             | 1    |
| 3,4           | 2    |
| 3,5           | 1    |
| 3,6           | 2    |
| 3,7           | 6    |
| 3,8           | 3    |
| 3,9           | 8    |
| 4             | 6    |
| 4,1           | 6    |
| 4,2           | 12   |
| 4,3           | 9    |
| 4,4           | 8    |
| 4,5           | 17   |
| 4,6           | 16   |
| 4,7           | 17   |
| 4,8           | 19   |
| 4,9           | 18   |
| 5             | 21   |
| 5,1           | 20   |
| 5,2           | 23   |
| 5,3           | 24   |
| 5,4           | 16   |
| 5,5           | 22   |
| 5,6           | 25   |
| 5,7           | 24   |
| 5,8           | 18   |
| 5,9           | 23   |

|            |            |
|------------|------------|
| 6          | 23         |
| 6,1        | 14         |
| 6,2        | 20         |
| 6,3        | 15         |
| 6,4        | 8          |
| 6,5        | 14         |
| 6,6        | 11         |
| 6,7        | 10         |
| 6,8        | 7          |
| 6,9        | 6          |
| 7          | 5          |
| 7,1        | 12         |
| 7,2        | 6          |
| 7,3        | 2          |
| 7,4        | 6          |
| 7,5        | 3          |
| 7,6        | 2          |
| 7,8        | 1          |
| 7,9        | 2          |
| 8          | 2          |
| 8,1        | 2          |
| 8,3        | 2          |
| 8,5        | 2          |
| 8,6        | 1          |
| 8,8        | 1          |
| 10         | 1          |
| <b>Tot</b> | <b>546</b> |

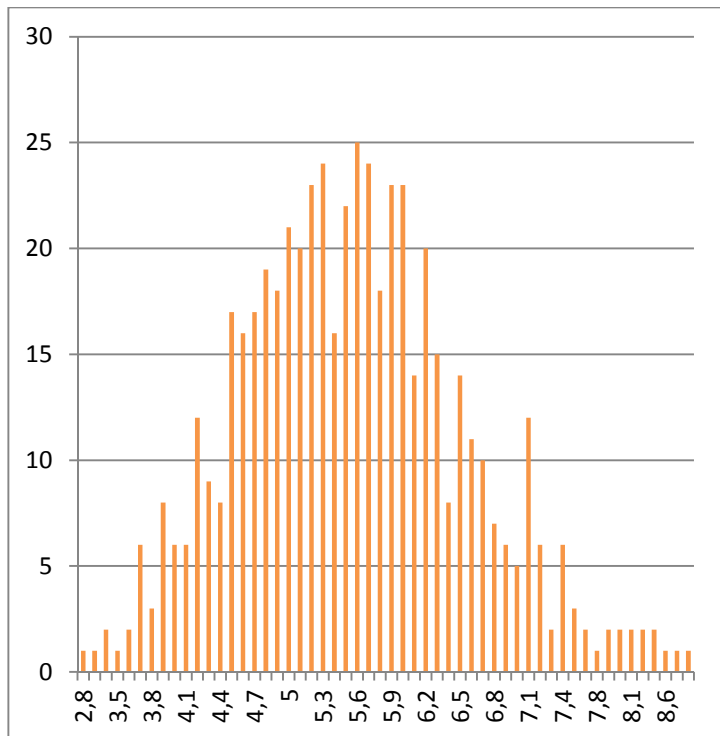


Figura 5-45 – grafico della distribuzione delle NP C19 zona A

**Tabella 5-13**  
- Tabella  
frequenze  
diametri NP C19  
Zona A

| Zona/ Campione A |      |                 |         |            |      |
|------------------|------|-----------------|---------|------------|------|
| Posizione[nm]    |      | Dispersione[nm] |         | Forma      |      |
| Media            | 5,56 | Varianza        | 1,01    | Asimmetria | 0,46 |
| Moda             | 5,6  | Dev.St.         | 1,00    | Curtosi    | 0,67 |
| Mediana          | 5,52 | Range           | 2,8-8,9 | Numero NP  | 546  |

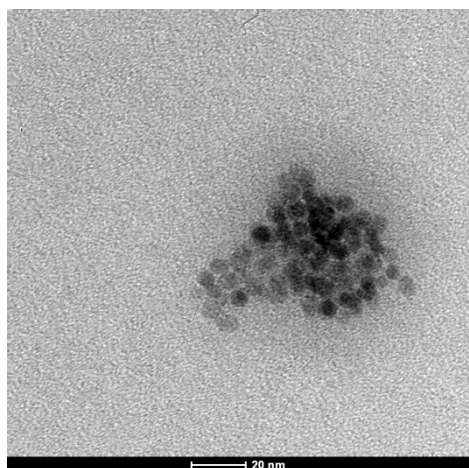
**Tabella 5-14** - Tabella di descrizione della  
distribuzione misure NP C19 Zona A

La distribuzione e' di tipo normale con  
varianza praticamene a valore 1 nm.

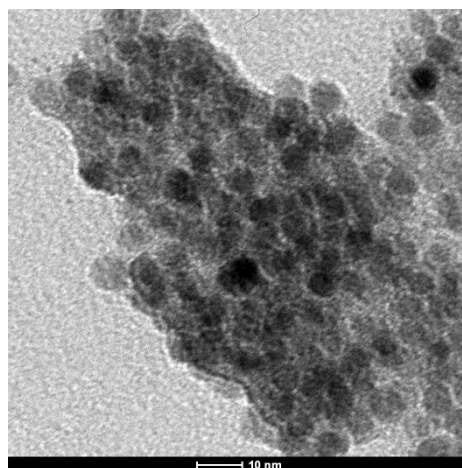
### Risultati Dimensioni NP:

In Tabella 5-13 sono evidenziate le frequenze per singolo valore di diametro. Il relativo grafico è riportato in Figura 5-45. In Tabella 5-14 sono riportati gli indicatori della distribuzione delle misure delle NP C19 per la zona A. La distribuzione con un valore di varianza pari a 1 si avvicina molto ad una normale standard centrata sul valore medio 5,56 e moda a 5,6

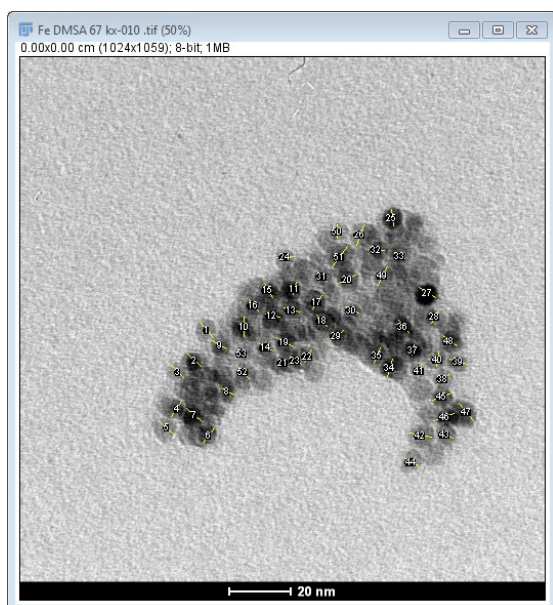
Di seguito le immagini e caratterizzazione per la ZonaB



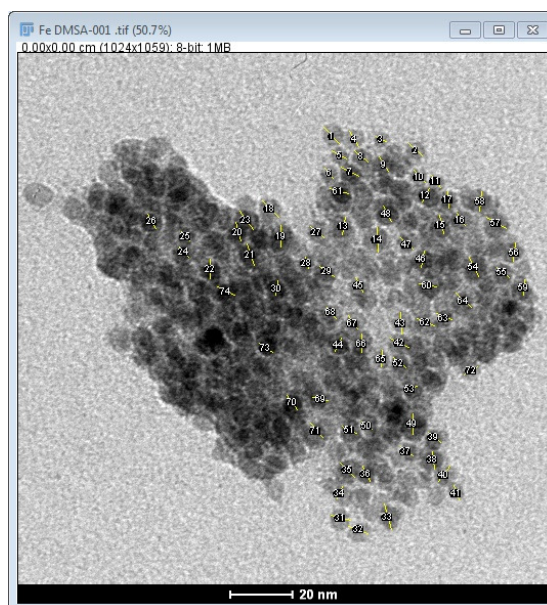
**Figura 5-46** Immagini NP C19 (scala 20nm) – Zona B



**Figura 5-47** Immagini NP C19 (scala 10nm) – Zona B



**Figura 5-48** Immagini NP C19 (scala 20nm) –con caratterizzazione manuale ImageJ- Zona B



**Figura 5-49** Immagini NP C19 (scala 20nm) –con caratterizzazione manuale ImageJ- Zona B

| Diam | Freq |
|------|------|
| 3,5  | 1    |
| 3,8  | 1    |
| 3,9  | 3    |
| 4,1  | 4    |
| 4,2  | 4    |
| 4,3  | 4    |
| 4,4  | 1    |
| 4,5  | 6    |
| 4,6  | 3    |
| 4,7  | 5    |
| 4,8  | 8    |
| 4,9  | 6    |
| 5    | 15   |
| 5,1  | 5    |
| 5,2  | 9    |
| 5,3  | 11   |
| 5,4  | 9    |
| 5,5  | 10   |
| 5,6  | 11   |
| 5,7  | 8    |
| 5,8  | 9    |
| 5,9  | 5    |
| 6    | 4    |
| 6,1  | 9    |
| 6,2  | 10   |
| 6,3  | 9    |

|            |            |
|------------|------------|
| 6,4        | 8          |
| 6,5        | 6          |
| 6,6        | 7          |
| 6,7        | 4          |
| 6,8        | 2          |
| 6,9        | 3          |
| 7          | 6          |
| 7,1        | 5          |
| 7,2        | 2          |
| 7,3        | 1          |
| 7,4        | 1          |
| 7,5        | 2          |
| 7,6        | 4          |
| 7,8        | 1          |
| 7,9        | 2          |
| 8          | 2          |
| 8,1        | 1          |
| 8,2        | 1          |
| 8,6        | 1          |
| 8,8        | 1          |
| <b>Tot</b> | <b>230</b> |

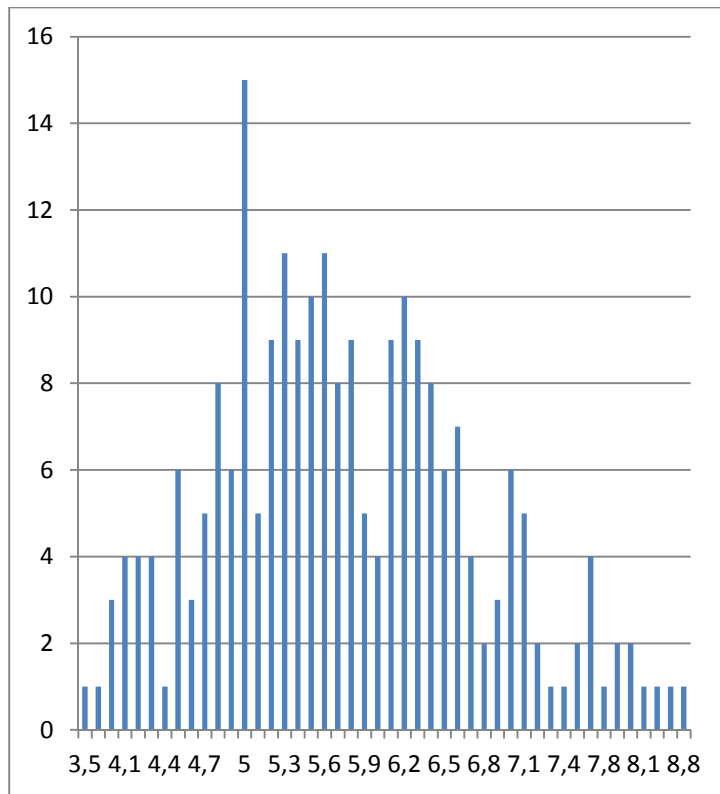


Figura 5-50 - distribuzione delle NP C19 zona B

**Tabella 5-15-**  
Tabella  
frequenze  
diametri NP  
C19 Zona B

Zona B

| Posizione[nm]  | Dispersione[nm] | Forma           |      |                   |       |
|----------------|-----------------|-----------------|------|-------------------|-------|
| <b>Media</b>   | 5,76            | <b>Varianza</b> | 0,99 | <b>Asimmetria</b> | 0,40  |
| <b>Moda</b>    | 5,0             | <b>Dev.St.</b>  | 1,00 | <b>Curtosi</b>    | -0,04 |
| <b>Mediana</b> | 5,63            | <b>Range</b>    | 5,27 | <b>Numero NP</b>  | 230   |

La zona A e B sono molto simili come distribuzione c'è solamente il valore di moda a 5nm della zona B che spicca.

**Tabella 5-16** Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C19 Zona B

**Risultati Dimensioni NP:** In Tabella 5-14 sono riportati gli indicatori della distribuzione delle misure delle NP C19 per la zona B. Anche per questa zona la distribuzione ha un valore di varianza prossimo a 1 e si avvicina molto ad una normale standard centrata sul valore medio 5,76 e moda a 5,0.

## 5.8 Immagini C17

**ID :** C17

**Metodo:** termo-decomposizione

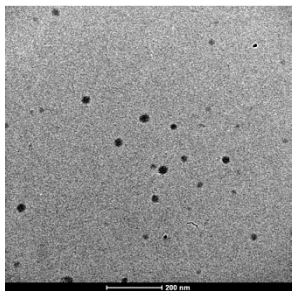
**Solubilità :** Peg/acqua

**Solvente:** toluene/DMSO

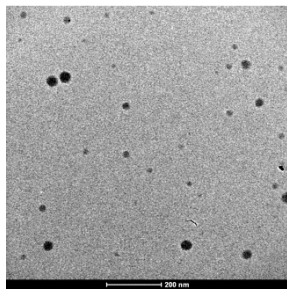
**Ricoprimento:** acido oleico + DMSA (C11 + DMSA in eccesso)

**Immagini analizzate :** Sono state caratterizzate 8 immagini a 200nm zona A , ci sono poi 13 immagini TEM della zona B con scala 20,50nm.

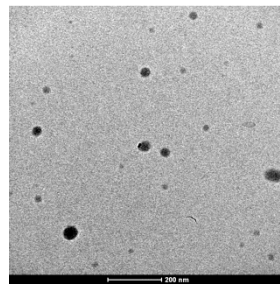
**Caratterizzazione:** Gli oggetti a forma di goccia presenti nelle zona A delle immagini TEM erano molto grandi e dispersi. Occorrerebbe un approfondimento per capirne esattamente la composizione ma e' molto probabile che si tratti di sostanze residue della produzione (es. DMSO che e' alto bollente e difficilmente viene rimosso nell'evaporazione che precede la preparazione del campione per il TEM). Le immagini TEM, anche ad ispezione FFT, apparivano buone con assenza di astigmatismo, per la zona A, visto il basso ingrandimento (scala 200nm) però, era complesso capire se fosser presenti NP. (nella zona B la situazione era migliore). Come metodo di caratterizzazione dei 166 oggetti misurati è stata scelto ImageJ/fiji manuale che ci permetteva durante la misura di osservare particella per particella per comprenderne peculiarità e caratteristiche della copertura laddove possibile.



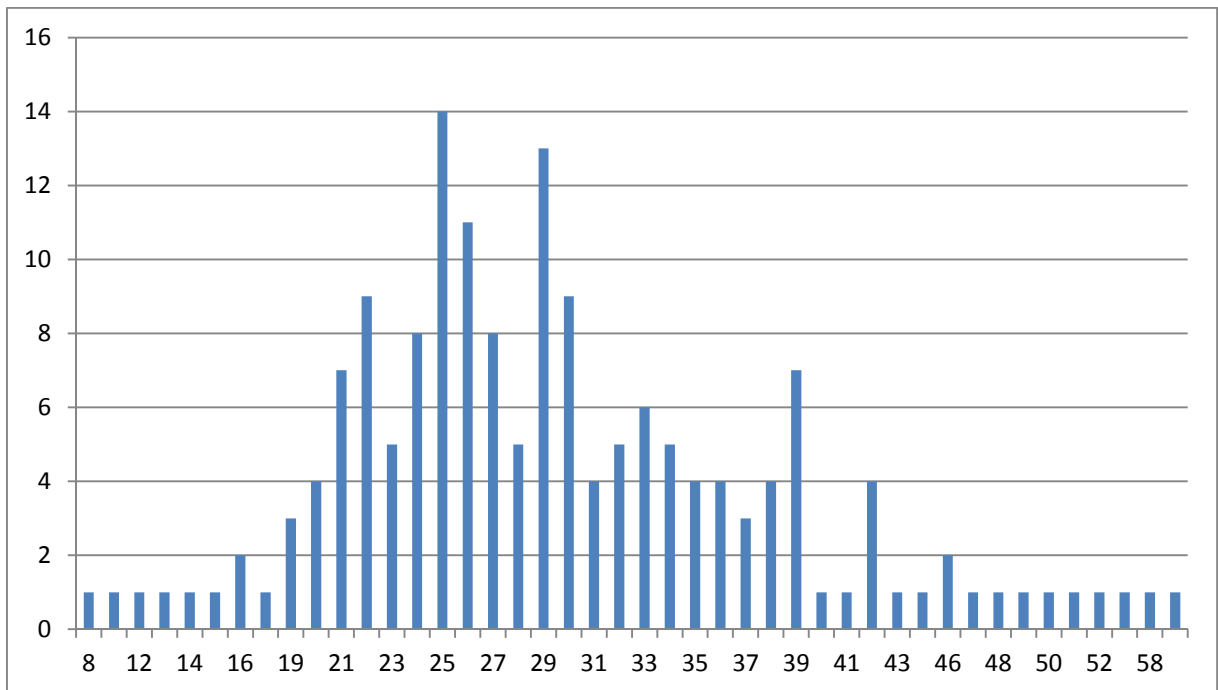
**Figura 5-51-** Immagini NP C17 (scala 200nm)



**Figura 5-52 -** Immagini NP C17 (scala 200nm)



**Figura 5-53 -** Immagini NP C17 (scala 200nm)



**Figura 5-54 –** grafico della distribuzione delle NP C17 zona A

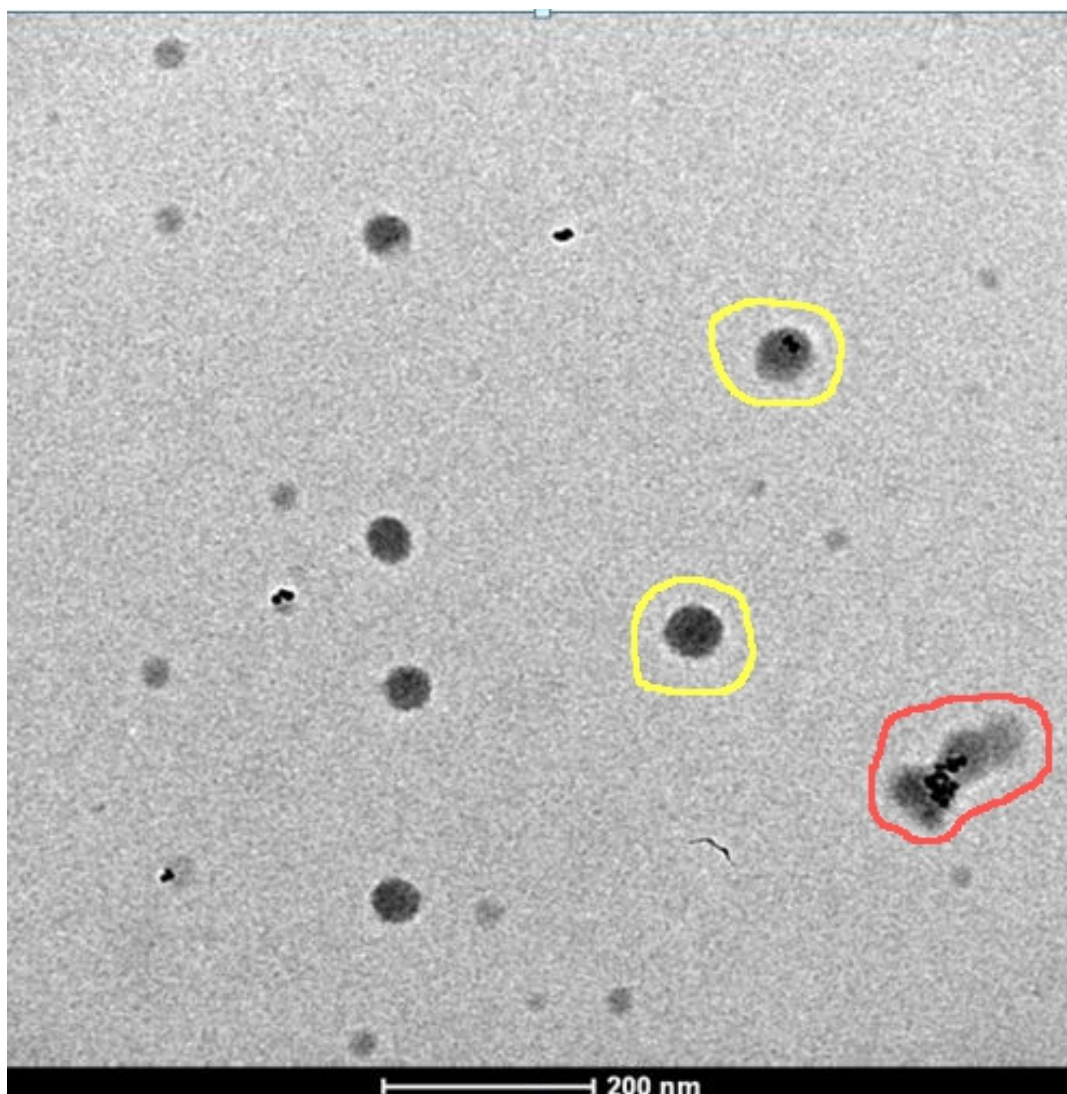
| Posizione[nm] |       | Dispersione[nm] |       | Forma      |      |
|---------------|-------|-----------------|-------|------------|------|
| Media         | 29,67 | Varianza        | 80,26 | Asimmetria | 0,78 |
| Moda          | 25,0  | Dev.St.         | 8,96  | Curtosi    | 1,15 |
| Mediana       | 28,34 | Range           | 8-59  | Numero NP  | 166  |



**Tabella 5-17 - Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C17 Zona A**

**Risultati Dimensioni NP:** In Figura 5-54 e' rappresentato il grafico della distribuzione degli oggetti rilevati nella zona A. Come e' possibile vedere dalla Tabella 5-17 si erano riscontrate delle oggetti con una media a 29,67 nm, la moda e' di 15. Il range completo andava da 8 a 59 nm pero' si noti che le oggetti sotto 19nm e superiori a 39 siano poche , pertanto il range si esaurisce in una 30ina di nm

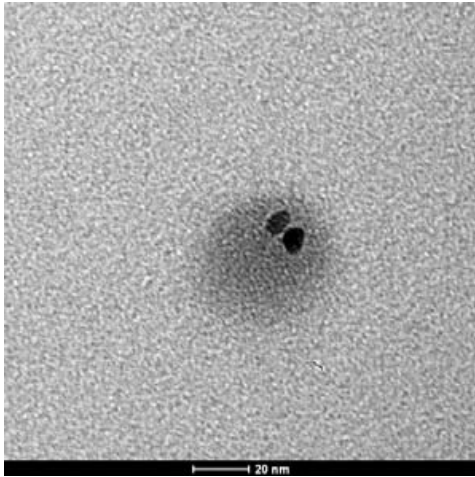
La dimensione riscontrata potrebbe essere in linea con il fatto che alle NP ( in questo caso C11) sono presenti altri oggetti di varia natura. Nella Zona B la situazione era migliore per alcune NP individuate (Figura 5-55)



**Figura 5-55 Immagini NP C19 (scala 200nm) –con caratterizzazione manuale ImageJ- Zona B**

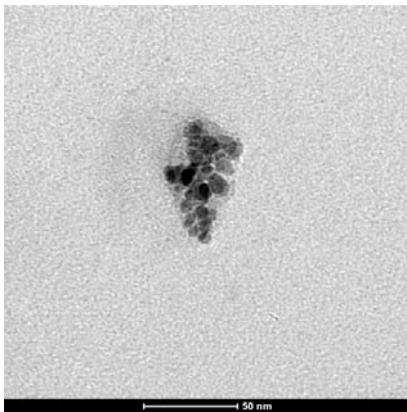
In Figura 5-55 si possono notare alcune particelle scure di diametro 8 nm con attorno una sostanza non identificabile con certezza di 48 nm (evidenziate in giallo) . E' presente inoltre un agglomerato in cui la copertura supera 130nm con all'interno una quindicina di NP molto scure di diametro 7-8nm (evidenziato in rosso)

Nell'ispezionare le NP nella zona B, sono stati utilizzati ingrandimenti su NP a valori 20,50 nm che permettono di verificare sia le misure del core della NP che la copertura.



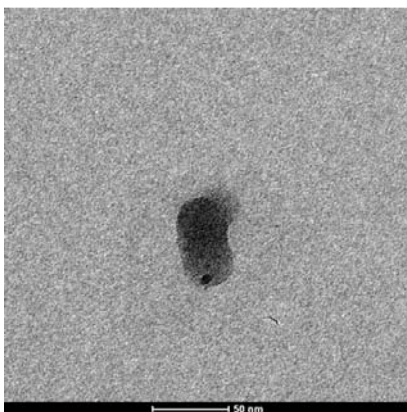
**Figura 5-56** Particolare NP C17 e sostanza che le ingloba (scala 20nm) Zona B

In questa immagine si possono vedere due NP di 9nm con attorno una sostanza presumibilmente DMSO, molto circolare, diametro non facilmente definibile ma vicino a 40 nm. Come già accennato in precedenza, laddove ci siano oggetti molto densi (NP) in contrapposizione con sostanze come il DMSO il TEM tende a effettuare una compensazione automatica delle luminosità favorendo l'osservazione delle particelle più scure, vanificando però l'effetto contrasto di quelle più chiare che risultano molto evanescenti e difficili da caratterizzare.



**Figura 5-57** Agglomerato NP C17 e sostanza che le ingloba (scala 50nm) Zona B

In questa immagine è evidente un agglomerato con una sostanza che lo ingloba di 70nmX37nm con all'interno almeno una ventina di NP di diametro 5-8nm



**Figura 5-58** Particolare NP C17 e ricoprimento sostanza che la ingloba (scala 50nm) Zona B

In questa immagine una sola NP di diametro 7nm inglobata in una sostanza di dimensioni 60nmX30nm a forma oblunga.

## 5.9 Immagini C16

**ID :** C16

**Metodo:** termo decomposizione con  $Mn(acac)_2$

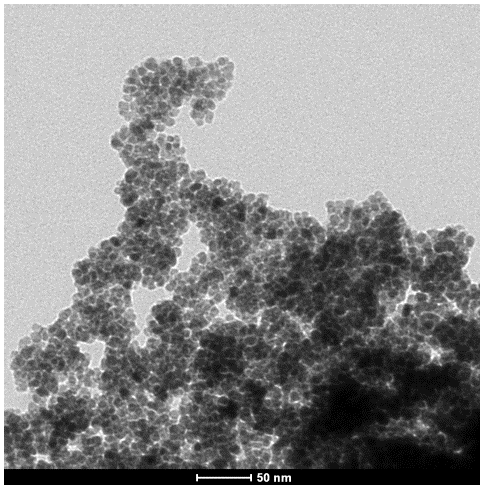
**Solubilità :** Esano

**Solvente:** difenil etere

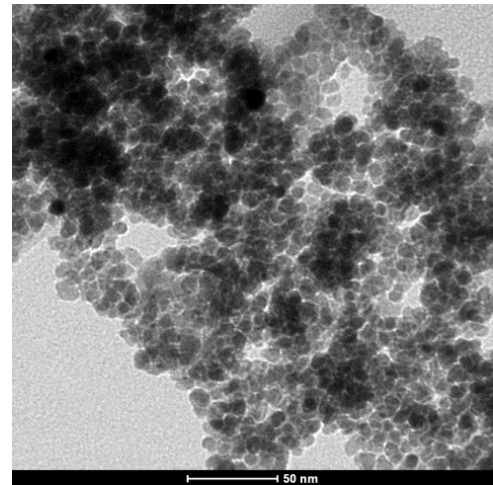
**Ricoprimento:** acido oleico

**Immagini analizzate :** Sono state analizzate 7 immagini con barra di riferimento a 200 nm, 1 immagine a 100 nm, e 3 immagini a 50 nm e 2 immagini a 20 nm.

**Metodo di caratterizzazione :** Le immagini a basso ingrandimento (barra di riferimento 200 e 100nm) mettevano in evidenza degli agglomerati molto densi ( Figura 5-61, Figura 5-62). Per la misurazione delle NP si sono utilizzate le immagini con barra di riferimento a 20 e 50 nm visto lo stato particolarmente aggregato delle particelle e la necessità di verificare la funzionalizzazione si e' optato per ImageJ manuale (Figura 5-63, Figura 5-64).

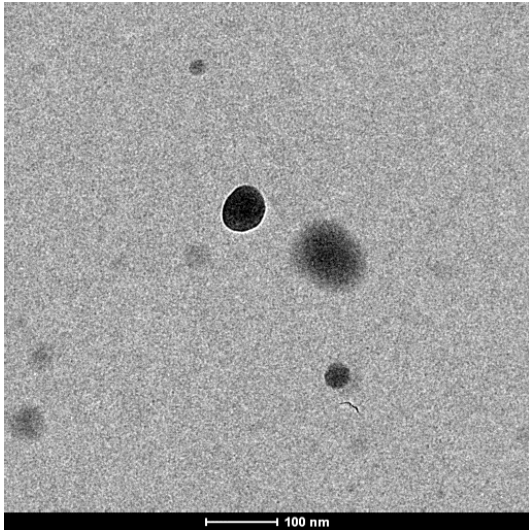


**Figura 5-59 - Immagine NP C16 (scala 50nm)**

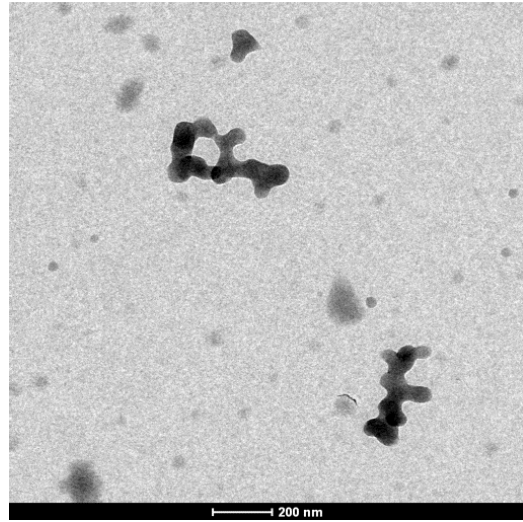


**Figura 5-60 Immagine NP C16 (scala 50nm)**

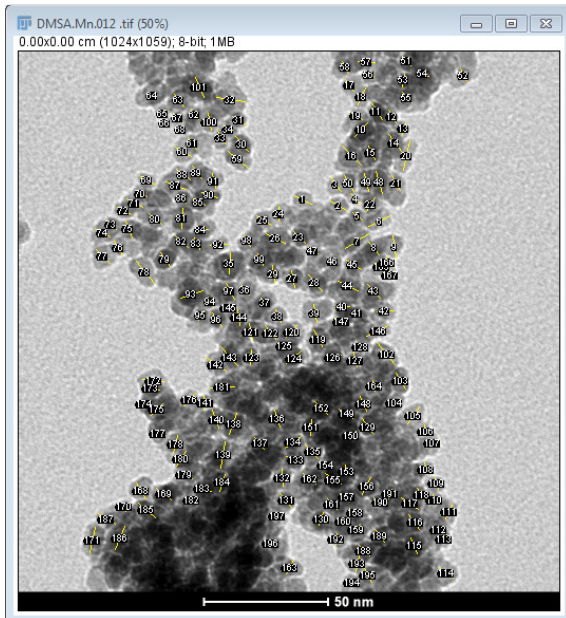
In Figura 5-61 e Figura 5-62 e' evidente che erano presenti degli agglomerati di una sostanza residua con dimensioni anche superiori a 200nm



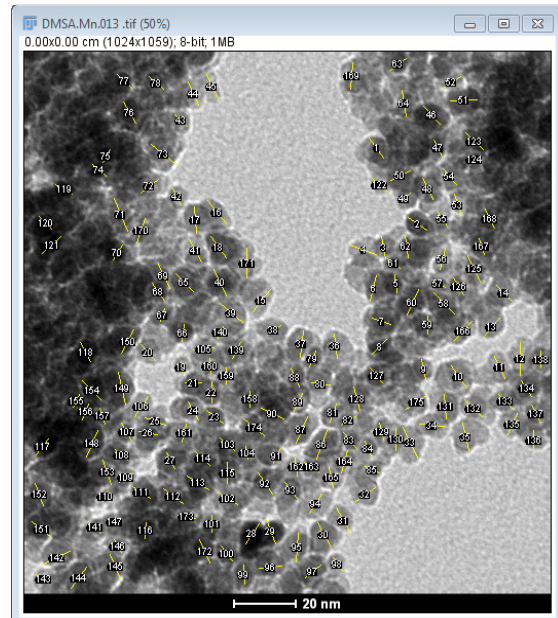
**Figura 5-61- Immagine NP C16 (scala 100nm)**



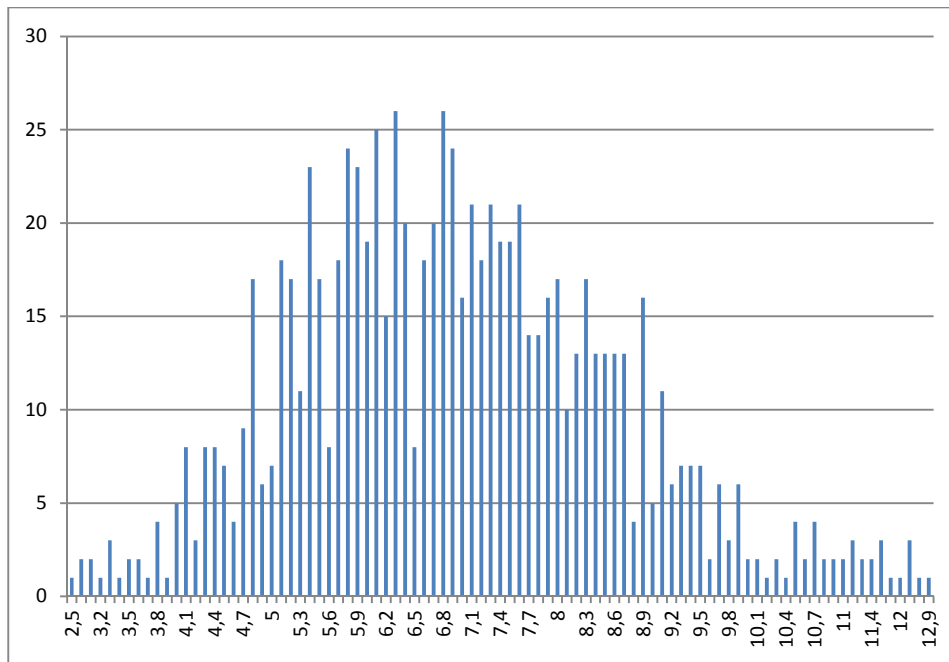
**Figura 5-62 - Immagine NP C16 (scala 200nm)**



**Figura 5-63 Immagine NP C16 (scala 50nm) –con caratterizzazione manuale ImageJ**



**Figura 5-64- Immagine NP C16 (scala 20nm) –con caratterizzazione manuale ImageJ**



**Figura 5-65-** grafico distribuzione delle NP C16

Si noti dalla Tabella 5-18 come la distribuzione sia molto simile a quella trovata per il caso non ricoperto con media e moda molto vicine a circa 6,9nm. Il grafico in Figura 5-65 mostra una distribuzione normale attorno a tale valore con un range che va da 2,5nm a 12,9nm.

**Risultati Dimensioni NP:**

| Posizione [nm] |      | Dispersione[nm] |          | Forma             |      |
|----------------|------|-----------------|----------|-------------------|------|
| <b>Media</b>   | 6,94 | <b>Varianza</b> | 2,92     | <b>Asimmetria</b> | 0,41 |
| <b>Moda</b>    | 6,8  | <b>Dev.St.</b>  | 1,71     | <b>Curtosi</b>    | 0,20 |
| <b>Mediana</b> | 6,83 | <b>Range</b>    | 2,5-12,9 | Numero NP         | 871  |

**Tabella 5-18** Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C16

## 5.10 Immagini C18

**ID :** C18

**Metodo:** termodecomposizione

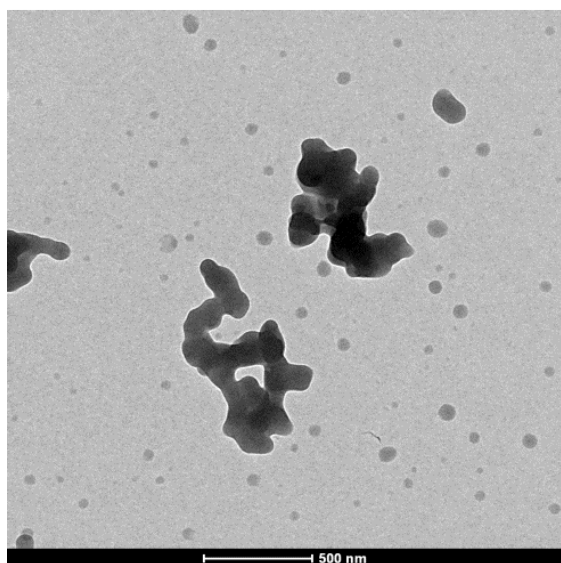
**Solubilità :** Peg/Acqua

**Solvente:** toluene/DMSO

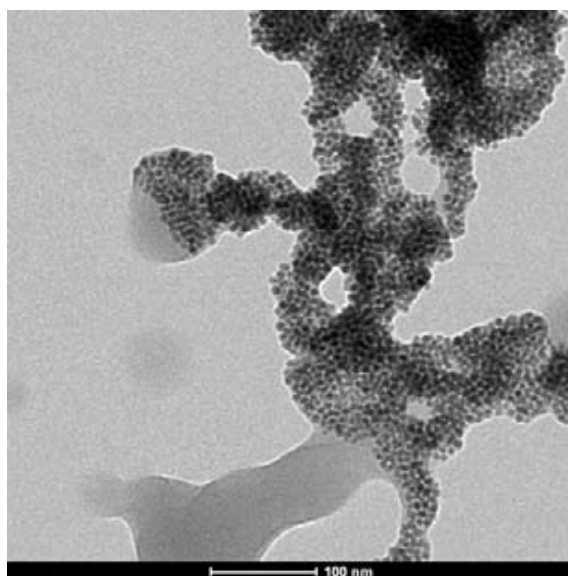
**Ricoprimento:** acido oleico + DMSA + complesso di platino [Pt(dppe)(dmsa)] (C19 + complesso di Pt)

**Immagini analizzate :** Sono state caratterizzate 2 immagini a barra di riferimento a 500nm , 5 a 200nm, 1 a 100nm,5 a 50 nm, 2 a 20 nm.

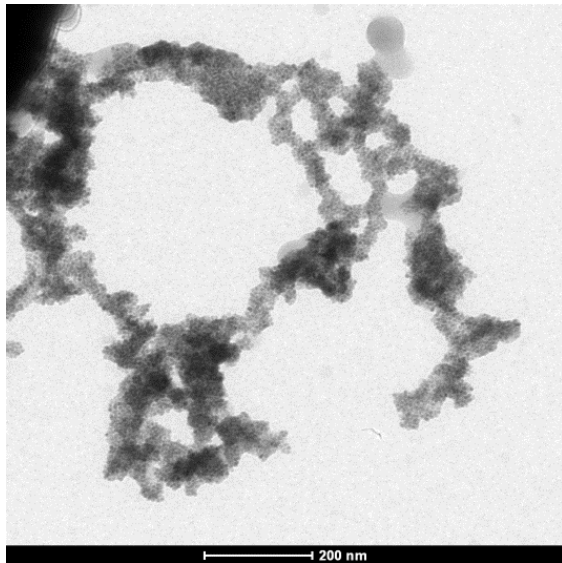
**Caratterizzazione:** Le immagini a basso ingrandimento (scala 500, 200 e 100nm) mettevano in evidenza residui di materiale che potrebbe far pensare a DMSO per morfologia e consistenza. Si veda a tal proposito Figura 5-66, Figura 5-67, Figura 5-68, Figura 5-69. Per la misurazione delle NP si sono state utilizzate le immagini a barra di riferimento 20 e 50 nm. Come metodo di analisi, visto lo stato particolarmente aggregato delle particelle e la necessità di verificare la funzionalizzazione si è optato per ImageJ manuale (Figura 5-70, Figura 5-71).



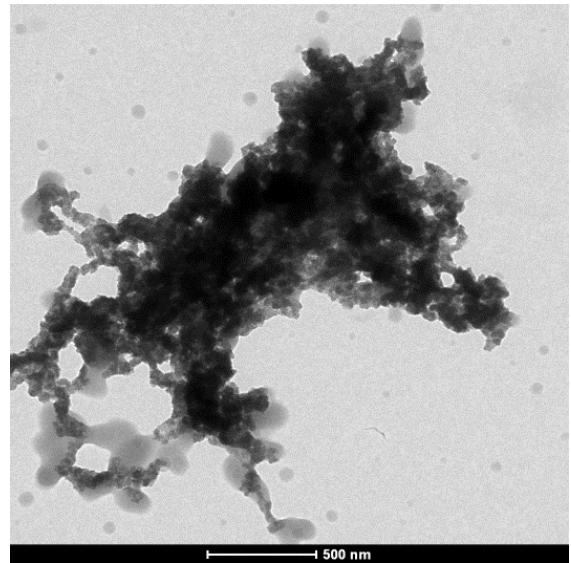
**Figura 5-66** Immagine NP C18 (scala 500nm)  
grandi agglomerati di materiale residuo



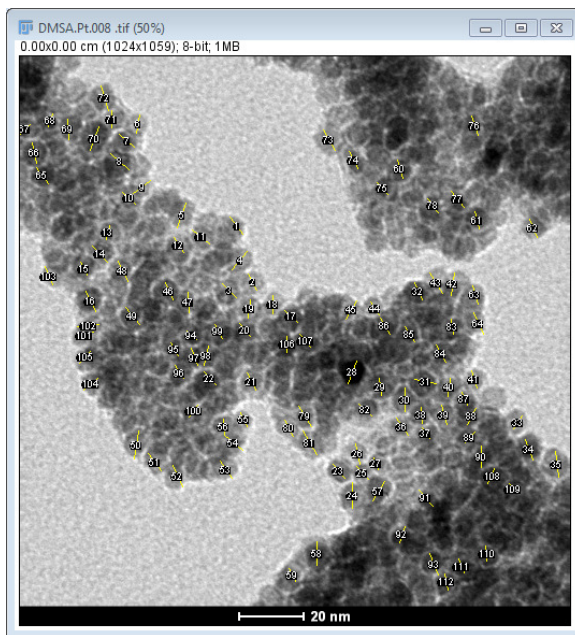
**Figura 5-67** - Immagine NP C18 (scala 100nm), si  
noti anche parti piu' chiaro DMSO



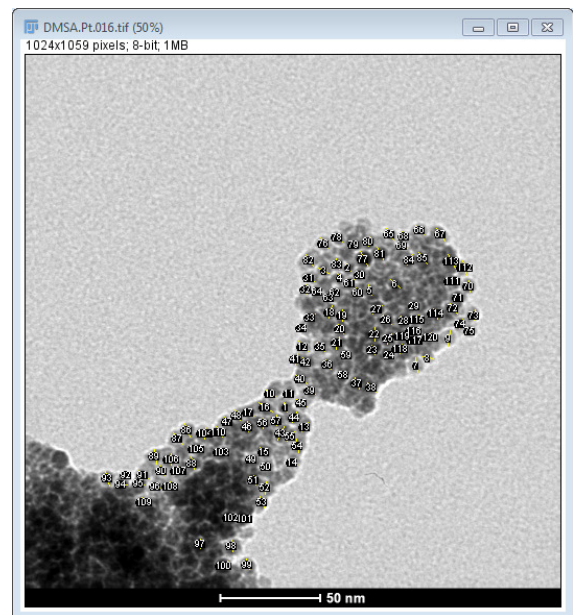
**Figura 5-68-** Immagine NP C18 (scala 200nm)



**Figura 5-69 -** Immagine NP C18 (scala 500nm)



**Figura 5-70** Immagine NP C18 (scala 20nm) –con caratterizzazione manuale ImageJ



**Figura 5-71** Immagine NP C16 (scala 50nm) –con caratterizzazione manuale ImageJ

| Diam | Freq |      |      |
|------|------|------|------|
| 2,4  | 1    | 6,3  | 55   |
| 2,7  | 1    | 6,4  | 53   |
| 3,3  | 1    | 6,5  | 29   |
| 3,4  | 3    | 6,6  | 51   |
| 3,5  | 4    | 6,7  | 37   |
| 3,6  | 2    | 6,8  | 42   |
| 3,7  | 3    | 6,9  | 44   |
| 3,8  | 5    | 7    | 26   |
| 3,9  | 8    | 7,1  | 24   |
| 4    | 6    | 7,2  | 37   |
| 4,1  | 9    | 7,3  | 22   |
| 4,2  | 11   | 7,4  | 38   |
| 4,3  | 9    | 7,5  | 20   |
| 4,4  | 14   | 7,6  | 33   |
| 4,5  | 23   | 7,7  | 21   |
| 4,6  | 31   | 7,8  | 24   |
| 4,7  | 22   | 7,9  | 12   |
| 4,8  | 26   | 8    | 28   |
| 4,9  | 22   | 8,1  | 10   |
| 5    | 32   | 8,2  | 16   |
| 5,1  | 40   | 8,3  | 17   |
| 5,2  | 30   | 8,4  | 4    |
| 5,3  | 35   | 8,5  | 9    |
| 5,4  | 52   | 8,6  | 8    |
| 5,5  | 36   | 8,7  | 5    |
| 5,6  | 49   | 8,8  | 3    |
| 5,7  | 48   | 8,9  | 1    |
| 5,8  | 29   | 9    | 2    |
| 5,9  | 48   | 9,1  | 2    |
| 6    | 35   | 9,2  | 1    |
| 6,1  | 54   | 9,3  | 2    |
| 6,2  | 44   | 9,4  | 2    |
| 6,3  | 55   | 9,7  | 2    |
| 6,4  | 53   | 9,8  | 2    |
| 6,5  | 29   | 9,9  | 3    |
| 6,6  | 51   | 10,1 | 1    |
| 6,7  | 37   | 10,2 | 2    |
| 6,8  | 42   | 10,3 | 1    |
| 6,9  | 44   | 10,4 | 1    |
| 7    | 26   | 10,5 | 1    |
| 7,1  | 24   | 12   | 1    |
|      |      | Tot  | 1426 |

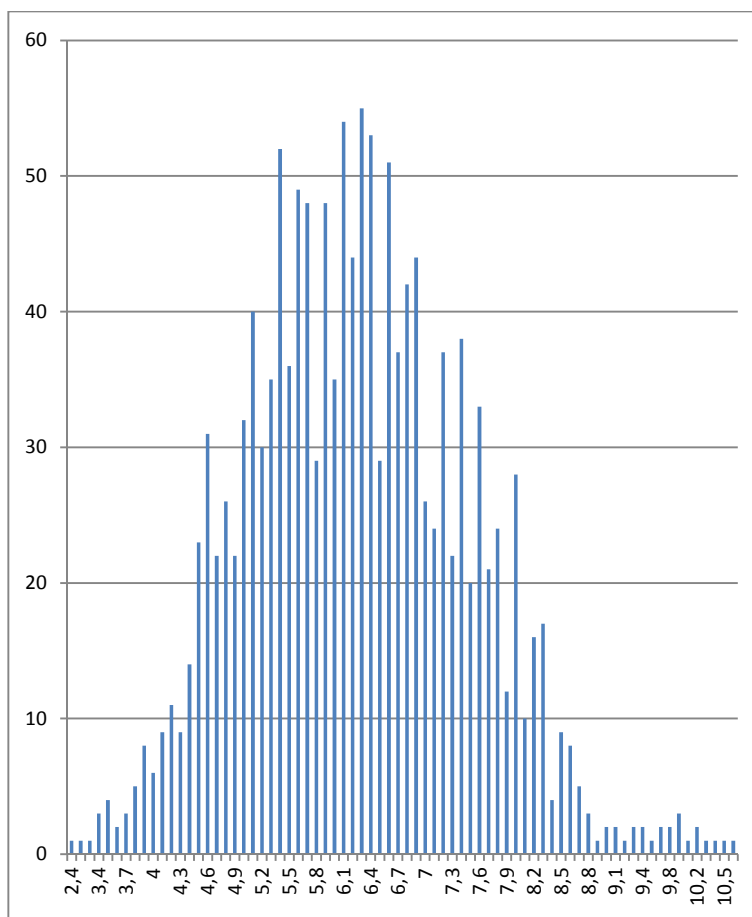


Figura 5-72- grafico della distribuzione delle NP C18

Tabella 5-19

Si noti dalla Tabella 5-20 come la distribuzione sia molto simile a quelle riscontrate per il caso non ricoperto con media e moda molto vicine a circa 6,25nm e il grafico in Figura 5-72 denota una distribuzione normale attorno a tale valore con un range che va da 2,4nm a 10,5nm.

### Risultati Dimensioni NP:

| Posizione [nm] |      | Dispersione [nm] |          | Forma      |      |
|----------------|------|------------------|----------|------------|------|
| Media          | 6,25 | Varianza         | 1,49     | Asimmetria | 0,33 |
| Moda           | 5,4  | Dev.St.          | 1,22     | Curtosi    | 0,34 |
| Mediana        | 6,22 | Range            | 2,5-10,4 | Numero NP  | 1426 |

Tabella 5-20- Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C18

Il fatto di riscontrare tracce di materia funzionalizzante o residua in alcune zone e NP apparentemente non ricoperte farebbe propendere per l'ipotesi che la sintesi non sia stata portata a conclusione sperata.



## 5.11 Immagini C20

**ID :** C20

**Metodo:** termodecomp.

**Solubilità :** Peg/Acqua

**Solvente:** toluene/DMSO

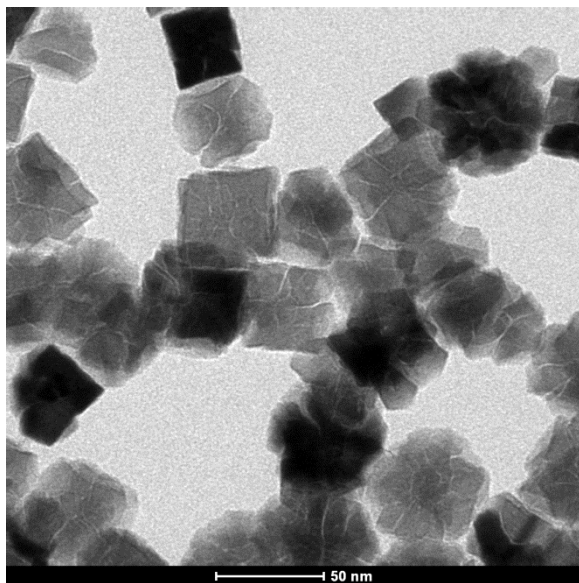
**Ricoprimento:** acido nonanoico

**Immagini analizzate :** Sono state caratterizzate 2 immagini a barra di riferimento 500nm , 15 a 100nm, 1 a 50 nm.

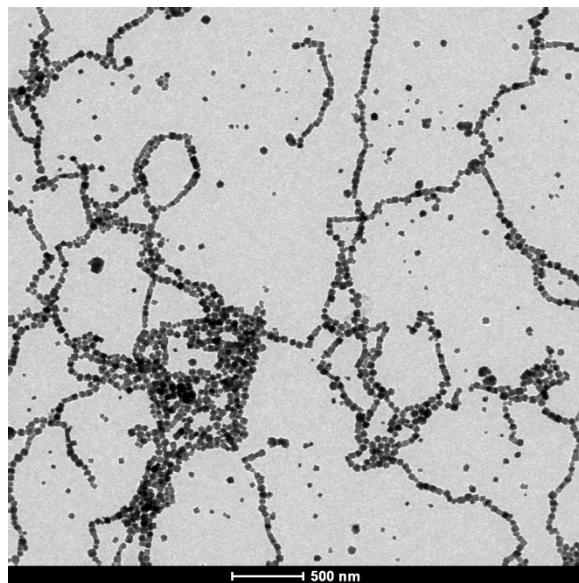
**Forma:** le NP sono di forma marcatamente cubica, anche se, sono evidenti delle fenditure che non rendono la superficie perfettamente omogenea e il che potrebbe far pensare di non essere in presenza di monocristalli. Questo e' piu' evidente con NP di dimensione superiore a 30nm.

L'aspetto della disposizione a catenella o vagoncini (Figura 5-74) che si riscontra in tutte le immagini fa pensare che le NP in realtà non siano particelle magnetiche monodominio per quanto riguarda l'aspetto di magnetizzazione. Il caso multi-dominio può essere dovuto sia al fatto che le NP effettivamente siano un monocristallo ma con dimensioni superiori a quelle teoriche possibili per il monodominio (circa 30nm), oppure le NP siano in realtà frutto di aggregazioni di piu' NP monodominio .

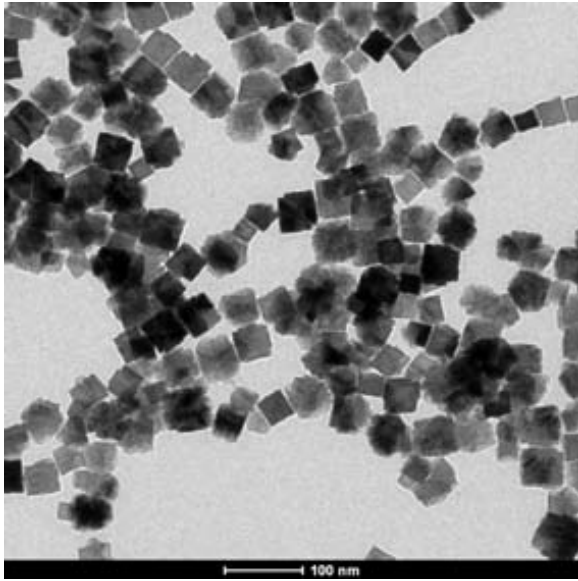
**Metodo di caratterizzazione** Proprio per questa caratteristica di agglomerazioni a catenella, metodi di segmentazione e di intensità falliscono, si è dovuto procedere con la caratterizzazione ImageJ Manuale ( Figura 5-76).



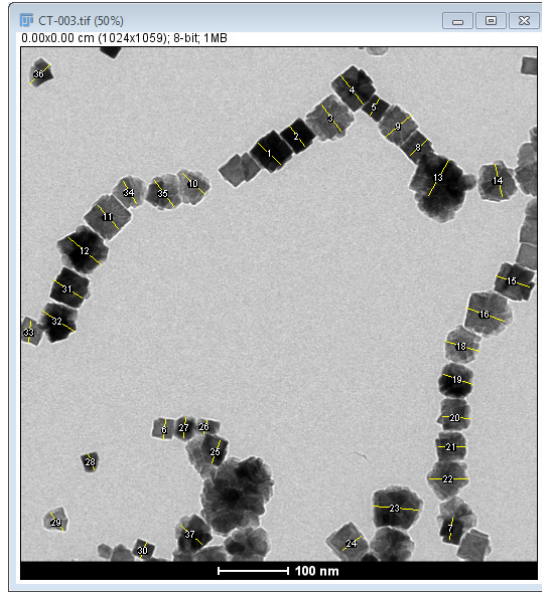
**Figura 5-73-** Immagine NP C20 (scala 50nm)



**Figura 5-74-** - Immagine NP C20 (scala 500nm) si notino le catenelle di NP che si vengono a formare



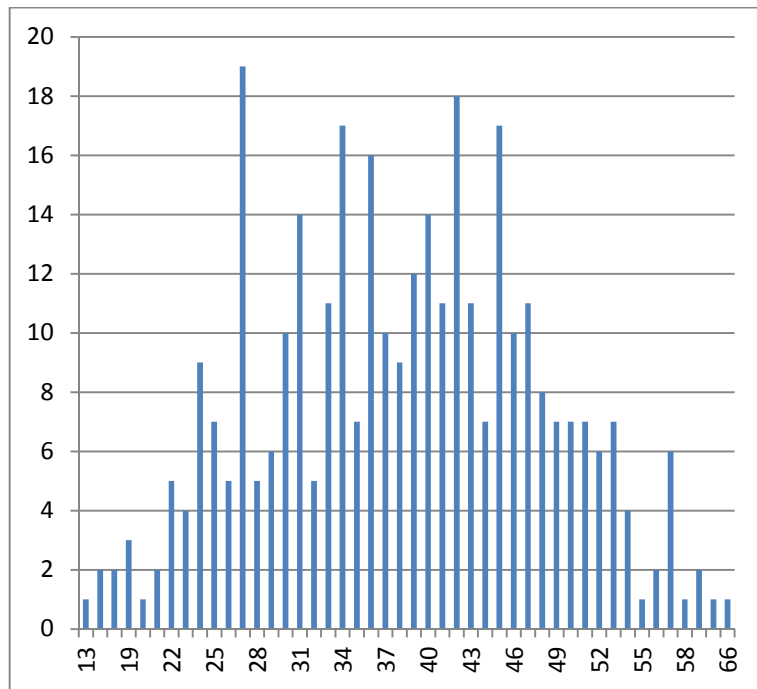
**Figura 5-75** Immagine NP C20 (scala 100nm)



**Figura 5-76** Immagine NP C20 (scala 100nm)-  
con caratterizzazione ImageJ manuale.

| Diam. | Freq |
|-------|------|
| 13    | 1    |
| 17    | 2    |
| 18    | 2    |
| 19    | 3    |
| 20    | 1    |
| 21    | 2    |
| 22    | 5    |
| 23    | 4    |
| 24    | 9    |
| 25    | 7    |
| 26    | 5    |
| 27    | 19   |
| 28    | 5    |
| 29    | 6    |
| 30    | 10   |
| 31    | 14   |
| 32    | 5    |
| 33    | 11   |
| 34    | 17   |
| 35    | 7    |
| 36    | 16   |
| 37    | 10   |
| 38    | 9    |
| 39    | 12   |
| 40    | 14   |
| 41    | 11   |
| 42    | 18   |
| 43    | 11   |
| 44    | 7    |
| 45    | 17   |
| 46    | 10   |
| 47    | 11   |
| 48    | 8    |
| 49    | 7    |
| 50    | 7    |
| 51    | 7    |
| 52    | 6    |
| 53    | 7    |
| 54    | 4    |
| 55    | 1    |
| 56    | 2    |
| 57    | 6    |
| 58    | 1    |
| 59    | 2    |
| 62    | 1    |
| 66    | 1    |
| Tot.  | 341  |

Tabella 5-21



**Figura 5-77** – grafico della distribuzione delle NP C20

| Posizione[nm] |        | Dispersione[nm] |       | Forma      |       |
|---------------|--------|-----------------|-------|------------|-------|
| Media         | 38,19  | Varianza        | 94,48 | Asimmetria | 0,04  |
| Moda          | 26,774 | Dev.St.         | 9,72  | Curtosi    | -0,54 |
| Mediana       | 38,6   | Range           | 13-66 | Numero NP  | 341   |

Tabella 5-22 - Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C20

**Risultati Dimensioni NP:** Si noti che la moda si discosta parecchio dalla mediana e dalla media. Andando ad indagare nello specifico le NP di dimensione negli intorno della moda, si può verificare che si tratta di NP che sembrano essere monocristalli, non sembrano avere le fessurazioni che sono invece più evidenti nel caso di NP con misure maggiori.

## 5.12 Immagini C0

**ID :** C0

**Metodo:** sconosciuto

**Solubilità :** Peg/Acqua

**Ricoprimento:** nessuno

**Immagini:** erano disponibili 5 immagini con diverso ingrandimento :15kx, 67kx, 110kx.

**Commento sintesi:** Queste NP non sono state sintetizzate in laboratorio, sono state acquistate. Non si conoscono il processo di sintesi o altre informazioni utili.

**Metodo di caratterizzazione:** Visto lo stato molto agglomerato si è adottato il metodo di caratterizzazione ImageJ-Manuale applicato a 2 immagini con ingrandimento 110k (Figura 5-81, Figura 5-82)

In Tabella 5-23 vengono riportate le frequenze in funzione del diametro in nm. In Figura 5-78 è riportato il relativo grafico con in ascisse le dimensioni del diametro in nm e nelle ordinate la frequenza.

| Diam [nm] | Freq. |
|-----------|-------|
| 3         | 1     |
| 4         | 8     |
| 5         | 21    |
| 6         | 15    |
| 7         | 12    |
| 8         | 8     |
| 9         | 7     |
| 10        | 1     |
| Totale NP | 73    |

Tabella 5-23- valori frequenze diametro NP C0

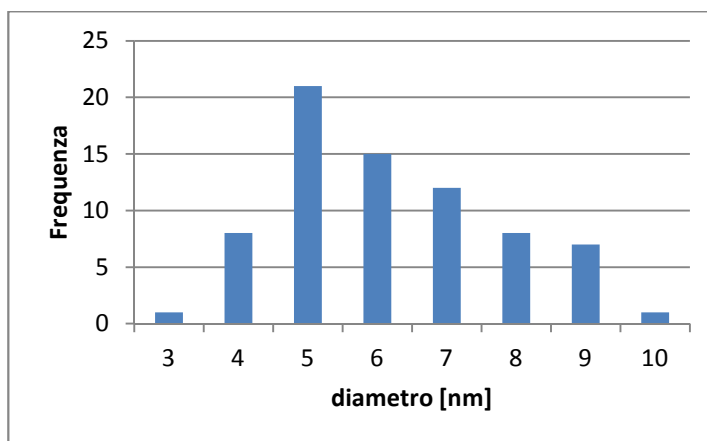
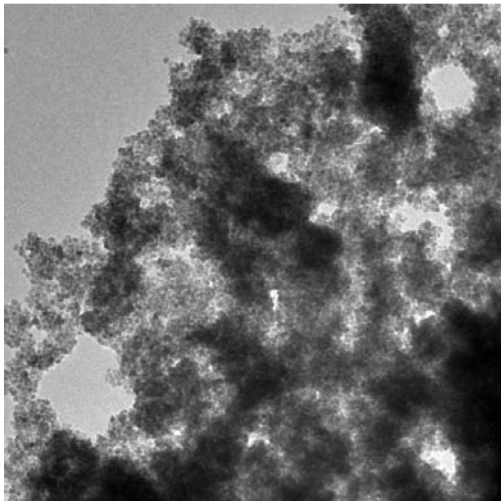


Figura 5-78 – Grafico distribuzione delle NP C0

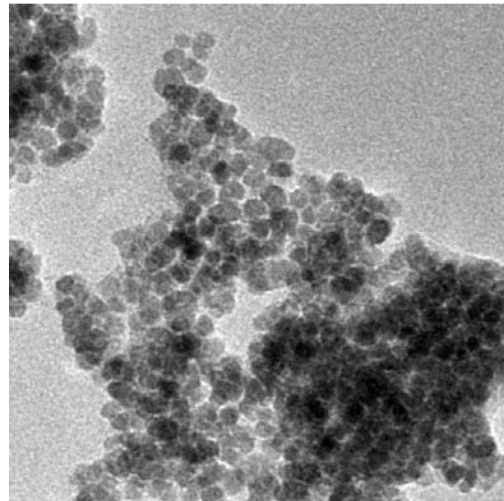
**Risultati Dimensioni NP :** si veda che la distribuzione dei diametri è asimmetrica e il range dei diametri va dai 3 ai 10nm con media di 6,17nm e moda a 5,5 nm. Altri parametri per la descrizione della distribuzione sono riportati in Tabella 5-24.

| Posizione[nm] |      | Dispersione[nm] |      | Forma      |       |
|---------------|------|-----------------|------|------------|-------|
| Media         | 6,17 | Varianza        | 2,93 | Asimmetria | 0,49  |
| Moda          | 5,5  | Dev.St.         | 1,71 | Curtosi    | -0,69 |
| Mediana       | 5,75 | Range           | 3-10 | Numero NP  | 73    |

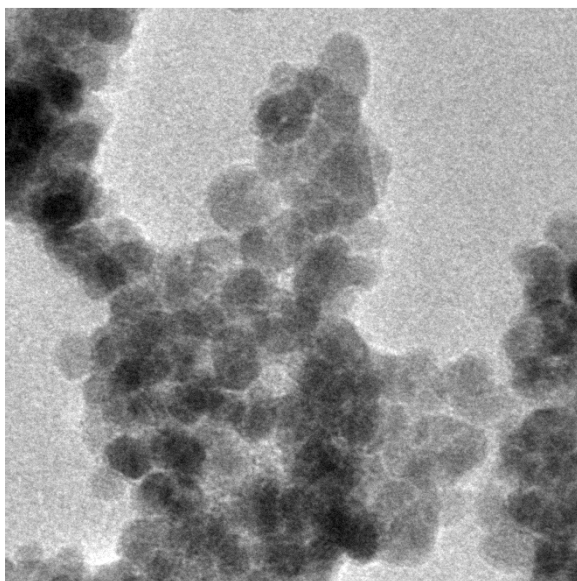
**Tabella 5-24** Tabella di descrizione della distribuzione misure NP C0



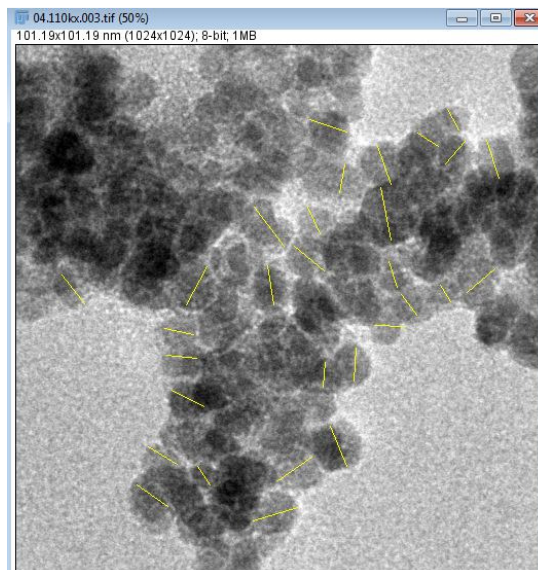
**Figura 5-79-** NP C0, 15K ingrandimenti



**Figura 5-80** NP C0, 67K ingrandimenti



**Figura 5-81-** NP C0, 110K ingrandimenti



**Figura 5-82 -** NP C0, 110K ingrandimenti con misurazione manuale ImageJ

**Forma:** La forma non e' particolarmente regolare però in prevalenza sferoidale. Le particelle nelle immagini analizzate risultano sempre molto agglomerate.

## 6 Conclusioni

Nel presente elaborato, allo scopo di supportare la caratterizzazione morfologica delle NP per Magneto Fluido Ipertermia sono stati presi in considerazione tre tipi di software. Si è visto come il metodo di intensità sfruttato da Pebbles abbia il grande pregio di permettere la verifica della forma della NP e sia basato su una funzione di fit che evita la discrezionalità dell'operatore. Di contro, però, si è riscontrata la tendenza ad arrotondare per eccesso le misure per NP irregolari. Si è anche visto come sia vincolato al controllo di una forma alla volta, risenta molto dei parametri iniziali e l'elaborazione sia piuttosto lenta.

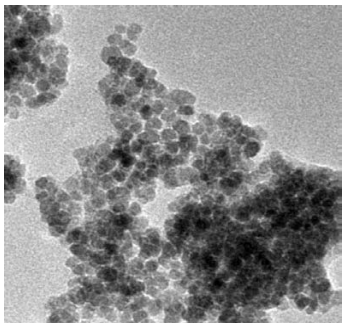
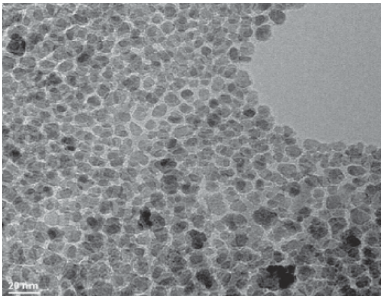
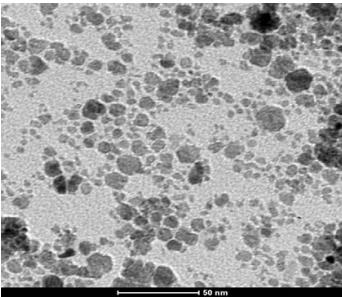
Si sono vagliati poi due metodi di segmentazione, Otsu e Rats implementati entrambi nel tool ImageJ. Questi due metodi si sono dimostrati molto versatili per le immagini TEM con NP di forme molto diverse. Si è potuto apprezzare la buona stima dell'area accompagnata da una velocità di elaborazione non riscontrabile con altri metodi. I metodi di segmentazione risentono tuttavia della scelta vincolante fatta all'inizio dall'operatore che, stabilisce quale debba essere il metodo che segmenta meglio gli oggetti da separare.

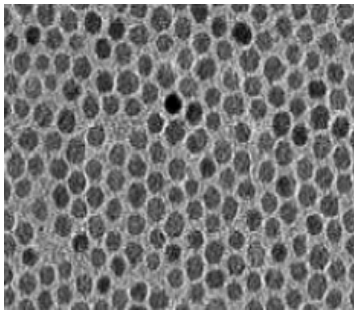
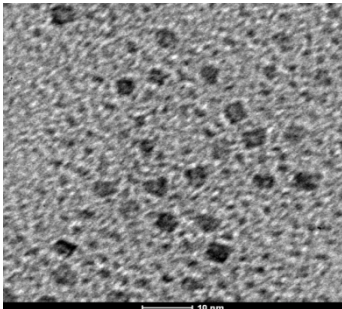
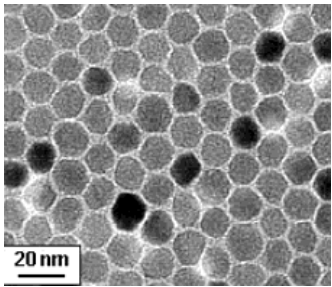
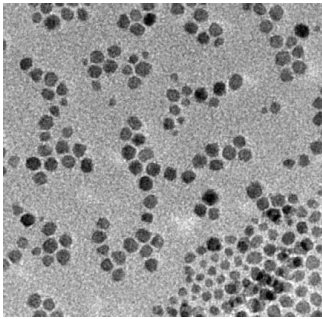
Sia i metodi di intensità che segmentazione non sono utilizzabili per casi di NP molto agglomerate per cui si è utilizzato un sistema di misura assistita Roi Manager fornito da ImageJ. Questo metodo permette, inoltre, misurazioni complesse e specifiche come quelle relative alla copertura delle NP. Essendo pur sempre misurazioni manuali, risentono di errori sistematici che possono essere attenuati solo con la ripetizione di molte misurazioni.

Nell'ambito dell'analisi della relazione tra processo di sintesi e morfologia delle NP prodotte in laboratorio, si è potuto riscontrare, sia per il caso della metodologia di Co-precipitazione che per Termo-decomposizione, congruità con i dati delle misurazioni e morfologia fornite dai paper. Nella tabella riassuntiva del Cap.7 è possibile trovare le informazioni messe a confronto e notare che sostanzialmente gran parte dei 12 casi caratterizzati risulta fornire risultati congrui, fatta eccezione per 2 casi. La sintesi C13 prodotta in laboratorio presenta dimensioni maggiori rispetto ai valori del paper[19], confermando lo svantaggio dei metodi di co-precipitazione nel controllo della dimensione. La sintesi C10-C15, pur presentando valori di ampiezza nel range previsto ha morfologia significativamente diversa da quelli previsti nel paper [21].

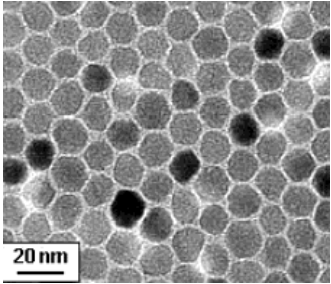
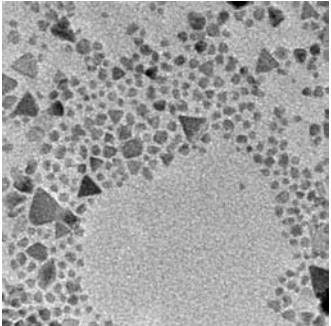
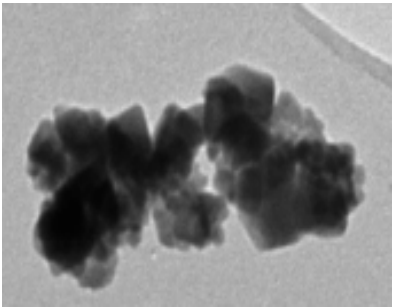
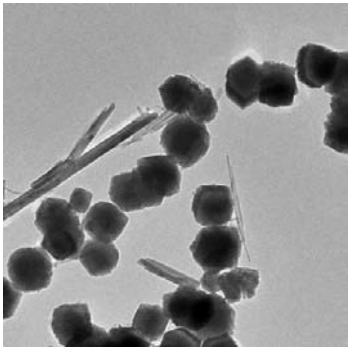


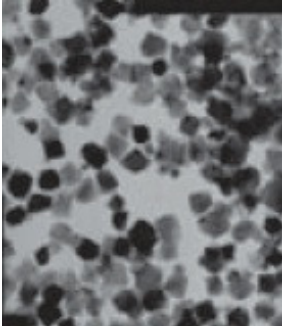
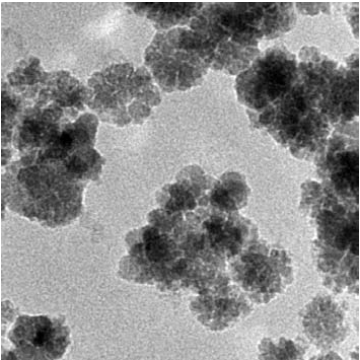
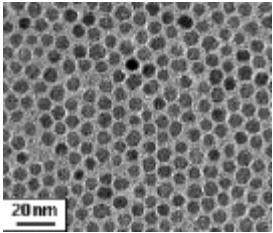
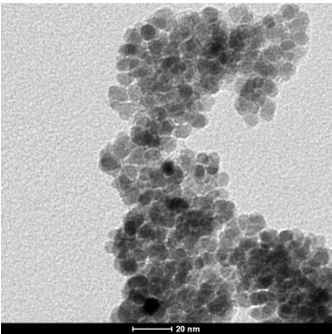
## 7 Tabella riassuntiva Risultati

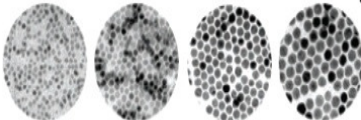
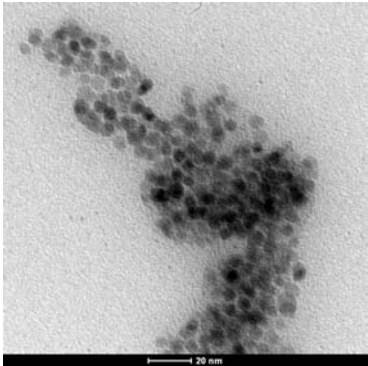
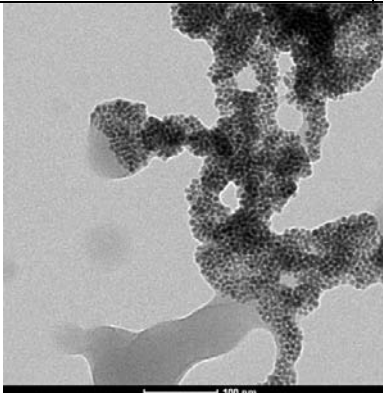
| ID | Tipi di sintesi   | Immagine Paper  | Immagine Laboratorio   | Misura paper              | Dimensioni calcolate                  | Rif. |
|----|-------------------|---|--|---------------------------|---------------------------------------|------|
|    | Copertura         |   |  |                           | media                                 |      |
|    | paragrafo         |   |  |                           | Tabella di riferimento                |      |
| C0 | ND                | ND  |   | ND                        | 3-10 nm                               | -    |
|    | ND                |   |  |                           | $6.17 \pm 1.71\text{nm}$              |      |
|    | -                 |   |  |                           | Tabella 5-24                          |      |
| C2 | co-precipitazione |  |  | 6-20nm<br>(10.6 nm media) | 2.9-12 nm                             | [16] |
|    | acido oleico      |   |  |                           | $5.39 \text{ nm} \pm 1.86 \text{ nm}$ |      |
|    | Par. 4.2.1        |   |  |                           | Tabella 5-1                           |      |

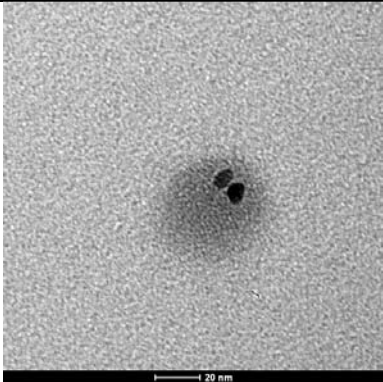
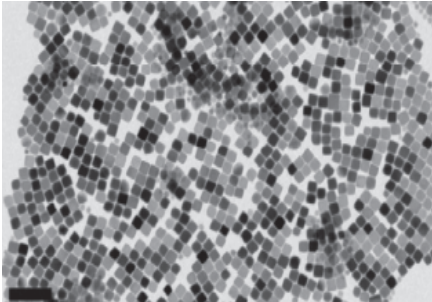
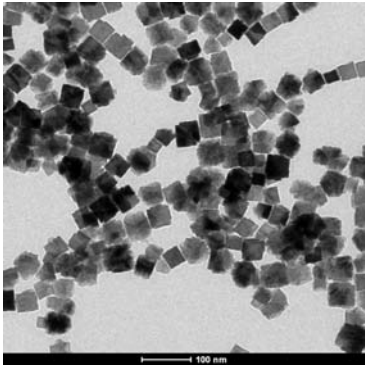
| ID  | Tipi di sintesi     |  | Immagine Paper  | Immagine Laboratorio   | Misura paper         | Dimensioni calcolate |                        | Rif. |
|-----|---------------------|--|---|--|----------------------|----------------------|------------------------|------|
|     | Copertura           |  |   |  |                      | media                | Tabella di riferimento |      |
|     | paragrafo           |  |   |  |                      |                      |                        |      |
| C1  | termodecomposizione |  |   | <br>Par. 5.2  | 4 nm                 | 2.3-8.9 nm           |                        | [20] |
|     | acido oleico        |  |   |  |                      | 4.31 ± 0.84 nm       |                        |      |
|     | 4.2.7               |  |   |  |                      | Tabella 5-2          |                        |      |
| C11 | termodecomposizione |  |  | <br>Par. 5.4 | Accr. da<br>4 a 6 nm | 3.1-9.8 nm           |                        | [20] |
|     | acido oleico        |  |   |  |                      | 6.96 ± 1.09 nm       |                        |      |
|     | Par. 4.2.9          |  |   |  |                      | Tabella 5-5          |                        |      |



| ID  | Tipi di sintesi     | Immagine Paper  | Immagine Laboratorio   | Misura paper                        | Dimensioni calcolate   | Rif. |
|-----|---------------------|---|--|-------------------------------------|------------------------|------|
|     | Copertura           |   |  |                                     | media                  |      |
|     | paragrafo           |   |  |                                     | Tabella di riferimento |      |
| C12 | termodecomposizione |   |  <p>Par. 5.5</p>  | da 4 nm<br><br>(ac-<br>crescimento) | 2.5-16.8 nm            | [20] |
|     | acido oleico        |   |  |                                     | $5.05 \pm 1.60$ nm     |      |
|     | 4.2.9               |   |  |                                     | Tabella 5-7            |      |
| C13 | coprecipitazione    |  |  <p>Par. 5.3</p> | 25-50 nm                            | 100-155 nm             | [19] |
|     | nessuna copertura   |   |  |                                     | $114.49 \pm 17.52$ nm  |      |
|     | 4.2.5               |   |  |                                     | Tabella 5-4            |      |

| ID      | Tipi di sintesi     |  | Immagine Paper   | Immagine Laboratorio   | Misura paper             | Dimensioni calcolate         |                        | Rif. |
|---------|---------------------|--|--|--|--------------------------|------------------------------|------------------------|------|
|         | Copertura           |  |  |  |                          | media                        | Tabella di riferimento |      |
|         | paragrafo           |  |  |  |                          |                              |                        |      |
| C10-C15 | termodecomposizione |  |  | <br>Par. 5.6  | 4 nm,<br>12 nm,<br>60 nm | 8-34 nm                      |                        | [21] |
|         | 2-pirrolidone       |  |  |  |                          | $22.16 \pm 4.26$ nm          |                        |      |
|         | 4.2.10              |  |  |  |                          | Tabella 5-12<br>Tabella 5-24 |                        |      |
| C16     | termodecomposizione |  |  | <br>Par. 5.9 | 6 nm                     | 2.5-12.9nm                   |                        | [20] |
|         | acido oleico        |  |  |  |                          | $6.94 \pm 1.71$ nm           |                        |      |
|         | 4.2.14              |  |  |  |                          | Tabella 5-18                 |                        |      |

| ID  | Tipi di sintesi   | Immagine Paper   | Immagine Laboratorio  | Misura paper | Dimensioni calcolate      | Rif. |
|-----|---|--|---|--------------|---------------------------|------|
|     | Copertura   |  |   |              | media                     |      |
|     | paragrafo   |  |   |              | Tabella di riferimento    |      |
| C19 | termodecomposizione                                       |  |  <p>Par. 5.7</p>   |              | 2.8-8.9 nm                | [22] |
|     | acido oleico e DMSA                                       |  |   |              | $5.56 \pm 1\text{nm}$     |      |
|     | 4.2.11  |  |   |              | Tabella 5-14              |      |
| C18 | termodecomposizione                                       | ND   |  <p>Par. 5.10</p> |              | 2.5-10.4 nm               | -    |
|     | acido oleico, DMSA, complesso di platino [Pt(dppe)(dmsa)] |  |   |              | $6.25 \pm 1.22\text{ nm}$ |      |
|     | Par. 4.2.15   |  |   |              | Tabella 5-20              |      |

| ID  | Tipi di sintesi     | Immagine Paper  | Immagine Laboratorio  | Misura paper | Dimensioni calcolate   | Rif. |
|-----|---------------------|---|---|--------------|------------------------|------|
|     | Copertura           |   |   |              | media                  |      |
|     | paragrafo           |   |   |              | Tabella di riferimento |      |
| C17 | termodecomposizione |   |  <p>Par. 5.8</p>   |              | 8-59 nm                | [22] |
|     | acido oleico, DMSA  |   |   |              | $29.67 \pm 8.96$ nm    |      |
|     | 4.2.12              |   |   |              | Tabella 5-17           |      |
| C20 | termodecomposizione |  |  <p>Par. 5.11</p> |              | 13-66 nm               | [23] |
|     | acido nonanoico     |   |   |              | $38.19 \pm 9.72$ nm    |      |
|     | Par. 4.2.13         |   |   |              | Tabella 5-22           |      |

## 8 BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Scherrer, Göttinger Nachrichten Gesell., Vol. 2, 1918, p 98
- [2] Ahmad Monshi, Mohammad Reza Foroughi , Mohammad Reza Monshi, *Modified Scherrer Equation to Estimate More Accurately Nano-Crystallite Size Using XRD*. World Journal of Nano Science and Engineering, 2012, 2, 154-160; doi:10.4236/wjnse.2012.23020
- [3] K. J. Binns, P. J. Lawrenson, e C. W. Trowbridge, *The analytical and numerical solution of electric and magnetic fields*. Chichester: Wiley, 1992.
- [4] P. Di Barba, *Multiobjective Shape Design in Electricity and Magnetism*. Springer, 2010.
- [5] Pyrz, W. D., & Buttrey, D. J. (2008). *Particle Size Determination Using TEM : A Discussion of Image Acquisition and Analysis for the Novice Microscopist*, (35), 11350–11360.
- [6] Mondini, S., Ferretti, a M., Puglisi, A., & Ponti, A. (2012). *Pebbles and PebbleJuggler: software for accurate, unbiased, and fast measurement and analysis of nanoparticle morphology from transmission electron microscopy (TEM) micrographs*. *Nanoscale*, 4(17), 5356–72. doi:10.1039/c2nr31276j
- [7] Sigle, W. (2005). *Analytical Transmission Electron Microscopy. Annual Review of Materials Research*, 35(1), 239–314. doi:10.1146/annurev.matsci.35.102303.091623
- [8] Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). *Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. Chemical reviews*, 108(6), 2064–110. doi:10.1021/cr068445e
- [9] Rosensweig, R. E. (2002). *Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252, 370–374. doi:10.1016/S0304-8853(02)00706-0
- [10] Mehdaoui, B., Meffre, A., Carrey, J., Lachaize, S., Lacroix, L.-M., Gougeon, M., ... Respaud, M. (2011). *Optimal Size of Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: A Combined Theoretical and Experimental Study. Advanced Functional Materials*, 21(23), 4573–4581. doi:10.1002/adfm.201101243
- [11] Wilkinson MHF (1998) Segmentation techniques in image analysis of microbes. Chapter 6 in: Wilkinson MHF, Schut F (eds.) *Digital Image Analysis of Microbes: Imaging, Morphometry, Fluorometry and Motility Techniques and Applications*, Vol. John Wiley & Sons, New York.
- [12] Otsu, N. (Jan. 1979), "A threshold selection method from gray level histograms", *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 9 (1): 62-66, CODEN: ISYMAW, ISSN 0018-9472
- [13] LaMer, V. K.; Dinegar, R. H. J. *Am. Chem. Soc.* 1950, 72, 4847.
- [14] Douglas, Fraser J. MacLaren, Donald a MacLaren. Murrie, Mark (2012) *A study of the role of the solvent during magnetite nanoparticle synthesis: tuning size, shape and self-assembly-RSC Advances*, 2012, 2, 8027–8035.
- [15] Roca, A. G.; Costo, R.; Rebolledo, A. F.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Tartaj, P.; González-Carreño, T.; Morales, M. P.; Serna C. J.; "Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine" *Journal of Physics D: Applied Physics* 2009, 42, 224002.
- [16] Ghasemi, E.; Mirhabibi, A.; Edrissi, "Synthesis and rheological properties of an iron oxide ferrofluid" *M. J Magn Magn Mater* 2008, 320, 2635.
- [17] Huang, C.; Hu, B. *Spectrochimica " Silica-coated magnetic nanoparticles" Acta Part B:*

- Atomic Spectroscopy 2008, 63, 437.
- [18] Ozmen, M.; Can, K.; Arslan, G.; Tor, A.; Cengeloglu, Y.; Ersoz, M. " *Adsorption of Cu(II) from aqueous solution by using modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles*" *Desalination* 2010, 254, 162.
- [19] Yiu, H. H. P.; Bouffier, L.; Boldrin, P.; Long, J.; Claridge, J. B.; Rosseinsky, M. J. *Langmuir* 2013, 29, 11354.
- [20] Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126, 273.
- [21] Li, Z.; Sun, Q.; Gao, M. *Angewandte " Preparation of Water-Soluble Magnetite Nanocrystals from Hydrated Ferric Salts in 2-Pyrrolidone: Mechanism Leading to Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>" Chemie International Edition* 2005, 44, 123.
- [22] Jun, Y.-w.; Huh, Y.-M.; Choi, J.-s.; Lee, J.-H.; Song, H.-T.; Kim, Y.; Yoon, S.; Kim, K.-S.; Shin, J.-S.; Suh, J.-S.; Cheon, " *Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging*" *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127, 5732.
- [23] Guardia, P.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Wilhelm, C.; Espinosa, A.; Garcia-Hernandez, M.; Gazeau, F.; Manna, L.; Pellegrino, " *Water-Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment*" *T. ACS Nano* 2012, 6, 3080.