

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
SCUOLA DI INGEGNERIA

Tesi di Laurea Triennale in
INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

**Preparazione e caratterizzazione di
nanoparticelle di ossido di ferro per
ipertermia magnetica da
coprecipitazione di sali di ferro**

Relatore

Prof. Roberta Bertani

Correlatore

Dott. Paolo Sgarbossa

Dott. Elisabetta Sieni

Candidato

Lorenzo Meneghetti

Anno Accademico 2012/2013

*A Francesco e Elisabetta per averci creduto
A tutti i malvagi del DEI perché "buon pranzo!"*

Indice

1	Ipertermia e tumori	1
1.1	Tipologie di ipertermia	1
1.2	Cenni storici	2
1.3	Ipertermia magneto fluida	4
1.4	Risposta biologica al trattamento ipertermico	6
2	Proprietà fisiche delle nanoparticelle	9
2.1	Magnetismo nei materiali	9
2.2	Meccanismi di riscaldamento	13
2.3	Temperatura di Curie	15
3	Tipi di nanoparticelle	17
3.1	Metalli puri	17
3.2	Leghe metalliche	18
3.3	Ossidi di ferro	19
3.4	Altri tipi di nanoparticelle	21
3.5	Ferrofluidi	22
4	Metodi di sintesi delle nanoparticelle	23
4.1	Il problema della sintesi	23
4.2	Tipologie di sintesi di NP di ossidi di ferro	25
4.2.1	Co-precipitazione	25
4.2.2	Decomposizione termica	26
4.2.3	Microemulsione	27
4.2.4	Sintesi idrotermica	29
4.2.5	Sintesi sonochimica	30
4.2.6	Pirolisi laser	31
5	Risultati sperimentali	33
5.1	Reagenti e solventi	33
5.2	Strumentazione	34

5.3	Sintesi delle nanoparticelle di magnetite (Fe_3O_4) protette con acido oleico [1]	35
5.4	Purificazione delle nanoparticelle di magnetite e dispersione in <i>n</i> -esano	35
5.5	Analisi spettroscopica FT-IR delle nanoparticelle disperse in <i>n</i> -esano.	37
5.6	Analisi micrografica TEM delle nanoparticelle disperse in <i>n</i> -esano	38
5.7	Sintesi del tensioattivo 11-ammino-undecanoato di tetrametilammonio. [2]	40
5.8	Trattamento delle nanoparticelle con tensioattivo, purificazione e dispersione in tampone fosfato	41
6	Conclusioni e prospettive	43

Capitolo 1

Ipertermia e tumori

L'ipertermia magneto fluida (MFH) permette il riscaldamento di tessuti biologici tramite l'impiego di nanoparticelle magnetiche (MNP) e costituisce una promettente terapia nella cura di alcuni tipi di cancro. Le cellule tumorali, a differenza di quelle dei tessuti sani, sono più sensibili al calore tra 43 e 46 °C. Un innalzamento della temperatura corporea a tale livello può indurre la morte delle cellule malate per apoptosi. Questa terapia non solo può indurre l'apoptosi delle cellule, ma può anche venire impiegata per innalzare la percentuale di successo di altre terapie come la chemioterapia e la radioterapia.

1.1 Tipologie di ipertermia

L'innalzamento della temperatura corporea può essere ottenuto in diversi modi. Una prima classificazione dei tipi di ipertermia può essere effettuata dividendo in:

- **ipertermia esterna:** il calore viene applicato al corpo dall'esterno, attraverso l'utilizzo di microonde, radiofrequenze, ultrasuoni, bagni caldi, infrarossi;
- **ipertermia interna:** vengono iniettate delle sostanze o impiantati dei dispositivi che possono essere scaldati mediante applicazione di campi elettromagnetici.

Il National Cancer Institute¹ inoltre distingue tre tipi di trattamenti di ipertermia:

- **ipertermia locale:** il calore è applicato ad un'area ridotta, come nel caso di un tumore.
- **ipertermia regionale:** vengono riscaldate larghe aree di tessuto come cavità o organi.
- **ipertermia *total body*:** il calore viene fornito a tutto il corpo utilizzando camere termiche o coperte di acqua calda. Utilizzata specialmente per terapia di tumori con metastasi.

L'utilizzo di nanoparticelle magnetiche consente un efficace metodo di approccio del primo tipo (ipertermia locale). Il sito tumorale presenta cavità permeabili che consentono alle MNP di entrare nelle cellule tumorali tramite indirizzamento passivo, grazie alle proprietà biologiche, fisiche e chimiche con cui sono state progettate le particelle. Una volta in sito, le particelle vengono riscaldate tramite l'applicazione di un campo magnetico tempo-variante, secondo meccanismi che saranno approfonditi nel capitolo 2.

Infine, un ultimo tipo di classificazione può essere effettuato in base alla temperatura raggiunta dal trattamento, dividendo così in

- *trattamento ipertermico (mild hypertermia)*, dove la temperatura è compresa nell'intervallo 42-46 °C
- *trattamento di termoablazione*, se si utilizza una temperatura di oltre 50 °C (si ha la necrosi delle cellule tumorali per carbonizzazione).

1.2 Cenni storici

I primi studi sperimentali di applicazione di materiali magnetici per l'ipertermia risalgono al 1957. Gilchrist et al. [3], impiegando particelle di magnetite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), di dimensioni comprese tra 20-100 nm, esposte ad un

¹www.nci.nih.gov

campo magnetico a 1.2 MHz , riscaldarono diversi tipi di campioni di tessuto. Da allora sono state divulgate numerose pubblicazioni che descrivevano diversi esperimenti nei quali sono stati impiegati diversi tipi di materiali magnetici, diverse intensità e frequenza di campo magnetico e diversi modi di incapsulamento delle particelle. Successivi studi sono stati effettuati, 20 anni dopo, dal gruppo di Gordon che sperimentò l'introduzione di nanoparticelle (NP) di magnetite (Fe_3O_4) in un carcinoma mammario in ratti da laboratorio [4]. L'applicazione clinica su larga scala di questa tecnica fu ostacolata dalle limitazioni tecniche come le incertezze riguardanti la distribuzione e la concentrazione intratumorale delle particelle e del calore. Inoltre, nessuna documentazione sull'effetto del calore sulla crescita del tumore fu presentata in questi primi studi.

Studi sistematici *in vitro* furono condotti nel 1993 dal gruppo di Chan [5] e nel 1996 dal gruppo di Jordan [6]. Quest'ultimo dimostrò che l'inattivazione di cellule tumorali tramite il riscaldamento indotto da nanoparticelle magnetiche eccitate da un campo magnetico alternato è equivalente al miglior trattamento di riscaldamento tramite bagno termico, per un dato lasso di tempo. Il risultato non fu per niente ovvio, poiché un gran numero di singole nanoparticelle magnetiche eccitate da un campo magnetico tempo-variante, ognuna però agente come parte di una sorgente di calore unica, producono una omogeneità di temperatura che era comparabile a quella prodotta dall'acqua esposta ad un campo magnetico tempo-variante, la quale contiene molte più molecole eccitate rispetto alle particelle esistenti in un fluido magnetico. Visti gli incoraggianti risultati *in vitro*, si è ipotizzato che dei risultati simili fossero da aspettarsi anche *in vivo*, a patto che il fluido fosse stato somministrato in maniera omogenea nella area da sottoporre a terapia. Studi più recenti condotti nel 1997 da Yanase et al. sempre su ratti [7] hanno mostrato l'effettiva fattibilità di questa terapia raggiungendo una temperatura di 43 °C per un tumore sottocutaneo. La quantità di fluido iniettata era pari a 3 mg; le esposizioni al campo magnetico tempo-variante erano ripetute e ciascuna aveva durata di 30 minuti, utilizzando una frequenza del campo pari a 118 kHz. Lo stesso gruppo di ricerca pubblicò risultati che mostravano una completa regressione del cancro in 30 giorni, senza una ricrescita

tumorale entro i primi tre mesi. In un altro studio basato sempre su nanoparticelle di magnetite sono state prelevate cellule di adenocarcinoma (tumore del tessuto epiteliale) e trapiantate in topi. Dopo cicli ripetuti di esposizione al campo magnetico venne osservata una notevole necrosi cellulare: in questo caso le temperature raggiunte sfioravano i 73 °C.

I primi esperimenti clinici per il trattamento di carcinomi attraverso MFH su pazienti umani sono stati condotti dal gruppo di ricerca di Jordan al Charité Hospital di Berlino. [5] Sono stati impiegati un prototipo di strumento che è in grado di generare campi magnetici variabili nel tempo di 0-15 kA/m alla frequenza di 100 kHz . Questo campo magnetico è in grado di eccitare nanoparticelle di ossido di ferro ricoperte con sostanze organiche del diametro di 15 nm . La macchina consente allo stesso tempo di monitorare la temperatura interna del paziente per assicurarsi che rimanga al di sopra della soglia terapeutica, per garantire l'efficacia del trattamento, e al di sotto di quella critica, di modo da impedire l'ablazione termica. Allo stato attuale, la via più promettente e la più considerata per l'ipertermia magneto fluida è quella locale. Il fluido contenente le nanoparticelle magnetiche viene iniettato direttamente nel tumore o nell'organismo, dove verrà indirizzato verso l'area malata, attraverso l'impiego di un rivestimento organico che faccia da recettore per gli anticorpi tumorali.

1.3 Ipertermia magneto fluida

Questo tipo di tecnica consiste nella dispersione di particelle magnetiche nel tessuto desiderato le quali, dopo l'applicazione di un campo magnetico tempo-variante, vengono riscaldate secondo meccanismi discussi nella sezione 2.2. In figura 1.1 è mostrata la rappresentazione schematica di una macchina per l'induzione di campi ad frequenza. Tra tutte le modalità di ipertermia, inclusi trattamenti basati su microonde, laser e ultrasuoni, l'ipertermia magneto fluida ha il potenziale migliore per agire selettivamente sulle cellule tumorali. Può essere dunque accoppiata alle terapie di chemioterapia e radioterapia, ottimizzandone l'efficacia (sezione 1.4).

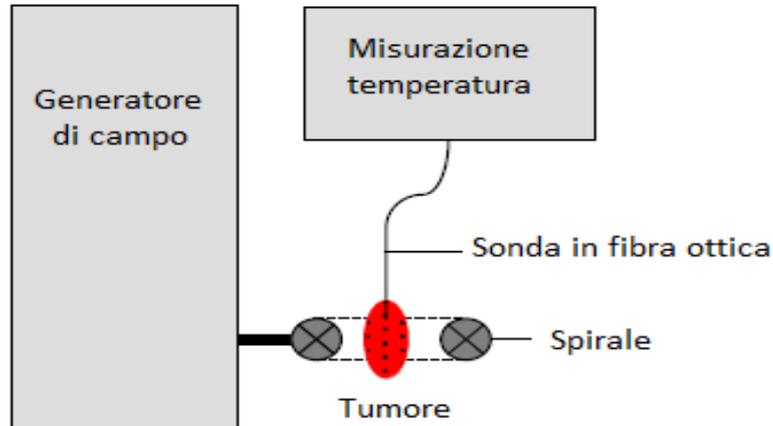


Fig. 1.1: Rappresentazione schematica di una macchina a induzione, spirale di rame e un sistema di misura della temperatura.

Il fluido magnetico che contiene le nanoparticelle magnetiche è può essere trasportato in tre modi nel tumore:

- *Iniezione in arteria:* il fluido viene iniettato nell'arteria da cui il tumore viene alimentato e questa viene usata come percorso per trasportare le MNP a destinazione.
- *Iniezione diretta:* il fluido viene iniettato direttamente nel tumore. Le particelle saranno situate nel tessuto tumorale e per la maggior parte nello spazio interstiziale. Perciò, quando il campo magnetico viene applicato il calore origina più che altro al di fuori delle cellule.
- *Targeting attivo:* una modalità più complicata per trasportare queste particelle al tessuto tumorale consiste nel targeting tramite anticorpi o tramite un gradiente di campo magnetico esterno (targeting magnetico). Nella procedura di targeting magnetico un gradiente di campo magnetico esterno, vicino al tessuto tumorale, porta ad un'attrazione magnetica delle MNP che circolano nel flusso sanguigno verso il tumore. Per il targeting tramite anticorpi, le MNP sono rivestite con un

anticorpo specifico espresso dalle cellule del tumore; dopo l'iniezione del magnetofluido nei vasi sanguigni, le particelle trovano la strada per il tumore e si legano in maniera specifica ai recettori bersaglio. Questo incrementa la ritenzione delle NP nella regione del tumore il che costituisce un vantaggio poiché i trattamenti di ipertermia sono spesso effettuati ripetutamente per ottenere un trattamento efficace. Per approfondimento delle tecniche di targeting si veda [8].

Il parametro principale che determina il riscaldamento del tessuto è il tasso di assorbimento specifico (SAR), definito come il tasso di energia elettromagnetica assorbita da un'unità di massa di materiale biologico. È espressa in W/kg ed è proporzionale all'incremento della temperatura ($\Delta T/\Delta t$):

$$SAR = 4.1868 \frac{P}{m_e} = C_e \frac{dT}{dt}$$

Dove P è la potenza elettromagnetica generata dal campione, m_e è la massa del campione e C_e è la capacità di calore specifica del campione.

1.4 Risposta biologica al trattamento ipertermico

Il trattamento ipertermico opera danneggiando le funzioni di membrane, citoscheletro e nucleo delle cellule tumorali. La suscettibilità al calore di queste cellule varia a seconda della fase del ciclo vitale. Si è osservato che la sensibilità è massima nella prima fase del ciclo (fase mitotica): il calore al di sopra dei 41 °C porta le cellule cancerogene verso l'acidosi che ne diminuisce la vitalità.

Le cellule sane sono caratterizzate da vasi distribuiti, ben ramificati; se sottoposte a temperature superiori a quella di normale funzionamento, grazie alla capacità di dilatazione fisiologica riescono a dissipare il calore in eccesso. Come si nota in figura 1.2, i vasi sanguigni delle cellule tumorali sono invece privi di un'impalcatura muscolare; questo li porta ad una crescita caotica e disuniforme con mancanza di elasticità. La mancanza di elasticità si ri-

percuote nell'incapacità di vasodilatazione; ciò impedisce alla cellula malata un'adeguata dissipazione del calore. Si comprende allora perché le masse tumorali siano maggiormente suscettibili al calore e abbiano una maggiore difficoltà a dissipare calore. In termini pratici, alla temperatura di 43-44 °C la maggior parte delle cellule tumorali tende a morire, mentre la maggior parte delle cellule sane sopravvive: questa è una delle basi fisiologiche dell'efficacia terapeutica dell'ipertermia.

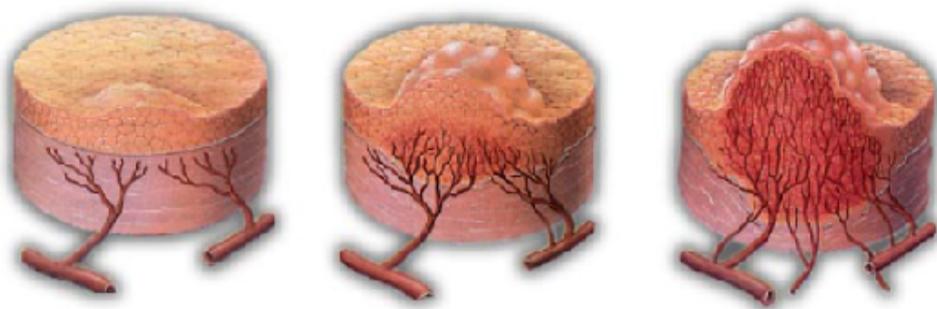


Fig. 1.2: Crescita anormale dei vasi sanguigni all'interno delle cellule tumorali.

Di norma, la parte più interna della massa tumorale, vista la relativa distanza dalla rete capillare, è caratterizzata da cellule ipossiche², carenti di zuccheri e altri elementi nutritivi. Di conseguenza queste cellule non riescono ad essere raggiunte dai farmaci chemioterapici somministrati per via sistemica, che tendono invece ad accumularsi nei tessuti sani ben vascolarizzati; queste cellule si sono dimostrate relativamente resistenti alle radiazioni ionizzanti della radioterapia, che per agire necessitano di un ambiente ben ossigenato; sono però estremamente sensibili al calore. Questo è uno dei motivi per cui, ad esempio, si vuole utilizzare l'ipertermia in combinazione con la radioterapia: le radiazioni agiscono sulle cellule ben ossigenate, situate sulla parte più esterna della massa tumorale, mentre l'ipertermia va ad operare sulla parte più interna, dove si hanno le cellule a basso contenuto di ossigeno. Questo tipo di terapia comporterà un aumento del loro livello di ossigenazione, ren-

²L'ipossia è una condizione patologica determinata da una carenza di ossigeno.

dendole più suscettibili all'azione delle radiazioni.

Quando si effettua un trattamento ipertermico esiste la possibilità di surriscaldare il tessuto e di danneggiare quindi le cellule sane che circondano la zona ammalata. Se le cellule dovessero rompersi per l'eccesso di calore, il loro contenuto potrebbe essere rilasciato causando problemi di tossicità per l'organismo.

Capitolo 2

Proprietà fisiche delle nanoparticelle

2.1 Magnetismo nei materiali

Quando un materiale viene sottoposto ad un campo magnetico di intensità H i singoli momenti atomici nel materiale contribuiscono alla risposta magnetica complessiva. L'induzione magnetica è data da $B = (\mu_0)(H + M)$, dove μ_0 è la permeabilità del vuoto e M è la magnetizzazione. I materiali vengono classificati in base alla loro risposta al campo magnetico, in termini di suscettibilità magnetica per volume χ (con $M = \chi H$).

In natura i materiali presentano diverse forme di magnetismo in base all'orientamento del loro momento magnetico. Si osservano cinque tipi di magnetismo: *diamagnetismo*, *paramagnetismo*, *ferromagnetismo*, *antiferromagnetismo* e *ferrimagnetismo*.

- **diamagnetismo** ($\chi = -10^{-6} \div -10^{-1}$): hanno suscettibilità negativa molto piccola e respingono debolmente un campo magnetico applicato.
- **paramagnetismo** ($\chi = 10^{-6} \div 10^{-1}$): sono materiali in cui gli elettroni spaiati degli atomi che costituiscono la materia presentano momenti magnetici orientati in maniera aleatoria per effetto dell'agitazione termica. Sotto l'azione di un campo magnetico esterno i momenti elementari tendono ad orientarsi concordemente ad esso (Figura 2.1 A),

dando origine ad una magnetizzazione di verso concorde con quello del campo e di intensità proporzionale al campo stesso; sono paramagnetici la maggior parte dei gas, alcuni metalli, i metalli alcalini e alcuni sali;

- **ferromagnetismo** ($\chi \approx 10^3$): sono materiali costituiti da un unico reticolo cristallino composto di dipoli magnetici orientati parallelamente, in cui i momenti magnetici sono totalmente allineati in assenza di campo magnetico e la loro risultante è dunque diversa da zero, dando luogo ad un fenomeno di magnetismo cooperativo. Tale effetto prende il nome di magnetizzazione spontanea; sono ferromagnetici il ferro, il cobalto, il nickel e molte loro leghe;
- **antiferromagnetismo** ($\chi = 0 \div 10^{-2}$): caso opposto al precedente; vi è la presenza di sottoreti in cui i momenti magnetici sono disposti in maniera opposta; i momenti mostrano un allineamento antiparallelo e la risultante totale è nulla. Sono antiferromagnetici il manganese e molti ossidi (MnO, FeO, CoO);
- **ferrimagnetismo**: anche in questo caso si è in presenza di un doppio sottorete con allineamento dei momenti antiparallelo, ma la magnetizzazione è di ampiezza differente nelle due orientazioni, con conseguente momento magnetico totale non nullo che da origine ad una magnetizzazione spontanea. Sono ferrimagnetici la magnetite e altre ferriti.

Il caso delle nano particelle magnetiche è di grande interesse per via del fatto che la loro grandezza può essere paragonabile a quella di un dominio magnetico. Un dominio magnetico (denominato dominio di Weiss) si riferisce a un volume di materiale ferromagnetico in cui tutti i dipoli magnetici sono allineati nella stessa direzione. Perché una particella si trovi nelle condizioni di singolo dominio il diametro deve essere inferiore a

$$R_{sd} = 36 \frac{\sqrt{AK}}{\mu_0 M_s^2}$$

dove A è la costante di rigidità di scambio, K è la costante di anisotropia e M_s è la magnetizzazione di saturazione¹ del materiale.

Tabella 2.1: Diametri critici per diversi materiali

Materiale	R_{sd} (nm)
Cobalto(Co)	70
Ferro(Fe)	14
Nickel(Ni)	55
Magnetite(Fe_3O_4)	128
Maghemite($\gamma-Fe_2O_3$)	166

La reazione di materiali ferromagnetici in termini di magnetizzazione conseguente all'applicazione di un campo è descritta da un ciclo di isteresi (figura 2.2), caratterizzato da due parametri principali: rimanenza² e coercitività. Il valore di campo coercitivo³ è la proprietà di maggior interesse. Nel caso di NP superparamagnetiche il campo coercitivo ha forte dipendenza dalla grandezza della particella ed è stato dimostrato che, al diminuire delle dimensioni, aumenta fino ad un massimo e poi desce fino ad assumere un valore costante come mostrato nel grafico di figura 2.1 B.

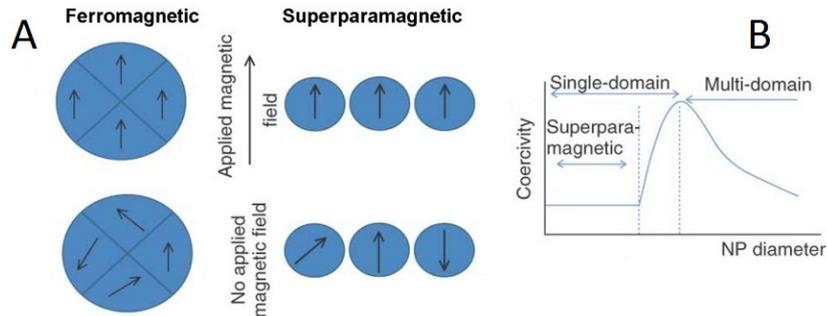


Fig. 2.1: **A:** disposizione dei domini magnetici per materiali ferromagnetici e superparamagnetici. **B:** andamento della coercività in funzione delle dimensioni di NP magnetiche.

¹Con saturazione si indica il massimo valore assoluto che la magnetizzazione di un materiale ferromagnetico può raggiungere, quando quest'ultimo sia sottoposto ad un campo magnetico esterno.

²Il valore della magnetizzazione a campo magnetico nullo.

³Campo magnetico da applicare per annullare la magnetizzazione del materiale.

Per una particella a singolo dominio, l'energia richiesta per invertire la magnetizzazione da una configurazione magnetica stabile verso un'altra, invertendo la polarizzazione dei domini magnetici, è proporzionale a $\frac{KV}{K_b T}$ dove V è il volume della particella, K_b è la costante di Boltzmann, K è la costante di anisotropia e T è la temperatura. Se l'energia termica è sufficiente a superare l'energia di anisotropia, la magnetizzazione non è più stabile e la particella si dice in questo caso superparamagnetica. Nelle particelle superparamagnetiche, le fluttuazioni termiche sono tali da provocare la smagnetizzazione spontanea di un assemblamento precedentemente saturato; perciò, queste particelle hanno coercitività nulla e non mostrano isteresi. Le nanoparticelle assumono comportamento magnetico in presenza di un magnete esterno, ma ritornano ad uno stato non magnetico quanto il magnete viene rimosso. Questo comportamento è analogo ai paramagneti convenzionali, con la sola differenza che nel caso delle nanoparticelle è il momento magnetico dell'intera particella che presenta questo comportamento e non i singoli dipoli magnetici a livello atomico, da cui il termine superparamagnetismo.

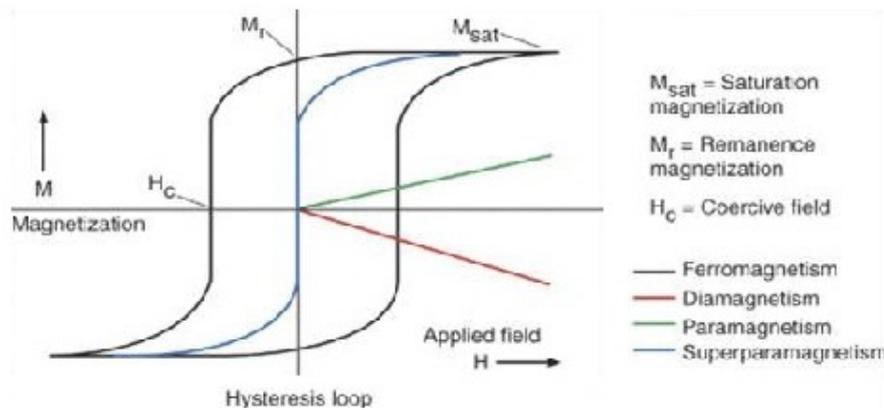


Fig. 2.2: Cicli di isteresi relativi a materiali diversi, classificati secondo le loro proprietà magnetiche.

La temperatura che permette ad una particella di smagnetizzarsi, superando l'energia di anisotropia, è detta temperatura di bloccaggio, T_B . Essa rappresenta il valore soglia tra la condizione di ferromagnetismo e di superpara-

gnetismo e può essere calcolata sperimentalmente con un magnetometro:

$$T_B = \frac{KV}{30K_B}$$

La temperatura di bloccaggio dipende dunque dalla costante di anisotropia K , dal volume della particella, dal campo magnetico applicato e dal tempo di misura. Vediamo quindi come questi parametri, in fase di sintesi, saranno di fondamentale interesse, infatti sia le dimensioni che la forma di una nanoparticella vanno ad influenzare la sua T_B e quindi le sue proprietà magnetiche.

2.2 Meccanismi di riscaldamento

Ci sono almeno quattro diversi meccanismi con cui i materiali magnetici possono generare calore in un campo magnetico alternato [9]:

- generazione di correnti parassite con grandezza $> 1\mu m$;
- perdite di isteresi in particelle magnetiche $> 1\mu m$ e particelle a multidominio magnetico;
- perdite per rilassamento in particelle superparamagnetiche;
- perdite per attrito in sospensioni viscosse.

Le perdite per rilassamento di sospensioni di nanoparticelle magnetiche si dividono in due categorie: Browniane e di Néel. Si parla di rilassamento di Néel nel caso in cui sia coinvolta la rotazione del momento magnetico e di rilassamento di Brown nel caso ci sia rotazione delle NP e produzione di calore per attrito.

Il principio di generazione del calore dovuto a rilassamento di Brown e Néel è mostrato in figura 2.3. Nel rilassamento di Néel, il momento magnetico, inizialmente bloccato lungo l'asse cristallino elementare, ruota allontanandosi da esso, verso quello del campo esterno. Il meccanismo di Néel è simile alle perdite di isteresi in particelle a multidominio magnetico nel senso che si

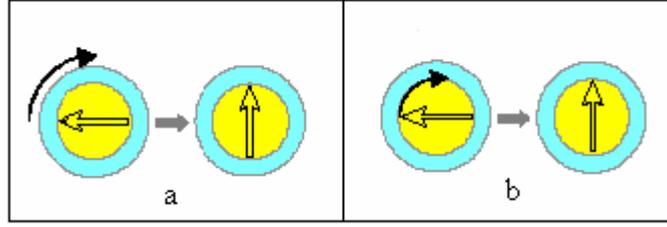


Fig. 2.3: Meccanismo di rilassamento di una MNP: a – Rilassamento Browniano, l'intera particella ruota nel fluido; b – Rilassamento di Néel, la direzione della magnetizzazione ruota nel nucleo. La freccia all'interno del nucleo rappresenta la direzione della magnetizzazione.

va a creare una specie di attrito interno dovuto al movimento del momento magnetico in un campo esterno; da qui ne risulta una generazione di calore. Nel rilassamento Browniano è l'intera particella oscilla contro l'attrito viscoso della sospensione. Questo meccanismo riscalda la sospensione di NP essenzialmente per attrito meccanico.

La densità di potenza prodotta dalle nanoparticelle sotto l'azione di un campo magnetico tempo-variante è:

$$P = \pi\mu_0\chi_0H_0^2f \frac{2\pi f\tau}{1 + (2\pi f\tau)^2}$$

dove μ_0 è la permeabilità del vuoto, $4\pi \cdot 10^{-7}H/m$; χ_0 è la suscettibilità di equilibrio; H_0 e f sono l'ampiezza e la frequenza del campo magnetico alternato; e τ è il tempo di rilassamento effettivo dato da da

$$\tau^{-1} = \tau_N^{-1} + \tau_B^{-1}$$

dove τ_N e τ_B sono rispettivamente i tempi di rilassamento di Néel e Brown. τ_N e τ_B sono calcolati rispettivamente come:

$$\tau_N = \frac{\sqrt{\pi}}{2}\tau_0 \frac{\exp(T)}{\sqrt{T}}$$

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k\Gamma}$$

dove τ_0 è il tempo medio di rilassamento in risposta ad una fluttuazione termica; η è la viscosità del mezzo; V_H è il volume idrodinamico delle MNP; k è la costante di Boltzmann, $1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$; T è la temperatura. Qui, $\Gamma = \frac{KV_M}{kT}$ e V_M è il volume della parte magnetica delle nanoparticelle. [10]

2.3 Temperatura di Curie

La temperatura di Curie viene definita come la temperatura alla quale un materiale cessa di avere proprietà ferromagnetiche o ferrimagnetiche e diventa paramagnetico. È una caratteristica intrinseca della sostanza ed è definibile per tutti i materiali, sebbene per i materiali antiferromagnetici venga definita come temperatura di Neel anche se il fenomeno è lo stesso.

Tale andamento (figura 2.4) è descritto nella seconda legge di Curie:

$\chi = \frac{C_c \rho}{T - T_c}$. C_c rappresenta la costante di Curie (caratteristica di ciascun materiale), ρ la densità del materiale, T_c la temperatura di Curie.

Un campione ferromagnetico sottoposto a riscaldamento mantiene le sue proprietà magnetiche fino al raggiungimento della temperatura di Curie. Il che vuol dire che è quindi in grado di assorbire potenza da

un campo magnetico esterno fino a che le dissipazioni di potenza di cui è sede gli facciano raggiungere una temperatura pari a T_c . Oltre questo limite, la sostanza assume caratteristiche paramagnetiche.

Questa proprietà è decisamente interessante per quanto riguarda l'impiego in ipertermia fluido magnetica. Utilizzando nanoparticelle composte da materiale avente temperatura di Curie compresa tra 42 e 43 °C è possibile prolungare l'esposizione al campo magnetico del paziente mantenendo comunque costante la temperatura. Questo fenomeno è garanzia di riscal-

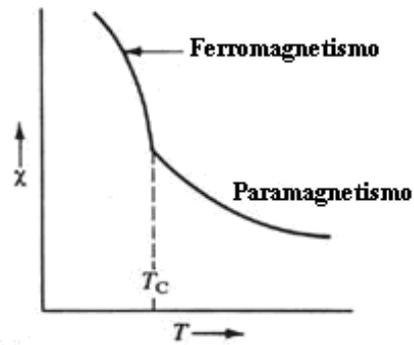


Fig. 2.4: Andamento della suscettività magnetica in funzione della temperatura.

damento uniforme: il campo magnetico infatti, può essere mantenuto finché tutte le particelle, indipendentemente dalla posizione occupata, raggiungano la temperatura ottimale (che corrisponde a quella di Curie). Risulta quindi evidente che se si utilizzano nanoparticelle con temperatura di Curie coincidente con la temperatura ideale di trattamento, non sarà necessario regolare il valore del campo magnetico applicato, con conseguente riduzione dei costi della strumentazione.

Capitolo 3

Tipi di nanoparticelle

In questo capitolo analizzeremo le varie produzioni di nanoparticelle e il loro impiego in base al materiale della quali sono costituite.

3.1 Metalli puri

Le nanoparticelle costituite da metalli puri quali ferro, cobalto e platino hanno una magnetizzazione maggiore rispetto a quello degli ossidi di metalli, il che le renderebbe interessanti per l'applicazione in ipertermia. Nonostante ciò non sono stabili all'aria in quanto facilmente ossidabili, il che risulta in una perdita o un cambiamento della loro magnetizzazione.

Fe. Il ferro è un materiale ferromagnetico e possiede un'alta densità di momento magnetico ($220 \text{ emu}^1/\text{g}$). La preparazione di nanoparticelle costituite da ferro è complicata per via del fatto che in quasi tutti i casi sono costituite da ossidi, carburi, etc ed è difficile eliminare completamente le impurità. È necessario mettere in evidenza come il ferro si presenti in tre forme allotropiche: $\alpha\text{-Fe}$, $\delta\text{-Fe}$ e $\gamma\text{-Fe}$, a seconda della temperatura. Le prime due hanno struttura cubica a corpo centrato e si differenziano per la dimensione della cella, mentre il ferro gamma presenta struttura cubica a facce centrate (Figura 3.1).

¹Nel sistema CGS $1 \text{ emu} = 1 \text{ erg/g} = 10^{-3} \text{ m}^2\text{A}$

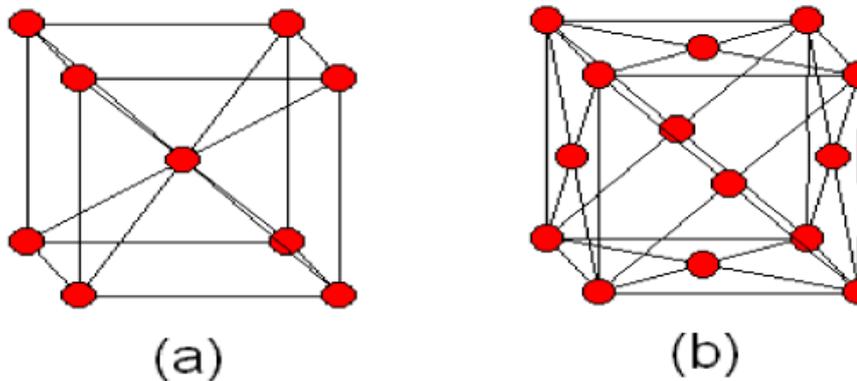


Fig. 3.1: **a** - reticolo a corpo centrato; **b** - reticolo a facce centrate.

Co. Come il ferro, il cobalto si presenta in due forme allotropiche diverse di tipo a corpo centrato o a facce centrate, a seconda che si trovi al di sotto o al di sopra della temperatura di 449 °C. Per metodi di sintesi di nanoparticelle di cobalto puro si rimanda a [11].

Ni. A differenza di ferro e cobalto, sulla sintesi di nanoparticelle di nichel sono state divulgate un numero esiguo di pubblicazioni. Nonostante ciò, l'interesse è crescente viste le sue numerose applicazioni anche in campi che esulano dal biomedico. Alcuni autori hanno osservato che l'ossidazione delle NP produce uno strato di rivestimento NiO che le rende particolarmente biocompatibili. [18]

3.2 Leghe metalliche

Fe-Co. Le leghe metalliche ferro-cobalto formano una struttura cristallina cubica a corpo centrato, con anisotropia cristallografica trascurabile. La magnetizzazione di saturazione di questo tipo di lega metallica è massima per una concentrazione del 35% del cobalto. È stato riportato, invece, per nanoparticelle di $Fe-Co$ un valore di magnetizzazione di saturazione massimo per un contenuto di cobalto del 40%. Il massimo valore di forza coercitiva è stato invece riportato per un contenuto dell'80% sul totale. [12]

Fe-Ni. A seconda del quantitativo di nichel presente, le leghe di ferro-nichel possono essere non magnetiche o leggermente ferromagnetiche. Proprietà ferromagnetiche si osservano quando il quantitativo in nichel è superiore al 30%. Le nanoparticelle, invece, presentano una magnetizzazione di saturazione molto bassa qualunque sia il rapporto tra i metalli. È stato osservato, per un quantitativo di nichel pari al 37% un basso valore della temperatura di Curie e una struttura cristallina cubica a facce centrate, in particelle di dimensioni che variano dai 12 agli 80 *nm*. Le nanoparticelle risultano superparamagnetiche in un range molto ampio di temperature. [13]

Fe-Pt. Le nanoparticelle di questo tipo sono risultate di interesse negli ultimi anni per via della loro applicazione nei dispositivi di *magnetic storage* e in magneti permanenti ad alte prestazioni. Le caratteristiche che le rendono candidate ideali sono la coercitività molto alta a temperatura ambiente e un valore molto elevato di anisotropia magnetocristallina (circa $6 \cdot 10^6 \text{ J/m}^3$) pari a 10 volte quella di una normale lega cobalto-cromo (materiale attualmente utilizzato) [14]. È disponibile un'ottima letteratura sui metodi di sintesi e sulle proprietà delle nanoparticelle di Fe-Pt [15].

Co-Pt. Anche le nanoparticelle Co-Pt, per le loro notevoli proprietà magnetiche e la loro stabilità sono considerate importanti per dispositivi di *magnetic storage* ad alta densità per via del fatto che sono chimicamente stabili e hanno anisotropia magnetocristallina molto alta $\sim 4 \cdot 10^6 \text{ J/m}^3$.

3.3 Ossidi di ferro

Il crescente interesse nei confronti delle nanoparticelle di ossidi di ferro è dovuto al loro esteso range di applicazioni, tra cui *magnetic recording media*, catalitici, pigmenti, sensori di gas, strumenti ottici e dispositivi elettromagnetici. Si presentano in numerose varietà di strutture e le loro proprietà magnetiche tendono cambiare a seconda delle dimensioni e del loro stato di idratazione. Le nanoparticelle di ossido di ferro sono risultate le candidate ideali per l'applicazione in campo medico grazie alla loro scarsa tossicità, l'alta magnetizzazione di saturazione e l'alta suscettibilità magnetica. Per definizione, a seconda delle loro dimensioni, le nanoparticelle di ossidi

di ferro sono classificate in base alla loro dimensione in SPIO (superparamagnetic iron oxide particle), che hanno diametro superiore ai 30 nm e USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxide particle) con diametro inferiore ai 30 nm. Una sintesi di nanoparticelle magnetiche di dimensione controllata verrà descritta in dettaglio nel capitolo 4.

Fe₂O₃ Tra le varie strutture cristalline di Fe₂O₃ ci sono tre fasi magnetiche, hematite romboidale α-Fe₂O₃, maghemite cubica γ-Fe₂O₃ e la meno conosciuta fase ε. Nella struttura dell'α-Fe₂O₃, tutti gli ioni Fe³⁺ hanno coordinazione ottaedrica, mentre nel γ-Fe₂O₃ ha la struttura di uno spinello cation-deficiente AB₂O₄, nella quale gli ioni metallici occupano sia i siti tetraedrici (A) che quelli ottaedrici (B). Nella struttura dell'α-Fe₂O₃, tutti gli ioni Fe³⁺ hanno coordinazione ottaedrica, mentre

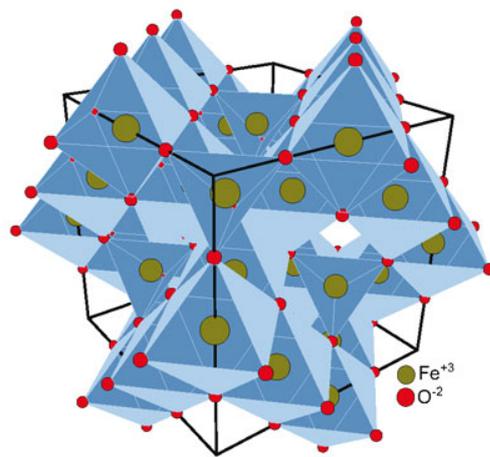


Fig. 3.2: Struttura di un cristallo di maghemite.

il γ-Fe₂O₃ ha la struttura di una spirale cation-deficiente AB₂O₄, nella quale gli ioni metallici occupano sia i siti tetraedrici (A) che quelli ottaedrici (B). L'ematite è antiferromagnetica a temperature inferiori a 950 K mentre sopra i 260 K esibisce quello che viene detto ferromagnetismo debole. La maghemite è ferromagnetica per temperature inferiori ai 950 K e spesso è ottenuta dopo un processo di ossidazione su nanoparticelle di magnetite (Fe₃O₄).

Fe₃O₄ (Magnetite) La magnetite presenta caratteristiche interessanti soprattutto per la presenza di cationi di ferro nei due stati di valenza Fe²⁺ e Fe³⁺. La magnetite (che si presenta soprattutto in forma cubica) è ferromagnetica per temperature sotto gli 858 K. La più comune strategia di sintesi consiste nel trattamento di una soluzione acquosa di sali di ferro (Fe²⁺ e Fe³⁺) con una base in atmosfera inerte. In alcuni casi, la decomposizione termica di composti contenenti ioni Fe³⁺, in assenza di ossigeno è accompagnata da una parziale riduzione di Fe³⁺ in Fe²⁺.

La necessità di rendere le nanoparticelle solubili in soluzioni acquose, quindi fisiologicamente compatibili, per la loro applicazione in campo biomedico, rappresenta un ostacolo che si sta cercando di superare tramite l'utilizzo di numerosi tipi di leganti e tensioattivi².

FeO (Wustite). La wustite è un ossido cubico di Fe^{2+} ed è antiferromagnetico ($T_c=185$ K) nel suo stato naturale. Tramite macinazione coingiunta di polveri di Fe_2O_3 e Fe, in un determinato rapporto, si ottengono nanoparticelle (5 ± 10 nm) che consistono di FeO e Fe [17]. Se riscaldate alla temperatura di 250-400 °C, la fase metastabile di FeO disproporziona a Fe_3O_4 e FeO, per poi riconvertirsi in struttura nanocristallina FeO alla temperatura di 550 °C.



Fig. 3.3: Cristalli cubici di magnetite.

3.4 Altri tipi di nanoparticelle

α -FeOOH (Goetite). Tra i più comuni ossidi-idrossidi $Fe_2O_3 \cdot H_2O$, l'ortorombico α -FeOOH (goetite) è antiferromagnetico nello stato naturale e ha temperatura di Curie $T_C = 393$ K. β -FeOOH (akagenite) è paramagnetica a 300 K, γ -FeOOH (ferroxyite) è ferrimagnetica. Nonostante allo stato naturale α -FeOOH sia antiferromagnetica, in forma di nanoparticella ha momento magnetico non nullo dovuto all'incompleta compensazione dei momenti magnetici dei sublattici. In generale, α -FeOOH è presente nelle NP come fase mista. [18]

²I tensioattivi o surfactanti (talvolta chiamati anche surfattanti) sono sostanze che hanno la proprietà di abbassare la tensione superficiale di un liquido, agevolando la solubilità in acqua o la miscibilità tra liquidi diversi.

Fe_xC_y . Carburi di ferro sono spesso presenti in nanoparticelle contenenti ferro. La loro formazione può avvenire o per decomposizione di legami organici presenti nei composti precursori o per la reazione del Fe con il mezzo organico in cui la sintesi è condotta.

CoO L'ossido di cobalto cubico è antiferromagnetico e ha $T_N^3=291$ K. Il monossido di cobalto è stato impiegato nella scoperta dell'*exchange shift* della curva di isteresi, trovata per prima in campioni di nanoparticelle di Co ossidate. [19]

3.5 Ferrofluidi

Si definiscono ferrofluidi o liquidi magnetici le sospensioni di particelle magnetiche colloidali, stabilizzate da tensioattivi in un mezzo liquido. La fase magnetica nei ferrofluidi può essere rappresentata da magnetite, ferrite o composti del tipo Fe_xC_y .

³ T_N : punto di Néel, la temperatura al di sopra della quale un materiale antiferromagnetico perde il suo antiferromagnetismo e diventa paramagnetico.

Capitolo 4

Metodi di sintesi delle nanoparticelle

Negli ultimi decenni, sono state sviluppate numerose ricerche sulla sintesi di nanoparticelle di ossidi di ferro. Nella maggior parte delle applicazioni, ciò che si richiede sono: stabilità e uniformità relativamente alla dimensione e alla struttura (morfologia) della particella e biocompatibilità nelle applicazioni in campo biomedico. Una caratteristica fondamentale della loro sintesi è la preparazione di particelle di specifica forma e dimensione. La dimensione dovrebbe avere quantomeno una distribuzione statistica nelle dimensioni stretta (del 5-10%) e controllabile. Il controllo della forma delle NP è importante nella sintesi di strutture magnetiche anisotropiche.

4.1 Il problema della sintesi

È noto come le caratteristiche fisiche delle nanoparticelle siano sostanzialmente dipendenti dalle loro dimensioni. Sfortunatamente, la maggior parte dei metodi attualmente conosciuti producono nanoparticelle che possiedono una distribuzione statistica nelle dimensioni con una dispersione attorno alla media molto elevata. Un meticoloso controllo dei parametri della reazione (tempo, temperatura, velocità di mescolamento e concentrazione dei rea-

genti e degli additivi) non contribuisce abbastanza alla riduzione di questa dispersione nel range richiesto all'applicazione.

La strategia comunemente usata nella sintesi di NP monodisperse consiste nel separare la fase di nucleazione e di accrescimento durante la sintesi. Nella teoria descritta da LaMer [12], un *burst nucleation* avviene quando i monomeri aumentano rapidamente oltre la supersaturazione critica, senza la seguente formazione di nuclei. I nuclei prodotti crescono quindi con lo stesso tasso, dando particelle monodisperse. È dunque importante che la fase di nucleazione e crescita avvengano temporalmente separate per far sì che il diametro delle nanoparticelle prodotte sia effettivamente dell'ordine desiderato. Le nanoparticelle hanno un rapporto area-volume (SAV)¹ estremamente alto e perciò vanno facilmente incontro ad un fenomeno di agglomerazione, di modo da minimizzare la loro energia superficiale. Il problema può essere risolto introducendo altri leganti che si sostituiscano ai cristalli nei legami superficiali ad alta energia. Perciò, assieme allo sviluppo di metodi per la sintesi di nanoparticelle con una distribuzione di dimensioni con una dispersione attorno alla media bassa, è stato necessario perfezionare le tecniche di separazione delle nanoparticelle allo scopo di ottenere frazioni monodisperse. Per questo scopo, si usano precipitazioni controllate di particelle da soluzioni stabilizzanti tensioattive, seguite da una centrifugazione. Dopo un periodo di decantazione, il precipitato può essere nuovamente dissolto e soggetto a precipitazione/centrifugazione. Il processo è ripetuto fino a che le frazioni di nanoparticelle con specifiche dimensioni e dispersione sono ottenute. Infine, la procedura di sintesi dovrebbe essere il più possibile semplice, economica e riproducibile, per consentirne una comoda diffusione.

¹Si definisce *Surface-to-volume-ratio* o *SAV* il rapporto tra l'area superficiale e il volume di un oggetto. È un importante fattore per la reattività di un materiale.

4.2 Tipologie di sintesi di NP di ossidi di ferro

I metodi di generazione di nanoparticelle magnetiche nella fase solida o gassosa utilizzando trattamenti ad alta energia del materiale sono chiamati fisici, mentre le sintesi che vengono condotte in soluzioni a temperatura moderata sono metodi chimici. Questi ultimi si sono sviluppati in maniera più intensiva negli ultimi anni; nonostante ciò i metodi fisici non sono da considerarsi ancora obsoleti.

I processi di tipo chimico grazie al controllo dei vari parametri permettono di avere maggior controllo nei vari stadi di cristallizzazione, crescita e agglomerazione delle particelle. I metodi più comuni includono co-precipitazione, microemulsione, sintesi idrotermica e sintesi sonochimica. Altri metodi sono costituiti da sintesi elettrochimica [23], tecniche di pirolisi al laser [24], sintesi tramite batteri o microorganismi [25].

4.2.1 Co-precipitazione

Caratteristiche generali:

- facile realizzazione
- basse temperature (<90 °C)
- durata ridotta (minuti)
- scarso controllo sulla struttura
- quantità di prodotto alta
- dimensioni tra 20-30 *nm*

La tecnica della co-precipitazione costituisce un modo facile e conveniente per sintetizzare ossidi di ferro quali maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o magnetite (Fe_3O_4), a partire da soluzioni acquose di sali $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, tramite l'aggiunta di una base, in atmosfera inerte, a temperatura ambiente o a temperature

elevate. Le dimensioni e la forma delle nanoparticelle magnetiche che vengono prodotte dipendono fortemente dal tipo di sali utilizzati (cloridi, solfati, nitrati), il rapporto Fe^{2+}/Fe^{3+} , la temperatura di reazione, il valore di pH, la forza ionica dei mezzi e altri parametri di reazione (velocità di mescolamento, velocità di inserimento della soluzione basica). Una caratteristica importante di questo tipo di sintesi è la completa riproducibilità della qualità delle nanoparticelle di magnetite, una volta fissate le condizioni di sintesi.

Questo metodo va a modificare le proprietà magnetiche del materiale di partenza. In particolare, i valori di saturazione magnetica delle nanoparticelle di magnetite sono determinate sperimentalmente e sono compresi nel range di 30-50 emu/g , valore inferiore rispetto ai 90 emu/g del ferro, in condizioni normali. Le particelle di magnetite non sono particolarmente stabili in condizioni normali poichè tendono ad ossidarsi a maghemite o a dissolversi in soluzione acida. Per evitare la possibile ossidazione nell'aria, la sintesi di nanoparticelle Fe_3O_4 deve essere svolta il più possibile in condizioni anaerobiche. Tuttavia, basandosi su questa proprietà, nanoparticelle di Fe_3O_4 possono quindi essere utilizzate per preparare nanoparticelle di Fe_2O_3 tramite ossidazione o di annealing in atmosfere di ossigeno.

Poichè la temperatura di bloccaggio dipende dalla dimensione della particella, una ampia distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle porterà ad un ampio range di temperature di bloccaggio e quindi in un comportamento non ideale per molte applicazioni. Le particelle preparate tramite coprecipitazione, sfortunatamente tendono ad essere abbastanza poli-disperse. È noto come una veloce fase di nucleazione, seguita da una lenta e controllata fase di crescita, è fondamentale per produrre particelle monodisperse. Il controllo di questi processi è dunque fondamentale nella produzione di nanoparticelle monodisperse.

4.2.2 Decomposizione termica

Caratteristiche generali:

- facile realizzazione
- elevate temperature (100-320 °C)

- durata variabile da ore a giorni
- ottimo controllo sulla struttura
- quantità di prodotto alta
- dimensioni tra 4-60 *nm*

Per via della loro natura instabile, i composti organometallici si decompongono facilmente se sottoposti ad agitazioni, calore, luce o anche suono.

Il trattamento più comune consiste nella decomposizione di composti organometallici, in solventi ad alta temperatura di evaporazione, contenenti tensioattivi stabilizzanti. I precursori organometallici possono includere metalli acetilacetoni $[M(\text{acac})_n]$, (dove $M = \text{Fe, Mn, Co, Ni, Cr}$; $n = 2$ or 3 , $\text{acac} = \text{acetilacetato}$), metalli cupferronati o carbonili. Come tensioattivi, vengono solitamente impiegati acidi grassi, acido oleico e hexadecilamina. I carbonili metallici, essendo molto reattivi, sono particolarmente utilizzati poichè hanno una forte tendenza a dissociare i loro gruppi carbonili, quando riscaldati, consentendo i loro centri metallici ad andare incontro alla nucleazione e alla crescita in nanoparticelle.

I parametri che principalmente definiscono il controllo delle dimensioni e della morfologia delle nanoparticelle sono i rapporti delle quantità dei reagenti, ossia dei composti organometallici, dei tensioattivi e dei solventi. Altri fattori che vanno a influenzare il risultato della sintesi sono la temperatura di reazione, la sua durata temporale e il suo periodo di invecchiamento.

Questa tecnica sta riscuotendo molto successo soprattutto grazie al perfetto controllo di parametri fondamentali quali la dimensione delle particelle e la loro struttura e forma. Il suo svantaggio è costituito dal fatto che, spesso, le nanoparticelle così prodotte sono dissolte solamente in solventi non polari oppure viene richiesto l'utilizzo di tensioattivi poco bio-compatibili.

4.2.3 Microemulsione

Caratteristiche generali:

- difficile realizzazione

- temperature molto basse ($<50^{\circ}\text{C}$)
- durata dell'ordine di qualche ora
- buon controllo sulla struttura
- quantità di prodotto bassa
- dimensioni tra 2-5 nm

La microemulsione consiste nella dispersione isotropica, termodinamicamente stabile, di due liquidi non mescolabili sotto la presenza di un tensioattivo. Nelle microemulsioni di acqua in olio, la fase acquosa è dispersa a formare delle micro-goccioline (di diametro tra 1-50 nm) circondate da un sottile strato di molecole del tensioattivo. Le code idrofobiche si dissolvono nell'olio mentre le teste idrofiliche nell'acqua.

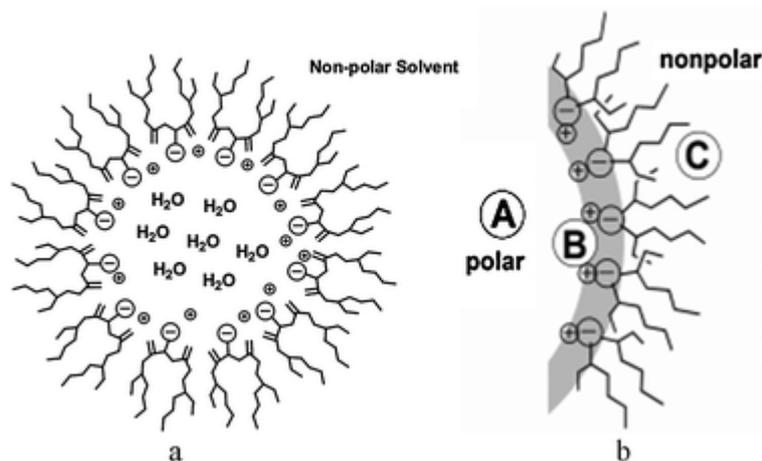


Fig. 4.1: Disposizione dei tensioattivi nelle molecole d'acqua in fase oleosa.

La dimensione della micella invertita² che si viene a formare è determinata dal rapporto molare tra acqua e tensioattivo. Mischiando due microemulsioni identiche di acqua in olio, contenenti i reagenti desiderati, le microgoccioline

²Una micella è un aggregato di molecole in fase colloidale, in genere con proprietà tensioattive e/o anfifiliche. Nei solventi polari in genere la parte idrofobica e lipofila si orienta all'interno di una sfera, mentre la parte idrofila si orienta all'esterno. In solventi apolari l'orientamento è inverso (si parla di micella inversa).

collidono ripetutamente, formando il precipitato. Con l'aggiunta di solventi quali acetone o etanolo, il precipitato può essere estratto tramite filtraggio o centrifuga. Poichè nei sistemi acqua/tensioattivo o olio/tensioattivo si vanno a formare strutture assemblate di vario tipo, le quali possono essere studiate e indotte, la microemulsione consente un controllo notevole sulla forma e la dimensione delle nanoparticelle.

Tramite questa tecnica sono state sintetizzate nanoparticelle di cobalto metallico, lega cobalto/platino e cobalto/patino avvolte in oro, in micelle invertite di bromide cetiltrimetilammonio, utilizzando 1-butanolo come tensioattivo e ottano come olio.

Nonostante l'impiego di tensioattivi, questo tipo di sintesi richiede comunque una serie di processi di lavaggio e di trattamenti stabilizzanti successivi per separare al meglio le nanoparticelle.

4.2.4 Sintesi idrotermica

Caratteristiche generali:

- facile realizzazione
- elevate temperature e pressioni
- durata variabile da ore a giorni
- ottimo controllo sulla struttura
- quantità di prodotto non troppo elevata
- dimensioni tra 30-200 *nm*

Con sintesi idrotermica (o idrotermale) si definiscono le varie tecniche per cristallizzare sostanze partendo da soluzioni acquose, partendo da alte temperature, ad alte pressioni di vapore. Il processo si basa sul trasferimento di fase e i meccanismi di separazione che si hanno sull'interfaccia di incontro tra fase liquida, solida e la soluzione che si manifestano durante la sintesi.

La crescita dei cristalli avviene in un sistema formato da un contenitore da acciaio a pressione detto autoclave, nel quale la fonte di ioni Fe(II/III) e

l'acqua vengono aggiunti. Viene mantenuto un controllo di temperatura alle estremità della camera di crescita di modo che l'estremità più calda dissolva i reagenti e quella più fredda provochi la nucleazione e la crescita. La sintesi avviene in contenitori sigillati partendo da soluzioni acquose portate ad alta temperatura (da 130 a 250 °C) ed elevata pressione (0,3 a 4 Mpa). Questo metodo oltre a permettere di ottenere singole particelle cristallizzate, porta alla produzione di nanoparticelle di ossidi di ferro che godono di una miglior cristallizzazione rispetto a quella ottenuta con altri metodi.

Grazie al basso costo e consumo di energia, il processo idrotermico può essere scalabile per produzione industriale, inoltre consente di scegliere tra numerosi solventi o miscele, aumentando così la versatilità della sintesi.

4.2.5 Sintesi sonochimica

Caratteristiche generali:

- facile realizzazione
- temperatura ambiente
- durata dell'ordine di qualche ora
- buon controllo sulla struttura
- quantità di prodotto non troppo elevata
- dimensioni tra 4-12 *nm*

L'impiego di ultrasuoni in un liquido causa un fenomeno detto cavitazione acustica che consiste nella formazione, crescita e implosione di bolle di piccole dimensioni. Il collasso implosivo delle bolle genera un punti di calore localizzati, tramite compressione adiabatica o formazione di onde d'urto all'interno della fase gassosa della bolla. Sperimentalmente sono state determinati transienti di temperatura di 5000 *K* e pressioni di 1800 *atm*, con una velocità di raffreddamento di 1010 *K/s*. [20] Queste condizioni estreme sono risultate produttive per la sintesi di NP e determinano un effetto a cesoia

che permette anche un controllo sull'agglomerazione. Questo metodo è stato applicato per la sintesi di vari nanocomposti e la sua versatilità è stata dimostrata con successo nella preparazione di NP di ossidi di ferro. [21]

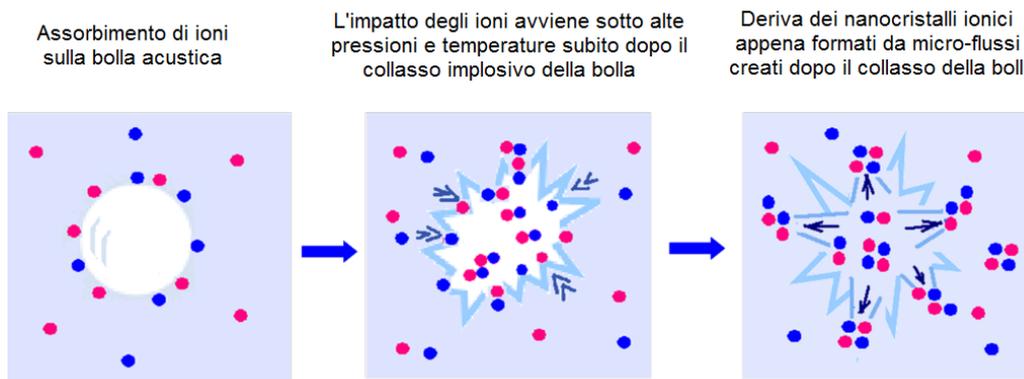


Fig. 4.2: Descrizione delle fasi del processo sonochimico.

4.2.6 Pirolisi laser

Caratteristiche generali:

- complessa realizzazione
- temperatura elevate (320 °C)
- durata dell'ordine di qualche minuto
- accurato controllo sulla struttura
- quantità di prodotto elevate
- dimensioni tra 3-5 *nm*

Il metodo prevede di riscaldare una miscela di gas con un laser ad anidride carbonica ad onda continua necessario per innescare la reazione. Oltre un certo valore di pressione e di potenza del fascio laser, si raggiunge una

concentrazione critica dei nuclei nella zona di reazione, che comporta un processo di nucleazione uniforme delle particelle che sono poi spinte in un filtro grazie ad un gas inerte.

Partendo da ferro pentacarbonile, cristalli uniformi e puri di $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ possono essere ottenuti in un unico step con l'utilizzo di un laser ad anidride carbonica [22]. Si ottengono particelle con dimensione compresa tra 3,5 e 5 nm. La figura 4.3 mostra un tipico esempio di configurazione per la realizzazione della pirolisi laser.

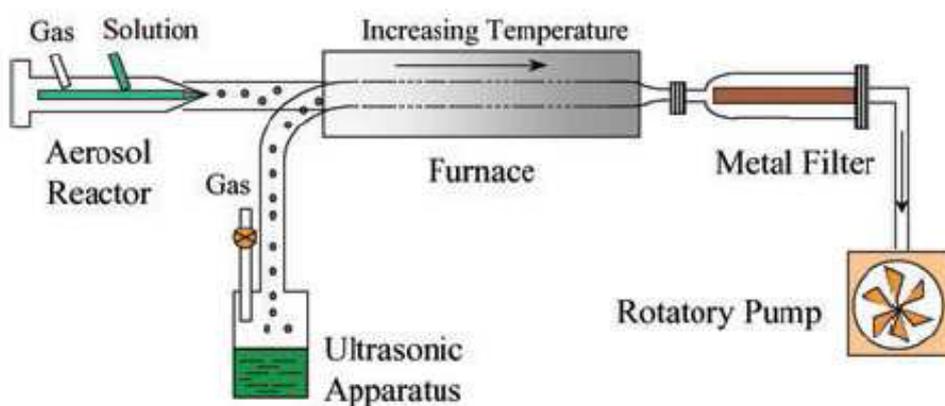


Fig. 4.3: Configurazione di un laser usato per la pirolisi.

Si viene a creare nella camera di reazione una piccola zona di reazione dove si ha la sovrapposizione del flusso di gas verticale e il fascio laser orizzontale. Ovviamente questa camera è separata dalle pareti esterne dell'apparato. Questo garantisce un ambiente ideale per la nucleazione di particelle di piccole dimensioni impedendo contaminazione e garantendo una precisione irraggiungibile con altri metodi.

Capitolo 5

Risultati sperimentali

5.1 Reagenti e solventi

Segue l'elenco dei reagenti e dei solventi utilizzati nelle sintesi riportate nel presente lavoro.

Nome composto	Formula	Peso molecolare	Purezza	Produttore
Acido 11-ammino undecanoico	$C_{11}H_{23}NO_2$	201.31 <i>g/mol</i>	>97%	Sigma-Aldrich
Acido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	282.46 <i>g/mol</i>	>90%	Sigma-Aldrich
Ammonio idrossido soluzione in acqua	NH_4OH	35.05 <i>g/mol</i>	Conc. 30 wt. %	Sigma-Aldrich
Cloruro di ferro(II) tetraidrato	$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	198.81 <i>g/mol</i>	>99.0%	Sigma-Aldrich
Cloruro di ferro(III) esaidrato	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270.30 <i>g/mol</i>	>97%	Sigma-Aldrich
Diclorometano	CH_2Cl_2	84.93 <i>g/mol</i>	>99.9%	Sigma-Aldrich
Glicole dietilenico dimetiletere	$C_6H_{14}O_3$	134.18 <i>g/mol</i>	>99%	Carlo Erba

Metanolo	CH_3OH	32.04 g/mol	>99%	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -esano	C_6H_{14}	86.18 g/mol	>95%	Sigma-Aldrich
Sodio di-idrogeno fosfato	NaH_2PO_4	156.01 g/mol	>98%	Merck
Sodio idrossido	$NaOH$	40.00 g/mol	>98%	Sigma-Aldrich
Tetraidrofurano	C_4H_8O	72.11 g/mol	>98%	Sigma-Aldrich
Tetrametilammonio idrossido soluzione in metanolo	$C_4H_{12}NOH$	201.31 g/mol	Conc. 25 wt. %	Sigma-Aldrich

Reagenti e solventi sono stati usati direttamente come forniti dal produttore, senza ulteriori purificazioni. L'acqua utilizzata è stata deionizzata su colonna a scambio ionico. La soluzione tampone a pH 7.5 (in seguito tampone fosfato) viene preparata subito prima dell'uso sciogliendo le opportune quantità di sodio di-idrogeno fosfato (NaH_2PO_4 , 5.5 mmol) e sodio idrossido ($NaOH$, 4.5 mmol) in acqua deionizzata (100 ml) fino a raggiungere il pH nominale.

5.2 Strumentazione

L'analisi IR è stata effettuata con uno spettrofotometro FT-IR Perkin-Elmer Spectrum 100 depositando una goccia di sospensione in *n*-esano contenente le nanoparticelle su KBr e procedendo, dopo evaporazione del solvente alla preparazione di una pastiglia per compressione.

L'analisi TEM è stata effettuata con uno strumento TEM FEI Tecnai G12, operando a 100KV dal Dott. Federico Caicci presso i Laboratori di Microscopia Elettronica (LME) del Dipartimento di Biologia. Il campione è stato preparato depositando una goccia di sospensione in *n*-esano contenente le nanoparticelle su retini di tipo "carbon coated" di rame da 400 mesh.

5.3 Sintesi delle nanoparticelle di magnetite (Fe_3O_4) protette con acido oleico [1]

Reazione:



In un pallone a tre colli da 500 ml si sono sciolti 5.00 g di cloruro di ferro(II) tetraidrato ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 25.0 mmol) e 13.50 g di cloruro di ferro(III) esaidrato ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 50.0 mmol) in 150 ml di acqua deionizzata. Mantenendo il sistema sotto vigorosa agitazione meccanica, si aggiungono 12.5 ml di soluzione di ammonio idrossido (NH_4OH). Si osserva la soluzione scurirsi rapidamente al marrone scuro. Si aggiunge goccia a goccia altra soluzione di ammonio idrossido (Figura 5.1) fino a raggiungere pH 11 (controllato attraverso carta al tornasole). Si pone il pallone in un bagno ad acqua termostata a 60 °C e si aggiungono al sistema 7.5 ml di acido oleico (5 % v/v). Si mantiene in vigorosa agitazione per 30 minuti (Figura 5.2) e si riporta a temperatura ambiente.

5.4 Purificazione delle nanoparticelle di magnetite e dispersione in *n*-esano

Si estraggono le nanoparticelle magnetiche utilizzando un'ancoretta magnetica e si pongono in un bicchiere. Si lavano ripetutamente con acqua deionizzata, separandole magneticamente di volta in volta. Si portano a secchezza sotto vuoto e a temperatura ambiente utilizzando un pompa rotativa. Si disperdono in 250 ml di *n*-esano ottenendo una sospensione limpida di colore arancio/bruno scuro.



Fig. 5.1: La soluzione di ammonio idrossido viene aggiunta lentamente nel pallone.



Fig. 5.2: Agitazione meccanica del contenuto del pallone.

5.5 Analisi spettroscopica FT-IR delle nanoparticelle disperse in *n*-esano.

Le nanoparticelle sintetizzate sono state caratterizzate attraverso spettroscopia infrarossa (FT-IR), la quale fornisce indicazioni sulla composizione chimica attraverso l'analisi dei segnali relativi alle transizioni vibrazionali dei legami chimici presenti.

La Fig. 5.3 mostra lo spettro misurato su un campione di NP disperse in matrice solida di KBr. Si possono osservare chiaramente i due segnali relativi ai modi vibrazionali dei legami Fe-O nella magnetite (589 e 628 cm^{-1}) [26]. La presenza delle molecole di oleato sulla superficie delle nanoparticelle è confermata dai segnali a 1410 cm^{-1} relativo al modo di stretching simmetrico del gruppo carbossilato (-COO-) e a 1632 cm^{-1} relativo allo stretching del doppio legame C=C.

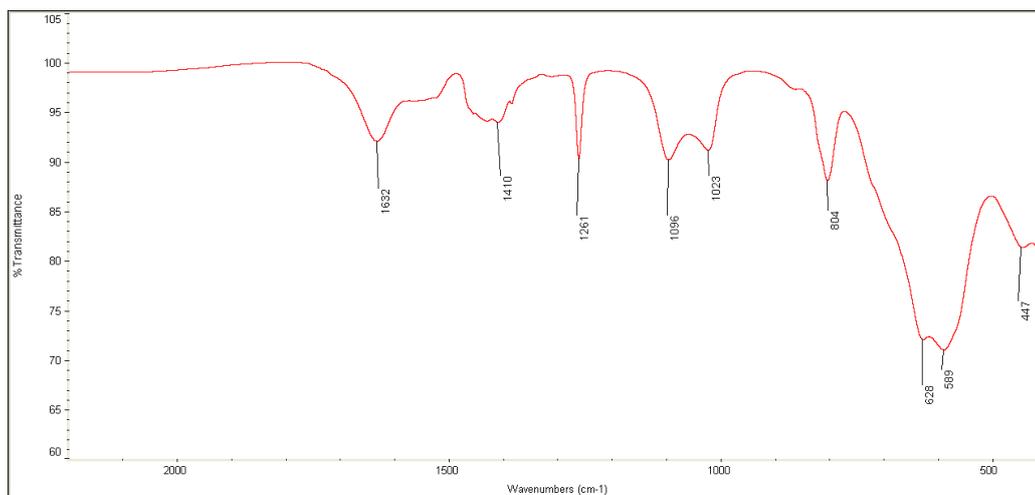


Fig. 5.3: Spettro FT-IR in trasmissione delle NP in KBr tra 400 e 2200 cm^{-1} .

Lo spettro condotto tra 2200 e 4000 cm^{-1} (Fig. 5.4) conferma la presenza dei gruppi protettori oleato con i segnali relativi allo stretching simmetrico dei gruppi CH_2 (2853 cm^{-1}), allo stretching asimmetrico degli stessi (2924 cm^{-1}) e a quello asimmetrico dei gruppi CH_3 (2960 cm^{-1}).

Si osserva infine un debole segnale a 3009 cm^{-1} relativo allo stretching del

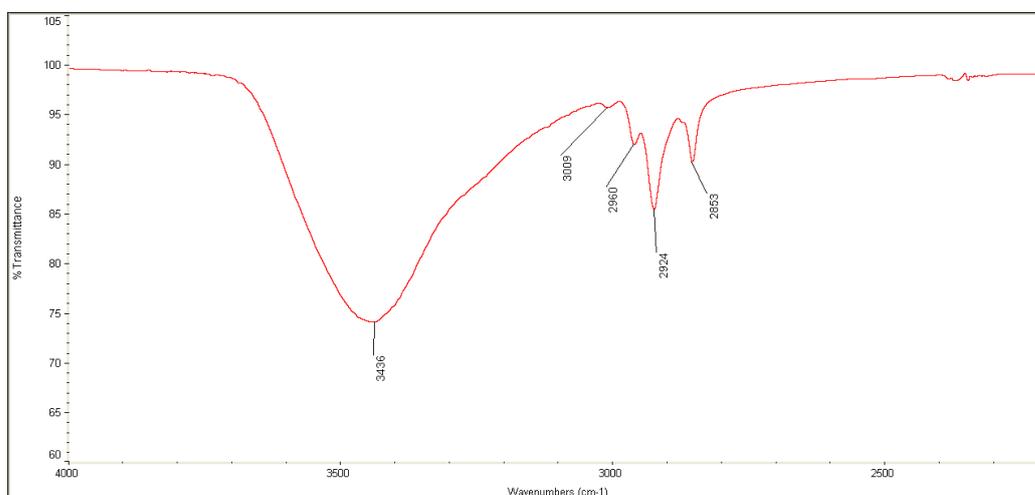


Fig. 5.4: Spettro FT-IR in trasmissione delle NP in KBr tra 2200 e 4000 cm^{-1} .

legame C-H sul doppio legame. La banda allargata a 3436 cm^{-1} di stretching del legame O-H è dovuta alla presenza di molecole d'acqua assorbite sulle NP e comunque presenti nella matrice di KBr.

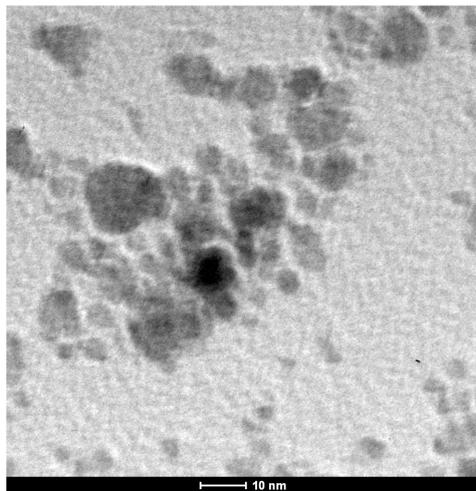
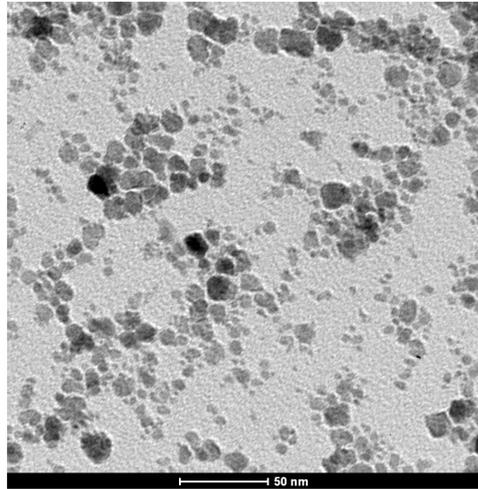
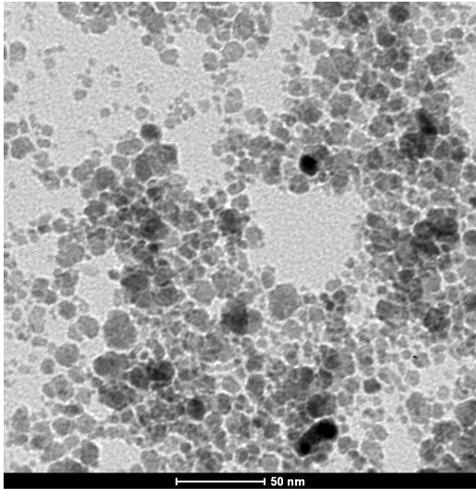
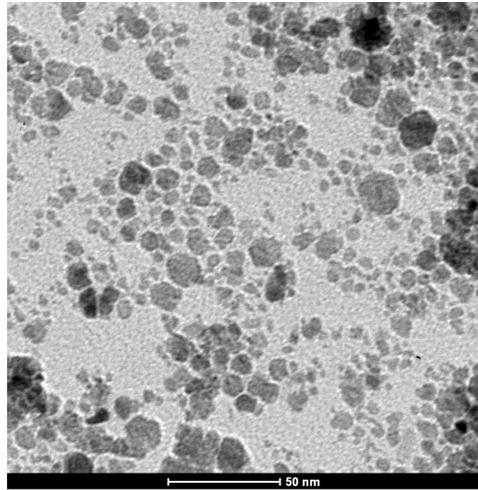
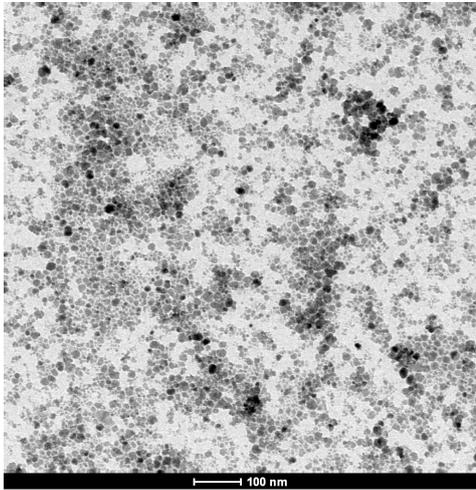
5.6 Analisi micrografica TEM delle nanoparticelle disperse in *n*-esano

Come indicato in precedenza, una goccia di un campione diluito in *n*-esano della sospensione di NP preparata è stato depositato su di un retino porta campioni in rame (carbon-coated) e lasciato evaporare.

Si sono ricavate micrografie ad ingrandimento progressivo su più punti del campione per ottenere un'indicazione più precisa della distribuzione ed omogeneità dimensionale delle NP.

Si riporta di seguito una selezione delle immagini ottenute a progressivo ingrandimento. Per ciascuna è riportato in basso il righello di riferimento per la determinazione delle dimensioni.

Come si può osservare, le NP sono di forma piuttosto irregolare, hanno dimensioni poco omogenee ancorché limitate al singolo dominio e tendenza all'aggregazione. Il diametro misurato su un campione di 100 NP risulta



compreso nell'intervallo 3 – 17 *nm*.

Le NP così ottenute, essendo liposolubili (disperdibili in solventi apolari) richiedono per l'applicazione a sistemi biologici il trattamento con opportuni tensioattivi per renderle polari e, possibilmente, idrosolubili. Si è quindi proceduto alla preparazione del tensioattivo 11-ammino-undecanoato di tetrametilammonio e al trattamento delle NP.

5.7 Sintesi del tensioattivo 11-ammino-undecanoato di tetrametilammonio. [2]

Reazione:



In un pallone a due colli da 250 *ml* si sospendono 10.00 *g* di acido 11-amminoundecanoico ($NH_2(CH_2)_{10}COOH$, 49.7 *mmol*) in 100 *ml* di metanolo, in atmosfera inerte (N_2). Si aggiunge la soluzione di tetrametilammonio idrossido in metanolo ($N(CH_3)_4OH$) lentamente fino a pH neutro (18.20 *ml*). Si porta a secchezza la sospensione bianca sotto vuoto a temperatura ambiente utilizzando un pompa rotativa. Si riprende il solido bianco con 100 *ml* di tetraidrofurano a caldo (50 °C). Si lascia ricristallizzare per raffreddamento e si filtra il solido su Gooch. Si secca sotto vuoto e si conserva sotto atmosfera inerte.

5.8 Trattamento delle nanoparticelle con tensioattivo, purificazione e dispersione in tampone fosfato

Si preleva un'aliquota di 10 *ml* di sospensione in *n*-esano di nanoparticelle magnetiche e si porta a secchezza. Il residuo solido (60 *mg*) viene ridisperso in 0.6 *ml* di *n*-esano e trattato con una soluzione di 60 *mg* di 11-ammino-undecanoato di tetrametilammonio in 6 *ml* di diclorometano anidro. Si osserva la precipitazione di un



solido marroncino che viene **Fig. 5.5:** Il risultato della sintesi disperso in acqua deionizzata.

separato con un magnete e lavato 3 volte con 5 *ml* di diclorometano e seccato sotto vuoto. Il residuo viene disperso in 45 *ml* di acqua deionizzata e 5 *ml* di tampone fosfato ottenendo una sospensione limpida colore arancio/bruno scuro.

Capitolo 6

Conclusioni e prospettive

La sintesi per via chimica (bottom-up) di nanoparticelle magnetiche consente in generale di ottenere una più accurata regolazione delle loro dimensioni e della loro morfologia, aprendo ad un ampio spettro di possibilità per quanto riguarda la loro stabilizzazione e/o funzionalizzazione superficiale.

Nella presente tesi si è preso in considerazione il metodo della coprecipitazione, che consiste nella formazione di magnetite (Fe_3O_4) per precipitazione in ambiente acquoso basico da soluzioni acquose contenenti il corretto rapporto stechiometrico degli ioni Fe^{2+} e Fe^{3+} . Attraverso estesa nucleazione (formazione di un numero elevato di cristalli in sospensione), accrescimento (aumento delle dimensioni dei cristalli) e protezione con oleato (per evitare la successiva aggregazione delle particelle) si ottengono nanoparticelle stabili e sospendibili in solventi apolari quali *n*-esano. Il successivo trattamento con un opportuno tensioattivo ne consente la dispersione anche in solventi polari. Come visto si tratta di una tecnica che unisce il vantaggio di utilizzare composti di partenza semplici e solventi non tossici, quali acqua o etanolo, a condizioni operative particolarmente blande.

Gli esperimenti condotti hanno portato alla produzione di nanoparticelle di magnetite stabilizzate con oleato e caratterizzate attraverso spettroscopia infrarossa (FT-IR) e microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

Le NP sono risultate di dimensioni nell'ordine del monodominio magnetico e in generale comprese tra 3 e 17 *nm*, pur mostrando struttura piuttosto

irregolare.

Il trattamento con 11-ammino-undecanoato di tetrametilammonio come tensioattivo ha permesso la loro successiva dispersione in acqua (tamponato fosfato).

I risultati hanno evidenziato come la facilità di esecuzione della sintesi tramite co-precipitazione conceda però uno scarso controllo sulle dimensioni producendo una distribuzione statistica in dimensioni piuttosto allargata.

Il presente lavoro potrà svilupparsi nel prossimo futuro attraverso le seguenti linee:

- Studio delle proprietà magnetiche delle NP.
- Studio del riscaldamento prodotto dalle NP sottoposte a campi magnetici oscillanti.
- Studio dell'effetto di altri stabilizzanti sulle proprietà delle NP.
- Studio dell'effetto di altri tensioattivi e mezzi disperdenti sulla stabilità delle NP.

Bibliografia

- [1] Edrissi M. Ghasemi E., Mirhabibi A. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 320, 2008.
- [2] Robinson D.B. Raoux S. Rice P.M. Wang S.X. Li G. Sun S., Zeng H. *Journal of the American Chemical Society* 126, 2004.
- [3] Hanselman RC Parrott JC Taylor CB Gilchrist RK, Shorey WD. *Selective inductive heating of lymph*. *Ann Surg*, 1957.
- [4] Wust P Jordan A Johannsen M, Thiesen B. *Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer*. *Int. J. Hyperthermia*, 2010.
- [5] Bunn PA Chan DCF, Kirpotin DB. *Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron-oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer*. *J Magn. Magn.*, 1993.
- [6] Maier-Hauff K Johannsen M Wust P Nadobny J et al Jordan A, Scholz R. *Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia*. *J Magn. Magn.*, 2003.
- [7] Ibarra M R Goya G F, Grazú V. *Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy*. *Current Nanoscience*, 2008.
- [8] Kai Cheng Natalie A. Frey, Sheng Peng and Shouheng Sun. *Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage*. *Chem Soc Rev.*, 2009.
- [9] Andra W. *Magnetism in Medicine*. Arnold, 1997.

- [10] Nedelcu G. *Magnetic nanoparticles impact on tumoral cells in the treatment by magnetic fluid hyperthermia*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures Vol. 3, No.3, 2008.
- [11] Koksharov Yu.A Gubin S.P. *Vol 38*. Neorg. Mater., 2002.
- [12] O'Connor CJ. Cushing BL, Kolesnichenko VL. *Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles*. Chem. Rev., 2004.
- [13] M. Ya. Gen V.I. Gol'danskii V.P. Korneev E.A. Manykin A.M. Afanas'ev, I.P. Suzdalev. *Investigation of Superparamagnetism of Ferromagnetic Particles by Mossbauer Spectroscopy*. Journal of Experimental and Theoretical Physics. Vol. 31, 1970.
- [14] D. Weller C. Murray S. Sun, E Fullerton. *Temperature dependence and magnetocrystalline anisotropy studies of self-assembled L10-Fe55Pt45 ferromagnetic nanocrystals*. J. Appl. Phys. 101, 2001.
- [15] S. Sun. *Recent Advances in Chemical Synthesis, Self-Assembly, and Applications of FePt Nanoparticles*. Advanced Materials 18, 2006.
- [16] J Cheon J Park. J. Am. Chem. Soc, 2003.
- [17] E Pirault R Street P G McCormick J Ding, W F Miao. *Mechanical alloying of iron-hematite powders*. J. Alloys Compd. Vol. 267, 1998.
- [18] G B Khomutov G Yu Yurkov S P Gubin, Yu A Koksharov. *Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties*. Russian Chemical Reviews 74, 2005.
- [19] C P Bean W H Meiklejohn. Phys. Rev. B 102, 1956.
- [20] K.S. Suslick. *Vol. 247*. Science 23, 1990.
- [21] K.S. Suslick J.H. Bang. *Sonochemical Synthesis of Nanosized Hollow Hematite*. J. Am. Chem. Soc., 2007.

- [22] S Veintemillas-Verdaguer T Gonzalez-Carreno C J Serna P Tartaj, M D P Morales. *The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*. Journal of physics, 2003.
- [23] N. Menendezb M.P. Morales-P. Herrasti L. Cabrera, S. Gutierrez. Electrochim. Acta 53, 2008.
- [24] A. Navrotsky S. Veintemillas-Verdaguer O. Bomati-Miguel, L. Mazeina. Chem. Mater. 20, 2008.
- [25] T.J. Phelps J.W. Moon J. Nanosci Y. Roh, H. Vali. Nanotechnol. 11, 2006.
- [26] Erné B.H. Klokkenburg M., Hilhorst J. Vibrational Spectroscopy 43, 2007.