

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA INDUSTRIALE**

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

**Sintesi mediante ablazione laser in liquido di nanoparticelle di lega oro-gadolinio per applicazioni biomediche**

**Relatore:** Prof. Vincenzo Amendola

**Controrelatore:** Prof. Leonard Jan Prins

**Laureanda:** Sara Cazzola

**Matricola:** 2058292

**Anno Accademico:** 2023/2024



“Poi un giorno l’atteso non si compie e l’inatteso ti apre la via verso ciò che non avresti mai  
immaginato.”



# Sommario

<i>Introduzione</i>	<b>1</b>
<i>Capitolo 1</i>	<b>4</b>
<i>Ablazione Laser in Liquido</i>	<b>4</b>
<b>1. Ablazione Laser in Liquido</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Meccanismo della LAL</b>	<b>6</b>
<b>1.1.1 Evoluzione temporale dei fenomeni fisico-chimici nella LAL</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Parametri che influenzano la sintesi LAL</b>	<b>12</b>
<b>1.2.1 Parametri del Laser</b>	<b>13</b>
<b>1.2.2 Parametri del materiale</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Sintesi LAL di nanoleghe metalliche</b>	<b>19</b>
<i>Capitolo 2</i>	<b>24</b>
<i>Nanoparticelle metalliche in nanomedicina</i>	<b>24</b>
<b>2.1 Tecniche di Imaging</b>	<b>28</b>
<b>2.1.1 Tomografia Computerizzata</b>	<b>29</b>
2.1.1.1 Agenti di contrasto per TC	32
<b>2.1.2 Imaging tramite Risonanza Magnetica (MRI)</b>	<b>34</b>
2.1.2.1 Principio della Risonanza magnetica nucleare	35
2.1.2.2 Agenti di contrasto per MRI	40
<b>2.1.3 Imaging multimodale e agenti di contrasto multimodali</b>	<b>45</b>
<b>2.1 Teranostica: diagnosi e terapia</b>	<b>48</b>
<b>2.2.1 Nanoparticelle per la Teranostica</b>	<b>49</b>
<b>2.1 Radioterapia a raggi X (XRT)</b>	<b>50</b>
<b>2.3.1 Principi di radioterapia</b>	<b>52</b>
<b>2.3.2 Radioterapia con AuNP – Radiosensibilizzazione</b>	<b>53</b>
<b>2.3.3 Proprietà chimico-fisiche delle NP per la radiosensibilizzazione</b>	<b>59</b>
<b>2.3.4 Tossicità</b>	<b>61</b>
<b>2.4 Funzionalizzazione di NP</b>	<b>62</b>
<i>Capitolo 3</i>	<b>68</b>
<i>Metodi di caratterizzazione delle NP</i>	<b>68</b>
<b>3.1 Spettroscopia UV-Visibile-NIR</b>	<b>69</b>
<b>3.1.1 Fattori che influenzano la risonanza plasmonica</b>	<b>71</b>
3.1.1.1 Ambiente dielettrico e chimico-fisico	71

3.1.1.2 Dimensioni	71
3.1.1.3 Aggregazione	73
3.1.1.4 Composizione	74
<b>3.1.2 Considerazioni generali</b>	<b>74</b>
<b>3.2 Spettroscopia FT-IR</b>	<b>75</b>
<b>3.3 Microscopia elettronica in trasmissione (TEM)</b>	<b>76</b>
<b>3.4 Spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDS)</b>	<b>77</b>
<b>3.5 Spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS)</b>	<b>79</b>
<b>3.6 Diffrazione di raggi X (XRD)</b>	<b>80</b>
<b>3.7 Dynamic Light Scattering (DLS)</b>	<b>84</b>
<b>Capitolo 4</b>	<b>88</b>
<b>Parte Sperimentale</b>	<b>88</b>
<b>4.1 Sintesi LAL di NP</b>	<b>90</b>
<b>4.1.1 AuNP in soluzione acquosa di NaCl</b>	<b>90</b>
<b>4.1.2 Sintesi AuNP in etanolo</b>	<b>94</b>
4.1.2.1 Trattamento termico con EDTA	94
<b>4.2 Sintesi Au-Gd NP</b>	<b>96</b>
<b>4.2.1 AuGd NP 99/1 at%</b>	<b>96</b>
<b>4.2.2 Sintesi AuGd NP 90/10 at%</b>	<b>98</b>
<b>4.2.3 Sintesi AuGd NP 25/75 at%</b>	<b>100</b>
<b>4.3 Caratterizzazione delle NP</b>	<b>101</b>
<b>4.3.1 Spettroscopia FT-IR</b>	<b>101</b>
<b>4.3.2 Microscopia elettronica in trasmissione</b>	<b>102</b>
<b>4.3.3 Microscopia elettronica a scansione e spettroscopia a raggi X a dispersione di energia</b>	<b>107</b>
4.3.3.1 Analisi SEM	108
4.3.3.2 Analisi EDS	109
<b>4.3.4 ICP-MS</b>	<b>112</b>
<b>4.3.5 Diffrazione di raggi X</b>	<b>114</b>
<b>4.3.6 Dynamic Light Scattering</b>	<b>118</b>
<b>4.4 Applicazioni teranostiche</b>	<b>121</b>
<b>4.4.1 Misure MRI</b>	<b>121</b>
4.4.1.1 Misure di rilassività longitudinale $r_1$	122
4.4.1.2 Misure di rilassività trasversale $r_2$	124

<b>4.4.2 Misure di Tomografia Computerizzata</b>	<b>126</b>
<b>4.5 Biocompatibilità <i>in vitro</i></b>	<b>128</b>
<b>4.5.1 Vitalità cellulare <i>in vitro</i> – Ospedale San Raffaele di Milano</b>	<b>128</b>
<b>4.5.2 Citotossicità <i>in vitro</i></b>	<b>129</b>
4.5.2.1 Vitalità cellulare	130
4.5.2.2 Test di Necrosi/Apoptosi	131
4.5.2.3 Assorbimento cellulare di NP	133
<b>4.6 Esperimenti di radioterapia a raggi X</b>	<b>134</b>
<b>4.6.1 Esperimenti di XRT <i>in vitro</i></b>	<b>134</b>
<b>4.7 Sintesi di NP di Au e AuGd ricoperte con mPEG-SH 350 Da</b>	<b>136</b>
<b><i>Conclusioni</i></b>	<b>140</b>
<b><i>Bibliografia</i></b>	<b>144</b>
<b><i>Ringraziamenti</i></b>	<b>154</b>





# Introduzione

La crescente incidenza e mortalità legate al cancro rappresentano una sfida persistente a livello globale, nonostante i progressi nei trattamenti convenzionali. Difatti, la distribuzione non specifica dei farmaci antitumorali, la citotossicità, gli effetti collaterali intollerabili e lo sviluppo della resistenza alle radiazioni e ai farmaci rimangono ostacoli impegnativi per la terapia del cancro.

L'impiego della nanomedicina, mediante l'utilizzo di nanomateriali ingegnerizzati, si configura come un approccio innovativo per superare le limitazioni associate ai trattamenti tradizionali. Le nanoparticelle (NP), concepite come terapie multifunzionali, strumenti diagnostici e vettori di farmaci, offrono numerosi vantaggi, tra cui un elevato rapporto superficie/volume, varietà di strutture e fasi, e capacità di funzionalizzazione con molecole specifiche per migliorare il targeting nei tessuti tumorali, nonché il profilo di tossicità e le proprietà per le applicazioni diagnostiche e terapeutiche. Tuttavia, il loro utilizzo in nanomedicina è ancora limitato perché, oltre ad essere efficaci nell'accumulo nei siti di interesse, devono anche esercitare efficacemente gli effetti terapeutici a livello equivalente o superiore ai farmaci convenzionali. Per questo motivo, il progresso della nanomedicina consiste nella continua esplorazione delle molteplici possibilità disponibili mediante la combinazione di componenti nanostrutturate inorganiche, organiche e biologiche.

In questo contesto, le nanoparticelle di lega bimetallica, progettate per sfruttare le proprietà desiderate di ciascun elemento per trattamenti medici specifici, emergono come una prospettiva promettente, sebbene ancora poco esplorata. Non tutti gli elementi della tavola periodica, però, formano leghe, e per questo motivo è necessario ricorrere all'ablazione laser in liquido (LAL). La LAL è un approccio sintetico one-

step che si è dimostrato potente per il raggiungimento di NP di lega, anche quando la termodinamica è sfavorevole e c'è una grande differenza nella reattività chimica dei diversi elementi. Difatti, le condizioni in cui la LAL opera permettono la formazione di NP mono e multi-elemento, anche con fasi metastabili, aventi composizione e proprietà senza precedenti. Inoltre, la LAL si basa su un *set-up* relativamente semplice e autonomo, che può essere controllato anche da remoto con un PC o uno smartphone, è una procedura a basso costo e compatibile con i principi della *green chemistry*.

Tuttavia, la LAL presenta alcune sfide da superare, come il limitato controllo sulla composizione delle NP ottenute e la necessità di stabilizzarle nella soluzione di sintesi per evitare l'aggregazione. La funzionalizzazione superficiale tramite molecole idrofiliche diventa cruciale giacché influenza anche proprietà determinanti nell'applicazione delle NP in nanomedicina, quali la stabilità in ambiente fisiologico, la biodistribuzione, il tempo di circolazione nel sangue e l'assorbimento cellulare.

La presente tesi ha impiegato la sintesi LAL per generare nanoparticelle bi-metalliche di Au-Gd a diverse composizioni, rivestite da un guscio polimerico biocompatibile (polietilenglicole tiolato, mPEG-SH). Queste NP combinano le proprietà di attenuazione dei raggi X dell'oro, in grado di migliorare la dose di radiazioni erogata localmente in radioterapia e il contrasto nelle immagini di tomografia computerizzata, con l'alto paramagnetismo del gadolinio, utilizzato come agente di contrasto per l'imaging di risonanza magnetica, offrendo così un nuovo agente di contrasto e radiosensibilizzante. Un altro vantaggio delle NP di Au-Gd è la chimica degli atomi d'oro superficiali, che è la più apprezzata per la facile ed efficace bioconiugazione delle NP, rendendole altamente biocompatibili.

Le nanoparticelle di oro sono state ottenute tramite gli stessi protocolli di sintesi, al fine di utilizzarle come nanomateriali di riferimento, perché esse permettono la semplice valutazione della stabilità e dell'aggregazione tramite la spettroscopia UV-Visibile o la valutazione della variazione della struttura cristallina della nanolega rispetto al metallo puro, per comprendere meglio come gli atomi si dispongono in una lega di dimensioni nanometriche. A questo scopo, sono state effettuate diverse procedure di caratterizzazione, come le analisi di diffrazione di raggi X (XRD) e la microscopia elettronica in trasmissione (TEM) necessarie a determinare la morfologia e le proprietà strutturali delle NP. La spettroscopia FT-IR è stata utilizzata per confermare il ricoprimento superficiale delle NP con polimeri idrofilici biocompatibili.

La spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDS) e la spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) sono state utilizzate per determinare la composizione atomica dei metalli nella lega. La diffusione dinamica della luce (DLS) è stata utilizzata per misurare la dimensione idrodinamica delle NP in diversi tipi di soluzione, e per valutarne la stabilità in ambiente fisiologico.

Queste NP sono state testate per verificare le loro proprietà come agenti di contrasto bimodali e *in vitro* per valutare la loro biocompatibilità e la loro capacità di agire come radiosensibilizzatori per la radioterapia con raggi X.

Dunque, questa tesi si articola attraverso quattro capitoli, iniziando con la descrizione del processo di sintesi mediante ablazione laser in liquido. Questa sezione fornisce un'analisi del meccanismo alla base della generazione delle nanoparticelle, considerando fattori chiave come il solvente impiegato e la composizione dei soluti, al fine di evidenziare l'incidenza di tali parametri sulla morfologia e le caratteristiche intrinseche delle particelle risultanti.

Nel capitolo successivo, si affrontano le applicazioni biomediche delle nanoparticelle di Au-Gd oggetto di studio. Questa sezione si propone di contestualizzare l'importanza di tali nanomateriali nell'ambito della ricerca biomedica, delineandone le potenzialità e le prospettive di impiego in contesti terapeutici e diagnostici, ma anche gli aspetti critici e le difficoltà da superare.

Nel terzo capitolo è riportata la descrizione delle varie tecniche di caratterizzazione adottate nell'ambito di questo lavoro di tesi.

La tesi si conclude con il quarto capitolo sulla presentazione dei risultati sperimentali, delineando le osservazioni e le considerazioni emerse dalla caratterizzazione delle nanoparticelle di lega Au-Gd, con particolare attenzione alle loro proprietà funzionali nel contesto biomedico.

L'obiettivo complessivo di questo studio è stato quello di contribuire alla comprensione e all'ottimizzazione di nanoparticelle bi-metalliche con una composizione mai esplorata o sintetizzata prima, fornendo informazioni rilevanti per avanzare nelle applicazioni teranostiche nell'ambito della nanomedicina ed evidenziando i vantaggi apportati dal ricorso alle nanoleghe in questo contesto.

# Capitolo 1

## Ablazione Laser in Liquido

### 1. Ablazione Laser in Liquido

Negli ultimi anni, la sintesi mediante ablazione laser in soluzione liquida (anche detta “LASiS” dall’inglese “laser ablation synthesis in solution” o “LAL” da “laser ablation in liquid”) ha guadagnato un notevole interesse per la sua facilità di esecuzione, il basso costo e la versatilità di applicazione alla tipologia di nanostrutture desiderata. Infatti, questa tecnica “green” permette di preparare una vasta gamma di nanomateriali (NM) con lo stesso *set-up* sperimentale, variando semplicemente alcuni parametri sintetici.<sup>1</sup>

Nella LAL, i NM sono ottenuti focalizzando gli impulsi laser su un target solido, che può essere sia una lastrina sia polvere pressata di metalli, ossidi, semiconduttori o anche materiali organici, a seconda delle esigenze specifiche, purché immerso in una soluzione liquida (*Fig. 1.1*).

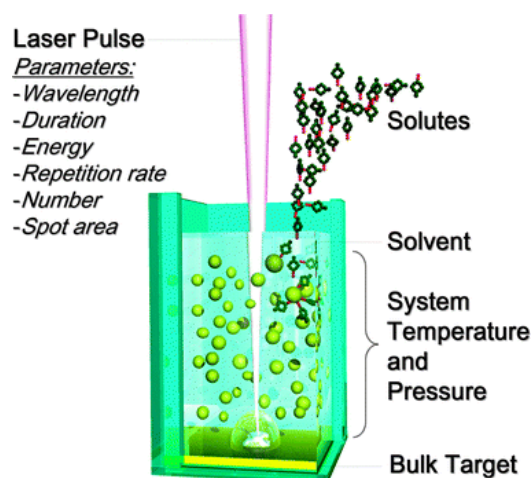


Figura 1.1: Set-up sperimentale per la LAL e un elenco dei principali parametri che influenzano la sintesi.

Per semplicità, si suddividono i parametri della sintesi in due categorie: i parametri che riguardano il materiale e i parametri del laser. I primi sono dati dal target bulk, solvente e soluti, temperatura e pressione del sistema. Quelli del laser, invece, sono: la lunghezza d'onda, la durata del singolo impulso, l'energia per impulso, la velocità di ripetizione, il numero di impulsi laser e le dimensioni dell'area dello spot sul target.

L'ablazione laser è una tecnica ibrida tra i metodi sintetici fisici top-down e quelli chimici bottom-up; infatti, induce la modificazione fisica della materia, data dalla frammentazione del materiale in nanoparticelle. Ma, in buona parte dei casi, avviene anche la modifica chimica della materia, ovvero la formazione di nuovi composti e fasi.<sup>1</sup>

Rispetto ai metodi tradizionali per la produzione di nanoparticelle in fase liquida, la tecnica LAL presenta considerevoli vantaggi, ovvero:<sup>1,2</sup>

- È un approccio unico per la sintesi di una varietà di nanomateriali con diversa composizione e dimensione, con diversi rivestimenti e in diversi solventi.<sup>1,2</sup>
- La LAL è compatibile con i 12 principi della “chimica verde”, perché non richiede necessariamente l'utilizzo di precursori, agenti chelanti o stabilizzanti e non produce materiali di scarto.<sup>1,2</sup>
- Le soluzioni colloidali di nanoparticelle ottenute risultano stabili in solventi come acqua o solventi organici senza l'utilizzo di stabilizzanti o leganti, lasciando la superficie libera per una successiva funzionalizzazione.<sup>2,3</sup>
- La LAL è un metodo intrinsecamente automatico e le operazioni manuali sono ridotte al minimo, rendendo il processo altamente economico e sicuro. Inoltre, queste caratteristiche facilitano la riproducibilità della sintesi da laboratorio a laboratorio.<sup>1,2,3</sup>

Tuttavia, la LAL presenta anche degli svantaggi:

- La difficoltà nel controllo delle dimensioni medie e della distribuzione dimensionale dei NM durante la sintesi.<sup>1,2,3</sup>
- Il controllo della forma dei NM non risulta possibile, tranne che per alcuni casi.<sup>1</sup>
- La produttività della tecnica LAL è sulla scala dei grammi, mentre quella ottenuta con altri metodi come la pirolisi spray o la sintesi chimica in fase liquida può arrivare a centinaia di grammi o anche kilogrammi.<sup>1,3</sup>

- Il confronto dei risultati di diversi gruppi risulta difficile perché in letteratura scientifica sono riportati parametri sintetici eterogenei. La LAL è una tecnica ancora in fase di sviluppo, per la quale non esistono delle procedure universalmente definite.<sup>1</sup>

### 1.1 Meccanismo della LAL

Il meccanismo di base della LAL consiste in diverse fasi (Fig. 1.2).<sup>1,2,3</sup> Il processo di ablazione avviene focalizzando un impulso laser su un target immerso in un solvente, che deve essere trasparente alla lunghezza d'onda del laser utilizzato. Il processo ha inizio con l'assorbimento della radiazione laser da parte del target.

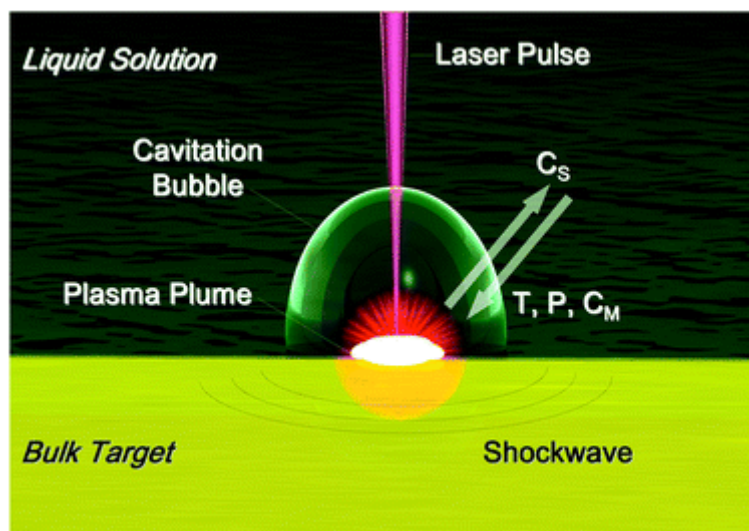


Figura 1.2: Rappresentazione delle fasi principali della LAL. Le frecce bianche indicano che aumentando la distanza dallo spot laser, la temperatura ( $T$ ), pressione ( $P$ ) e concentrazione del materiale ablatato ( $C_M$ ) diminuiscono, mentre aumenta la concentrazione delle specie in soluzione ( $C_S$ ).<sup>1</sup>

Per ogni materiale e per una certa durata dell'impulso laser, esiste una fluena di soglia necessaria perché avvenga l'ablazione, misurata in  $J/cm^2$  perché definita dal rapporto tra l'energia dell'impulso laser ( $J$ ) per unità di area irradiata ( $cm^2$ ). Al di sopra di questo valore di fluena di soglia, la porzione di target colpita dall'impulso laser viene riscaldata e ionizzata (fotoionizzazione), al punto che avviene il distacco del materiale.<sup>1,2,3</sup>

Il materiale ablato è costituito principalmente da specie altamente ionizzate e ad alta temperatura, cioè da una “nuvola di plasma” o “*plasma plume*”. Questa si espande nel liquido circostante, accompagnata dall’emissione di un’onda d’urto. Durante l’espansione, la *plasma plume* si raffredda e rilascia la sua energia alla soluzione liquida, portando alla formazione di una bolla di cavitazione che si espande nel liquido per poi collassare e generarne una seconda. Dopo il collasso della bolla di cavitazione si ha il rilascio delle particelle in soluzione.<sup>1,2,3</sup>

Si possono identificare quattro parametri principali la cui evoluzione nello spazio e nel tempo determinano poi la fase e la struttura dei NM finali, e questi sono:<sup>1</sup>

- i) Temperatura (T);
- ii) Pressione (P);
- iii) Concentrazione del materiale ablato ( $C_M$ );
- iv) Concentrazione delle specie in soluzione ( $C_S$ ).

A causa della simmetria emisferica del fenomeno, i valori assunti da questi quattro parametri non sono né uniformi nello spazio né costanti nel tempo.

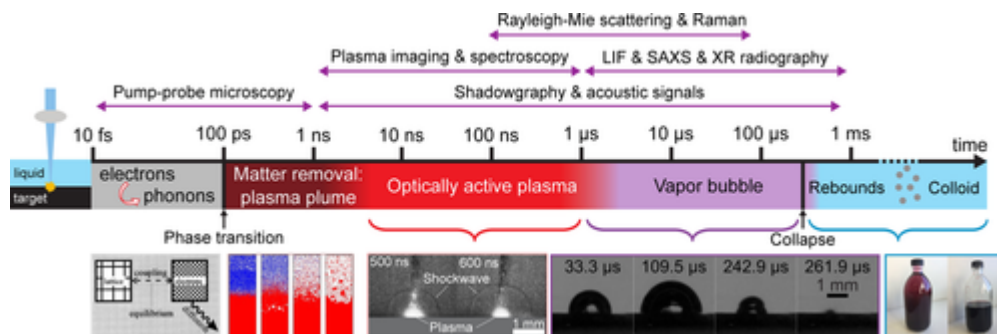


Figura 1.3: Sequenza temporale degli stadi che avvengono nel processo d’ablazione, dall’interazione con il target sino al rilascio delle NP in soluzione. In alto sono riportate le tecniche di caratterizzazione delle varie fasi in accordo con le loro risoluzioni temporali. In basso, da sinistra a destra: schema di accoppiamento elettrone-fotone, istantanea della transizione di fase da simulazioni di dinamica molecolare, immagini del plasma plume e dell’onda d’urto emessa, dinamica della bolla di cavitazione e soluzione colloidale finale.<sup>2</sup>

Per comprendere meglio l’evoluzione dei quattro parametri, è utile descrivere la sequenza temporale dei vari stadi del processo di ablazione a partire da quando un singolo impulso laser colpisce il target fino all’ottenimento del colloide (Figura 1.3).<sup>1,2</sup>

### 1.1.1 Evoluzione temporale dei fenomeni fisico-chimici nella LAL

Si assume che la fluensa sia al di sopra della soglia di ablazione (solitamente nell'intervallo  $10\text{-}10^3 \text{ J/cm}^2$ ) e si imposta il tempo  $t=0$  come l'istante in cui l'impulso laser colpisce il target.<sup>1</sup>

**Per  $t < 0$ : penetrazione dell'impulso laser nel liquido.** Per prima cosa, l'impulso laser deve passare attraverso uno strato di liquido e ciò che si vuole ottenere è che l'energia venga rilasciata solo sul target. Si vogliono quindi evitare fenomeni quali diffusione del fascio laser o l'assorbimento di energia da parte del liquido. Affinché ciò sia possibile, lo strato di liquido che ricopre il target deve essere meno spesso possibile e il liquido deve essere trasparente alla lunghezza d'onda del laser utilizzato. Nelle condizioni LAL ordinarie, alla lunghezza d'onda tipica di 1064 nm, la trasparenza di alcuni liquidi non è completa (ad esempio l'assorbanza dell'acqua a 1064 nm è diversa da 0). In queste condizioni, si presume che l'assorbimento del solvente non svolga un ruolo rilevante nella formazione dei nanomateriali perché l'assorbimento da parte del target è di ordini di grandezza maggiori. Solamente in casi specifici, la soluzione liquida può assorbire o diffondere in modo significativo la luce laser per la presenza di soluti in grado di assorbire o di NM già formati, con conseguente riduzione dell'energia trasferita al target.<sup>1,2</sup>

**Da  $t=0$  s a  $\tau_{pulse}$ : assorbimento dell'impulso laser.** L'impulso laser colpisce il target e, a causa dell'elevata densità di fotoni, si verificano fenomeni di assorbimento lineare e non lineare. Alla fluensa necessaria perché avvenga la LAL, impulsi con  $\tau_{pulse}$  (durata dell'impulso) inferiore a pochi picosecondi (ps) portano preferenzialmente a processi di assorbimento multifotonico istantaneo e a ionizzazione fotoindotta localizzata. All'aumentare della durata dell'impulso oltre i picosecondi, i processi termici diventano sempre più rilevanti. Quindi, contemporaneamente alla fotoionizzazione possono verificarsi processi come l'emissione termoionica, la vaporizzazione, l'ebollizione e la fusione, interessando un volume maggiore di quello definito dall'area dello spot di focalizzazione del fascio laser e dalla profondità dello stesso cratere di ablazione che si andrà a formare dopo l'eiezione del materiale.<sup>1</sup>

**Per  $t=10^{-12}$  s a  $10^{-10}$  s: distacco del materiale ablato.** Dopo l'assorbimento e la fotoionizzazione diretta, avviene il distacco della materia dal target, promosso dalla



collisione tra ioni ed elettroni. Il distacco del materiale dal target può avvenire in modi diversi in base alle caratteristiche dell'impulso laser (lunghezza d'onda, durata, fluensa) e come avviene permette di comprendere la fase successiva di formazione delle particelle quali nucleazione, crescita e reattività. In generale, l'uso di impulsi a pico e femtosecondi (fs) con alte fluense comporta un trasferimento di energia al target molto localizzata nell'area irraggiata e porta a un distacco del materiale per frammentazione. La frammentazione consiste nel distacco di atomi caldi, vapori e goccioline in liquido in condizioni al di fuori dell'equilibrio.<sup>1</sup>

Nel caso di impulsi a nanosecondi, il plasma è presente per un tempo circa pari al doppio della durata dell'impulso. Pertanto, assieme alla fotoionizzazione si verificano anche la vaporizzazione e l'ebollizione del target. Tale meccanismo termodinamico è detto esplosione di fase "*phase explosion*" o anche ebollizione esplosiva "*explosive boiling*".

L'ebollizione esplosiva si verifica quando il materiale del target viene rapidamente surriscaldato fino alla temperatura critica termodinamica, alla quale la decomposizione spinodale in fase vapore e liquida nel materiale irradiato avviene tramite nucleazione omogenea. In ogni caso, poiché la differenza di temperatura tra la zona irradiata e il resto del sistema è molto ampia e poiché i target solidi dissipano il calore in maniera molto efficace, il distacco di materia avviene prevalentemente nella regione coincidente con lo spot del laser.<sup>1,3</sup>

Contemporaneamente al fenomeno di ablazione, il rinculo dovuto alla pressione esercitata sul target porta alla formazione di due onde d'urto speculari: una propagante in direzione del target e una verso la soluzione liquida a velocità supersonica (dell'ordine di  $10^3 \text{ m s}^{-1}$ ). Sul fronte dell'onda di pressione vi è discontinuità di densità e temperatura, la sua propagazione pertanto porta ad un riscaldamento ulteriore del target e della soluzione e può favorire il distacco del materiale.<sup>1</sup>

A causa dell'alta temperatura e della fotoionizzazione diretta, il materiale ablato è costituito da atomi altamente ionizzati, quindi è considerato una *plasma plume* non in equilibrio. Il plasma è caratterizzato da condizioni estreme di temperatura, pressione e densità che sono rispettivamente dell'ordine di  $10^3 \text{ K}$ ,  $10^9 \text{ Pa}$  e  $10^{22}$  atomi per  $\text{cm}^3$  circa; al suo interno vi possono essere anche delle goccioline di target fuso

e, a volte, frammenti solidi. Il plasma dura per una decina di nanosecondi dopo l'impulso laser.<sup>1</sup>

Nel caso di impulsi con durata uguale o maggiore di  $10^{-11}$  s, è presente una finestra temporale in cui impulso laser e nuvola di plasma coesistono, ciò significa che il plasma stesso può assorbire energia dall'impulso laser. Questo processo è in grado di omogeneizzare la fase del materiale espulso dal target e, per effetto dell'aumento della temperatura della *plasma plume*, l'atomizzazione del materiale contenuto in esso viene favorita. Al contempo, la quantità di energia laser direttamente rilasciata al target diminuisce a causa della schermatura da parte del plasma. Questo effetto è chiamato "*plasma shielding*".<sup>1,3</sup>

L'evoluzione dei parametri termodinamici del plasma è molto veloce, poiché il riscaldamento del plasma dovuto all'impulso è seguito da un rapido raffreddamento dovuto all'espansione della nube e a uno scambio di calore con la soluzione liquida.<sup>1,3</sup>

***Per  $t = 10^{-10}$  s a  $10^{-7}$  s: espansione e spegnimento della plasma plume.*** Il liquido confina fortemente la *plasma plume* sulla zona del cratere di ablazione, e questo comporta un raffreddamento più lento all'interfaccia target-materiale ablato, poiché il materiale ablato caldo può fornire energia termica al target sottostante. Di conseguenza, nel liquido l'ablazione del target avviene per trasferimento di energia sia da parte dell'impulso laser al target solido che dalla *plasma plume* al target riscaldato.

Dopo circa  $10^{-10}$  s, la *plasma plume* si espande e si raffredda in soluzione rilasciando la sua energia al liquido da un lato e al target dall'altro. Nella zona a contatto con il plasma, anche il liquido viene scaldato a temperature intorno ai 1000 K con conseguente degradazione, ionizzazione e pirolisi delle molecole in soluzione. Mentre il plasma si espande, raffreddandosi e rilasciando energia termica alla soluzione, sono possibili fenomeni di degradazione, ionizzazione o pirolisi del solvente o delle specie in soluzione.<sup>1</sup>

**Per  $t=10^{-6}$  s a  $10^{-4}$  s: espansione e collasso della bolla di cavitazione.** L'evoluzione del plasma e la sua espansione con conseguente rilascio di energia sia al target che alla soluzione, fa sì che esso si estingua rapidamente, tipicamente dopo un tempo di  $10^{-8} - 10^{-7}$  s. Inoltre, il rilascio di energia al liquido circostante induce la formazione di una bolla di cavitazione su una scala temporale di  $10^{-7} - 10^{-6}$  s, che si espande a velocità supersonica ( $> 102$  m/s) nel liquido fino a raggiungere un raggio massimo dell'ordine dei millimetri. Durante l'espansione, la temperatura della bolla diminuisce e la pressione interna cala progressivamente fino a un valore inferiore a quello della pressione del liquido, il che porta al collasso della bolla con emissione di un'ulteriore onda d'urto. Ciò rappresenta l'ultimo processo fisico che avviene nella LAL.

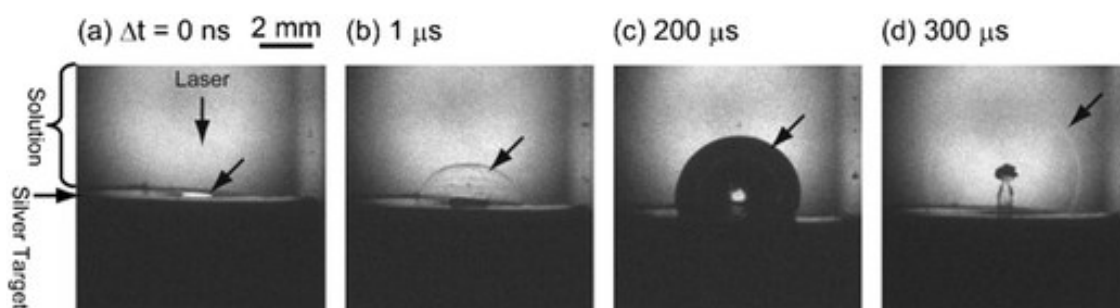


Figura 1.4.: Evoluzione della bolla di cavitazione durante l'ablazione laser di un target di Ag in soluzione acquosa. Da sinistra a destra: (a) emissione di luce dalla plasma plume, (b) prima onda d'urto, (c) risalita della bolla di cavitazione, (d) collasso e generazione della seconda onda d'urto.<sup>1</sup>

Si stima che al punto di collasso le condizioni di T e P siano dello stesso ordine di quelle del plasma ( $10^3$  K e  $10^{10}$  Pa) e ciò potrebbe causare effetti di aggregazione, transizioni di fase per alcuni NM formati in precedenza o promuovere un ulteriore distacco del materiale dal target.<sup>1</sup>

**Per  $t > 10^4$  s: crescita lenta e agglomerazione dei NM.** A seguito del collasso della bolla, il sistema raggiunge la condizione fisica e chimica di stato stazionario. In questo stadio, i NM generati possono subire minime modifiche dovute alla condensazione di specie atomiche e cluster molecolari che sopravvivono ancora in soluzione. Se la dispersione dei NM non è stabile, cominciano ad agglomerarsi con successiva precipitazione nell'arco di tempo di alcuni minuti. In base alle specie del target e alle condizioni di solvente, possono avvenire anche fenomeni di ossidazione.<sup>1,2</sup>

La formazione di nanoparticelle comprende generalmente tre fasi (Fig. 1.5):<sup>2</sup>

i) Nucleazione;

- ii) Evoluzione dei nuclei in semi;
- iii) Crescita dei semi in nanocristalli finali.

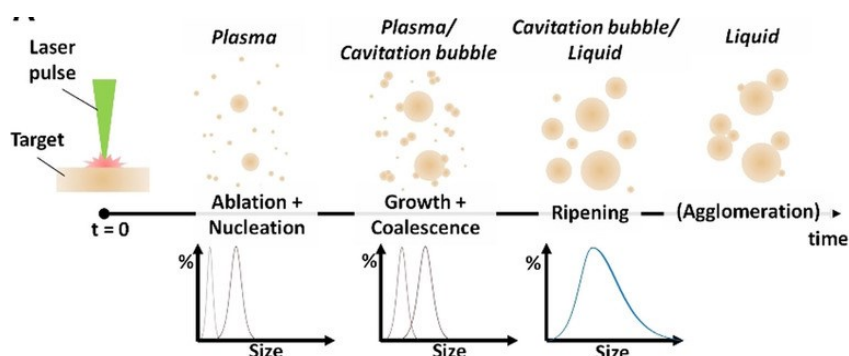


Figura 1.5: Formazione delle NP tramite ablazione di un target solido, nucleazione, crescita e coalescenza, maturazione ed eventualmente agglomerazione se il sistema colloidale non è stabile.<sup>2</sup>

Nonostante il quadro generale di come queste fasi della sintesi LAL si evolvono sia ancora in fase di studio, si sostiene che il tempo necessario per raggiungere la concentrazione critica per la nucleazione è molto più breve di quello della sintesi chimica in fase liquida, a causa della rapida dinamica di espulsione dei “precursori” e dei ripidi gradienti di temperatura (fino a  $10^{12}$  K s<sup>-1</sup>).<sup>2</sup> Inoltre, poiché parte del processo avviene nella fase gassosa (bolla di cavitazione), o a una concentrazione relativamente bassa una volta nella fase liquida, dove le particelle hanno una lenta mobilità, la crescita per coalescenza e maturazione può durare più a lungo che nel meccanismo convenzionale dei metodi chimici in fase liquida.<sup>2</sup>

## 1.2 Parametri che influenzano la sintesi LAL

È molto importante conoscere i parametri principali che hanno influenza sul tipo di prodotti ottenuti dalla LAL, in termini di dimensione, composizione e forma delle NP, per avere padronanza di questa tecnica di sintesi. Come detto in precedenza, i fattori che possono influenzare la sintesi sono quelli legati ai materiali e quelli del laser.<sup>1,2</sup>

Il principale parametro è chiaramente dovuto alla scelta del target d’ablazione, che in generale costituisce la forma massiva (o “bulk”) della specie di cui si vogliono ottenere i nanomateriali corrispondenti. Tuttavia, la LAL porta alla formazione di NM che non necessariamente hanno composizione o fase analoghe al target massivo.

Inoltre, materiali diversi mostrano una diversa reattività e producono prodotti diversi nelle stesse condizioni sperimentali.

### 1.2.1 Parametri del Laser

Il laser può influenzare la produttività, le dimensioni, la struttura e la composizione delle NP in base ai suoi parametri: lunghezza d'onda, durata dell'impulso, area del cratere, velocità di ripetizione.<sup>1</sup>

**Lunghezza d'onda dell'impulso:** spesso le nanoparticelle già formate si vengono a trovare nel cammino dell'impulso laser e, se queste assorbono alla lunghezza d'onda del laser utilizzato per l'ablazione, possono subire delle modificazioni quali fotoframmentazione e fotodegradazione. La conseguenza è l'allargamento della distribuzione dimensionale e la diminuzione della dimensione media delle particelle, oppure la modifica della struttura cristallina con ottenimento di un prodotto eterogeneo.<sup>1,3</sup>

**Energia dell'impulso:** L'energia dell'impulso influenza principalmente la quantità di materiale ablato e il meccanismo di ablazione. Aumentando questa aumenta linearmente anche la produttività di nanoparticelle, fintantoché il meccanismo di ablazione resta lo stesso. A causa della crescente concentrazione di materiale ablato nel plasma e del distacco di frammenti solidi e fusi, si ottengono anche distribuzioni dimensionali e dimensioni medie delle NP maggiori. Più in dettaglio, aumentando l'energia dell'impulso sono possibili contemporaneamente molteplici meccanismi di distacco del materiale, come la frammentazione, l'esplosione di fase, l'ebollizione e la vaporizzazione. La coesistenza di questi meccanismi porta ad una distribuzione dimensionale bimodale, mentre per avere una distribuzione monomodale è opportuno lavorare a più basse energie.<sup>1,3</sup>

**Durata dell'impulso:** la durata dell'impulso ( $\tau_{pulse}$ ) influenza fortemente la distribuzione dimensionale, la struttura e la composizione dei NM. A parità di fluensa, aumentando  $\tau_{pulse}$  (decine di ps o più) vengono favoriti i meccanismi di ablazione dominati dai processi termici come emissione termoionica, vaporizzazione, ebollizione e fusione a scapito dei meccanismi di fotoionizzazione. Inoltre, è noto che la distribuzione delle NP ottenute con laser a ns risulta più stretta rispetto a quella ottenuta da laser a fs o ps.<sup>1,3</sup>

**Area spot:** Se si aumenta l'area dello spot mantenendo invariata la fluensa, si osserva un aumento della produttività delle NP come anche un aumento delle dimensioni medie e della distribuzione dimensionale. Un aumento dell'area del cratere, infatti, permette una cessione dell'energia ad una maggior porzione del target la quale verrà ablata. Questo porta ad una maggiore concentrazione di specie del target ablato nel plasma, producendo NP più grandi.<sup>1</sup>

**Velocità di ripetizione:** definisce l'intervallo di tempo ( $\Delta t_p$ ) tra due impulsi laser consecutivi. La produttività delle NP per unità di tempo aumenta con la velocità di ripetizione. Tuttavia, l'aumento lineare è osservato solo per intervalli di tempo maggiori del tempo di vita della bolla di cavitazione, che è dell'ordine di  $10^{-4} - 10^{-3}$  s, che corrisponde a frequenze inferiori a  $10^3 - 10^4$  Hz.

Utilizzando infatti frequenze più elevate, l'impulso laser si scontra con la bolla di cavitazione e si avrà il fenomeno di scattering della radiazione. Questo determina la riduzione dell'energia laser che raggiunge il target a causa della discontinuità dell'indice di rifrazione all'interfaccia liquido/gas. Pertanto, si ha riduzione della massa ablata ad ogni singolo impulso.

L'aumento della velocità di ripetizione, d'altra parte, incrementa la concentrazione locale di NP attorno al cratere, perché il tempo di diffusione delle NP lontano dalla regione ablata è ridotto. Questo effetto può favorire l'aggregazione e la coalescenza delle particelle ma diminuisce la resa di ablazione a causa dello scattering degli impulsi laser in ingresso.<sup>1</sup>

**Numero di impulsi laser:** Il numero di impulsi laser è strettamente legato al tempo di ablazione e alla frequenza di ripetizione. La quantità di materiale ablato in genere aumenta con il numero di impulsi. Tuttavia, il prodotto di ablazione può subire delle modificazioni con l'aumento del numero di impulsi, specialmente se il target subisce delle modifiche durante l'ablazione. Il target può subire delle variazioni di composizione a causa di interazioni con molecole in soluzione, o modifiche morfologiche dovute al distacco del materiale dalla superficie. Entrambi questi fenomeni sono favoriti dall'aumento di temperatura e pressione durante l'ablazione. Inoltre, la concentrazione di NP in soluzione aumenta con il crescente numero di impulsi laser e, visto che le nanoparticelle diffondono la luce, la quantità di energia che raggiunge il target diminuisce con il numero di impulsi.<sup>1</sup>

### 1.2.2 Parametri del materiale

**Soluti:** I soluti presenti in soluzione possono interagire direttamente con il materiale ablatato o modificare le proprietà chimico-fisiche del liquido.

I soluti sono in grado di modificare i parametri rilevanti per la dinamica della bolla di cavitazione e il confinamento del plasma sul cratere. Questi parametri sono viscosità, densità e tensione superficiale del solvente. In particolare, l'aumento della viscosità e densità del solvente migliora il confinamento della *plasma plume* nella zona del cratere, che a sua volta migliora la resa di ablazione.

Gli effetti soluto-solvente sono rilevanti solamente quando i soluti che interagiscono direttamente con le NP vengono aggiunti ad alta concentrazione al solvente. Gli effetti dovuti alle interazioni soluto-NP sono invece molto più significativi.<sup>1</sup>

L'interazione tra soluti e materiale ablatato può avere diversi gradi di intensità (Fig. 1.6).

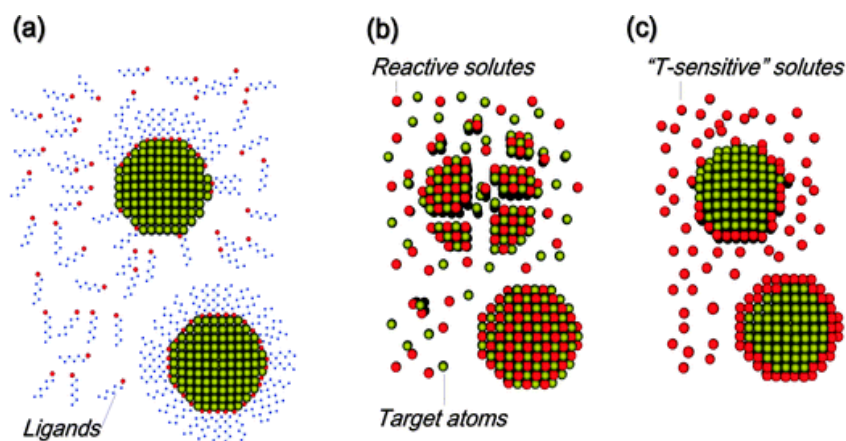


Figura 1.6: Esempi dell'effetto dei soluti su LAL di NM: (a) i ligandi vengono assorbiti da interazioni fisiche o chimiche sulla superficie delle NP impedendone la crescita, coalescenza e aggregazione e, talvolta, la precipitazione; (b) i soluti reagiscono con il materiale ablatato per produrre un composto diverso dal target; (c) i soluti capaci di reazioni chimiche attivate dalla temperatura (soluti "T-sensitive")

Si possono verificare delle interazioni fisiche fino al caso in cui siano presenti dei ligandi in grado di legare chimicamente le nanoparticelle, risultando una limitazione efficiente della loro crescita.

Quella tra il sodio dodecilsolfato (SDS) e le nanoparticelle d'oro (AuNP) ottenute dalla LAL è un esempio di interazione fisica. Gli anioni dodecilsolfato sono in grado di coordinare la superficie delle AuNP tramite interazioni elettrostatiche, formando

uno strato molecolare che riduce sia la coalescenza sia la crescita delle NP per adsorbimento di atomi liberi in soluzione (*Fig. 1.6(a)*). La sintesi di AuNP tramite LAL in una soluzione acquosa contenente una concentrazione 10 mM di SDS porta alla formazione di nanoparticelle con dimensioni medie di 10 nm, mentre in acqua pura la stessa sintesi dà nanoparticelle con dimensioni di 20 nm. Tuttavia, la riduzione delle dimensioni è efficace solo se, durante la crescita delle nanoparticelle, la concentrazione di legante è abbastanza elevata da competere con la diffusione degli embrioni di NP e delle specie target in forma molecolare. L'utilizzo di SDS impedisce anche l'aggregazione e la precipitazione delle NP; difatti l' SDS si è rivelato un ottimo legante per l'ottenimento di soluzioni acquose di NP con elevata stabilità. Effetti simili si osservano ad esempio con le ciclodestrine, polimeri come il polivinilpirrolidone (PVP) o con il bromuro di cetiltrimetilammonio.<sup>1,3</sup>

Un caso molto studiato è quello della LAL di Au in soluzione acquosa di NaCl, in cui gli ioni Cl<sup>-</sup> sono presenti sulla superficie delle AuNP, con conseguente aumento del potenziale Z delle NP e miglioramento della stabilità del sistema colloidale, soprattutto a pH neutro e basico. In generale, la crescita delle NP si arresta quando la repulsione superficiale impedisce la collisione tra le particelle o quando, dopo la collisione, viene impedita la formazione di legami chimici tra le NP.<sup>1</sup> Nel caso di NaCl, l'elevato potenziale Z aumenta la repulsione superficiale tra le NP e produce particelle più piccole rispetto a LAL in acqua pura.<sup>3</sup>

A un livello più alto di interazione, (*Fig. 1.6(b)*), ci sono i ligandi in grado di formare dei legami chimici con la superficie delle NP, ad esempio le molecole tiolate con le AuNP. Quando i soluti stabiliscono legami chimici con le NP, l'azione di *capping* è irreversibile, limitando la crescita delle particelle stesse. La stabilità della soluzione colloidale è ulteriormente migliorata con le molecole tiolate, che sono ben solubilizzate nel solvente di ablazione. In presenza di tioli, le dimensioni delle AuNP possono essere ridotte da 20 nm a 5-2 nm.<sup>1,3</sup>

Un'incognita sul ruolo dei soluti che interagiscono con il target è che le reazioni avvengono sulla superficie del cratere prima, durante e dopo il distacco del materiale ablato. Attualmente, l'evoluzione chimica della composizione del target durante l'ablazione laser è poco conosciuta.<sup>1</sup>

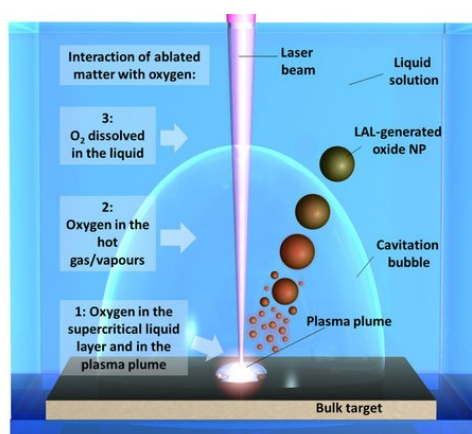


Infine, se i soluti subiscono reazioni chimiche spontanee o attivate dalla temperatura, le NP possono fungere da siti di nucleazione; questo perché la temperatura delle NP appena formate è maggiore della temperatura ambiente (*Fig. 1.6(c)*) Ad esempio, durante la LAL, è possibile ridurre sali di metalli nobili *in situ* sulla superficie di NP di ossidi o metalli, per formare strutture *core-shell*, *core-satellite* o dimeriche.<sup>1</sup>

**Solvente:** il solvente influenza fortemente la composizione e la struttura dei NM ottenuti dalla LAL.

Nella sintesi LAL, la materia estratta dal target incontra le molecole della soluzione liquida in tre diverse condizioni:<sup>2</sup>

- i) All'interfaccia *plasma plume*-liquido circostante;
- ii) All'interno della bolla di cavitazione, in fase gassosa;
- iii) Nel liquido a T ambiente e P ambiente dopo il collasso della bolla di cavitazione.



*Figura 1.7: Tre ambienti in cui le specie del target ablatto incontrano le specie di ossigeno: (1) nella plasma plume, (2) nella bolla di cavitazione, (3) nel liquido in condizioni ambientali.*

È noto che il laser induce la degradazione delle molecole di solvente nel plasma, con conseguente formazione di specie radicaliche dell'ossigeno (*Fig. 1.7*). Quindi, l'ossigeno proveniente dalle molecole di liquido (ad esempio l' $\text{H}_2\text{O}$ ) o da additivi reagirà con il materiale ablatto e l'entità della reazione di ossidazione dipenderà dal tipo e concentrazione delle specie reattive dell'ossigeno e dal potenziale redox del metallo.<sup>2</sup>

Quando la LAL viene eseguita in solventi organici in condizioni di atmosfera inerte ( $\text{Ar}$ ,  $\text{N}_2$ ), anche gli elementi con maggiore tendenza ad ossidarsi e caratterizzati da un ossido non passivante (come il  $\text{Fe}$ ) possono essere ottenuti stabili in liquido sotto

forma di NP metalliche, eventualmente circondate da uno strato di ossido in seguito alla reazione con l'ossigeno atmosferico.<sup>2</sup> Quando la concentrazione di specie di ossigeno reattive è sufficientemente bassa nel plasma da evitare la completa ossidazione del nucleo metallico, si formano queste NP *core-shell*.<sup>2</sup>

È importante evidenziare che la purezza di un liquido è un concetto relativo e che i solventi HPLC o di grado spettroscopico contengono ancora gas atmosferici come N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub> e tracce di altri composti. Ad esempio, nell'acqua in condizioni atmosferiche sono presenti circa 9 mg dm<sup>-3</sup> di O<sub>2</sub> e circa 14 mg dm<sup>-3</sup> di N<sub>2</sub>. In alcuni casi, la degradazione nel tempo del solvente può anche portare alla comparsa di altri composti chimici.<sup>1</sup> L'ossigeno è presente nel liquido in equilibrio con l'atmosfera ambiente, quindi gli atomi di ossigeno sono presenti all'interno della bolla di cavitazione e nella fase liquida, causando l'ossidazione degli atomi di metallo presenti nel guscio esterno delle NP generate dal laser.<sup>2</sup>

La LAL di AuNP in acqua pura è l'esempio più comune di ablazione laser in liquido, che produce una soluzione d'oro colloidale stabile nel tempo. La stabilità deriva dalla presenza di ioni adsorbiti sulla superficie delle NP. È stata riportata una maggiore stabilità colloidale per la LAL in acqua in atmosfera inerte (Ar, N<sub>2</sub>), ciò significa che l'ossigeno atmosferico può avere effetti dannosi sul processo di adsorbimento di ioni in superficie. Ciò evidenzia l'influenza delle reazioni chimiche tra il materiale ablatato e le impurità del solvente sul prodotto finale.<sup>1</sup>

Quando l'ablazione laser del target di oro viene eseguita in solventi organici come etanolo (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), tetraidrofurano (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O), dimetilsolfossido (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS), acetonitrile (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N) e dimetilformammide (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO) si possono comunque ottenere AuNP con struttura cristallina. Nonostante ciò, la dimensione media delle AuNP è inferiore e, rispetto all'acqua pura, c'è una maggiore frazione di nanoparticelle non sferiche o aggregate. Inoltre, a medio-lungo termine, si osserva la coagulazione e la precipitazione delle AuNP ottenute in solventi organici. Questi risultati possono essere dovuti all'effetto di *capping* originato dai solventi organici, che ostacola la coalescenza dei nuclei e l'ulteriore crescita delle NP. La presenza di NP non sferiche è correlata dal ricoprimento incompleto della superficie delle particelle con molecole di *capping*, che permette la crescita dei nanocristalli lungo la porzione di superficie rimasta scoperta.

La minore stabilità delle AuNP ottenute nei solventi organici può essere data da un effetto combinato: la costante dielettrica inferiore (rispetto all'acqua) e il minore potenziale  $Z$  delle NP, dovuto all'adsorbimento delle molecole di solvente sulla superficie. Poiché la fase di AuNP risulta essere cristallina, le specie cappanti prodotte durante l'ablazione laser in solventi organici non interferiscono con la formazione del reticolo metallico FCC (*"face centered cubic"*) dell'oro, ma possono essere comunque adsorbite sulla superficie negli stadi successivi di crescita.<sup>1</sup>

Durante l'ablazione, solventi diversi generano sottoprodotti diversi con proprietà chimiche e fisiche caratteristiche. Ad esempio, le NP ottenute in acetone ed etanolo presentano una maggiore stabilità rispetto a quelle ottenute in altri solventi organici. La spiegazione è data dalla complessazione superficiale da parte degli anioni enolato e alcolato, che sono carichi negativamente.

Un esempio lampante di azione tappante dei sottoprodotti generati dalla degradazione del solvente è l'ablazione laser di oro in toluene ( $C_7H_8$ ). In questo caso, la LAL porta alla formazione di AuNP estremamente piccole (diametro medio di 1 nm, le più piccole tra tutti i solventi) e sono incorporate in una matrice grafitica. I materiali grafitici vengono prodotti da tutti i solventi aromatici che, se scaldati a circa  $10^3$  K a bassa concentrazione di ossigeno, subiscono pirolisi prolungata. Dunque, la coalescenza e la crescita delle AuNP viene arrestata nella fase iniziale, quando la dimensione media è di pochi nm, da parte della matrice grafitica. Dal momento che l'Au ha una reattività praticamente nulla nei confronti del C, si formano comunque AuNP con struttura cristallina.<sup>1</sup>

Dunque, la LAL permette di modulare la composizione e la struttura delle NP in base alla natura chimica del solvente utilizzato.

### 1.3 Sintesi LAL di nanoleghe metalliche

È ormai risaputo che la sintesi LAL permette di ottenere un'ampia libreria di nanomateriali, tra cui nanoparticelle bimetalliche con diversa composizione, forma o conformazione in un singolo step a partire da un target di lega massivo (*Figura 1.8*).<sup>1,3,4</sup>

H																				He	
Li	Be																				Ne
Na	Mg																				Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br					Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I					Xe
Cs	Ba	*	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At				Rn
Fr	Ra	**																			

*	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Tb
**	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No

Figura 1.8: La libreria di NM disponibili per la LAL è riassunta nella tavola periodica, tratta da un riferimento bibliografico del 2013. Le voci gialle indicano gli elementi principali dei composti ottenuti dalla LAL, ai quali se ne sono aggiunti diversi altri negli anni successivi.

Le nanoparticelle di lega sono caratterizzate dalla combinazione di molteplici proprietà fornite dagli elementi distinti, che sono interessanti per lo studio di nuovi fenomeni fotonici, magnetici, plasmonici e chimici.<sup>4</sup> Il campo delle nanoleghe è in rapida espansione grazie al gran numero di applicazioni per le quali possono essere sfruttate. Ad esempio, le nanoleghe sono di interesse nella plasmonica (che copre un'ampia gamma di applicazioni dall'ottica alla fotonica e alla sensoristica), nei processi magneto-ottici, in nanomedicina e nella catalisi di vario tipo.<sup>5</sup>

Nel caso di nanoparticelle con composizione non termodinamicamente stabile (cioè, *metastabili*), la sintesi è molto impegnativa e richiede cinetiche di formazione molto rapidi e approcci sintetici fuori dall'equilibrio. In particolare, la sintesi con metodi tradizionali, come la sintesi chimica in liquido, è molto difficile specialmente per nanoleghe i cui elementi costituenti hanno reattività chimica e struttura cristallina differenti.<sup>4</sup>

Negli ultimi anni, la LAL ha raggiunto un certo successo nella sintesi di NP metastabili multimetalliche, grazie alle condizioni d'ablazione, in particolare temperatura e pressione elevate, e al rapido raffreddamento delle particelle appena formate, che permettono la formazione di NP con composizioni, struttura elettronica, proprietà e applicazioni senza precedenti.<sup>1,4</sup>

D'altra parte, la composizione del target non si trova necessariamente nei NM finali a causa delle reazioni collaterali con la soluzione liquida. Soprattutto con i target in

lega, la stechiometria delle NP può essere molto diversa da quella del materiale massivo e, frequentemente, si ottiene una miscela di prodotti con fase, struttura e morfologia eterogenea.<sup>1</sup>

Per questo motivo, la resa dei prodotti desiderati può essere massimizzata tramite la scelta di opportuni parametri sperimentali. Infatti, la capacità di controllare la fase e la struttura dei NM richiede un'approfondita comprensione dei processi chimici e fisici coinvolti nella LAL e, oggi, ci sono ancora molti punti poco chiari sulla correlazione tra i parametri sperimentali della LAL e la formazione di NM.<sup>1</sup>

Sono già stati effettuati diversi studi riguardo l'influenza delle condizioni di sintesi di nanoleghe metalliche mediante LAL, ad esempio sono stati valutati gli effetti dei parametri come il laser, solvente, target o gas flussati sulla natura delle NP ottenute.

Nella sintesi LAL di NP di Au-Fe, per le quali i metodi di sintesi classici comportano spesso la comparsa di etero-strutture Au-ossidi di Fe, è stato studiato il ruolo dell'ambiente chimico e come questo influenza la struttura e la composizione finale delle particelle. In questo studio, l'ablazione laser è stata eseguita in due solventi diversi, come etanolo e acqua, che hanno effetti opposti sulla composizione delle nanoleghe di Au-Fe.<sup>4</sup>

Si è visto che la LAL in acqua induce la formazione di eterostrutture, insieme ad una grande maggioranza (in numero) di piccole NP metalliche (cioè, con una distribuzione dimensionale bimodale) e le NP che si ottengono sono "povere di ferro" con ~3 at% di Fe. D'altra parte, la sintesi in etanolo induce la formazione di leghe Au-Fe con distribuzione dimensionale monomodale (logonormale) con dimensioni medie e contenuto di ferro superiori a quelli dell'acqua. Le NP risultanti sono "ricche di ferro", con ~10-13 at% di Fe.<sup>4</sup>

Nella LAL la resa di NP è anche legata all'efficace confinamento della *plasma plume* sul target da parte della soluzione liquida. I risultati suggeriscono che la dimensione e la durata della bolla di cavitazione dovrebbero essere aumentate il più possibile per preservare la composizione della lega, favorire la coalescenza e la crescita delle NP. Utilizzando solventi aventi elevata tensione superficiale, densità e viscosità si creano condizioni tali da aumentare il confinamento del plasma nella bolla con conseguente maggiore produttività di particelle.<sup>4</sup>

Sono tantissimi gli esempi di nanoleghe bimetalliche prodotte tramite LAL, prova del fatto che i vantaggi ottenuti dalla sintesi hanno suscitato molto interesse da parte di un numero sempre maggiore di utilizzatori.

Tra le leghe ottenute tramite LAL, vi sono ad esempio le NP di lega bimetallica Au-Ag, Ag-Fe, Ag-Co, Au-Co, e Fe-B. Vi sono anche esempi di leghe ternarie, come Au-Ag-Cu, o quaternarie, come Au-Ag-Cu-Pt, ottenute tramite ablazione laser in liquido.<sup>6</sup>

Le nanoleghe metalliche sono sotto i riflettori come materiali potenti e versatili per l'integrazione di varie funzionalità in un'unica nanomedicina; difatti, queste nanostrutture presentano migliori proprietà e prestazioni rispetto alle tecnologie mediche convenzionali. Ad esempio, le NP di Pt-Cu sono state utilizzate per la terapia fototermica, nonché per l'imaging fotoacustico e il rilascio di farmaci. Le NP di Pt-Co sono state sfruttate come agenti di contrasto efficienti per l'imaging fotoacustico e la risonanza magnetica (MRI), con la capacità di guidare l'irradiazione laser per la terapia fototermica. Le NP di Au-Ag sono state utilizzate come radiosensibilizzanti per i raggi X e i raggi  $\gamma$ , mostrando anche il potenziale per la generazione di specie reattive all'ossigeno. Le NP magneto-plasmoniche in lega Au-Fe si sono dimostrate un efficace agente di contrasto multimodale per la tomografia computerizzata (TC) a raggi X, la risonanza magnetica e l'imaging Raman. Un ulteriore esempio sono le NP di Fe-B, le quali combinano la capacità di radiosensibilizzazione per la terapia di cattura neutronica del boro (BNCT) con la risonanza magnetica e l'ipertermia magnetica.<sup>7</sup>



## Capitolo 2

# Nanoparticelle metalliche in nanomedicina

La nanotecnologia è un ambito multidisciplinare che si occupa dello studio, della progettazione, della sintesi e dell'applicazione di materiali e sistemi funzionali attraverso il controllo della materia a livello nanometrico. Ciò che è interessante della nanotecnologia è lo studio delle proprietà fisiche e chimiche uniche delle nanostrutture (ad esempio proprietà superficiali, conduttività elettrica e magnetismo). Negli ultimi anni la nanotecnologia ha avuto un forte impatto su diverse aree di ricerca; questo è il caso della biologia e della medicina. Nasce così il concetto di “nanomedicina” ovvero l'applicazione delle nanotecnologie alla diagnosi, alla prevenzione e al trattamento delle malattie e, di conseguenza, alla comprensione dei processi fisiopatologici coinvolti nell'origine e nel decorso di una determinata malattia.<sup>8</sup> I trattamenti tradizionali presentano, infatti, diversi limiti ed effetti collaterali, come la capacità di arrivare al tumore, il rischio degli interventi chirurgici su organi vitali, la poca selettività per le cellule cancerogene e lo spargimento di esse all'interno del corpo. Sono dunque in corso da alcuni decenni numerosi sforzi che possono aggirare o ridurre i problemi della medicina tradizionale tramite l'utilizzo di nanotecnologie.<sup>9</sup>

Sono tre gli ambiti principali in cui si sviluppa la nanomedicina:<sup>8</sup>

- i) Rilascio di farmaci e ingegneria tissutale. Quest'area si concentra sullo sviluppo di biomateriali nanostrutturati per costruire sistemi che trasportano e



distribuiscono farmaci in maniera controllata oppure che servano da adiuvanti per la rigenerazione e la riparazione dei tessuti.

- ii) Diagnosi. Questa branca della nanomedicina si concentra sulla progettazione di nanodispositivi al fine di identificare una malattia a livello cellulare o molecolare per mezzo di nanosistemi di imaging o nanobiosensori, i quali contengono una componente biologica in grado di rilevare un determinato analita in tempo reale e con elevata sensibilità.
- iii) Terapia e diagnosi (teranostica). L'obiettivo è quello di progettare e applicare nanomateriali che identificano una patologia e rilasciano molecole terapeutiche simultaneamente e in modo controllato.

Dunque, la nanomedicina è vista come la porta d'accesso a una serie di strategie diagnostiche e terapeutiche che superano molti ostacoli affrontati dalle terapie convenzionali, in quanto i potenziali vantaggi che presenta rispetto ai metodi diagnostici e terapeutici tradizionali sono vari e numerosi. In primo luogo, a differenza dei farmaci per imaging costituiti da piccole molecole, le NP possono facilmente integrare più di un tipo di agente di imaging o terapeutico, il che le rende delle potenziali nano-piattaforme multifunzionali per diagnosticare e trattare simultaneamente patologie come il cancro, l'Alzheimer e molte altre. In secondo luogo, grazie al loro elevato rapporto superficie/volume, le NP possono essere ricoperte con grandi quantità di agenti di imaging o di farmaci attraverso interazioni fisiche o coniugazione chimica. Si creano, così, dei "serbatoi" che potrebbero ridurre il numero di dosi in un trattamento. In terzo luogo, tramite l'ottimizzazione chimico-fisica delle dimensioni e delle proprietà di superficie o con specifiche funzioni di riconoscimento molecolare, le NP possono diventare selettive per le cellule tumorali, nelle quali si possono accumulare per migliorare la somministrazione di farmaci o l'imaging dell'area di interesse. Infine, un'appropriata modifica delle dimensioni e della superficie delle NP può portare ad un aumento del tempo di circolazione nel sangue, riducendo l'opsonizzazione.<sup>8,9,10</sup> Difatti, quando le NP vengono somministrate per via endovenosa, una varietà di proteine sieriche (opsonine) si legano alla superficie delle NP, che vengono riconosciute dal recettore presente sulla superficie delle cellule macrofagiche e internalizzate, portando a una perdita di NP in circolazione. I macrofagi che contribuiscono alla maggiore perdita di dose iniettata sono una componente fondamentale del sistema reticoloendoteliale (RES), anche detto sistema fagocitario mononucleato (MPS).<sup>11</sup>

Nel caso specifico della teranostica del cancro, dopo la somministrazione, le NP devono essere in grado di raggiungere il tessuto tumorale bypassando tutte le barriere biologiche presenti e, una volta sul bersaglio, rilasciare il farmaco. Numerosi studi hanno dimostrato che la localizzazione delle nanoparticelle, e quindi la loro selettività per il bersaglio, può avvenire tramite due diverse strategie:<sup>8,10,12</sup>

a) *Targeting passivo*: ottimizzazione delle proprietà chimico-fisiche delle nanoparticelle, come dimensioni e potenziale zeta, per la somministrazione mirata. In particolare, il cosiddetto effetto di permeazione e ritenzione potenziata (“EPR” da “enhanced permeation and retention”) può consentire un elevato accumulo di NP nei siti di malattie angiogeniche come i tumori. Le NP raggiungono il tessuto tumorale per diffusione passiva e vi rimangono a lungo a causa dello scarso drenaggio linfatico (Fig. 2.1(a)). In questo modo, la concentrazione dei nanosistemi può essere fino a 10 volte superiore nel tumore rispetto al tessuto sano;

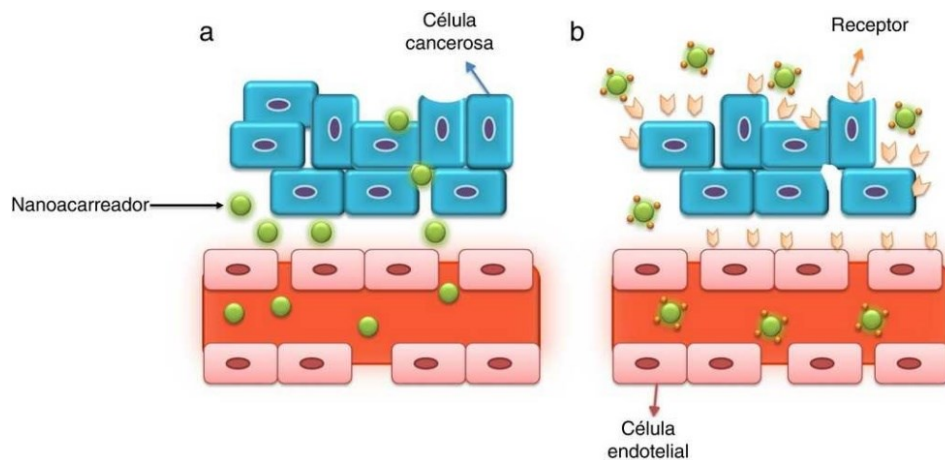


Figura 2.1: Rappresentazione del targeting passivo (a) e attivo (b) di un nanocarrier nel tessuto tumorale.

b) *Targeting attivo*: Le cellule tumorali spesso sovraesprimono alcuni tipi di recettori di membrana che ne promuovono la crescita incontrollata. Se sulla superficie delle NP vengono coniugati dei ligandi (peptidi, proteine o anticorpi) in grado di riconoscere il recettore, le NP si accumuleranno preferenzialmente al tessuto tumorale (Fig. 2.1(b)).

Oltre alle strategie di targeting attivo e passivo, si può sfruttare anche il targeting fisico in cui sorgenti o campi esterni guidano le NP verso il sito bersaglio e controllano il processo di rilascio.<sup>12</sup>

Tra tutte le caratteristiche delle NP, la dimensione gioca un ruolo particolarmente importante per l'imaging e la terapia del cancro. La dimensione, infatti, influenza in modo significativo la biodistribuzione, l'emivita della circolazione sanguigna, l'assorbimento cellulare, la penetrazione nel tumore e il targeting. Poiché in media i pori di filtrazione renale sono di 10 nm, le NP di dimensioni inferiori a 10 nm vengono rapidamente eliminate dal sistema di escrezione renale. Al contrario, le NP con dimensioni superiori a 100 nm sono facilmente identificabili dai macrofagi e si accumulano negli organi del RES, come linfonodi, fegato, milza e polmoni. Inoltre, diversi studi hanno dedotto che le dimensioni delle nanoparticelle comprese tra 10 e 60 nm sono quelle con il maggiore assorbimento a livello cellulare.<sup>12</sup>

La rapida eliminazione delle NP dal flusso sanguigno da parte del RES è uno dei principali ostacoli per garantire che le nanoparticelle possano raggiungere il livello di accumulo nel tessuto bersaglio, e la modulazione della farmacocinetica delle NP per prevenire la rapida clearance dal sangue è legata alle dimensioni e al tipo di ricoprimento superficiale.<sup>13</sup> Il metodo di modifica superficiale più comune è l'incapsulamento di nanomateriali idrofobici in un guscio di polietilenglicole (PEG) e derivati, che aumenta notevolmente la solubilità e prolunga il tempo di circolazione sanguigna. A causa della struttura idrofila del PEG, il legame delle opsonine alle NP e il riconoscimento da parte dei macrofagi è minore, riducendo la clearance delle nanoparticelle da parte del RES.<sup>12</sup>

Fino ad ora, circa tre dozzine di materiali diagnostici o terapeutici con formulazioni su scala nanometrica sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) per uso clinico, ma sono considerati nanomedicine di prima generazione, ovvero prodotti semplici senza una specificità. D'altra parte, varie NP, anche multifunzionali, con un'elevata specificità per il bersaglio sono attivamente in fase di studio.<sup>10</sup>

Nonostante i continui progressi delle tecnologie biomediche, la lotta alle malattie è in continua evoluzione e alcune condizioni patologiche si sono rivelate ancora più complesse di quanto si supponesse in passato, facendo sembrare la soluzione ancora

più lontana. Uno dei motivi di questa situazione è l'eterogeneità della malattia tumorale e dei pazienti. Pertanto, molti ricercatori hanno compreso che ogni paziente necessita di una terapia ottimizzata in base alle differenze nei fattori genetici, nelle condizioni fisiche nei fattori ambientali e nelle caratteristiche della malattia.<sup>10</sup>

Dato che le NP multifunzionali possono consentire l'imaging multimodale con la combinazione di due o più modalità di imaging, oppure la teranostica per l'imaging e la terapia simultanei,<sup>10</sup> offrono delle possibilità aggiuntive per la personalizzazione della medicina richiesta dalle patologie più complesse.

## 2.1 Tecniche di Imaging

La diagnosi precoce della malattia è una parte cruciale della pratica clinica, in particolare per il cancro. Per la diagnosi non invasiva, si fa ricorso alle tecniche di imaging *in vivo*, che hanno lo scopo di visualizzare le anomalie dei tessuti o monitorare l'evoluzione delle zone di interesse. In questo modo, l'imaging spesso svolge il ruolo più importante nella diagnosi precoce e nella valutazione della risposta terapeutica di varie malattie.<sup>10,12</sup>

L'obiettivo principale delle tecniche di imaging è quello di fornire una mappa, più dettagliata possibile, degli organi interni di un corpo in tempo reale, senza l'alterazione dei tessuti e preferibilmente in maniera non invasiva. Le immagini vengono create sulla base dei segnali modificati dopo aver attraversato l'organismo oppure riflessi da organi e tessuti. Esistono diversi tipi di tecniche, nelle quali si genera un contrasto dovuto alle differenti caratteristiche fisiche proprie dei tessuti esaminati.<sup>14</sup> Ogni tecnica è indirizzata all'analisi di determinate strutture atomiche e presenta i suoi vantaggi unici insieme a limitazioni intrinseche, come l'insufficiente sensibilità o risoluzione spaziale, che rendono difficile ottenere informazioni affidabili e accurate nel sito della malattia.

Per compensare questo problema, si possono combinare più modalità di imaging. L'imaging multimodale, infatti, è in grado di fornire informazioni più affidabili e accurate dei siti d'interesse grazie all'unione dei vantaggi offerti da ogni singola tecnica.<sup>10</sup>

Per ottenere informazioni anatomiche e funzionali più accurate è possibile fare ricorso degli agenti di contrasto esterni, introdotti nell'organismo per via venosa, arteriosa o dagli orifizi naturali, che permettono di distinguere tra il tessuto normale

e le lesioni anomale.<sup>12</sup> Gli agenti di contrasto hanno la capacità di modificare le proprietà fisiche dei tessuti con i quali interagiscono, consentendo di ottenere da questi un segnale più o meno intenso rispetto all'ambiente circostante.<sup>14</sup> La maggior parte delle sonde di imaging attualmente utilizzate nelle cliniche sono molecole organiche o composti metallo-organici, la cui utilità è limitata a causa delle loro intrinseche proprietà fisiche e fisiologiche. Per esempio, gli agenti di contrasto per risonanza magnetica a base di chelati di  $Gd^{3+}$  mostrano un ottimo effetto di contrasto ma hanno un basso tempo di circolazione *in vivo*, con conseguente scarsa efficienza di targeting e insufficiente miglioramento dell'imaging, al quale si associano serie preoccupazioni per gli effetti neurotossici a medio e lungo termine ed effetti di tossicità acuta in un numero limitato di pazienti, in particolare con limitata funzionalità renale.<sup>15</sup>

Di seguito particolare attenzione viene rivolta alle modalità di imaging attualmente più in uso, ovvero la risonanza magnetica (MRI, da "magnetic resonance imaging") e la tomografia computerizzata a raggi X (TC).

### 2.1.1 Tomografia Computerizzata

La parola tomografia deriva dal greco ed è composta da *tomos* (fetta, sezione) e *graphia* (riguardante l'atto di scrivere). L'invenzione della tomografia computerizzata risale al 1972, ad opera dell'ingegnere Godfrey Hounsfield e del fisico Allan Cormack, insigniti del Premio Nobel per la medicina per la loro scoperta.

Il tomografo utilizzato da Hounsfield e Cormack impiegava diverse ore per acquisire una singola sezione, mentre oggi il tomografo può vagliare fino a quattro sezioni in circa 350 ms.<sup>16</sup>

La tomografia computerizzata è una procedura di imaging biomedico basata sull'interazione dei raggi X con un corpo o un mezzo di contrasto. Questa tecnica sfrutta l'attenuazione differenziale dei raggi X e lo spessore dei tessuti per creare immagini trasversali e tridimensionali, generate tramite l'aiuto di un computer utilizzando i profili di intensità dei raggi X. La TC è una delle tecniche di imaging più utilizzate grazie alla sua elevata risoluzione spaziale e alla rapida acquisizione delle immagini. Per la maggior parte delle applicazioni in cui viene impiegata, la

sensibilità della TC non è sufficientemente elevata, dunque i mezzi di contrasto sono spesso necessari per distinguere i tessuti con coefficienti di attenuazione simili.<sup>12,15</sup>

La capacità della TC di distinguere i tessuti si basa sul fatto che tessuti diversi forniscono diversi gradi di attenuazione dei raggi X, dove il coefficiente di attenuazione è determinato dal numero atomico e dalla densità elettronica del tessuto. Maggiore sono queste due proprietà, maggiore è il coefficiente di attenuazione.<sup>17</sup>

L'attenuazione dei raggi X attraverso un oggetto, in questo caso i tessuti del corpo umano, avviene in modo esponenziale con lo spessore dell'oggetto, secondo l'Eq.1:<sup>16</sup>

$$\frac{I(x)}{I(0)} = e^{-\mu x} \quad (\text{Eq. 1})$$

Dove  $x$  è la distanza percorsa dalla radiazione nel mezzo,  $I(x)$  è l'intensità della radiazione nel punto  $x$ ,  $I(0)$  è l'intensità della radiazione prima di entrare nel mezzo e  $\mu$  è il coefficiente di attenuazione lineare, la cui unità di misura è  $\text{cm}^{-1}$ .

Tale attenuazione è dovuta all'interazione dei raggi X con la materia, ovvero all'urto dei fotoni utilizzati nei tomografi (con energia compresa tra 20-150 keV) con gli elettroni degli atomi nei tessuti. Il principale tipo di interazione responsabile della formazione delle immagini è l'assorbimento fotoelettrico, processo in cui un fotone incidente ad alta energia collide con un elettrone di un atomo nei tessuti (Fig. 2.2). Gran parte dell'energia del fotone viene trasferita all'elettrone in forma di energia cinetica, mentre una parte viene utilizzata per staccare dal nucleo l'elettrone che quindi viene espulso. Il risultato è la rimozione di un fotone dal fascio di raggi X e la ionizzazione di un atomo.

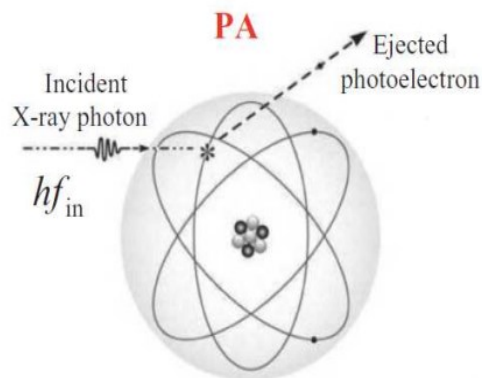


Figura 2.2: Rappresentazione dell'assorbimento fotoelettrico (PA, photoelectric absorption).

Dopo questi eventi, gli atomi ionizzati si trovano in uno stato eccitato instabile, solitamente con una vacanza elettronica nei gusci più interni. In risposta, un elettrone da un orbitale superiore cade a colmare la vacanza con emissione di raggi X caratteristici.<sup>16</sup>

Ci sono quattro fattori che contribuiscono a determinare  $\mu$  e quindi quanto efficacemente un organo (ad esempio un tessuto, un organo) è in grado di attenuare il fascio di raggi X: lo spessore locale, la densità ( $\rho$ ), la composizione chimica ( $Z$ ), e l'energia effettiva del fotone ( $E$ ).

La velocità di attenuazione del fascio è direttamente proporzionale alla densità dei tessuti. In generale, risulta che più energia possiede un fotone e più alta è la probabilità che non venga assorbito. Se in particolare si considera l'interazione con i muscoli,  $\mu$  diminuisce rapidamente all'aumentare dell'energia e risulta  $\mu(E) \propto 1/E^3$ . Inoltre, i fotoni dei raggi X sono più inclini ad interagire tramite assorbimento fotoelettrico con atomi con numero atomico elevato e risulta  $\mu(\rho, Z, E) \propto \rho Z^3 / E^3$ .

In sintesi, l'effetto di assorbimento fotoelettrico è favorito tra fotoni a bassa energia e gli elettroni interni degli atomi con elevato numero atomico.<sup>16</sup>

Il coefficiente di attenuazione di qualsiasi materiale dipende dall'energia del fascio incidente ma, tale dipendenza non è di diretto interesse clinico e per questo viene rimossa normalizzando il numero TC (il valore del coefficiente di attenuazione lineare di un tessuto in un determinato punto,  $\mu(x,y)$ ) rispetto a quello dell'acqua.

$$\text{numero TC (HU)} = 1000\{[\mu(x,y) - \mu_{H_2O}]/\mu_{H_2O}\} \quad (\text{Eq. 2})$$

Il numero 1000 è stato scelto per convenzione e il numero TC è espresso in Unità Hounsfield (HU). Come riferimento è stata scelta l'acqua pura perché comprende dall'80 al 90% del peso dei tessuti molli. Inoltre, è un materiale economico e completamente riproducibile per la calibrazione delle macchine e questo permette di confrontare le immagini TC ottenute con strumenti diversi.<sup>16</sup>

### 2.1.1.1 Agenti di contrasto per TC

Attualmente, i mezzi di contrasto più utilizzati per la TC sono molecole contenenti iodio o bario. Tuttavia, poiché la TC è in grado di rilevare una concentrazione del mezzo di contrasto di circa  $10^{-2}$  M, deve essere somministrata una dose elevata, il che solleva preoccupazioni sulla loro tossicità. Ad esempio, sebbene la sospensione di solfato di bario sia stata somministrata per via orale per decenni per l'imaging gastrointestinale, non può più essere utilizzata come mezzo di contrasto intravascolare a causa della sua tossicità renale e cardiovascolare.<sup>15</sup> Invece, i composti a base di iodio presentano diverse limitazioni come il breve tempo di circolazione sanguigna, che impedisce il loro accumulo su particolari organi e tessuti, la rapida clearance renale che impone l'iniezione di più dosi consecutive con conseguenti effetti avversi documentati.<sup>12,15,17,18</sup>

Per questo motivo, degli agenti di contrasto di dimensioni nanometriche sono stati studiati da molto tempo nel tentativo di superare queste limitazioni e aumentare l'efficienza dell'imaging TC.

Gli agenti di contrasto TC di dimensioni nanometriche sono stati utilizzati in diverse applicazioni in base alla loro biodistribuzione, alla capacità di generare una efficace attenuazione dei raggi X e alla loro capacità di essere selettivi per alcuni tipi particolari di tessuti. Ad esempio, una valida alternativa ai composti molecolari iodati è costituita dalle nanoparticelle di oro. In letteratura è riportato un caso di AuNP funzionalizzate con degli anticorpi che si legano in maniera specifica a delle cellule tumorali. Il coefficiente di attenuazione di tali cellule, dopo essersi legate alle nanoparticelle di oro funzionalizzate, risulta 5 volte maggiore delle cellule libere.<sup>17</sup>

Esistono due categorie di agenti di contrasto TC in base alla composizione delle nanoparticelle:<sup>12</sup>

- i) Agenti di contrasto a base di iodio, in cui le NP sono utilizzate come vettori per caricare lo iodio utilizzando la classica struttura *core-shell*. Lo iodio è caricato nel nucleo delle NP.
- ii) Agenti di contrasto a base metallica, in cui le nanoparticelle sono realizzate utilizzando i vari metalli con elevati coefficienti di attenuazione dei raggi X. I metalli utilizzati in questa categoria includono principalmente oro, ossido di tantalio, biossido di zirconio, afnio e bismuto (metallico o ossido).



Le NP a base di metalli possono presentare diversi design strutturali, di cui i più comuni sono la forma sferica semplice, *core-shell* o ramificata (Fig. 2.3).

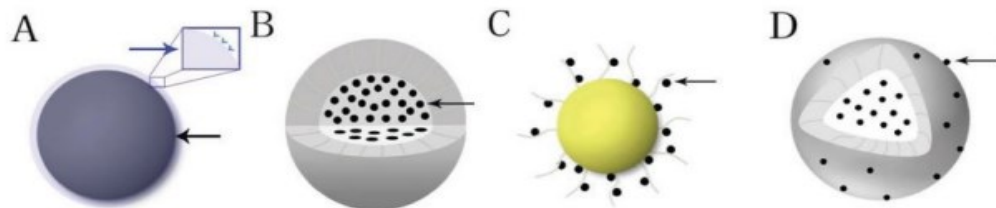


Figura 2.3 Diverse strutture di nanoparticelle per l'imaging CT-MRI. A) struttura semplice; B) struttura Core-Shell; C) Struttura ramificata; D) struttura mista.

Per la struttura semplice, le nanoparticelle d'oro sono l'esempio più comune (Fig. 2.3(A)). Per le strutture *core-shell* (struttura nucleo-guscio), gli elementi metallici possono essere incorporati sia nel *core* che nella *shell* (Fig. 2.3(B)). Il design *core-shell* permette un certo controllo delle dimensioni delle NP e della quantità di materiale caricato. Inoltre, questa struttura presenta dei vantaggi per quanto riguarda la solubilità e la biosicurezza; infatti, il guscio può diminuire il rilascio di ioni metallici. C'è un cospicuo elenco di NP *core-shell* ottenute mediante sintesi LAL, tra cui NP composte da un nucleo di Fe e da un guscio di ossido di ferro, o NP composte da un nucleo metallico di Ni con un guscio di ossido di nichel, prodotte in acqua o in alcoli.<sup>2</sup> Per le strutture ramificate (Fig. 2.3(C)), gli elementi metallici sono inseriti tramite composti molecolari polimerici o dendritici sulla superficie intorno ad un nucleo di supporto. Un esempio sono nanoparticelle con gadolinio coordinato tramite specifiche funzionalità chelanti inserite in una catena polimerica, il tutto agganciato sulla superficie di una nanoparticella di oro. Infine, le varie modalità possono essere combinate in strutture più complesse o miste (Fig. 2.3(D)).<sup>12</sup>

L'oro induce una forte attenuazione dei raggi X, maggiore rispetto agli agenti a base di iodio, delle ossa e dei tessuti molli (5.16 vs 1.94, 0.186 e 0.169 cm<sup>2</sup>/g a 100 keV rispettivamente). Il numero atomico e la densità elettronica dell'oro (79 e 19.32 g/cm<sup>3</sup> rispettivamente) sono molto più elevati di quelli dello iodio attualmente utilizzato (53 e 4.9 g/cm<sup>3</sup>). Inoltre, le AuNP presentano proprietà fisiche, chimiche e biologiche uniche, che le rendono un candidato ideale per i mezzi di contrasto TC.<sup>12,17</sup> L'oro ha un alto profilo di biosicurezza e può essere facilmente trasformato in varie dimensioni e forme. Rispetto ai mezzi di contrasto a base di iodio, le AuNP non hanno rischi di danno a livello renale e l'elevata attenuazione dei raggi X migliora la

risoluzione dell'immagine. Il diametro delle AuNP varia da pochi nm a centinaia di nm, ma le dimensioni nell'intervallo da 4 a 30 nm hanno la massima stabilità e specificità cellulare.<sup>12</sup>

### 2.1.2 Imaging tramite Risonanza Magnetica (MRI)

La risonanza magnetica è una tecnica di imaging biomedico non invasiva basata sul principio della Risonanza Magnetica Nucleare (NMR, dall'inglese Nuclear Magnetic Resonance).<sup>15</sup> Essa si basa sull'interazione con gli spin dei protoni in presenza di un campo magnetico esterno quando eccitati con un impulso di radiazione elettromagnetica a radiofrequenza. In base al segnale di risonanza magnetica nucleare proveniente dai protoni del corpo umano, l'MRI può mostrare, con elevata qualità, porzioni o immagini 3D dell'anatomia e fisiologia di tessuti, organi e vasi, con una risoluzione in piano anche inferiore a 1 mm. Per esempio, può dare contrasto tra tessuti molli radiologicamente simili (Fig. 2.4), il tutto senza esporre il paziente a radiazioni ionizzanti.<sup>12,16</sup>

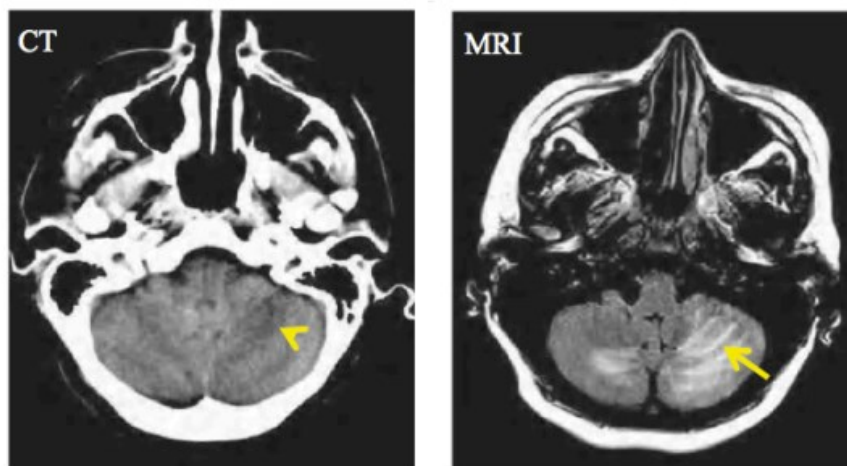


Figura 2.4 Rappresentazione di due porzioni trasversali di emisfero di un paziente affetto da sindrome encefalopatica posteriore reversibile, che si presenta come cambiamenti edematici sulla materia bianca. Si può osservare che la tecnica MRI mostra l'edema con una risoluzione molto maggiore rispetto alla TC.

Il contrasto della risonanza magnetica è generato dalle diverse caratteristiche di rilassamento degli atomi di idrogeno nei tessuti, in particolare quelli delle molecole di acqua presenti in essi.

Questi protoni sono influenzati dalla rotazione e dal movimento delle molecole coinvolte e nel modo in cui queste interagiscono con l'intorno bio-fisico, che dipende a sua volta dal tipo di tessuto e dal suo stato di salute. Quindi la tecnica MRI crea mappe spaziali dell'intorno dei nuclei di idrogeno dell'acqua nei tessuti. Differenze

in questo intorno possono essere clinicamente correlate con differenze nelle proprietà biofisiche, biochimiche e fisiologiche dei tessuti.<sup>15,16</sup>

Rispetto ad altre modalità di imaging, la risonanza magnetica si distingue per la sua superba risoluzione anatomica; tuttavia, il suo successo nell'imaging molecolare soffre a causa della sua intrinseca insensibilità. Inoltre, i limiti della risonanza magnetica includono costi, tempi di imaging più lunghi, artefatti da movimento e potenziali artefatti da corpi estraneo/impianto.<sup>12,19</sup>

### 2.1.2.1 Principio della Risonanza magnetica nucleare

Il principio fisico alla base dell'MRI è lo stesso della spettroscopia NMR ed è l'interazione tra una radiazione elettromagnetica, nel campo delle radiofrequenze (1-1000 MHz) e un campione costituito da nuclei atomici che possiedono momento di spin, definito dal numero quantico  $I$ , inseriti all'interno di un intenso campo magnetico uniforme. Ad un momento di spin nucleare  $\vec{I}$  è associato un momento magnetico  $\vec{\mu}$ . I due vettori sono paralleli tra loro e la costante di proporzionalità tra  $I$  e  $\mu$  è detta rapporto giromagnetico nucleare ( $\gamma_N$ ), ed è una costante caratteristica di ogni nucleo (Eq. 3).<sup>20</sup>

$$\vec{\mu} = \gamma_N \vec{I} \quad (\text{Eq. 3})$$

Lo spin possiede tutte le proprietà di un momento angolare, anche se non è associato ad una reale rotazione del nucleo nello spazio. Il vettore momento di spin possiede un modulo di grandezza  $|\vec{I}| = \{I(I+1)\}^{1/2}\hbar$  e può assumere  $2I+1$  orientazioni rispetto a un asse specificato (l'asse z in genere). Queste orientazioni sono gli autovalori dell'operatore di proiezione secondo l'asse di riferimento,  $I_z$ , definite dal numero quantico magnetico di spin  $m_I$ , che può assumere i valori da  $-I$  a  $+I$  (Eq. 4).<sup>20</sup>

$$\vec{I}_z = m_I \hbar \quad m_I = -I, -I+1, \dots, I-1, +I \quad (\text{Eq. 4})$$

In caso di  $I = 1/2$  e in assenza di un campo magnetico esterno, i due autostati  $\alpha$  e  $\beta$  sono degeneri (presentano la stessa energia), ed avranno uguali popolazioni. In presenza di un campo magnetico statico avviene la separazione in energia dei due livelli di spin, i quali avranno popolazioni diverse. L'energia di interazione (Eq. 5)

tra un nucleo di momento magnetico  $\mu$  e il campo magnetico esterno  $B_0$  diretto lungo una direzione che si assume sia l'asse  $z$  è:<sup>20</sup>

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = -\mu_z \cdot B_0 \quad (\text{Eq. 5})$$

Nella meccanica quantistica, all'energia si associa l'operatore Hamiltoniano  $\hat{H}$  (Eq. 6):

$$\hat{H} = -\hat{\mu} \cdot \vec{B} = -\gamma_N \vec{B} \cdot \hat{I} = -\gamma_N \cdot B_0 \cdot \hat{I}_z \quad (\text{Eq. 6})$$

Dato che gli autovalori di  $\hat{I}_z$  sono  $m_I \hbar$ , gli autovalori dell'operatore Hamiltoniano  $\hat{H}$  sono le energie degli stati di spin in un campo magnetico (Eq. 7):

$$E_{m_I} = -\gamma_N m_I \hbar B_0 \quad (\text{Eq. 7})$$

Il protone ( $^1\text{H}$ ) ha  $I=1/2$  e il suo spin può adottare l'una o l'altra tra le due orientazioni  $+1/2$  e  $-1/2$ , e le corrispondenti autofunzioni (stati di spin) vengono indicate con  $\alpha$  e  $\beta$  (Eq. 8,9).

$$E_\alpha = -\frac{1}{2} \gamma_N \hbar B_0 \quad (\text{Eq. 8})$$

$$E_\beta = +\frac{1}{2} \gamma_N \hbar B_0 \quad (\text{Eq. 9})$$

La separazione in energia (Eq. 10) tra i livelli di spin in un campo magnetico  $B_0$ , dove gli spin  $\alpha$  (paralleli a  $B_0$ ) hanno un'energia inferiore agli spin  $\beta$  (antiparalleli a  $B_0$ ) è:

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \gamma_N \hbar B_0 \quad (\text{Eq. 10})$$

Si può notare che  $\Delta E$  dipende dal valore del campo magnetico, per cui maggiore è il campo magnetico applicato e maggiore sarà la differenza tra i due livelli.<sup>20</sup>

All'equilibrio termico, le popolazioni dei due stati di spin ( $N_\alpha$  e  $N_\beta$ ) sono definite dalla distribuzione di Boltzmann (Eq. 11):

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}} = e^{\frac{\gamma_N \hbar B_0}{k_B T}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{k_B T} = 1 - \frac{\gamma_N \hbar B_0}{k_B T} \quad (\text{Eq. 11})$$

Dove  $k_B$  è la costante di Boltzmann e  $T$  la temperatura assoluta. Nelle condizioni sperimentali normalmente utilizzate negli spettrometri NMR, il campo magnetico è di pochi Tesla e risulta che  $\gamma \hbar B_0 \ll k_B T$ ; quindi, il rapporto  $N_\alpha/N_\beta$  è di poco superiore

a 1. Si ha, cioè, un piccolo eccesso di popolazione nello stato a minore energia (stato  $\alpha$ ), e questo genera un momento magnetico netto (magnetizzazione) in un insieme di spin nucleari immersi in un campo magnetico. La magnetizzazione, rappresentata da un vettore  $M$  diretto lungo la direzione  $z$ , è proporzionale alla differenza di popolazione  $\Delta N$  tra i livelli  $\alpha$  e  $\beta$ , e quindi al valore del campo magnetico  $B_0$ . Le componenti dei momenti magnetici lungo le direzioni  $x$  e  $y$  sono presenti con uguale probabilità in tutte le direzioni; quindi,  $M_x$  e  $M_y$  sono nulle (Fig. 2.5).<sup>20</sup>

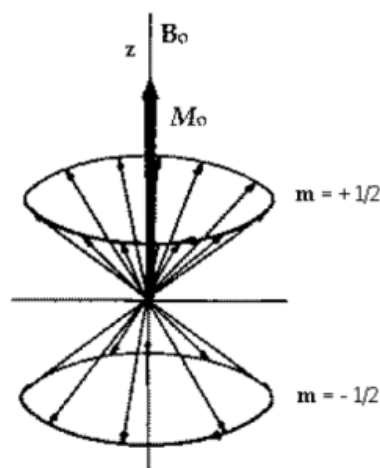


Figura 2.5 Rappresentazione della magnetizzazione di equilibrio in presenza di un campo magnetico  $B_0$ .

Se si sottopone il campione a una radiazione di frequenza  $\nu$ , gli intervalli di energia entrano in risonanza con la radiazione quando la frequenza soddisfa la condizione di risonanza (Eq. 12):

$$\Delta E = h \cdot \nu = \gamma_N \hbar B_0 \rightarrow \nu = \frac{\gamma_N}{2\pi} B_0 \quad (\text{Eq. 12})$$

Dove  $\nu$  è detta “frequenza di Larmor”. Lo scambio di energia avviene tra il campo magnetico  $B_1$  oscillante della radiazione elettromagnetica e il momento magnetico nucleare, e la probabilità di transizione è diversa da 0 solo se la direzione di  $B_1$  è perpendicolare al campo magnetico statico  $B_0$ . Inoltre, per transizioni di spin nucleare indotte da radiazione elettromagnetica risulta che la transizione può avvenire solo tra stati che differiscono nel numero quantico magnetico  $m_I$  (proiezione lungo l’asse di quantizzazione) di una unità, cioè  $\Delta m_I = \pm 1$ , che rappresenta la regola di selezione per le transizioni di spin nucleare.<sup>20</sup>

I nuclei di idrogeno  $^1\text{H}$  (protoni) svolgono un ruolo chiave nel meccanismo della risonanza magnetica, perché tutti i protoni allineano il loro spin in una direzione sotto il controllo di un campo magnetico esterno. Dopo l’applicazione di un impulso a

radiofrequenza (RF), l'orientamento dello spin del protone viene deviato per poi rilassare allo stato originale. Questo processo genera due parametri di rilassamento indipendenti che vengono sfruttati per generare le immagini.

Per capire come avviene la generazione delle immagini consideriamo il vettore magnetizzazione  $\mathbf{M}$ , che si genera quando il campione viene immerso in un campo magnetico esterno  $B_0$  diretto lungo l'asse  $z$ . La magnetizzazione, essendo un momento magnetico associato a un momento angolare, se ha componenti  $M_x$  e  $M_y$  non nulle, è soggetta a un moto di precessione intorno alla direzione del campo magnetico, con frequenza pari alla *frequenza di Larmor* (Fig. 2.6).<sup>20</sup>

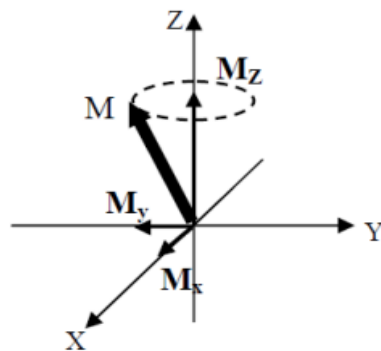


Figura 2.6 Rappresentazione del moto di precessione della magnetizzazione attorno alla direzione del campo magnetico.

Se il campione viene irradiato lungo l'asse  $x$  con un impulso a RF che contiene anche la frequenza di Larmor dei nuclei in esame, questi assorbiranno energia e subiranno una transizione di spin. A livello macroscopico si osserva che  $M$  ruota allontanandosi dall'asse  $z$  per avvicinarsi al piano  $XY$ , con una velocità di precessione in radianti pari a  $\omega = \gamma \cdot B_1$  (Fig. 2.7).

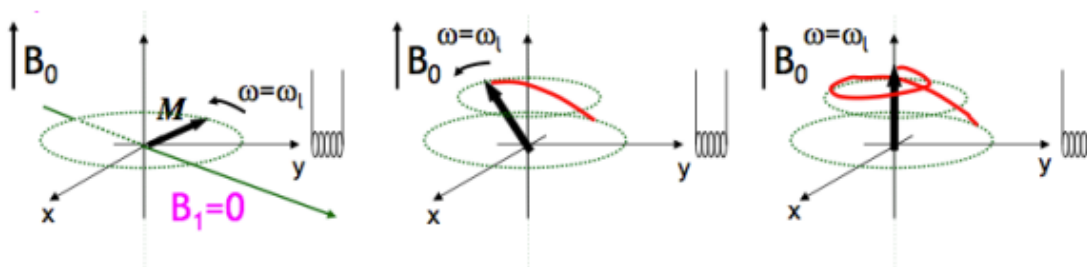


Figura 2.7 Rappresentazione del moto di precessione della magnetizzazione in seguito ad un impulso di  $\pi/2$  di radiazione con componente  $B_1$  parallela a  $X$ .

Quando la componente lungo  $Z$  diventa nulla si parla di un impulso di angolo pari a  $\theta = \pi/2$ . Dopo un tale impulso, il vettore  $M$  inizia un moto di precessione attorno a  $Z$  che si associa a una progressiva scomparsa della magnetizzazione  $XY$  e ricomparsa della magnetizzazione  $Z$ .<sup>20</sup>

Dopo che un sistema di spin è stato eccitato da un impulso, esso va incontro a una serie di processi di rilassamento di spin aventi lo scopo di ripristinare la magnetizzazione di equilibrio ( $M_x=M_y=0$ ,  $M_z \neq 0$ ). Questi processi prendono il nome di rilassamento longitudinale e rilassamento trasversale. I tempi  $T_1$  e  $T_2$  (rispettivamente) con cui questi processi avvengono e la densità di spin protonica sono i principali fattori di contrasto tra i vari tessuti e organi del corpo umano.<sup>16,20</sup>

#### 2.1.2.1.1 Rilassamento longitudinale o spin-reticolo

Il primo processo è quello che ripristina la magnetizzazione lungo  $z$  e viene detto rilassamento spin-reticolo, che avviene con il rilassamento del segnale  $M_z(t)$  verso il valore iniziale di equilibrio  $M_0$ . La funzione che descrive questo processo ha un andamento esponenziale del tipo (Eq. 13):

$$M_z(t) = M_0 (1 - e^{-t/T_1}) \quad (\text{Eq. 13})$$

$T_1$  è il tempo caratteristico di questa funzione e viene indicato come Tempo di rilassamento longitudinale. Il suo reciproco invece rappresenta la velocità di rilassamento longitudinale,  $R_1 = 1/T_1$ . Il rilassamento viene fortemente influenzato dall'interazione degli spin eccitati con l'ambiente circostante e quindi, nel caso dell'MRI di sistemi biologici, dall'interazione in particolare delle molecole d'acqua con biomolecole e/o membrane cellulari. Il valore di  $T_1$  viene influenzato quindi dalla quantità d'acqua che risiede dentro e tra i tessuti, che a sua volta viene influenzata dai processi fisiologici normali e anormali, dallo stato di salute di un tessuto e da molti altri fattori. Per questo motivo le variazioni spaziali del valore di  $T_1$  sono interessanti.<sup>16,20</sup>

#### 2.1.2.1.2 Rilassamento trasversale o spin-spin

Il secondo processo di rilassamento è quello che annulla la magnetizzazione sul piano  $xy$  e viene detto rilassamento spin-spin. Anche questo processo ha un andamento esponenziale del tipo (Eq. 14):

$$M_{x,y}(t) = M_0 e^{-t/T_2} \quad (\text{Eq. 14})$$

Il tempo caratteristico di questa funzione viene indicato con  $T_2$  e si chiama Tempo di Rilassamento trasversale. In generale, anche il  $T_2$  dipende dal nucleo in esame, dalla molecola in cui si trova inserito, dal solvente e dalla temperatura, ma risulta essere più breve del  $T_1$ .<sup>16,20</sup>

Il parametro  $T_2$  può essere espresso dalla somma di due contributi (Eq. 15): uno è lo stesso parametro  $T_1$ , mentre l'altro è un distinto fenomeno di rilassamento chiamato *componente secolare* e descritto da  $T_2^*$ . Questo rilassamento accelera il decadimento di  $M_{x,y}(t)$  nel tempo e coinvolge lente e casuali variazioni del campo magnetico locale, derivanti da lenti movimenti delle molecole circostanti.

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2^*} \quad (\text{Eq. 15})$$

Questi sono detti anche processi di defasamento di spin, in quanto la presenza di una magnetizzazione trasversale richiede un certo grado di “coerenza” o “fasatura” tra gli spin. Una coerenza tra gli spin indica che il valore medio della fase dell'insieme di spin non è nullo. A seguito di un impulso di  $90^\circ$  si ha la creazione di una coerenza tra gli spin che genera una componente  $M_y$  non nulla. Qualsiasi processo di rilassamento che modifichi l'equilibrio tra gli spin contribuisce alla suddetta redistribuzione casuale, portando alla perdita di coerenza.

Il movimento molecolare, dunque, risulta molto importante in questo processo; un moto molecolare lento risulta in un  $T_2$  breve, mentre il moto veloce corrisponde a  $T_2$  lungo. Ad esempio, nei tessuti molli le molecole hanno un comportamento intermedio tra solidi e liquidi e il  $T_2$  risulta più breve di  $T_1$  di un 3-10 volte.<sup>16,20</sup>

In base a quanto detto, la velocità di rilassamento trasversale, data dal reciproco del tempo di rilassamento, può essere scomposta in due contributi (Eq. 16):

$$R_2 = \frac{1}{T_2} = \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2^*} \quad (\text{Eq. 16})$$

Il fattore  $\frac{1}{2}$  è dovuto al fatto che l'effetto secolare avviene sul piano  $xy$ , mentre il rilassamento longitudinale avviene solo lungo la direzione  $z$ .<sup>16,20</sup>

### 2.1.2.2 Agenti di contrasto per MRI

Come detto in precedenza, il naturale contrasto nelle immagini di risonanza magnetica dipende principalmente dalla densità di spin protonica e dai tempi di rilassamento  $T_1$  e  $T_2$ . Nei tessuti molli sani, le differenze nei tempi di rilassamento locali sono spesso abbastanza marcate per produrre un contrasto significativo nelle immagini  $T_1$  e  $T_2$ . Anche i tessuti patologici possono essere distinti dai tessuti sani grazie alle differenze intrinseche nei valori di  $T_1$  e  $T_2$  nei due casi. Tuttavia, ci sono molte condizioni patologiche che non portano a significativi cambiamenti



morfologici, e non mostrano quindi sufficienti differenze nei tempi di rilassamento. In queste circostanze, si possono utilizzare degli agenti di contrasto per MRI, efficaci nell'assorbire i raggi X. Questi agenti alterano l'ambiente magnetico locale di determinati protoni dell'acqua, influenzando così i tempi di rilassamento locali dei tessuti.<sup>21</sup>

L'efficacia di un agente di contrasto è misurata in termini di rilassività ( $r$ ), che rappresenta l'aumento della velocità di rilassamento del protone dell'acqua per concentrazione millimolare del complesso paramagnetico.<sup>22</sup>

I mezzi di contrasto aumentano sia  $1/T_1$  sia  $1/T_2$  in misura variabile a seconda della loro natura e del campo magnetico applicato.<sup>23</sup> Il rapporto  $r_2/r_1$  è un parametro chiave per distinguere i mezzi di contrasto  $T_1$  e  $T_2$ . I mezzi di contrasto  $T_1$  devono avere un valore di rilassività  $r_1$  elevato, con il rapporto  $r_2/r_1$  idealmente vicino a 1. I mezzi di contrasto  $T_2$ , invece, possiedono un alto valore di rilassività  $r_2$  e quindi hanno un grande rapporto  $r_2/r_1$ , fino a 10 volte maggiore o più.<sup>23,24</sup>

La combinazione di MRI e agenti di contrasto può incrementare notevolmente la sensibilità della tecnica.<sup>15,24</sup>

#### **2.1.2.2.1 Agenti di contrasto $T_1$**

Gli agenti di imaging  $T_1$  sono in genere materiali paramagnetici, i quali accorciano il tempo di rilassamento  $T_1$ , ovvero accelerano il rilassamento longitudinale dei protoni dell'acqua con conseguente contrasto più luminoso sulle immagini pesate in  $T_1$ . Questa categoria di mezzi di contrasto rappresenta i contrasti "positivi", i quali rendono più chiara e brillante la zona in cui si localizzano (*Fig. 2.8*).<sup>12,19</sup> Lo ione più ampiamente utilizzato è il  $Gd^{3+}$ , che possiede un elevato paramagnetismo grazie alla presenza di 7 elettroni spaiati negli orbitali atomici f. Il problema principale di questi ioni è la loro tossicità nei confronti dell'organismo; per questo motivo è necessaria la loro coordinazione con agenti chelanti per formare dei complessi metallici meno tossici.<sup>10</sup>

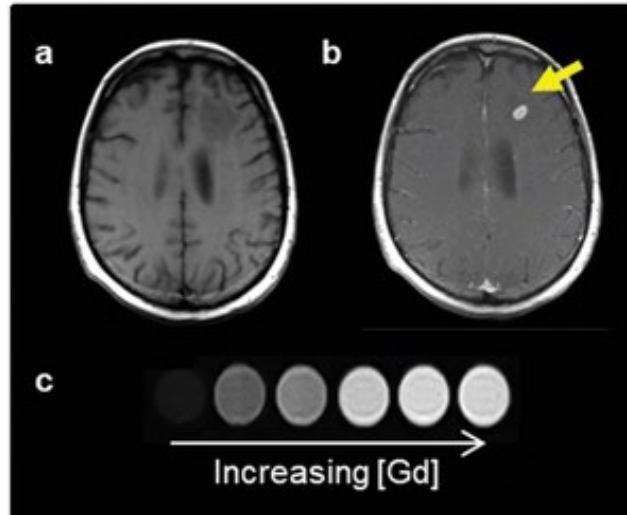


Figura 2.8 a) Pre e b) post MRI con agenti di contrasto T1-pesato a base di Gd su una metastasi cerebrale. C) Gli agenti di contrasto T1 riducono il tempo di rilassamento spin-reticolo, aumentando il segnale con l'aumentare della concentrazione dell'agente e producono immagini di contrasto più luminose.

In presenza dell'agente di contrasto, la velocità di rilassamento totale osservata ( $R_1^{tot} = 1/T_{tot}$ ), può essere suddivisa in un contributo intrinseco dei tessuti  $R_1^{tissue}$  e in un contributo derivante dall'agente stesso  $R_1^{ca}$  (Eq. 17). Il contributo  $R_1^{ca}$  risulta uguale al prodotto  $r_1[CA]$  (con  $r_1$  = velocità di rilassamento in presenza dell'agente di contrasto, ovvero la *relattività*), indicando che l'aumento della velocità di rilassamento totale è lineare con la concentrazione di agente di contrasto.

$$R_1^{tot} = R_1^{tissue} + R_1^{ca} \quad (\text{Eq. 17a})$$

$$R_1^{tot} = R_1^{tissue} + r_1[CA] \quad (\text{Eq. 17b})$$

$$\frac{1}{T_1^{tot}} = \frac{1}{T_1^{tissue}} r_1[CA] \quad (\text{Eq. 17c})$$

L'equazione (17c) mostra che il contrasto può essere aumentato o utilizzando un agente di contrasto con elevata relattività  $r_1$  e/o utilizzando elevate concentrazioni locali della sostanza.<sup>16,23,25</sup>

L'aumento del contrasto  $T_1$  portato dall'agente è originato dallo scambio di energia tra molecole d'acqua coordinate allo ione  $Gd^{3+}$  (nella prima e seconda sfera di coordinazione interna, IS "Inner Sphere") e l'intorno (sfera esterna, OS "Outer Sphere"). La componente OS deriva dalla diffusione traslazionale delle molecole d'acqua in prossimità degli ioni di cui è composta la NP. Il  $Gd^{3+}$  presenta 7 elettroni

di valenza spaiati, ognuno dei quali può interagire con le molecole d'acqua; questo, insieme ad avere una magnetizzazione minima, conferisce ai complessi di Gd un miglioramento superiore del contrasto  $T_1$ . Lo scambio di energia avviene in modo più efficiente alla frequenza di Larmor ( $42,58 \text{ MHz T}^{-1}$  per i protoni dell'idrogeno), quindi i mezzi di contrasto  $T_1$  sono più efficaci quando il loro movimento rotatorio corrisponde a questa frequenza. L'aumento dell'interazione con le molecole d'acqua rallenta la loro velocità di rotolamento per avvicinarsi alla frequenza di Larmor, il che consente ai protoni di perdere energia e recuperare il loro momento magnetico iniziale più rapidamente.<sup>24</sup>

La rilassività generale  $r_1$  è data dalla somma delle rilassività dell'IS e dell'OS. Il Gd deve avere almeno un sito di coordinazione libero a cui l'acqua può legarsi, e deve inoltre scambiare velocemente acqua con l'intorno, in modo che un significativo numero di molecole d'acqua risenta dell'intorno. Inoltre, il rilassamento dell'IS è influenzato dal tempo di correlazione rotazionale caratteristico dell'agente ( $\tau_R$ ) e dalla vita media di residenza ( $\tau_m$ ) delle molecole d'acqua all'interno dell'IS. La frequenza rotazionale dei complessi di  $\text{Gd}^{3+}$  è generalmente elevata, e rallentare la rotazione risulta in fluttuazioni del centro paramagnetico che generano un incremento di rilassività.<sup>23,24</sup>

Gli agenti  $T_1$  commerciali a base di Gd sono complessi poli(ammino-carbossilati) a basso peso molecolare, tra cui i più noti sono Gd-DTPA (Magnevist), Gd-DOTA (Dotarem) e Gd-DTPA-BMA (Omniscan).<sup>23</sup> Nonostante la loro efficacia nel migliorare il contrasto della risonanza magnetica, sono stati identificati gravi effetti collaterali. I complessi a base di Gd(III) subiscono facilmente transmetallazione poiché gli ioni calcio, zinco o ferro possono spostare il Gd dai chelati, con conseguente rilascio del metallo nel corpo, aumentandone la tossicità per l'accumulo nei tessuti. È stato dimostrato che i complessi di Gd causano fibrosi sistemica nefrogenica (NSF), che porta a contratture cutanee fibrotiche e, in casi estremi, frattura delle ossa o addirittura alla morte. Inoltre, è stato segnalato che questi complessi di metalli pesanti si accumulano nelle lesioni cerebrali, fenomeno che si aggrava nei pazienti con problemi al fegato o ai reni a causa della loro ridotta capacità di eliminare gli agenti dall'organismo. La Food and Drug Administration (FDA) ha emesso una serie di avvertimenti sulla possibile deposizione a lungo termine di Gd nel cervello e i potenziali danni di questa ritenzione sono sotto indagine. I problemi

associati alla tossicità sono ulteriormente aggravati dalla breve emivita ematica che presentano, la quale può richiedere ai pazienti di ricevere più somministrazioni di mezzo di contrasto per acquisire le immagini necessarie.<sup>22,24,25,26,27</sup>

C'è chiaramente un urgente bisogno di un mezzo di contrasto T<sub>1</sub> più biocompatibile.<sup>24</sup> Con lo sviluppo della nanotecnologia, il Gd è stato incorporato in nanomateriali di varia natura come punti quantici, nanoparticelle di silice, silice mesoporosa e nanotubi di carbonio, generando nuove sonde di imaging con cui si sono ottenuti buoni contrasti dovuti all'elevato numero di ioni Gd<sup>3+</sup> per unità di agente di contrasto.<sup>12,28</sup> Sono state sintetizzate, ad esempio, delle nanoparticelle di silice la cui superficie è funzionalizzata con chelati di Gd<sup>3+</sup> come il silato-Gd-DTTA (DTTA=dietilentriamminotetraacetato). Le nanoparticelle modificate con Gd-Si-DTTA hanno valori di rilassività r<sub>1</sub> e r<sub>2</sub> maggiori rispetto a quelli del complesso Gd-Si-DTTA stesso.<sup>28</sup> Ulteriori vantaggi di questi sistemi derivano dall'aumento del tempo di circolazione nel sangue e dalla possibilità di multifunzionalità, consentendo per esempio analisi ottiche e magnetiche su uno stesso sistema.<sup>29</sup>

Un altro esempio di ancoraggio di agenti di contrasto è quello mostrato in *figura 2.9*, in cui sono mostrate delle AuNP funzionalizzate con leganti DTDTPA (analoghi del DTPA con due tioli per legarsi alle AuNP). Si forma una robusta shell multistrato che assicura una buona stabilità al sistema su un ampio range di pH e che consente di legare facilmente un grande numero di ioni Gd<sup>3+</sup>. NP delle dimensioni di 2nm possono legare fino a 150 ioni e presentano una rilassività molto più elevata (586 nM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) rispetto al solo complesso (3 nM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>).<sup>30</sup>

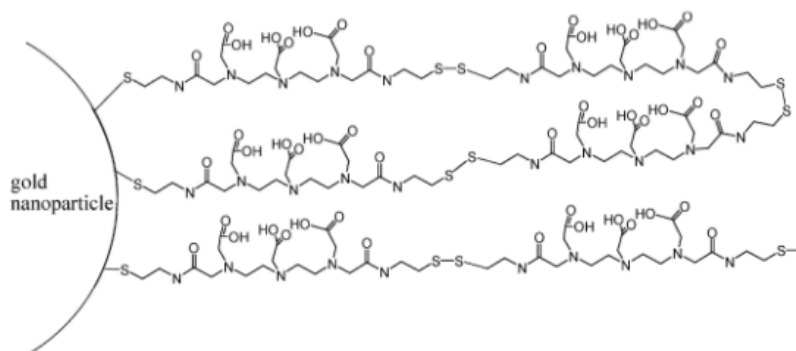


Figura 2.9 Schema illustrativo di AuNP con shell di DTDTPA.

### 2.1.2.2.2 Agenti di contrasto T<sub>2</sub>

Gli agenti di imaging T<sub>2</sub> sono in genere materiali superparamagnetici che accorciano i tempi di rilassamento T<sub>2</sub>, portando a un contrasto scuro sulle immagini pesate in T<sub>2</sub>. Questa categoria rappresenta i contrasti “negativi” quindi, al contrario degli agenti di contrasto T<sub>1</sub>, rendono più scura la zona in cui sono presenti. Le nanoparticelle di ossido di ferro superparamagnetico (SPION) sono comunemente utilizzate come agente di contrasto in questa categoria, il cui componente principale è la magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) o maghemite (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).<sup>12</sup> Le particelle di FeO<sub>x</sub> possono contenere migliaia di ioni ferro con momenti di dipolo ordinati, creando un momento magnetico superiore rispetto al caso di un singolo ione paramagnetico isolato. Quindi, in presenza di un campo magnetico esterno B<sub>0</sub> le nanoparticelle possono essere magnetizzate, con conseguente influenza sul tempo di rilassamento trasversale. Il grande momento magnetico delle nanoparticelle superparamagnetiche produce rilevanti gradienti di campo locali, che accelerano la perdita di fase coerente da parte degli spin protonici nelle molecole d’acqua circostanti.<sup>31,32</sup>

Anche per gli agenti di contrasto T<sub>2</sub>, una maggiore concentrazione porta ad un incremento della velocità di rilassamento R<sub>2</sub><sup>tot</sup> come mostrato nell’Eq. 18 (a, b):

$$R_2^{tot} = R_2^{tissue} + r_2[CA] \quad (\text{Eq. 18a})$$

$$\frac{1}{T_2^{tot}} = \frac{1}{T_2^{tissue}} + r_2[CA] \quad (\text{Eq. 18b})$$

Dove  $r_2$  è la relaxività per il processo di rilassamento di spin trasversale, e [CA] è la concentrazione dell’agente di contrasto.<sup>16,25</sup>

### 2.1.3 Imaging multimodale e agenti di contrasto multimodali

Ogni modalità di imaging in clinica presenta i suoi vantaggi unici insieme a limitazioni intrinseche, come l’insufficiente sensibilità o risoluzione spaziale, che rendono difficile ottenere informazioni accurate e affidabili nel sito della malattia. Ad esempio, l’imaging ottico fornisce uno screening rapido e informazioni funzionali sulla malattia con un’alta sensibilità, mentre la TC e l’MRI offrono immagini ad alta risoluzione per raccogliere informazioni anatomiche. Per questo motivo, la combinazione di diverse modalità di imaging ha attirato l’attenzione per migliorare gli strumenti di imaging attualmente utilizzati per la diagnosi. L’imaging multimodale è un metodo potente in grado di fornire un rilevamento più accurato e

affidabile dei siti patologici, e permette di ottenere contemporaneamente un'elevata sensibilità e un'alta risoluzione e fornire informazioni anatomiche o biologiche più dettagliate sulla malattia in esame.<sup>10,28,32</sup>

L'utilizzo di agenti di contrasto multimodali (MCAs, dall'inglese Multimodal Contrast Agents) permette di superare i limiti di una singola modalità di imaging e di ottenere informazioni più dettagliate sul sito di destinazione attraverso il targeting. Pertanto, le NP multifunzionali possono consentire l'imaging multimodale tramite la combinazione di due o più modalità di imaging o la teranostica per l'imaging e la terapia simultanei.<sup>10,28</sup>

Gli MCA permettono due importanti vantaggi non ottenibili con la somministrazione multipla di due mezzi di contrasto monomodali, ovvero l'imaging della stessa area con entrambe le tecniche e la riduzione della dose totale di farmaci di contrasto somministrati ai pazienti per la combinazione di MRI/TC, con conseguente riduzione degli effetti collaterali. Le nanoparticelle possono essere la soluzione al problema dell'imaging multimodale perché la nanotecnologia permette di fondere più funzionalità in un unico oggetto di dimensioni nanometriche.<sup>33</sup>

Nonostante ci si aspetti che queste combinazioni forniscano informazioni più precise e dettagliate per una diagnosi chiara rispetto a una singola modalità, la selezione consapevole delle modalità di imaging per l'imaging multimodale è molto importante. Durante la progettazione di sonde di imaging multimodale, i ricercatori dovrebbero evitare la sovrapposizione dei vantaggi e compensare piuttosto i punti deboli di ogni modalità per massimizzare l'effetto sinergico. Per questo motivo spesso vengono combinate le modalità di imaging ad alta sensibilità (PET, ottica, ecc) con altre modalità di imaging ad alta risoluzione spaziale (MRI, TC, ecc).<sup>10</sup>

Ad esempio, un agente dual-mode MRI/TC è una combinazione di due modalità anatomiche che condividono quasi le stesse caratteristiche funzionali ma la fisica coinvolta nei due processi di imaging è differente. La TC utilizza radiazioni a raggi X che attraversano il tessuto e l'immagine viene registrata in base alle caratteristiche di assorbimento e attenuazione dell'agente di contrasto. Al contrario, la risonanza magnetica funziona sotto l'influenza di un forte campo magnetico e l'immagine viene analizzata sulla base dell'aumento del contrasto  $T_1$  o  $T_2$  indotto dalle NP.<sup>32</sup>

Poiché gli elementi costitutivi influenzano fortemente le proprietà fisico-chimiche e la funzione delle NP risultanti, i ricercatori dovrebbero selezionare attentamente i materiali per lo scopo specifico delle NP.<sup>10</sup> Negli ultimi anni sono stati riportati vari esempi di agenti di contrasto in cui NP con capacità di imaging multimodale sono state ottenute unendo diverse fasi, inorganiche/organiche o inorganiche/inorganiche e ognuna di esse presentava una funzione ben definita.<sup>33</sup> Tra gli esempi più significativi di composti multifase inorganici/organici troviamo nanoparticelle d'oro rivestite con complessi organometallici di Gd per la generazione simultanea di segnali SERS (dall'inglese *Surface-enhanced Raman spectroscopy*), MRI e fotoacustici. La struttura di queste NP è costituita da quattro fasi sovrapposte (Fig. 2.10): un core centrale di oro è ricoperto da molecole Raman attive, le quali sono ulteriormente protette da uno strato di silice. Questo è a sua volta funzionalizzato con un complesso organico di Gd per impartire le proprietà magnetiche idonee affinché le NP vengano utilizzate anche come agente di contrasto  $T_1$ .<sup>33,34</sup>

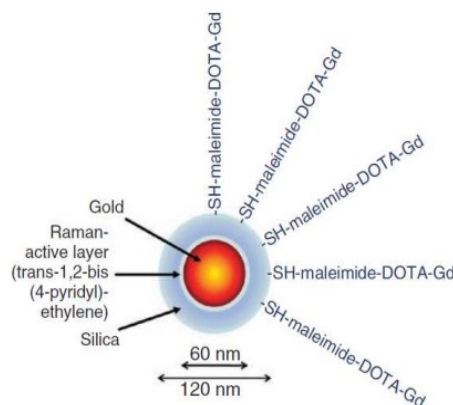


Figura 2.10 Rappresentazione schematica della struttura di una nanoparticella ideata per fungere da agente di contrasto multimodale.

Un altro esempio è costituito dalle nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro rivestite con coloranti organici fluorescenti, ampiamente utilizzate per l'imaging di risonanza magnetica e l'imaging ottico. Queste nanoparticelle di ossido di ferro sono rivestite chimicamente di destrano reticolato, un polimero idrofilico che conferisce stabilità in soluzione, il quale viene coniugato alle molecole coloranti fluorescenti.<sup>28</sup>

Tuttavia, il raggiungimento di più modalità di imaging con MCA costituiti da più fasi ha lo svantaggio di richiedere numerosi passaggi sintetici e costi elevati, mentre protocolli di sintesi facili con un limitato numero di fasi di preparazione sono più

convenienti e favoriti dall'industria farmaceutica.<sup>33</sup> Un'ottima soluzione a questa problematica sono agenti di imaging multimodale costituiti da nanoleghe metalliche, ottenuti tramite un'appropriata combinazione di metalli nello stesso reticolo cristallino. Ne sono un esempio le nanoparticelle di lega Au-Fe (AuFeNP) con struttura e composizione ingegnerizzate, le quali consentono l'imaging multimodale di risonanza magnetica, TC e SERS. La semplicità della sintesi è data dall'utilizzo della LAL, che opera lontano dall'equilibrio termodinamico, dove è favorita la formazione di nanoleghe Au-Fe.<sup>33</sup>

## 2.1 Teranostica: diagnosi e terapia

Le nanoparticelle non vengono utilizzate solamente per l'imaging multimodale, ma sono anche applicate come agenti terapeutici nel sito della malattia al fine di realizzare l'imaging e la terapia simultaneamente o in sequenza. Recentemente, l'imaging è stato combinato con la terapia per etichettare i siti bersaglio, ottenere informazioni biologiche, visualizzare la distribuzione delle NP o dei farmaci e monitorare i risultati della terapia. Con l'aiuto di un agente di imaging, infatti, la biodistribuzione delle NP e l'accumulo nel sito bersaglio possono essere confermati in modo non invasivo *in vivo*.

Le NP possono essere costituite da vari materiali (ad es. polimeri, lipidi, metalli) e possono ospitare un'ampia gamma di componenti attivi, tra cui chemioterapici, agenti di contrasto, proteine e acidi nucleici, per varie applicazioni biomediche. La progettazione delle nanoparticelle dipende dall'applicazione terapeutica, dal sito bersaglio (organi, tessuti, organelli cellulari o subcellulari) e dalla via di somministrazione. Infatti, la corretta selezione della chimica degli elementi costitutivi di questi nanovettori e del loro carico utile può avere un forte impatto sulla loro sicurezza, farmacocinetica e destino intracellulare.<sup>35</sup> Quando sia i farmaci che gli agenti di imaging sono integrati nello stesso compartimento sulla superficie o all'interno delle NP, si presume che entrambi abbiano comportamenti simili, come la biodistribuzione e l'accumulo mirato.<sup>10</sup>

Lo sviluppo di nanoparticelle per la teranostica (TNP) efficaci richiede un po' di dare e avere tra sensibilità di imaging, accuratezza del targeting e rilascio controllato del farmaco.<sup>36</sup>



### 2.2.1 Nanoparticelle per la Teranostica

Le nanoparticelle usate in teranostica, in gran parte, sono caratterizzate da quattro componenti:<sup>35</sup>

- i) Un *emettitore di segnale*, il quale possiede proprietà ottiche, magnetiche o radioattive e può emettere il segnale in maniera spontanea o in seguito ad un'eccitazione da parte di una sorgente esterna. Tale segnale è individuato da rilevatori esterni ed è utilizzato per la costruzione dell'immagine.
- ii) Un carico utile terapeutico (*therapeutic payload*), che può essere un medicinale chemioterapico o un acido nucleico come il DNA o il siRNA.
- iii) Un trasportatore di carico utile (*payload carrier*), che solitamente include una matrice polimerica di materiali con molteplici gruppi funzionali, ai quali possono essere coniugati gli emettitori di segnale o il carico terapeutico.
- iv) Un *legante di targeting*, scelto in modo che legni e formi un complesso con un marker della specifica patologia, facilitando così il trasporto delle NP nel sito di interesse e consentendo interazioni con la cellula o con il tessuto malato.

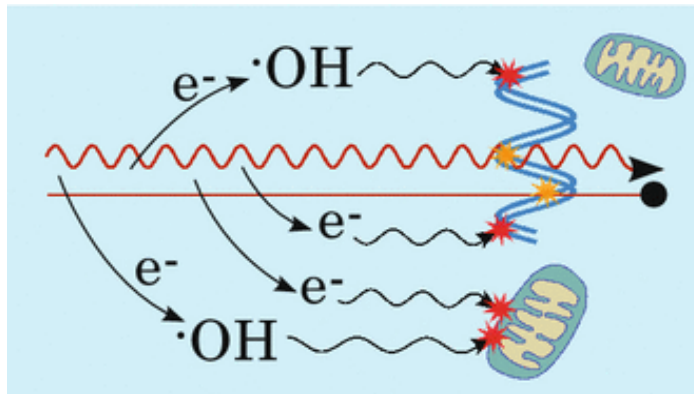
Le nanoparticelle *core-shell* costituiscono un veicolo terapeutico e di somministrazione di agenti di contrasto molto robusto grazie alla vasta gamma di elementi che possono essere utilizzati come componenti del core e del guscio.<sup>36</sup> Le nanostrutture a base di oro e ferro sono un esempio di queste classi di nanomedicine inorganiche e sono molto promettenti come agenti teranostici grazie alle proprietà uniche come la biocompatibilità, la capacità intrinseca di migliorare il contrasto nella TC e MRI, la possibilità di generare calore assorbendo luce (terapia fototermica con nanoparticelle di oro) o in presenza di campi magnetici alternati (ipertermia magnetica con particelle magnetiche a base di ferro) e la facile modifica superficiale.<sup>10,37</sup>

Tra i nanoveicoli attualmente disponibili, le SPION hanno ricevuto grande attenzione nello sviluppo di nanofarmaci teranostici perché, non solo sono utilizzati come agenti di potenziamento nel contrasto per la risonanza magnetica, ma possono anche fornire agenti terapeutici, come farmaci antitumorali e RNA, nei siti della malattia. Ad esempio, un nanosistema basato su SPION rivestite di polimero biocompatibile in cui è presente un farmaco (doxoriubicina, DOX) è stato efficace nella riduzione del

tumore al polmone. Inoltre, hanno favorito l'imaging mediante MRI per ottenere informazioni diagnostiche.<sup>32</sup>

## 2.1 Radioterapia a raggi X (XRT)

La radioterapia è un potente strumento per trattare il cancro ed è utilizzata in circa il 50% di tutti i pazienti oncologici. Tale trattamento si basa sulla deposizione di energia (*dose*) nelle cellule tumorali, tipicamente tramite irradiazione con raggi  $\gamma$  o raggi X ad alta energia (fotoni) o fasci energetici di ioni, sufficienti a danneggiare le cellule tumorali o la loro vascolarizzazione e quindi indurre la morte del tumore diretta o per carenza di nutrienti. Le radiazioni ionizzanti vengono erogate al tumore tramite un fascio esterno diretto verso il tessuto canceroso da una sorgente di radiazioni, ovvero un acceleratore lineare che produce un fascio di particelle ionizzanti (*Fig. 2.11*).<sup>38,39</sup>



*Figura 2.11* Illustrazione dei meccanismi di danno da radiazioni. Sia la radiazione fotonica che quella ionica (linee rosse e rette, rispettivamente) possono danneggiare direttamente il DNA (contrassegnato da stelle gialle) o altre parti della cellula, così come ionizzare il mezzo producendo radicali e altre specie reattive (rappresentate dal radicale OH) così come elettroni secondari, che possono causare danni indiretti dopo la diffusione (stelle rosse).

Per quanto efficace, questo trattamento presenta ancora alcune limitazioni, quali ad esempio l'eterogeneità della dose, il dosaggio e gli effetti collaterali a lungo termine legati all'esposizione dei tessuti sani. Infatti, la radioterapia a raggi X è aspecifica, poiché una dose significativa può essere somministrata al tessuto sano lungo la traccia dei fotoni, davanti e dietro il tumore.<sup>38,39</sup> Un altro importante svantaggio della terapia fotonica è che i tessuti tumorali possono avere, o sviluppare, resistenza alle radiazioni; inoltre, a causa dell'estensione fisica di questo tessuto, può essere difficile irradiare efficacemente l'intero tumore, il che può portare alla sua rigenerazione.<sup>38</sup>

Negli ultimi decenni sono stati apportati continui miglioramenti per ottenere una somministrazione più efficiente e precise della dose agli organi e ai tessuti da trattare, e sono state studiate nuove strategie per migliorare l'effetto delle radiazioni.<sup>38,39</sup>

I principali metodi per aumentare l'indice terapeutico, ovvero il rapporto tra l'efficacia del trattamento e gli effetti collaterali, sono l'aumento della radiosensibilizzazione nel tessuto tumorale e un migliore confinamento della dose depositata nel volume del tumore.<sup>38</sup>

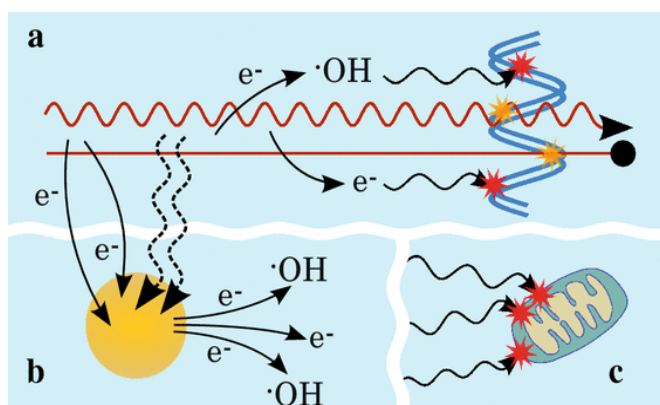


Figura 2.12 Illustrazione dei meccanismi di danno da radiazioni in presenza di NP. (a) Oltre al danno diretto e indiretto (stelle gialle e rosse, indirettamente) al DNA o ad altre parti della cellula, (b) la radiazione incidente può anche interagire con le NP (freccie tratteggiate e ondulate) e indurre l'emissione di elettroni secondari che possono reagire con il mezzo per aumentare la produzione di radicali e altre specie reattive. (c) Gli elettroni secondari prodotti dalla radiazione o dalle NP possono anche indurre un'ulteriore emissione di elettroni dalle NP, diffondersi e danneggiare altre parti della cellula.

Un approccio per risparmiare selettivamente il tessuto sano è l'introduzione di agenti di contrasto, materiali ad alto numero atomico ( $Z$ ) che assorbono fortemente le radiazioni ionizzanti (Fig. 2.12). Se queste particelle possono essere trasportate preferenzialmente ai volumi tumorali, possono aumentare selettivamente l'assorbimento del bersaglio, offrendo sia un migliore contrasto sia aumenti selettivi della deposizione della dose.<sup>38,39,40</sup> Diversi gruppi hanno lavorato allo sviluppo di nuovi agenti radiosensibilizzanti, utilizzando diversi elementi come Au,  $Z=79$ ; Ag,  $Z=47$ ; Gd,  $Z=64$ ; I,  $Z=53$ ; Pt,  $Z=78$ ; Bi,  $Z=83$ .<sup>39</sup>

Le AuNP, in particolare, sono diventate popolari poiché presentano diversi vantaggi, tra cui una buona biocompatibilità, una sintesi semplice in un'ampia gamma di dimensioni e una facile funzionalizzazione superficiale mediante l'attaccamento di ligandi necessari per colpire le cellule tumorali. Inoltre, le AuNP hanno un'ampia sezione d'urto di interazione (ovvero la probabilità che si verifichi un'interazione)

con la radiazione X fino a circa 1 MeV, maggiore rispetto a quella dell'acqua e dei tessuti molli delle cellule, il che contribuisce alla localizzazione della dose.<sup>38</sup>

### 2.3.1 Principi di radioterapia

Come detto in precedenza, i trattamenti radioterapici si basano sulla deposizione di energia lungo il percorso della radiazione incidente. In seguito all'irradiazione del mezzo biologico, si verificano una serie di eventi fisici, chimici e biologici su scale temporali diverse.<sup>38</sup>

Durante la fase fisica, i fotoni interagiscono con gli atomi contenuti nei tessuti secondo specifici meccanismi di interazione particella-materia. Uno dei meccanismi più importanti è l'espulsione di elettroni dagli atomi che costituiscono i materiali irradiati. Questi elettroni producono una traccia lungo la quale si verificano le ionizzazioni e, ad ogni passo, depositano una certa frazione della loro energia cinetica fino a quando non si fermano. La *dose terapeutica* viene quindi consegnata ai tessuti tramite deposizione di energia elettronica.<sup>38</sup>

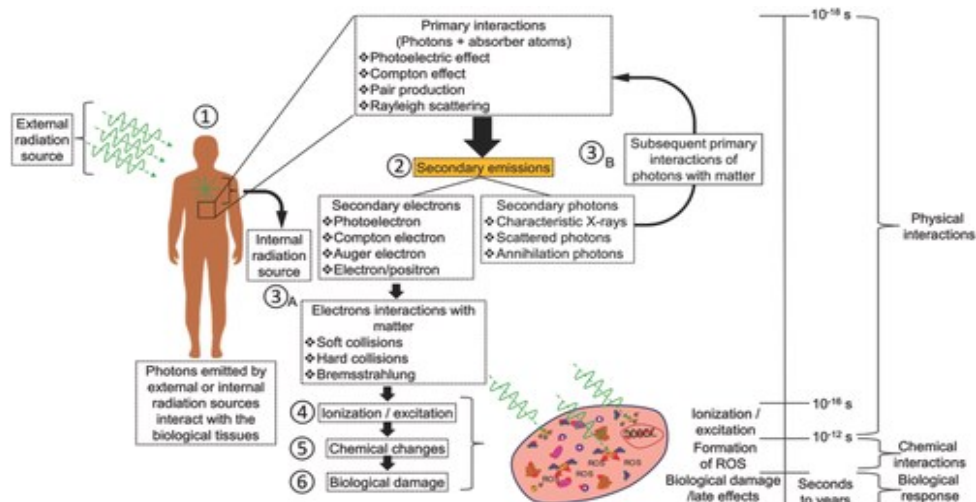


Figura 2.13 Rappresentazione delle fasi che portano alla deposizione di energia in radioterapia.

1) I fotoni (frecce verdi) vengono attenuati dai tessuti biologici. 2) L'emissione di elettroni e fotoni secondari porta a ulteriori interazioni (3A), (3B) con gli atomi del mezzo biologico. 4) Infine, le ionizzazioni atomiche causano 5) danni chimici e 6) biologici alle cellule, in particolare tramite l'impatto sul DNA e l'attivazione di specie reattive all'ossigeno (ROS).

I fotoni emessi da sorgenti di radiazioni esterne irradiano i tessuti che, a loro volta, attenuano i fotoni secondo meccanismi specifici (Fig. 2.13 (1)). Questo genera diversi tipi di emissioni secondarie (ovvero il rilascio di elettroni e fotoni secondari) che successivamente interagiscono con gli atomi presenti nell'ambiente circostante (Fig. 2.13 (2, 3A, 3B)). Molti di questi atomi diventano ionizzati o eccitati a causa dell'interazione con gli elettroni secondari (Fig. 2.13 (4)). D'altra parte, l'emissione

di fotoni secondari porta a ripetuti processi di attenuazione seguiti dalla generazione di prodotti secondari, in modo simile a quanto avviene per i fotoni primari (*Fig. 2.13 (3B)*). Quindi, le ionizzazioni atomiche causano danni diretti alle molecole biologiche (come proteine, lipidi e DNA) e generano radicali liberi (ad esempio, specie reattive all'ossigeno (ROS) dalla radiolisi dell'acqua). Il danno indiretto si verifica quando queste specie altamente reattive si diffondono e reagiscono con altri atomi di varie molecole nelle cellule (*Fig. 2.13 (5)*). Questo fenomeno chimico crea una cascata di eventi, che culminano in ulteriori danni cellulari.<sup>39</sup>

Il modo più utilizzato per determinare l'efficacia della radioterapia è quello di monitorare la quantità di rotture del filamento di DNA prodotte. Diversi studi hanno dimostrato che la via principale del danno al DNA è tramite la produzione di radicali dell'acqua, con circa il 70% dei danni causati da queste specie reattive (i più importanti sono  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{NO}\cdot$ ,  $\text{H}\cdot$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e il 30% dovuto agli elettroni secondari e alla frammentazione diretta del DNA.<sup>38</sup>

Generalmente, nella radioterapia del cancro, si utilizzano fasci di radiazione con energie di raggi X comprese nell'intervallo tra 80 keV e 25 MeV per i moderni acceleratori lineari.<sup>38</sup>

Una dose sufficiente può uccidere qualsiasi cellula tumorale, ma le preoccupazioni sulla quantità di danni al tessuto sano in prossimità del tumore limitano la quantità di radiazioni che un paziente può ricevere. I raggi X e i raggi  $\gamma$  hanno una deposizione esponenziale della dose con la profondità del tessuto; quindi, una frazione significativa della dose totale viene consegnata al tessuto sano davanti e dietro il bersaglio. Nel tentativo di aumentare la dose erogata al bersaglio, è possibile utilizzare radiazioni a bassa energia tollerabili dai tessuti sani da più angolazioni. La sovrapposizione dei fasci sul tessuto garantisce un'elevata dose totale sul bersaglio, ma porta a un volume molto maggiore di tessuto sano irradiato a basse dosi.<sup>38</sup>

### **2.3.2 Radioterapia con AuNP – Radiosensibilizzazione**

Il concetto di radiosensibilizzazione si basa sulla forte attenuazione dei fotoni terapeutici da parte di atomi ad alto numero atomico ( $Z$ ), che porta ad un aumento della deposizione locale della dose.<sup>39,41</sup> In pratica, l'effetto di radiosensibilizzazione è una conseguenza dell'interazione dell'oro con i raggi X emessi dalla sorgente radioterapeutica.

Quando collidono con le NP, i fotoni possono essere attenuati da quattro tipi principali di interazioni (Fig. 2.14):<sup>38,39</sup>

- i) *Effetto fotoelettrico*: si verifica quando un fotone incidente si scontra con un elettrone appartenente a uno degli orbitali interni dell'atomo impattato. Il fotone viene assorbito e l'elettrone viene espulso (cioè, il "fotoelettrone"). Quando il fotoelettrone viene espulso dall'orbitale del guscio interno, un elettrone del guscio superiore riempie il posto vacante, il che porta all'emissione di raggi X caratteristici o elettroni Auger.
- ii) *Effetto Compton*: avviene quando un fotone si scontra con un elettrone del guscio esterno e lo espelle dall'atomo. Il fotone perde parte della sua energia e può continuare il suo corso o in alternativa può essere coinvolto in ulteriori processi come lo scattering di Compton o di Rayleigh. L'elettrone espulso (cioè, l'elettrone Compton) viaggia attraverso il materiale circostante dove può causare la successiva eccitazione e ionizzazione dell'atomo.
- iii) *Produzione di coppie di elettroni*: deriva dalla traiettoria di un fotone ad alta energia ( $>1,02$  MeV) che passa vicino al nucleo dell'atomo. L'energia del fotone viene convertita in massa e viene creata una coppia elettrone-positrone.
- iv) *Scattering di Rayleigh*: non contribuisce all'aumento della dose, poiché nessuna energia viene trasferita agli elettroni negli orbitali per causare la ionizzazione. In genere è trascurabile, ma è più probabile con materiali ad alto Z e per fotoni a bassa energia.

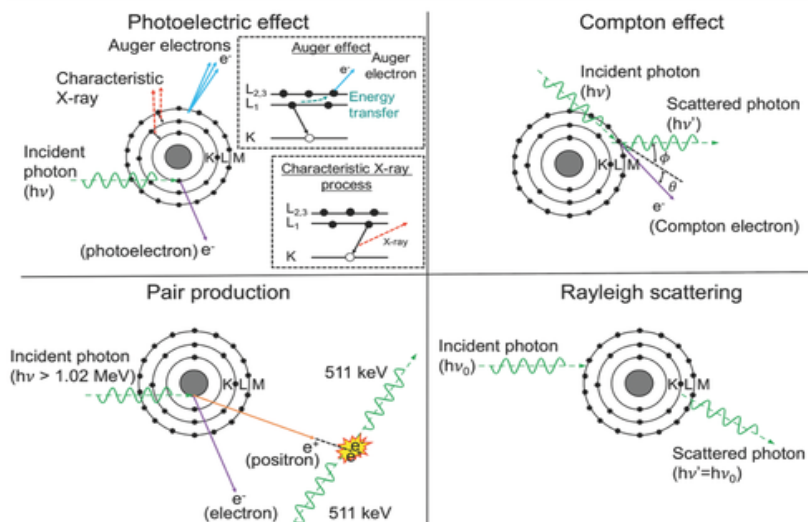


Figura 2.14 Meccanismi di interazione dei fotoni con la materia, i quali portano all'attenuazione dei raggi X e alle emissioni secondarie.

Gli elettroni Auger hanno energie inferiori a 5 keV e si sono dimostrati efficaci nel danneggiare direttamente il DNA, oltre a ionizzare le molecole d'acqua circostanti. Tutti gli elettroni secondari delle NP possono anche interagire con altre NP, con conseguente ulteriore emissione di elettroni Auger, o possono essere assorbiti dal mezzo che causa la ionizzazione e la formazione di radicali. Inoltre, le NP cariche positivamente (dopo l'emissione di fotoelettroni o elettroni Auger) potrebbero causare l'instabilità delle molecole d'acqua circostanti e favorirne la dissociazione, aumentando ulteriormente la resa radicalica nell'ambiente intorno alle NP.<sup>38</sup>

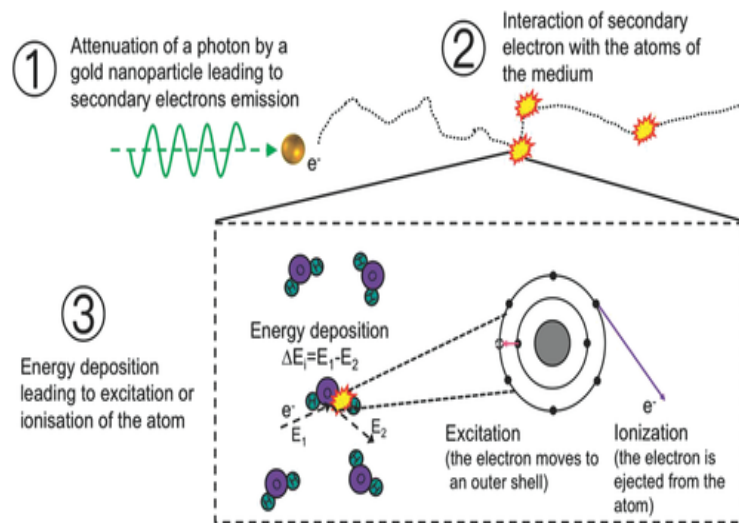


Figura 2.15 Rappresentazione dei meccanismi che portano alla deposizione di energia nei tessuti biologici. 1) Un fotone incidente interagisce con le AuNP e provoca l'emissione di un elettrone secondario. 2) Questo elettrone viaggia fino a quando non si scontra con un elettrone di un atomo nel mezzo. 3) Una parte dell'energia cinetica dell'elettrone viene trasferita all'elettrone dell'atomo (deposizione di energia), che può provocare l'espulsione di elettroni (ionizzazione) o la migrazione verso un orbitale superiore (eccitazione). L'elettrone continua a viaggiare nel mezzo dove interagisce con altri atomi e, ad ogni collisione, trasferisce una piccola quantità di energia finché non si ferma completamente.

In base alla sezione d'urto specifica per ogni processo di attenuazione, i coefficienti di attenuazione permettono di quantificare ognuno di questi meccanismi in funzione dell'energia in arrivo. Il coefficiente di attenuazione della massa totale ( $\mu/\rho$ ) corrisponde alla somma dei singoli coefficienti di attenuazione (Fig. 2.16) e rappresenta la probabilità di interazione per unità di massa di un dato materiale (in  $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ).

A causa dell'effetto fotoelettrico che è proporzionale a  $(Z/E)^3$ , dove  $Z$  è il numero atomico ed  $E$  è l'energia del fotone in arrivo, è particolarmente probabile che l'emissione Auger avvenga per metalli ad alto  $Z$  come oro, gadolinio, platino o argento. L'aumento della sezione d'urto di interazione tra oro e tessuti molli diminuisce ad alte energie, ed è stato infatti scoperto che l'energia della radiazione

gioca un ruolo importante nell'effetto di radiosensibilizzazione. Ad esempio, è stato dimostrato che a 20 keV, il coefficiente di attenuazione di massa dell'oro è di  $78,83 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$  e diminuisce a 2,19 e  $5,16 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$  a 80 e 100 keV rispettivamente. Ciò significa che la probabilità di interazione è molto più alta a energie di fotoni inferiori, dove l'effetto fotoelettrico è il meccanismo di interazione predominante e la radiosensibilizzazione delle AuNP è massimizzata.<sup>39</sup>

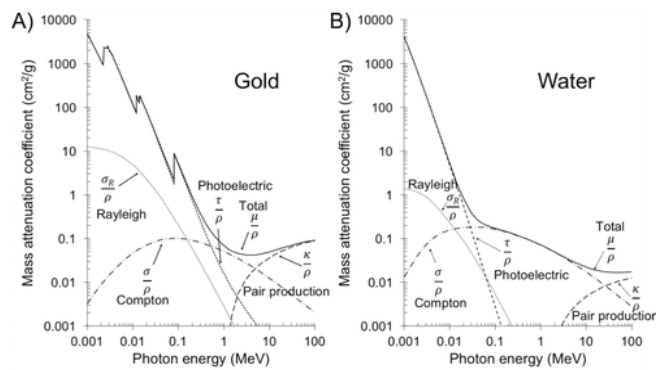


Figura 2.16 Coefficiente di attenuazione di massa per A) oro B) acqua in base all'energia del fotone.

Il contributo delle AuNP nell'aumentare l'efficienza della radioterapia è misurato dal fattore di potenziamento della dose (*DEF*), definito come il rapporto tra la dose di radiazioni assorbita dalle cellule tumorali in presenza di NP e la dose assorbita in loro assenza. Questo può variare con la concentrazione e le caratteristiche delle NP e la loro posizione all'interno della cellula.<sup>38</sup>

È stato scoperto che i raggi X a bassa energia in combinazione con le AuNP erano in grado di fornire un *DEF* elevato e che l'effetto aumentava con la concentrazione di AuNP. Sono stati trovati valori di *DEF* di 4.0, 20 e 24.6 per concentrazioni di 0.25, 0.5 e 1 mM rispettivamente.<sup>38</sup>

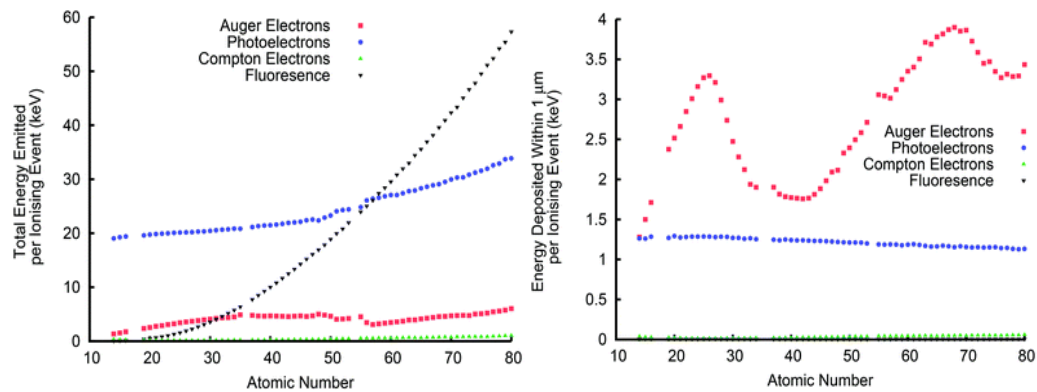
Sebbene questi concetti teorici consentano una comprensione razionale dell'effetto di radiosensibilizzazione, non spiegano la disparità tra l'aumento della dose osservato sperimentalmente in molti studi *in vitro* e *in vivo*. In effetti, molti studi riportano sostanziali effetti di radiopotenziamento a concentrazioni d'oro molto più basse di quelle necessarie per aumentare significativamente la dose nel mezzo. Ciò suggerisce che anche le interazioni biologiche e chimiche sottostanti svolgono un ruolo chiave nell'effetto di radiosensibilizzazione.<sup>39</sup>

È stato svolto uno studio computazionale sistematico dell'impatto della composizione elementare sulle interazioni nanoparticelle-radiazione per esposizioni



a raggi X a keV e meV, che spaziano dal silicio ( $Z=14$ ) al mercurio ( $Z=80$ ).<sup>40</sup> Per entrambi i tipi di esposizione, tutte le particelle secondarie emesse dalle NP sono state valutate, identificando il processo che ha portato alla loro emissione, nonché la dose depositata in gusci concentrici da 2 nm attorno alla nanoparticella, fino ad un intervallo di 1  $\mu\text{m}$  dalla NP.<sup>40</sup>

In *figura 2.17* si può osservare una ripartizione dei processi che contribuiscono alla deposizione della dose sia totale che locale ( $< 1 \mu\text{m}$ ), per NP di diametro di 20 nm esposte all'irradiazione a keV. La deposizione di energia totale (a sinistra) è dominata dai fotoelettroni e fotoni di fluorescenza rispettivamente a basse e alte energie, come atteso. Considerando solo la dose depositata entro 1  $\mu\text{m}$  dalla NP (a destra), gli elettroni Auger sono la fonte primaria di deposizione di energia per tutti gli elementi, poiché i fotoelettroni e i fotoni di fluorescenza hanno un raggio d'azione troppo lungo per depositare una dose significativa nelle vicinanze della NP. In particolare, la distribuzione di energia Auger ha un comportamento multi-picco su questa scala, guidato dalla variazione di resa elettronica, dell'energia e della portata di Auger in funzione di  $Z$ .<sup>40</sup>



*Figura 2.17 Sinistra: Energia totale emessa da una NP tramite vari processi a seguito di un evento ionizzante in funzione del numero atomico, per l'irradiazione keV. Destra: Distribuzione dell'energia depositata entro 1  $\mu\text{m}$  dal centro di una NP per evento ionizzante, suddivisa in base ai contributi dei vari processi.*

Successivamente sono state analizzate la distribuzione di energia radiale su scala nanometrica (Fig. 2.18, sinistra) e la distribuzione della dose per un evento ionizzante medio (cioè, un'interazione radiazione-NP che produce almeno una particella secondaria) nelle NP degli elementi selezionati (Fig. 2.18, destra).<sup>40</sup>

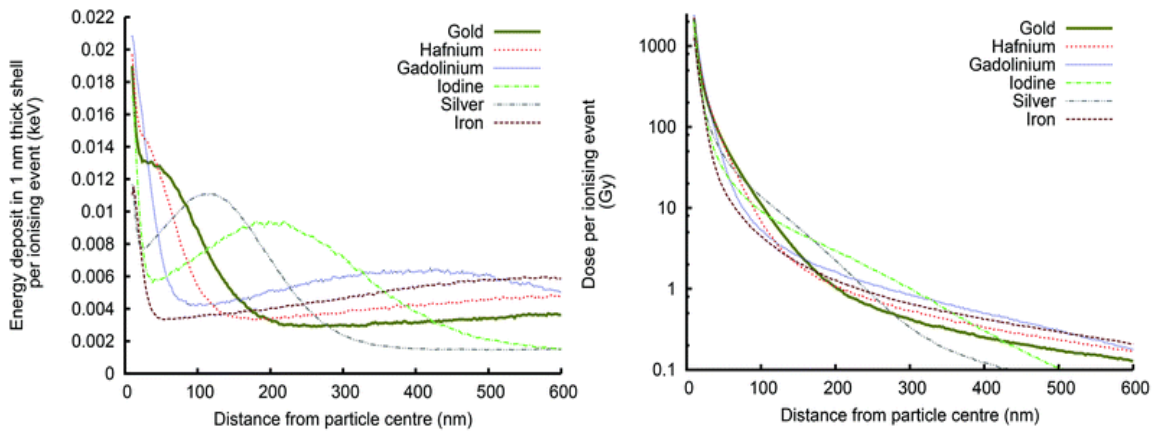


Figura 2.18 Sinistra) distribuzione di energia radiale su scala nanometrica e destra) distribuzione della dose a seguito di un singolo evento di ionizzazione causato da raggi X keV.

Come previsto, c'è una notevole variabilità tra i diversi elementi, dovuta alle diverse distribuzioni di elettroni Auger che possono portare a deposizioni molto elevate nelle immediate vicinanze della NP, ampi picchi a intervalli moderati o miscele di questi effetti. Pertanto, è difficile prevedere quale materiale fornisca il più alto aumento di dose o quale possa offrire la maggiore radiosensibilizzazione.<sup>40</sup>

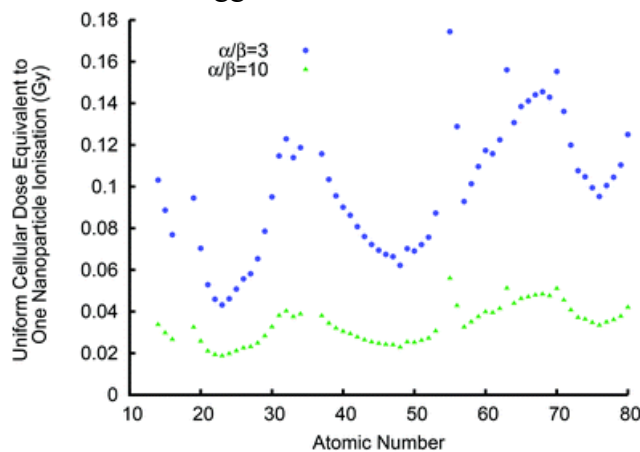


Figura 2.19 Effetti biologici delle interazioni NP-radiazione, in termini di dose efficace depositata da un singolo evento ionizzante, per cellule con rapporti  $\alpha/\beta=3$  (blu) o 10 (verde) per esposizioni a keV.

Infine, sono stati osservati gli effetti biologici delle interazioni NP-radiazione, in termini di dose efficace depositata da un singolo evento ionizzante, per linee cellulari diverse per esposizioni a keV (Fi. 2.19).

Si possono osservare nuovamente due massimi locali relativi ai tassi di danno, centrati approssimativamente intorno a  $Z=34$  e  $Z=68$ . Gli elementi in questi intervalli di energia hanno elettroni Auger primari (dal guscio K e L rispettivamente) con energie comprese tra 9 e 10 keV, con numerosi elettroni aggiuntivi a bassa energia, con energie intorno a 2 keV e inferiori. Dunque, un piccolo numero di elementi tra cui l'europio, il gadolinio e l'itterbio, sembra trovarsi significativamente al di sopra della tendenza generale e la caratteristica comune che guida questo effetto è la densità relativamente bassa. Ciò riduce l'autoassorbimento degli elettroni secondari, che può aumentare la dose depositata in prossimità delle NP.<sup>40</sup>

Un'osservazione di questi risultati è che gli elementi meno densi producono distribuzioni di dose che si prevede portino a una sensibilizzazione maggiore di quella che ci si aspetterebbe sulla base del solo numero atomico. Come già anticipato, si ritiene che ciò sia dovuto agli elettroni secondari a bassa energia aventi maggiori probabilità di fuga. Questa deduzione suggerisce che preparare particelle meno dense, ad esempio combinando alcuni atomi di un materiale ad alto  $Z$  in un cristallo o in una molecola organica con elementi più leggeri, può portare a una radiosensibilizzazione superiore rispetto a una massa simile di materiale contenuta in NP pure più dense. Tale approccio è stato adottato nello sviluppo di NP a base di ossido di gadolinio, che ha riportato significative proprietà radiosensibilizzanti.<sup>40</sup>

### **2.3.3 Proprietà chimico-fisiche delle NP per la radiosensibilizzazione**

Le dimensioni, la forma e la chimica superficiale delle NP sono fattori determinanti per la loro applicazione in radioterapia. Questi parametri influenzano l'interazione con le radiazioni ionizzanti e la risposta biologica delle cellule; pertanto, devono essere ottimizzati in modo da poter ottenere la massima efficacia terapeutica.<sup>13,38,39</sup>

#### **Effetti sull'interazione NP-radiazione:**

- a) *Dimensione delle NP*: studi teorici hanno suggerito che NP più piccole di 50 nm sono più adatte per aumentare la deposizione della dose; ciò dovuto al fatto che all'aumentare delle dimensioni delle particelle, aumenta anche la probabilità che gli elettroni secondari dissipino la loro energia all'interno di esse, aumentando così l'autoassorbimento.<sup>38,39</sup>
- b) *Concentrazione di NP*: è stato riconosciuto che la concentrazione di NP gioca un ruolo maggiore nell'aumento della dose rispetto alla loro dimensione.

Brun et al. hanno scoperto che, attraverso una gamma di rapporti DNA plasmidico:AuNP compresi tra 1:1 e 1:10, energie fotoniche da 14,8 a 70 keV e dimensioni comprese tra 8 e 92 nm, il miglior radio-enhancement è stato ottenuto con AuNP da 37.5 nm, con un rapporto DNA:AuNP di 1:1 e un'energia di 50 keV.<sup>38</sup>

**Effetti sull'interazione NP-sistema biologico:** influenzano la biodistribuzione e l'accumulo delle NP nella matrice tumorale, la diffusione nel tessuto tumorale e l'assorbimento cellulare, nonché l'escrezione dall'organismo.<sup>35,38,39</sup>

- a) *Dimensione delle NP:* Per evitare l'accumulo di NP in organi come cuore e il fegato, causando potenziali effetti collaterali a lungo termine, le NP metalliche devono essere eliminate entro pochi giorni. Ciò si ottiene al meglio attraverso la clearance renale, che impone però delle restrizioni sulle dimensioni delle NP. Le NP con diametro idrodinamico >10 nm hanno maggiori probabilità di essere catturate dal fegato, mentre le NP inferiori a 6 nm vengono eliminate per clearance renale indipendentemente dalla loro carica.
- b) *Carica superficiale:* Si ritiene che una carica positiva sulla superficie delle NP migliori l'assorbimento nelle cellule, grazie alla sua interazione con la membrana lipidica carica negativamente. A causa dell'interazione più pronunciata, le NP cariche positivamente inducono una maggiore distorsione locale della membrana e possono perturbare il potenziale transmembrana interferendo così con alcune funzioni cellulari. Inoltre, quando le NP cariche positivamente vengono introdotte nel flusso sanguigno, le proteine sieriche (ovvero le opsonine) cariche negativamente si adsorbono sulla loro superficie etichettandole per l'eliminazione dal corpo. Questo problema può essere risolto rivestendo in modo opportuno le NP.
- c) *Rivestimento delle NP:* può aiutare a controllare l'interazione delle NP con le proteine del flusso sanguigno e può essere utilizzato per colpire in modo specifico le cellule tumorali del corpo (vedi "Targeting attivo"). Il rivestimento consente anche il controllo della carica superficiale, importante sia per le interazioni con le proteine opsoniniche, sia per la stabilità delle NP (ad esempio la loro tendenza ad aggregarsi) in soluzione acquosa e nell'organismo.<sup>38</sup> È importante che la superficie metallica delle NP sia

ricoperta con rivestimenti biocompatibili che riducano al minimo l'immediato riconoscimento e la rimozione delle NP da parte dei macrofagi.<sup>39</sup>

#### 2.3.4 Tossicità

Per valutare la tossicità di una nanoparticella, i fattori da considerare sono la forma e dimensione, la dose/concentrazione, la superficie e l'ambiente. Sono stati condotti diversi studi *in vitro* per esaminare l'assorbimento cellulare e la tossicità cellulare (citotossicità) delle NP per poter comprendere quanto esse possano essere tossiche alle potenziali concentrazioni a cui potrebbero essere utilizzate.<sup>38,42</sup>

Ad esempio, in uno studio è stata analizzata l'influenza delle dimensioni delle AuNP sulla loro potenziale tossicità nelle cellule leucemiche umane. Le dimensioni variavano dai 4 ai 18 nm di diametro. I dati hanno suggerito che nessuna delle AuNP sferiche era tossica per le cellule leucemiche umane fino a ~ 100  $\mu\text{M}$  di concentrazione di atomi d'oro, anche se venivano assorbite nelle cellule. Studi di vitalità simili con cellule del sistema immunitario hanno dimostrato che le AuNP non erano citotossiche e che riducevano la quantità di ROS potenzialmente dannose nelle cellule.<sup>42</sup>

Rotello et al. hanno studiato la tossicità di AuNP a 2 nm funzionalizzate con gruppi superficiali sia cationici che anionici in tre diversi tipi di cellule. I risultati hanno suggerito che le particelle cationiche sono in genere tossiche a concentrazioni molto più basse rispetto a quelle anioniche.<sup>42</sup>

Sono stati condotti diversi studi tossicologici con AuNP di dimensioni diverse, vari tipi di cellule e utilizzando intervalli di concentrazioni di AuNP. Uno dei modelli *in vitro* più comuni per la misura della tossicità è la misura della concentrazione inibitoria semimassima ( $\text{IC}_{50}$ ), ovvero la concentrazione di sostanza chimica che dà una diminuzione del 50% della vitalità cellulare.<sup>38</sup> Il valore di  $\text{IC}_{50}$  aiuta i ricercatori a confrontare gli effetti inibitori di diversi composti. Un valore inferiore di  $\text{IC}_{50}$  suggerisce un'efficacia maggiore, poiché è necessaria una concentrazione minore per un'inibizione del 50%. Pan et. al hanno dimostrato che tossicità delle AuNP rivestite dipende dalle dimensioni ma non dal tipo di rivestimento perché, ad esempio, i rivestimenti di trifenilfosfina monosolfato di sodio (TPPMS) e trisolfonato di trifenilfosfina di sodio (TPPTS) hanno la stessa tossicità per linee cellulari diverse.

Tsoli et al. invece hanno riscontrato una tossicità del 50% dopo l'esposizione a AuNP 0.24  $\mu\text{M}$  di dimensioni di 1.4 nm per 24 ore; dunque, hanno scoperto che le AuNP possono migliorare la tossicità per le cellule tumorali rispetto alla chemioterapia standard. Ad esempio, l' $\text{IC}_{50}$  su una linea cellulare di melanoma esposta a AuNP di 1.4 nm era 180 volte inferiore all' $\text{IC}_{50}$  dopo l'esposizione al cisplatino.<sup>38</sup>

Come accennato in precedenza, le NP di diametro inferiore a 5 nm sono spesso utilizzate per scopi di radiosensibilizzazione a causa dell'eliminazione relativamente rapida dall'organismo, del buon assorbimento e dell'interazione favorevole con le radiazioni, ma a queste dimensioni le NP possono diventare chimicamente reattive. Pertanto, determinare il modo in cui le NP interagiscono e modulano la risposta cellulare potrebbe fornire ulteriori informazioni per colpire specificatamente le cellule tumorali e migliorare i risultati terapeutici.<sup>38</sup>

## 2.4 Funzionalizzazione di NP

Nonostante i diversi vantaggi derivanti dall'applicazione di NP in nanomedicina, il loro utilizzo nell'organismo può comportare delle controindicazioni. Le NP, come altri corpi estranei, vengono sequestrate dal RES, accumulandosi nel fegato, nella milza, nel midollo e quindi aree che potrebbero non essere quelle di interesse. Inoltre, fenomeni di aggregazione possono portare ad occlusione capillare, intrappolando le NP nel fegato, nei polmoni etc.<sup>43,44</sup> Per questo motivo, la funzionalizzazione superficiale delle NP è essenziale per determinare le proprietà delle nanoparticelle stesse, in quanto influenza la biocompatibilità e, di conseguenza, la loro tossicità.<sup>8</sup> Tra gli agenti stabilizzanti troviamo i composti tiolati; ad esempio, gli alchiltioli sono tra i migliori agenti protettivi per le AuNP. Le molecole di tiolo formano un monostrato auto-assemblato (SAM da "self-assembled monolayer") sulla superficie delle AuNP attraverso un legame oro-zolfo.<sup>45</sup>

La coniugazione di PEG-SH (polietilenglicole tiolato) alla superficie delle nanoparticelle (operazione chiamata PEGilazione, o dall'inglese *PEGylation*) può ridurre molti di questi problemi, ed è infatti uno dei metodi di funzionalizzazione più comunemente usato per le AuNP (*Fig. 2.20*).<sup>35,43,44,45,46</sup> La stabilità e l'integrità funzionale delle AuNP PEGilate sono influenzate da diversi fattori quali il peso molecolare del PEG, i gruppi funzionali attaccati, il ligando e la dimensione delle NP utilizzate.<sup>44,46</sup>

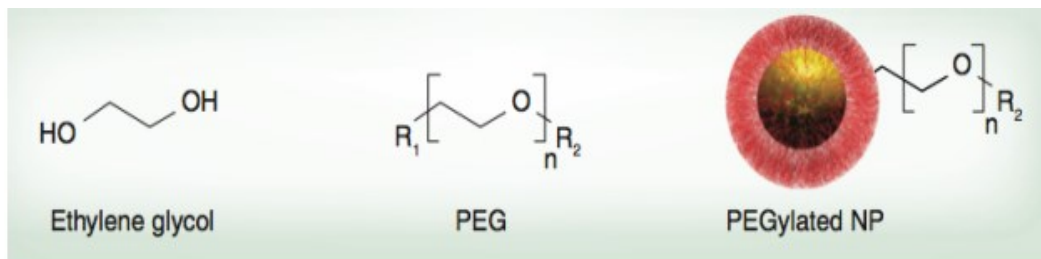


Figura 2.20 Monomeri di etilene glicole sono polimerizzati per formare il PEG, utilizzato per il coating delle NP. Il PEG contiene un gruppo  $R_1$  per legarsi alle NP e un gruppo  $R_2$  per legare altre funzionalità.

Il PEG è un polimero biocompatibile, idrofilo, biologicamente inerte, approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*) statunitense per uso interno, per una serie di applicazioni.<sup>35</sup> La funzionalizzazione delle NP con questo polimero apporta diversi vantaggi per applicazioni biomediche:

- i) Il riconoscimento delle NP da parte del RES attraverso l'opsonizzazione viene ridotto e, di conseguenza, aumenta il tempo di circolazione in vivo.<sup>35,43,44</sup>
- ii) La passivazione della superficie impedisce parzialmente l'aggregazione delle nanoparticelle e ostacola le interazioni non specifiche con le proteine sieriche e tissutali formando un'interfaccia stabilizzante neutra, con conseguente comportamento detto “*stealth*”.<sup>44,35</sup>
- iii) Aumento della solubilità delle NP grazie alle proprietà idrofiliche del PEG. La carica superficiale viene ridotta, riducendo così le interazioni elettrostatiche con proteine e piccole molecole.<sup>43,44</sup>

Il tempo di circolazione ( $t$ ) descrive la residenza delle NP nel circolo sanguigno ed è il periodo durante il quale la concentrazione di NP circolanti rimane al di sopra del 50% della dose iniettata. L'efficacia delle NP richiede un  $t$  sufficiente non solo per raggiungere il bersaglio, ma anche per rimanere nell'area interessata abbastanza a lungo per l'acquisizione dell'immagine o la somministrazione del farmaco. Il sistema RES previene l'accumulo sito-specifico perché rimuove le NP dalla circolazione, utilizzando macrofagi e monociti circolanti, cellule di Kupffer del fegato e della milza e altri vasi linfatici adibiti alla rimozione di materiale estraneo (come batteri e virus) dal corpo. Poiché batteri e virus hanno la stessa carica superficiale negativa delle cellule fagocitiche, il ricoprimento dei corpi estranei da parte delle opsonine è fondamentale per ridurre la repulsione di carica tra i due sistemi. Successivamente,

le cellule fagocitiche inghiottiscono il materiale e lo trasportano al fegato o alla milza per la degradazione e l'escrezione. Il ricoprimento superficiale delle NP da parte del PEG riduce questo processo di opsonizzazione, aumentando il tempo di circolazione nel sangue (Fig. 2.21).<sup>44</sup>

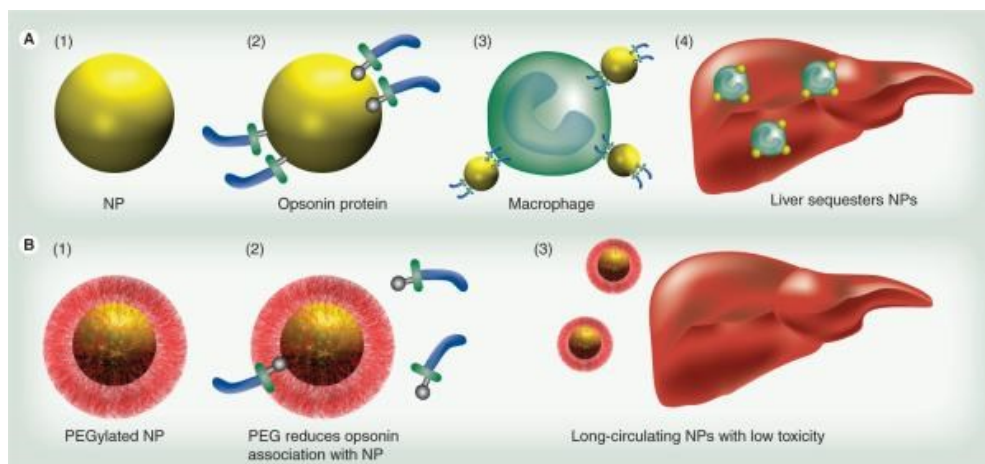


Figura 2.21 Le NP sono rivestite con proteine opsoniniche (A2) e si associano ai macrofagi (A3) per il transito al fegato (A4). Le NP rivestite con il PEG (B1) resistono l'opsonizzazione (B2), con conseguente diminuzione dell'accumulo epatico (B3) e maggiore disponibilità delle NP per l'imaging o/e la terapia.

Oltre alle interazioni NP-RES, uno scarso tempo di circolazione può anche derivare dall'interazione tra le NP stesse, ovvero l'aggregazione. Le NP si aggregano principalmente perché l'attrazione tra le particelle è più forte dell'attrazione per il solvente. Le NP aventi elevata energia superficiale hanno una maggiore tendenza ad aggregarsi. Il PEG diminuisce l'energia superficiale delle NP e minimizza l'attrazione di van der Waals aumentando la distanza sterica tra di loro.<sup>44</sup>

L'aumento del tempo di circolazione nell'organismo porta a una maggiore biodisponibilità, pertanto la frequenza di somministrazione del farmaco e la quantità di farmaco possono essere ridotte, il che migliora la qualità di vita del paziente e riduce i rischi clinici.<sup>43,44</sup>

Il peso molecolare e la polidispersità del polimero sono importanti per la biocompatibilità e per il comportamento *stealth*. Il peso molecolare del PEG utilizzato in applicazioni farmaceutiche e biomediche varia da pochi Da a circa a 50 KDa. In generale, i materiali terapeutici più piccoli (come oligonucleotidi e siRNA) utilizzano PEG più grandi (20-50 KDa) per prevenire l'escrezione da parte dei reni e mantenere un'elevata concentrazione nel pool sanguigno per tempi più lunghi. I farmaci più "grandi" (come anticorpi e NP), invece, sono spesso rivestiti con PEG



aventi pesi molecolari inferiori (1-5 KDa) perché ulteriori aumenti del raggio idrodinamico potrebbero accorciare il tempo di circolazione.<sup>43,44</sup>

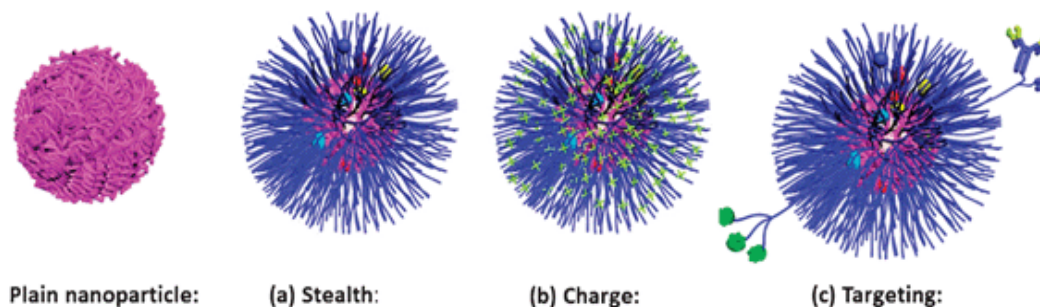


Figura 2.22 Caratteristiche delle NP rivestite con un polimero. (a) effetto Stealth: conferisce biocompatibilità, stabilità sterica e protezione del farmaco incapsulato e riduce l'opsonizzazione e la clearance delle NP, ma può anche ridurre l'assorbimento cellulare. (b) carica: ad es. il carattere cationico migliora l'assorbimento cellulare, ma è soggetto a una distribuzione tissutale incontrollata e spesso associata a tossicità. (c) targeting: migliora l'assorbimento e la specificità cellulare, ma a volte può accelerare la clearance e/o l'immunogenicità.

L'estremità terminale  $R_1$  del polimero (Fig. 2.20) è quella utilizzata per formare il legame con le NP. Come detto in precedenza, per le AuNP vengono generalmente utilizzati approcci covalenti tramite un legame con un gruppo sulfidrilico. Indipendentemente dalla chimica di immobilizzazione, la purificazione del coniugato PEG-NP viene effettuata tramite ripetute fasi di centrifugazione e lavaggio, filtrazione, dialisi o altri metodi di separazione.<sup>44</sup>

L'estremità terminale del polimero indicata come  $R_2$ , invece, influenza il comportamento in vivo (Fig. 2.20). È stato osservato che il PEG con un gruppo terminale metossilico o alcolico riduce il legame non specifico con le proteine aspecifiche. Poiché la superficie cellulare è negativa, il rivestimento delle NP con una carica negativa (ad es. un tiolo o un carbossile) provoca una quantità minore di eventi fagocitotici rispetto alle cariche positive (ad es. un'ammina). Infatti, l'm-PEG-SH (Fig. 2.23(A)) offre il minor legame non specifico, non presenta attività di bioconiugazione ed è il più comune in commercio. Ciononostante, è disponibile un'ampia gamma di tipi di PEG che, ad esempio, possono presentare un gruppo amminico  $-NH_2$  (Fig. 2.23(B)) o carbossilico  $-COOH$  (Fig. 2.23(C)).<sup>44</sup>

In sintesi, il PEG ideale riduce l'assorbimento di proteine aspecifiche, aumenta l'idrofilia, previene l'aggregazione delle NP e facilita il legame del ligando nel caso di NP destinate al targeting attivo. I ligandi possono aumentare l'accumulo delle NP sull'organo bersaglio causato dall'effetto EPR e le NP offrono un accumulo sito-specifico, seguito dal rilascio di un farmaco non limitato al sistema vascolare. I tipi

di ligandi includono anticorpi, piccoli peptidi, lectine, aptameri, proteine ingegnerizzate e frammenti proteici.<sup>44</sup>

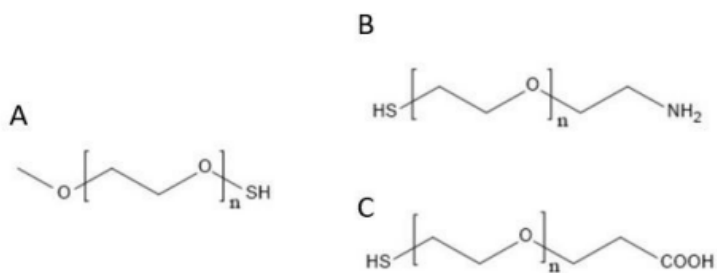


Figura 2.23 Rappresentazione delle molecole di:  $m\text{-PEG-SH}$  (A);  $\text{SH-PEG-NH}_2$  (B);  $\text{SH-PEG-COOH}$  (C).



## Capitolo 3

### Metodi di caratterizzazione delle NP

In generale, la caratterizzazione dei nanomateriali prevede la valutazione di proprietà chimiche e fisiche molto varie tra loro, quali dimensione, dispersione, composizione chimica, forma, area superficiale, struttura cristallina, solubilità, chimica superficiale, carica, proprietà ottiche e così via. I metodi più utilizzati per la misurazione delle dimensioni sono la diffrazione dei raggi X (XRD), la diffusione dinamica della luce (DLS) e la microscopia elettronica (EM). La morfologia, ovvero l'aspetto fisico e la topografia superficiale di un materiale, come crepe, creste o pori, solitamente si osservano con la microscopia elettronica a scansione (SEM) e la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). La composizione chimica, invece, corrisponde ai componenti atomici che costituiscono una o più NP e può essere analizzata tramite spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS da "*inductively coupled plasma-mass spectrometry*") e spettroscopia a dispersione di energia (EDS) tramite microscopi SEM e TEM equipaggiati in maniera opportuna.<sup>47</sup> Inoltre, nel caso di nanomateriali costituiti da una particolare struttura cristallina, la disposizione degli atomi nel reticolo cristallino può essere caratterizzata tramite diffrazione dei raggi X, la diffrazione elettronica al TEM. A volte, anche la spettroscopia UV-Vis, la spettroscopia FT-IR e quella Raman possono fornire informazioni riguardo la presenza di fasi amorfe ed eventuali difettualità. Gli stabilizzanti organici possono essere identificati tramite FT-IR, risonanza magnetica nucleare (NMR), analisi termogravimetrica (TGA) e calorimetria differenziale a scansione (DSC). La composizione chimica di superficie delle particelle, sia per quanto riguarda gli stabilizzanti organici che gli strati atomici più superficiali della NP dove essi sono ancorati, è caratterizzata dalla spettroscopia fotoelettronica a raggi X. Anche il potenziale zeta, ottenuto tramite misure di DLS, fornisce informazioni

sulla natura della superficie delle NP. Infine, le proprietà ottiche e, nel caso di AuNP, plasmoniche delle nanoparticelle vengono determinate principalmente con la spettroscopia UV-Vis-NIR.<sup>47,48</sup>

### 3.1 Spettroscopia UV-Visibile-NIR

La spettroscopia UV-Visibile-NIR è una tecnica analitica qualitativa e quantitativa utilizzata per determinare la quantità di luce che viene assorbita e trasmessa da un campione in un intervallo spettrale che, in generale, va dall'ultravioletto (190 - 400 nm) al vicino infrarosso (NIR da "Near Infra-red", 780 - 2500 nm).

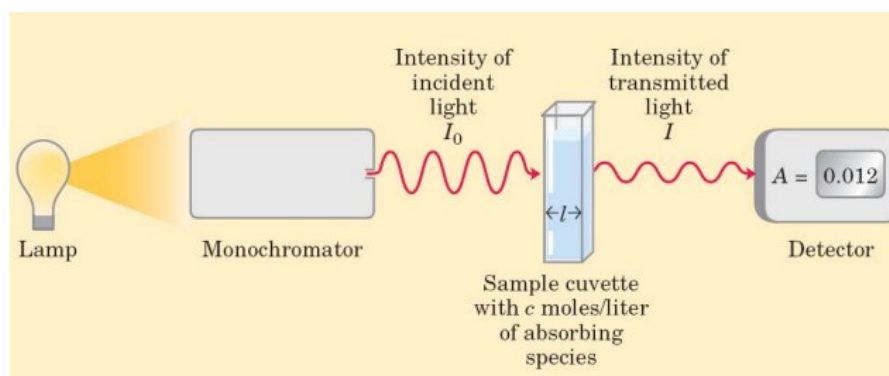


Figura 3.1. Esperimento di spettroscopia di assorbimento UV-Visibile. La luce monocromatica di lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) e di intensità ( $I_0$ ) viene fatta passare attraverso un campione tenuto in una cuvetta, il quale assorbe parte dell'intensità della radiazione incidente. Questa viene rivelata come una diminuzione dell'intensità della luce trasmessa ( $I$ ) comparata a quella incidente. Il  $\log I_0/I$  è misurato come assorbimento. Variando la lunghezza d'onda si ottiene l'intero spettro del campione.

L'assorbimento di luce da parte della soluzione campione viene definito da una grandezza che prende il nome di Assorbimento ( $A$ ), calcolata con la seguente formula (Eq. 3.1):

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \log_{10} \frac{1}{T} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

In cui  $T$  è la trasmittanza, una grandezza che esprime la quantità di radiazione trasmessa dal campione,  $I_0$  è l'intensità della radiazione incidente,  $I$  è l'intensità della radiazione trasmessa.

L'Assorbimento è linearmente proporzionale alla concentrazione del campione nella legge di Lambert-Beer (Eq. 3.2):

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot C \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Dove:

- $\epsilon$ , il coefficiente di estinzione molare ( $\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ );
- $d$ , il cammino ottico della cuvetta;
- $C$ , la concentrazione della specie in soluzione espressa in molarità ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

Dalla misura si ottiene uno spettro di assorbimento, grazie al quale è possibile riconoscere e quantificare la sostanza in esame. I dati sono solitamente riportati come  $A$  in funzione della lunghezza d'onda,  $\lambda$ .

Le soluzioni di AuNP presentano un caratteristico spettro di assorbimento UV-Vis dovuto alla presenza di un segnale di risonanza plasmonica superficiale (SPR) nella parte visibile dello spettro.<sup>49,50</sup> Il picco plasmonico di una soluzione colloidale di AuNP sferiche si trova in prossimità di 520 nm, che le fa apparire rosse.

Il fenomeno di SPR deriva dai *plasmoni superficiali localizzati* delle NP, che sono oscillazioni collettive di elettroni liberi sulla superficie del metallo in seguito all'applicazione di un campo elettrico esterno per interazione con un'onda elettromagnetica.<sup>50</sup> Nel caso delle AuNP, la risonanza degli elettroni avviene su tutto il volume della nanoparticella, a causa delle dimensioni nanometriche della particella stessa. L'oscillazione dei plasmoni (carichi negativamente) genera uno sbilanciamento locale di carica all'interno della NP; questo fenomeno è chiamato *risonanza plasmonica superficiale localizzata* (LSPR), che dà luogo all'effetto plasmonico delle NP metalliche. Dunque, il plasmone in una NP può essere considerato come un oscillatore armonico *massa-molla* guidato dall'onda luminosa risonante in energia, dove la nuvola di elettroni oscilla come un dipolo in direzione parallela al campo elettrico della radiazione elettromagnetica. Solo radiazioni luminose aventi frequenza in risonanza con l'oscillazione dei plasmoni sono in grado di eccitare l'LSPR della NP.<sup>50</sup>

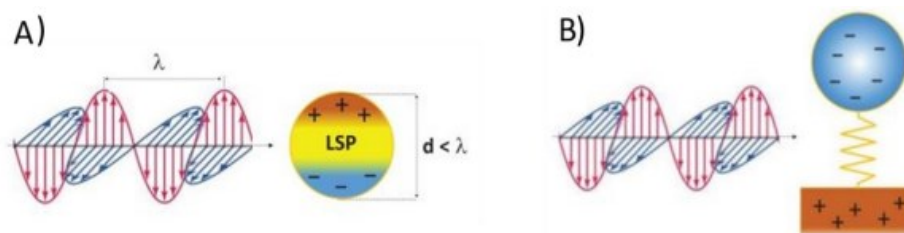


Figura 0.2 A) eccitazione degli LSP da parte della luce che si propaga nello spazio. B) LSP nelle AuNP può essere modellato come un oscillatore armonico a massa elastica, dove la densità degli elettroni liberi è equivalente alla massa.

### 3.1.1 Fattori che influenzano la risonanza plasmonica

La lunghezza d'onda corrispondente al fenomeno LSPR di una nanoparticella dipende da diversi fattori come il tipo di metallo, il mezzo dielettrico (ovvero il solvente) dove sono sospese le NP, la dimensione, la forma ed eventuali aggregazioni delle NP. Uno dei metodi più semplici per caratterizzare le proprietà ottiche delle NP, e quindi studiare la LSPR, è la spettroscopia UV-Visibile.<sup>49,50</sup>

#### 3.1.1.1 Ambiente dielettrico e chimico-fisico

La posizione della LSPR è molto sensibile alle proprietà dielettriche ambientali, a causa delle dimensioni nanometriche delle NP, ovvero della grande frazione di atomi superficiali sul totale. Le variazioni di densità di liquidi o gas, la formazione di gusci organici come quelli dei leganti stabilizzanti, e in generale qualsiasi adsorbimento superficiale di composti chimici ha un effetto sulla frequenza di oscillazione del plasmone. Questo perché, variando il mezzo, la superficie avrà una diversa capacità di accogliere la densità di carica degli elettroni (quindi dei plasmoni) della NP. Questo aspetto è fondamentale per sviluppare sensori basati su nanoparticelle.<sup>50</sup>

Oltre al mezzo, anche le modificazioni chimiche sulla superficie delle AuNP, come la reazione con ligandi tiolati, il fisisorbimento di sostanze chimiche o l'adsorbimento di specie gassose reattive, può portare alla modifica delle proprietà LSPR. Ad esempio, il rivestimento di piccole NP di Au (cioè <10 nm) con un denso monostrato di ligandi tiolati a catena corta è tipicamente associato allo smorzamento della LSPR.<sup>50</sup>

#### 3.1.1.2 Dimensioni

La dipendenza della  $\lambda$  di assorbimento dal diametro delle NP spiega perché è fondamentale sintetizzare sospensioni di NP monodisperse (aventi lo stesso diametro).

Ad esempio, in *figura 3.3* sono mostrati gli spettri di assorbimento UV-Visibile di AuNP aventi diversi diametri. Da questi spettri si vede che al decrescere delle

dimensioni, si ha un allargamento e uno smorzamento della LSPR di nanosfere di Au.

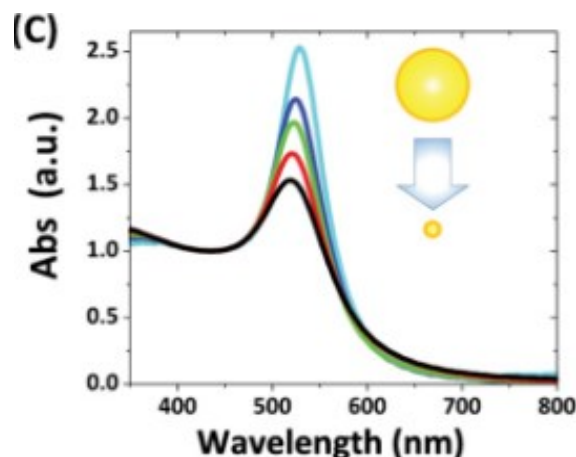


Figura 3.3 Allargamento e smorzamento della LSPR in nanosfere di Au con dimensioni decrescente da 25 a 5 nm.

Inoltre, quando la dimensione delle AuNP è inferiore rispetto alla lunghezza d'onda della radiazione luminosa ( $d < \lambda$ ), la distribuzione del campo elettrico lungo la particella è uniforme, la polarizzazione della nuvola elettronica è coerente in ogni punto del metallo e l'oscillazione del plasmon è di tipo dipolare. Al contrario, quando  $d \geq \lambda$ , la polarizzazione della nuvola di elettroni non è più coerente in ogni punto del metallo e sono eccitate le oscillazioni plasmoniche multipolari.<sup>50</sup>

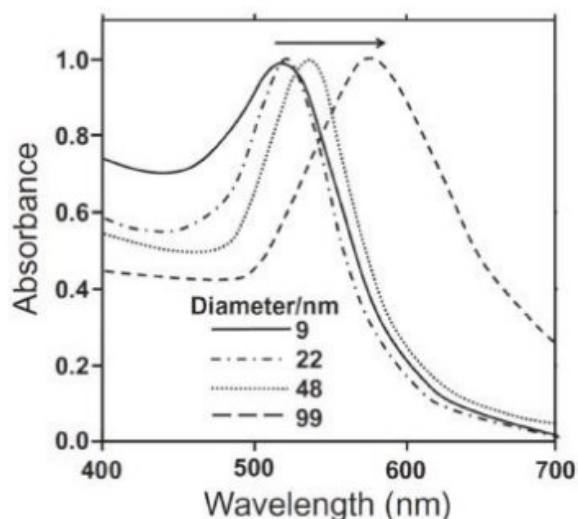


Figura 3.4 Spettri di assorbimento UV-Vis di AuNP aventi diametri diversi.

Come mostrato in figura 3.4, l'effetto della dimensione appare nello spettro di assorbimento ottico come un allargamento e *redshift* della LSPR (spostamento della banda verso  $\lambda$  maggiori) all'aumentare del diametro delle NP.



In conclusione, se si ha una sospensione di NP caratterizzata da un'ampia distribuzione dei diametri, l'assorbimento produrrà una banda molto larga, poiché particelle diverse assorbono a  $\lambda$  diverse.<sup>50</sup>

### 3.1.1.3 Aggregazione

Un problema riscontrato nella preparazione di NP è la loro aggregazione. Questo fenomeno avviene perché i plasmoni di due singole NP possono influenzarsi a vicenda, in funzione della distanza delle particelle, della geometria e della polarizzazione relativa della luce. Ciò risulta in un fenomeno di risonanza plasmonica diverso da quello originale delle singole NP.<sup>50</sup>

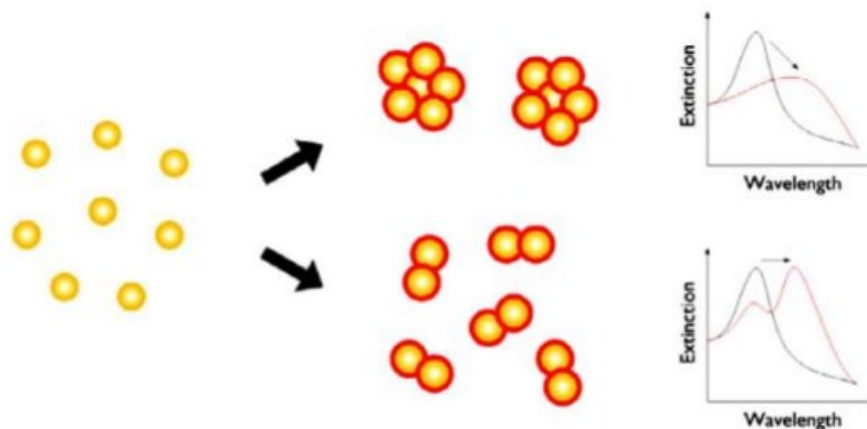


Figura 3.5 Effetti dell'aggregazione delle AuNP, quali lo spostamento e l'allargamento del picco plasmonico.

In seguito all'aggregazione di AuNP si ha, dunque, una variazione della LSPR e della  $\lambda$  del massimo di assorbimento. Questa variazione comporta un cambiamento di colore della sospensione da rosso a blu, accompagnato anche da un allargamento del picco. Questo fenomeno consente di distinguere tra NP isolate e monodisperse e NP aggregate, e di valutare la dimensione degli aggregati in base alla larghezza e allo spostamento verso il rosso della banda di assorbimento plasmonica (Fig. 3.5).<sup>50</sup>

Per prevenire gli effetti di aggregazione, è molto importante utilizzare un buon agente stabilizzante in grado di aumentare la stabilità delle NP in soluzione (ad es. il PEG tiolato).<sup>50</sup>

### 3.1.1.4 Composizione

Qualsiasi modifica chimica al reticolo cristallino (come il drogaggio o la formazione di una lega) induce un notevole cambiamento nella LSPR. Ciò significa che le leghe di Au e il drogaggio sono altri metodi per regolare la risposta ottica dei sistemi plasmonici, oltre alla modifica delle dimensioni, della forma, dell'aggregazione e dell'ambiente delle NP.

Ad esempio, nel caso di nanoleghe di Au-Fe, si osserva uno smorzamento LSPR e un blue-shift di ~15 nm dopo l'introduzione di ~11 at% di Fe (Fig. 3.6).<sup>50</sup>

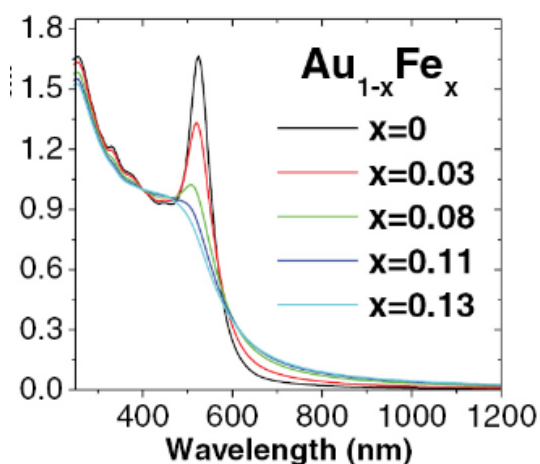


Figura 3.6 Influenza del drogaggio di AuNP con Fe sulla LSPR.

### 3.1.2 Considerazioni generali

La dimensione delle AuNP e la concentrazione molare di Au possono essere estratte direttamente dagli spettri UV-Vis, sia utilizzando la posizione dell'LSPR che l'assorbimento a questa lunghezza d'onda, oppure il rapporto degli assorbimenti alla  $\lambda$  dell'LSPR e a 450 nm ( $Abs_{LSPR}/Abs_{450}$ ). Dal rapporto tra il valore di assorbanza a 450 nm e quello a 1200 nm invece è possibile ricavare informazioni sulla stabilizzazione delle AuNP: un valore più elevato del rapporto indica che le AuNP hanno formato aggregati di dimensioni inferiori, il che è generalmente associato a una maggiore stabilità colloidale. Il valore di  $Abs_{1200}$  infatti è correlato all'aggregazione delle NP in cluster di dimensioni maggiori e ai conseguenti contributi di assorbimento plasmonico nel NIR che si generano in questi cluster, oltre che a fenomeni di scattering della luce in presenza di questi aggregati di NP.<sup>49</sup>

### 3.2 Spettroscopia FT-IR

La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier è una tecnica di analisi che fornisce informazioni sulla presenza di gruppi funzionali in molecole organiche; quindi, viene sfruttata per confermare la presenza di diversi gruppi funzionali caratteristici dei reagenti utilizzati per la funzionalizzazione delle NP. Se esposte alla radiazione infrarossa, le molecole del campione assorbono selettivamente le radiazioni di lunghezze d'onda specifiche che causano una variazione del momento di dipolo delle molecole del campione. Di conseguenza, avviene una transizione tra i livelli energetici vibrazionali delle molecole, dallo stato fondamentale a quello eccitato. Le frequenze vibrazionali di un dato gruppo funzionale sono attese in specifiche regioni che dipendono dal tipo di atomi coinvolti e dal tipo di legami chimici. L'intensità dei picchi di assorbimento è correlata all'entità della variazione del momento di dipolo prodotta dalla specifica vibrazione. Pertanto, analizzando lo spettro di assorbimento IR si possono ottenere informazioni strutturali della molecola in esame. Lo spettro IR è riportato in trasmittanza percentuale (%T) o in assorbanza (A) in funzione del numero d'onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) ed è suddiviso in due zone: la zona delle *frequenze di gruppo* ( $4000\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ ) dove si possono osservare i picchi di assorbimento relativi ai modi vibrazionali di gruppi funzionali specifici presenti all'interno delle molecole, e la zona del *fingerprint* ( $1250\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ ) in cui i segnali sono tipici e caratteristici della struttura molecolare.<sup>51</sup>

Lo spettrometro FT-IR applica una modulazione interferometrica della radiazione, che permette di ottenere l'interferogramma, ovvero il segnale del rivelatore in funzione del cammino ottico. L'interferogramma è la trasformata di Fourier dello spettro originale (segnale in funzione del numero d'onda); dunque, per ottenere lo spettro dell'interferogramma misurato, si effettua la sua trasformata di Fourier (FFT) (Fig. 3.7).<sup>52</sup>

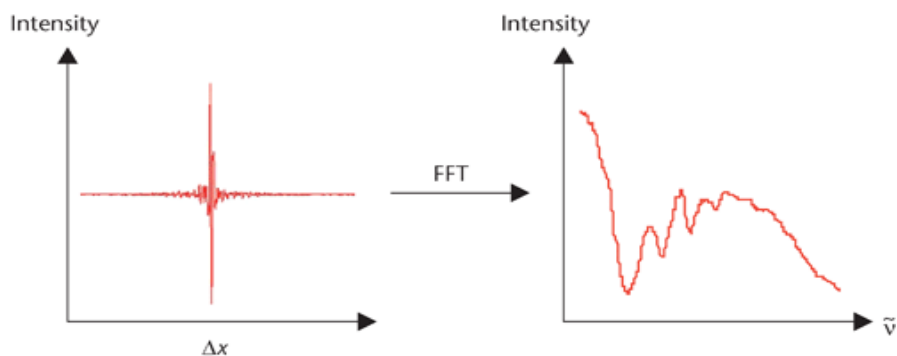


Figura 3.7 Il segnale del rivelatore in funzione della differenza di cammino ottico  $\Delta x$  è l'interferogramma. Dopo il calcolo della trasformata di Fourier (FFT) si ottiene lo spettro di assorbimento nell'infrarosso.

La spettroscopia FT-IR verrà impiegata in questo progetto di tesi per confermare il ricoprimento superficiale delle NP con il PEG tiolato.

### 3.3 Microscopia elettronica in trasmissione (TEM)

La microscopia elettronica in trasmissione è un potente strumento di imaging che fornisce preziose informazioni sulla morfologia dei campioni, oltre che una caratterizzazione diretta della distribuzione dimensionale dei nanomateriali a livello di singola nanoparticella.<sup>53</sup> Per ottenere una statistica significativa, è necessario raccogliere un alto numero di immagini, analizzando diverse zone del campione, e fare una media delle dimensioni di un elevato numero di particelle (circa 500).

Questo strumento consente di esaminare le strutture dei materiali fino a risoluzione atomica e contemporaneamente di avere informazioni chimiche e cristallografiche da aree del materiale sub-micrometriche. Il TEM utilizza un fascio di elettroni, il quale attraversa il campione che deve avere uno spessore estremamente ridotto (20-100 nm). Il fascio di elettroni ad alta energia passa attraverso un complesso sistema di lenti elettromagnetiche, che hanno la funzione di controllarlo in modo da ottenere un'immagine ingrandita della porzione di campione attraversata, con risoluzione che può arrivare a frazioni di nanometri.<sup>54</sup>

Il modo in cui l'immagine o le informazioni possono essere estratte dal TEM dipende dalle interazioni tra il fascio di elettroni e gli elettroni e/o nuclei degli atomi che compongono il campione.<sup>54</sup> Quando il fascio attraversa il campione, si possono avere diversi tipi di fenomeni di scattering:

- *Scattering elastico*, dovuto all'interazione degli elettroni del fascio con i nuclei atomici. Consiste in una variazione della direzione di propagazione della radiazione, senza perdita di energia (Scattering di Rayleigh).
- *Scattering anelastico*, dovuto all'interazione degli elettroni del fascio con gli elettroni delle shell più interne (*K*) dell'atomo in esame. Consiste in una perdita di energia, senza variazione della direzione di propagazione. Questa interazione porta all'espulsione di elettroni secondari (a bassa energia) dalla shell *K*, generando una vacanza elettronica che verrà colmata dalla transizione di un elettrone da una shell a energia superiore. L'eccesso di energia può essere rilasciato in due modi:
  - Raggi X caratteristici: emissione di un fotone *X*
  - Effetto Auger: l'energia viene ceduta ad un terzo elettrone, del guscio più esterno, che riesce così a raggiungere il livello di vuoto e a fuoriuscire dalla materia. Questo elettrone viene chiamato *elettrone Auger*.

L'ampiezza e le variazioni di fase nel fascio trasmesso forniscono un contrasto di immagine che dipende principalmente dallo spessore del campione (la quantità di materiale che il fascio di elettroni deve attraversare) e dalla composizione chimica (gli atomi pesanti diffondono più elettroni rispetto a quelli più leggeri). Le NP contenenti atomi pesanti hanno una densità elettronica maggiore rispetto a quelle contenenti atomi di massa inferiore. Di conseguenza, le NP inorganiche (ad es. di oro, argento, rame, ossido di alluminio, a base di silice) sono facilmente rilevabili e non necessitano di alcuna particolare procedura di colorazione per migliorare il loro contrasto.<sup>53</sup>

### 3.4 Spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDS)

La tecnica di spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (EDS, *Dispersive X-ray Spectroscopy*) viene utilizzata principalmente per l'analisi qualitativa dei materiali, ma è in grado di fornire anche risultati semiquantitativi. Tipicamente, la strumentazione SEM (microscopia elettronica a scansione) è dotata di un sistema EDS per consentire l'analisi chimica delle immagini osservate nel monitor. I segnali prodotti in un sistema SEM/EDS includono elettroni secondari e backscatterati che vengono utilizzati nella formazione dell'immagine per l'analisi morfologica, nonché i raggi X, utilizzati per l'identificazione e la quantificazione di sostanze chimiche presenti a concentrazioni rilevabili. Inoltre, l'EDS permette di scansionare le diverse

aree della superficie del campione a singoli punti, generando delle “mappe a punti”<sup>55,56</sup>.

Al contempo l’EDS presenta alcuni svantaggi, tra i quali:<sup>55,56</sup>

- I dati ottenuti riguardano solamente la parte superficiale del materiale in esame (alcuni nm);
- Si tratta di un metodo relativamente insensibile, con limiti di rilevamento nell’intervallo di concentrazione tra 0.1 e 10% in peso;
- Non è in grado di vedere elementi più leggeri del boro;
- L’analisi quantitativa di materiali eterogenei spesso si traduce in dati imprecisi.

L’EDS utilizza un fascio di elettroni ad alta energia per eccitare gli elettroni del nucleo per la generazione di raggi X, che verranno poi misurati.

Le transizioni di energia sono denominate usando le lettere del guscio in cui si sono verificate (K, L, M), una lettera greca che indica il gruppo di linee a cui appartiene la transizione ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), in ordine di importanza decrescente, e un pedice numerico che classifica il picco di intensità all’interno del gruppo (*Fig. 3.8*).

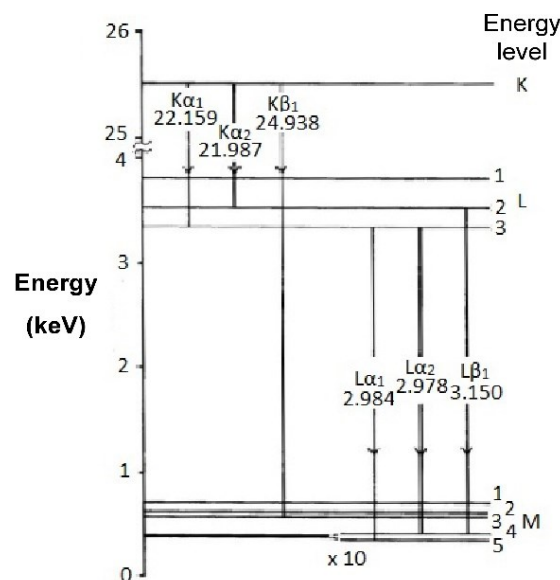


Figura 3.8 Diagramma delle transizioni energetiche dopo l'eccitazione di un atomo d'oro.

Poiché ogni elemento presenta una carica nucleare diversa, le energie dei gusci e la spaziatura tra loro variano da un elemento all'altro. Di conseguenza, è possibile

determinare la composizione del campione attraverso il riconoscimento dei picchi caratteristici.<sup>57</sup>

Oltre alle transizioni caratteristiche, negli spettri EDS si osserva un fondo continuo dovuto alla *Radiazione di Bremsstrahlung*, ovvero la radiazione elettromagnetica emessa a causa della decelerazione degli elettroni derivante dall'interazione con il nucleo atomico; questo fenomeno è anche noto come “radiazione di frenamento”.

Le energie delle transizioni del guscio centrale comunemente usate sono tabulate per tutti gli elementi naturali; dunque, la determinazione della composizione del campione viene effettuata tramite confronto dei picchi dello spettro sperimentale con i picchi presenti in letteratura o degli standard. Per determinare la stechiometria del campione, invece, è necessaria un'alta risoluzione per far sì che il rapporto tra il numero di conteggi a ogni frequenza caratteristica dia il giusto rapporto degli elementi nel campione. All'aumentare del numero di conteggi di raggi X, aumenta l'affidabilità e la precisione dell'analisi.<sup>57,56</sup>

Gli spettri EDS sono riportati con l'energia (in keV) sull'asse delle x e il numero di conteggi sull'asse delle y.

### **3.5 Spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS)**

L'ICP-MS (dall'inglese *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) è considerata una tecnica altamente sensibile, tra le più potenti per l'analisi degli elementi in tracce, in grado di fornire una rapida analisi multielemento e con bassi limiti di rilevamento (fino a concentrazioni al di sotto di 1ppb) per un'ampia gamma di campioni, sia metallici che non metallici. I campioni liquidi vengono introdotti nello strumento ICP-MS tramite un sistema di nebulizzazione, costituito da un nebulizzatore e da una camera di nebulizzazione, la quale produce un aerosol di goccioline polidisperse. Una volta che le goccioline si trovano nel plasma, il solvente evapora formando particelle solide, che a loro volta vengono vaporizzate e i loro elementi atomizzati e ionizzati. Gli ioni vengono estratti attraverso l'interfaccia nello spettrometro di massa, dove vengono separati in base al loro rapporto massa/carica e rilevati (*Fig. 3.9*).<sup>58</sup>



Figura 3.9 Schema a blocchi del funzionamento dell'ICP-MS.

È noto che le misure ICP-MS sono fortemente dipendenti dalla matrice della soluzione di campione introdotta; nel caso delle NP sospese, la stabilità della sospensione è un ulteriore fattore che influenza l'accuratezza della misura. Per effettuare l'analisi quantitativa degli elementi è necessario digerire il campione, ai fini di ottenere soluzioni che contengano gli elementi in forma libera. Generalmente la digestione viene effettuata tramite l'uso di un forte agente ossidante (acido cloridrico, acqua regia, acido nitrico), il quale digerisce tutta la matrice organica tramite mineralizzazione e gli elementi vengono portati al massimo stato di ossidazione.<sup>59</sup>

### 3.6 Diffrazione di raggi X (XRD)

La diffrazione dei raggi X (XRD, *X-ray diffraction*) è una tecnica ampiamente utilizzata per la caratterizzazione strutturale di materiali cristallini, e quindi la composizione e le proprietà di questi ultimi. Nella XRD si registra un pattern di intensità della radiazione diffratta dal campione, che costituisce un'impronta digitale del materiale stesso. Confrontando il diffrattogramma sperimentale con quelli presenti in un database, è possibile identificare qualitativamente qualsiasi campione incognito, oltre che le fasi cristalline presenti e la struttura tridimensionale. Nel caso di coesistenza di più fasi, lo spettro può essere fittato con opportuni modelli per ottenere le abbondanze relative.<sup>60,61</sup>

La diffrazione è un fenomeno caratteristico di ogni tipo di onda, e si verifica quando un impulso ondulatorio attraversa delle fenditure di dimensioni confrontabili con la



sua lunghezza d'onda. Consiste nella variazione della direzione di propagazione dell'onda incidente; le estremità della fenditura agiscono come sorgenti di radiazioni sferiche, il cui involuppo produce fenomeni di interferenza.

Un cristallo è per definizione un sistema periodico di atomi equidistanti e paralleli, con distanze interatomiche dell'ordine dell'Angstrom ( $10^{-10}$  m), analogamente alla lunghezza d'onda dei raggi X. Di conseguenza, i cristalli sono considerati come un reticolo di diffrazione in cui ogni atomo diventa una sorgente secondaria di radiazione. L'interazione è un processo di *scattering elastico*, in cui l'energia del fotone non varia mentre cambia la direzione di propagazione.<sup>60,61</sup>

Nel reticolo cristallino ci sono diverse famiglie di piani ognuna delle quali può essere interessata dalla "riflessione" delle onde incidenti. La riflessione però non è sempre possibile, ma è limitata ad alcune relazioni angolari tra la direzione di incidenza e il piano in questione.

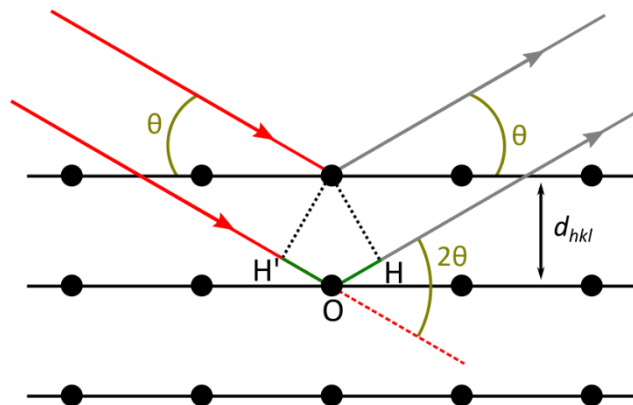


Figura 3.10 Rappresentazione del processo di diffrazione, ovvero lo scattering elastico e coerente di un fascio incidente da parte di un sistema cristallino

La Legge di Bragg afferma che, l'interferenza costruttiva tra due raggi diffratti è possibile solo se la differenza di cammino ottico tra i due è pari ad un numero intero di lunghezze d'onda (Eq. 3.3):

$$2d_{hkl}\sin(\theta) = n\lambda \quad \text{con } n=0,1, 2, \dots \text{intero} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

Dove  $d_{hkl}$  è la distanza interplanare,  $hkl$  sono gli Indici di Miller che definiscono i piani cristallini,  $2\theta$  è l'angolo di diffrazione e  $\theta$  è l'angolo di incidenza del raggio. Per qualsiasi sistema cristallino, tale angolo può essere correlato ai parametri della cellula unitaria  $a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$  tramite trigonometria.<sup>60,61</sup>

Tipicamente i diffrattometri a raggi X per i campioni in polvere sono basati sulla configurazione Bragg-Brentano (detta  $\theta$ - $2\theta$ ), in cui il campione è tenuto fisso, mentre la sorgente a raggi X e il detector ruotano in un determinato range di angoli, mantenendo la geometria costante durante la misura (Fig. 3.11).

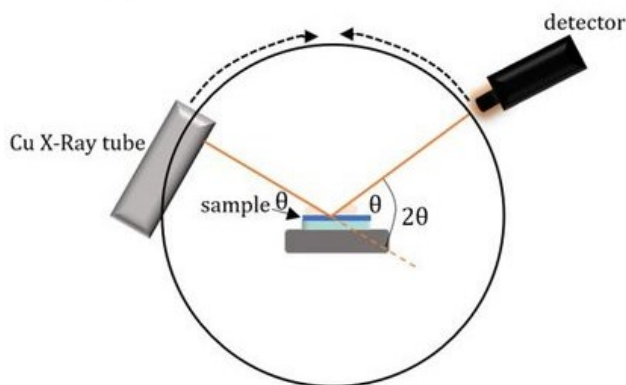


Figura 3.11 Configurazione geometrica di Bragg-Brentano: sia la sorgente di raggi X che il rivelatore si muovono simultaneamente con un angolo  $\theta$  rispetto al campione.

Dal diffrattogramma è possibile stimare la struttura cristallina, l'abbondanza delle fasi, il grado di cristallinità e la dimensione dei domini cristallini. Raramente un cristallo è perfettamente cristallino; in genere sono presenti porzioni amorfe (o difetti reticolari) e porzioni cristalline, dette cristalliti o grani cristallini. Per questo motivo, la dimensione dei domini cristallini non coincide necessariamente con le dimensioni delle NP. In ogni caso, si tratta di informazioni pesate sul volume relativo di ciascuna componente.

La legge di Scherrer correla la dimensione dei cristalliti (NP) alla larghezza del picco di diffrazione (Eq. 3.4):

$$d = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

con  $d$  dimensione della particella,  $\lambda$  la lunghezza d'onda della radiazione incidente,  $\theta$  l'angolo di riflessione di Bragg,  $\beta$  la larghezza del picco a mezza altezza sulla scala  $2\theta$ , e  $K$  una costante vicino all'unità (approssimabile a 0.9), il cui valore dipende da fattori come la geometria dei cristalliti.

Il maggiore svantaggio della XRD di polveri è che i dati di diffrazione tridimensionali di un singolo cristallo sono compressi sulla singola dimensione  $2\theta$ , ciò significa che diverse riflessioni  $hkl$  spesso si sovrappongono in  $2\theta$ . Pertanto, risulta difficile determinare sperimentalmente le intensità accurate delle singole riflessioni necessarie per l'analisi strutturale. La soluzione consiste nell'adottare il *metodo di Rietveld*, un approccio di adattamento del profilo sperimentale che si basa sulla minimizzazione di una funzione, che rappresenta la differenza tra il profilo di diffrazione sperimentale e quello calcolato. L'intensità calcolata ad ogni passo in  $2\theta$  viene confrontata con l'intensità sperimentale e la differenza tra i due viene ridotta al minimo modificando alcuni parametri del modello.<sup>61</sup>

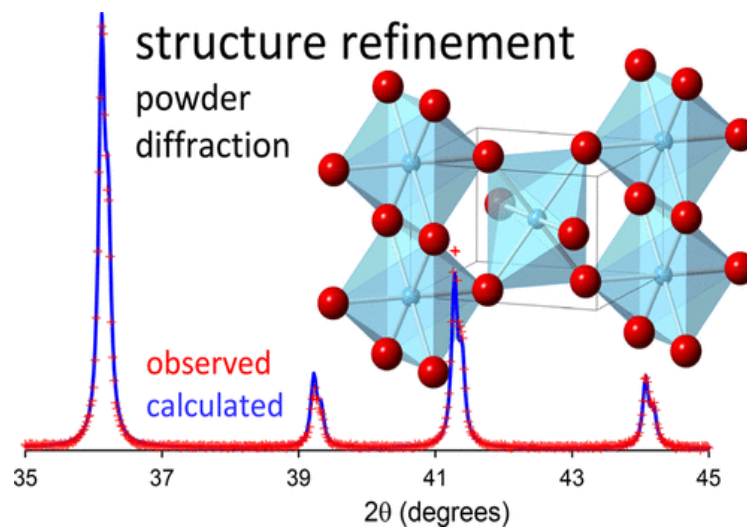


Figura 3.12 Rappresentazione del metodo di Rietveld che si adatta ai dati sperimentali.

Dal diffrattogramma, quindi, è possibile trarre diverse informazioni:<sup>60,61</sup>

- Posizione dei picchi, legata alle distanze interplanari che a loro volta sono legate agli assi cristallografici → si ricavano informazioni sulla cella elementare e sulle fasi cristalline presenti.
- Intensità dei picchi, legata a quanta radiazione viene riflessa dalla struttura atomica → si ricavano informazioni sulle posizioni atomiche nella cella elementare (informazioni strutturali, metodo di Rietveld) e sulla % di cristallinità.
- Forma e larghezza dei picchi, legata alla morfologia dei cristalli e alla loro difettività → si ricavano informazioni sulla dimensione dei cristalliti e sulle difettività dei materiali (metodo di Scherrer).

### 3.7 Dynamic Light Scattering (DLS)

Le potenziali applicazioni biomediche in cui le NP possono essere sfruttate dipendono sia dalla loro piccola dimensione che dalla stabilità in soluzione per poter diffondere, tramite il flusso sanguigno, verso l'organo di interesse oltre che per il successivo smaltimento senza provocare effetti collaterali. Il raggio idrodinamico ( $r_h$ ) delle NP in soluzione può essere determinato tramite la tecnica di diffusione dinamica della luce (DLS).

Nella DLS si va a misurare la diffusione delle particelle nel campione sulla base delle fluttuazioni dell'intensità della luce diffusa, che sono collegate al coefficiente di diffusione delle particelle, e possono essere utilizzate per determinare le distribuzioni dimensionali delle particelle in tempo reale. Le fluttuazioni dell'intensità della luce diffusa sono causate dal *moto browniano* individuale delle particelle in soluzione, e l'ampiezza di queste fluttuazioni dipende dalla dimensione delle particelle e dalla loro concentrazione (a una specifica  $\lambda$ ). Diversi parametri influenzano queste fluttuazioni, tra cui la dimensione delle particelle, la viscosità della soluzione, la temperatura e le interazioni tra le particelle.<sup>62</sup>

A seconda della dimensione delle particelle varia la loro velocità (il loro coefficiente) di diffusione delle particelle, quando esse sono sottoposte ad un moto browniano in sospensione. La relazione tra diffusione e dimensione è descritta dall'equazione di *Stokes-Einstein* (Eq. 3.5) che, tramite la determinazione del coefficiente di diffusione  $D$ , permette di stimare il raggio idrodinamico delle particelle.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h} \quad (\text{Eq. 3.5})$$

Con  $k_B$  costante di Boltzmann ( $1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ),  $T$  la temperatura,  $\eta$  la viscosità della soluzione campione.<sup>62</sup>

Le fluttuazioni nel tempo dell'intensità della luce diffusa vengono valutate attraverso una funzione di autocorrelazione,  $\gamma(\tau)$ , il cui profilo di decadimento dipende dal sistema che si considera. Per un sistema monodisperso, la velocità di decadimento è proporzionale alla dimensione della particella e al coefficiente di diffusione, ed è rappresentata da un esponenziale. Per un sistema polidisperso, invece, la funzione di autocorrelazione è la somma di decadimenti esponenziali, ciascuno corrispondente ad una delle specie in soluzione.

La grandezza che si misura è la correlazione delle fluttuazioni dell'intensità della luce diffusa nel tempo, in un intervallo di  $10^{-6}$  - 10 secondi. Particelle grandi si muovono più lentamente in soluzione, quindi richiedono tempi più lunghi per cambiare la loro posizione; dunque, le fluttuazioni dell'intensità diffusa sono correlate attraverso tempi più lunghi. Particelle più piccole si muovono più rapidamente in soluzione, quindi le fluttuazioni dell'intensità diffusa sono correlate attraverso tempi più brevi (Fig. 3.14 e 3.15).

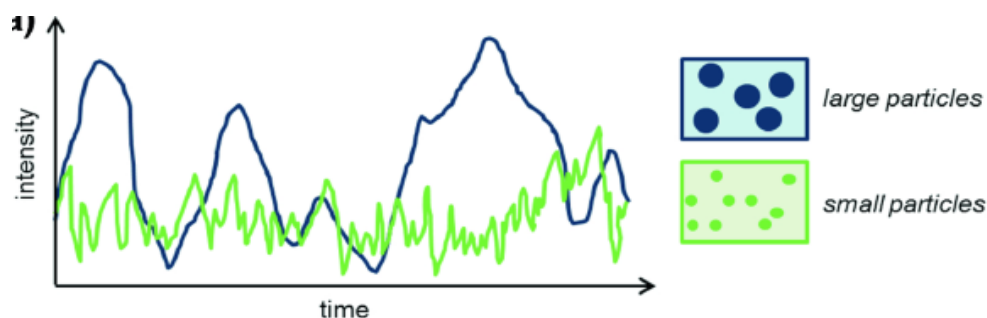


Figura 3.14 Rappresentazione generalizzata dell'intensità della luce diffusa dalle particelle in funzione del tempo, che fluttua a causa del moto browniano.

Il raggio idrodinamico che si ottiene è legato al comportamento idrodinamico, ovvero alla diffusione di una particella in una particolare soluzione, ed è proporzionale all'inverso del tempo di decadimento nella funzione di autocorrelazione.

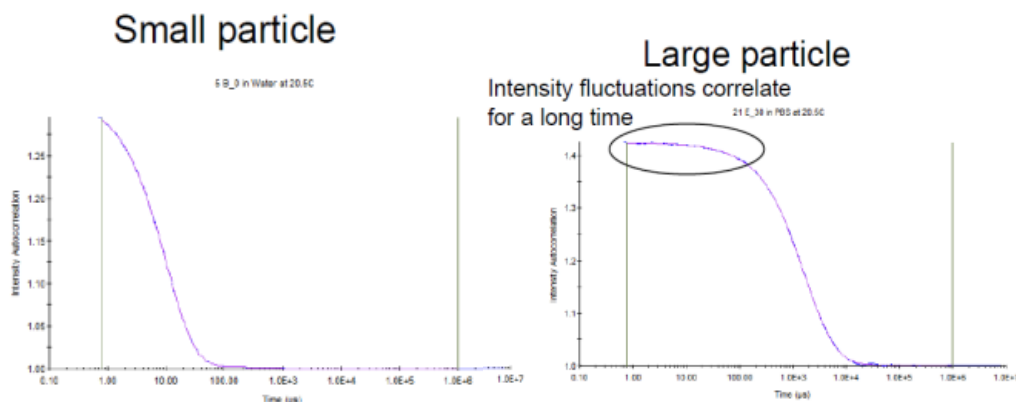


Figura 3.15 Decadimento della funzione di autocorrelazione in funzione del tempo. 1) Particelle piccole: il decadimento è molto rapido. 2) Particelle grandi\_ la funzione impiega molto tempo per decadere.

Il DLS solitamente utilizza una luce laser visibile che viene focalizzata su una soluzione campione, una sospensione o un'emulsione all'interno di un contenitore per campioni, in genere una cuvetta o un capillare (Fig. 3.16).

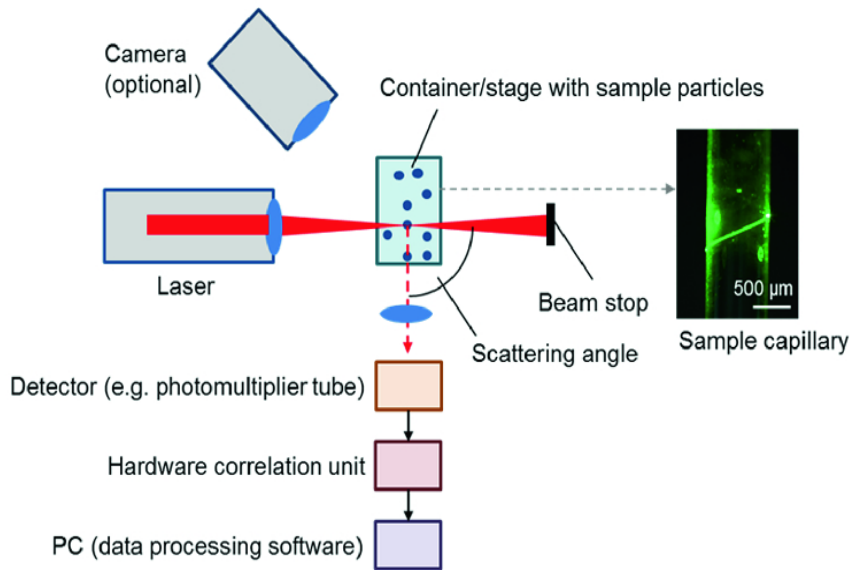


Figura 3.16 Schema di una configurazione di uno strumento DLS. La luce diffusa dalle particelle nel tempo con un angolo di diffusione  $\theta$  viene focalizzata su un rivelatore, collegato a un'unità di elaborazione dei dati.

La luce laser che viene diffusa dalle particelle all'interno di un piccolo volume di campione DLS viene continuamente registrata e quantificata da un rivelatore a conteggio di fotoni, posizionato con un'angolazione specifica. Il numero di fotoni che colpisce il rivelatore fluttua nel tempo a causa del moto browniano delle particelle all'interno del volume di campione.

I valori ottenuti dall'analisi DLS sono in generale più elevati rispetto a quelli ottenuti dal TEM perché il parametro misurato è il raggio idrodinamico delle NP, che dipenderà dall'aggregazione e dalla presenza di un ricoprimento polimerico.



# Capitolo 4

## Parte Sperimentale

Il presente studio è stato concepito con l'obiettivo di sintetizzare nanoparticelle di lega bimetallica di oro-gadolinio attraverso il metodo dell'ablazione laser in liquido. È stata affrontata la sintesi di nanoparticelle bimetalliche di Au-Gd partendo da tre diverse composizioni, e usando delle nanoparticelle di oro puro come riferimento.

Le nanoparticelle di Au-Gd sono state studiate per applicazioni in ambito biomedico, in particolare in teranostica. Nel caso delle NP di Au-Gd, esse sono concepite per possedere le caratteristiche necessarie per combinare le tecniche di imaging, quali MRI e TC, con la radioterapia ed eventualmente anche altre funzioni possibili come il targeting selettivo delle cellule tumorali o il trasporto di medicine (drug delivery).

Nel panorama dei mezzi di contrasto, questo progetto si concentra su oro e gadolinio, sfruttando le caratteristiche uniche di entrambi. L'oro ha caratteristiche ideali per l'imaging TC e radiosensibilizzante nella radioterapia a raggi X. Inoltre, le AuNP presentano un'elevata stabilità fisica e chimica e sono semplici da funzionalizzare, rendendole altamente biocompatibili e quindi perfette per le applicazioni in ambito biomedico. Il gadolinio è noto per il suo elevato paramagnetismo, che lo rende un agente di contrasto  $T_1$  in MRI quando è in forma ionica complessata, oppure un



agente di contrasto T<sub>2</sub> quando è sotto forma di nanoparticelle. Inoltre, anche il Gd è un efficiente assorbitore di raggi X e contribuisce al contrasto per imaging TC e come radiosensibilizzante per la radioterapia a raggi X, di conseguenza, in combinazione con l'oro può favorire un incremento dell'assorbimento dei raggi X.

L'impiego di nanoparticelle di lega Au-Gd può essere interessante per sostituire i CA a base di Gd chelato, mitigando gli effetti negativi causati da questi composti tal quali (tossicità renale) e dal rilascio di ioni Gd(III), come neurotossicità e reazioni specifiche molto gravi.<sup>63</sup>

Dunque, le nanoleghe Au-Gd sono studiate per la possibilità di consentire l'integrazione sinergica di proprietà distinte, permettendo la combinazione di diagnosi, trattamenti radioterapici e monitoraggio della risposta terapeutica. Questo approccio consente di ridurre la dose totale di sostanze somministrate ai pazienti, riducendo così gli effetti collaterali.

Il presente lavoro si ispira a precedenti studi sulla sintesi di nanoparticelle bimetalliche in ambito biomedico,<sup>37</sup> estendendo l'indagine attraverso la combinazione di oro e gadolinio, fornendo così anche un contributo significativo alla comprensione delle dinamiche di crescita e organizzazione degli elementi della tavola periodica su scala nanometrica.

Nella pratica sperimentale, la lega tra metalli nobili e metalli non nobili è spesso ostacolata da vincoli termodinamici, oltre che dall'ossidazione del metallo meno nobile, tanto che diversi tentativi di fabbricare nanoleghe hanno portato a eterostrutture o strutture *core-shell*.<sup>64</sup> Difatti, in questo caso non si ha miscibilità completa tra Au-Gd se non per alcuni composti intermetallici particolari, a causa della differenza strutturale tra il reticolo cristallino esagonale a impaccamento compatto (HPC) del gadolinio e quello cubico a facce centrate dell'oro (FCC), e di una certa differenza nei loro raggi atomici. Per questa ragione, la lega Au-Gd negli intervalli di composizione che vedono la prevalenza dell'oro può essere ottenuta solamente con metodi sintetici che operano fuori dall'equilibrio e limitando l'ossidazione del metallo meno nobile.

La caratterizzazione delle proprietà chimiche e fisiche delle nanoparticelle è stata eseguita attraverso diverse tecniche di analisi, permettendo di acquisire informazioni

sul modo in cui i due elementi si sono miscelati in condizioni fuori dall'equilibrio termodinamico. Infatti, la struttura dei composti multielemento in condizioni di non-equilibrio è caratterizzata da elevata difettualità e deformazione strutturale a livello atomico, dato che i costituenti atomici sono costretti a organizzarsi in strutture non convenzionali che non possono essere semplicemente descritte con le celle cristalline di Bravais.<sup>65</sup>

#### **4.1 Sintesi LAL di NP**

Le nanoparticelle di lega bimetallica di Au-Gd sono prodotte attraverso un approccio sintetico one-step mediante l'utilizzo della tecnica di ablazione laser in liquido (LAL).

##### **4.1.1 AuNP in soluzione acquosa di NaCl**

Le AuNP sono state ottenute con il seguente *set-up* sperimentale (*Fig. 4.1*):

- Un laser Nd:YAG Q-Switched ( $\lambda=1064$  nm, 6 ns, 10 Hz) controllato tramite una consolle;
- Uno specchio;
- Una lente con focale di 10 cm;
- Un portacampioni che presenta la possibilità di agitazione magnetica durante la sintesi;
- Un traslatore, che tramite il collegamento ad un computer, permette l'ablazione laser del target in diversi punti nel tempo durante la sintesi.

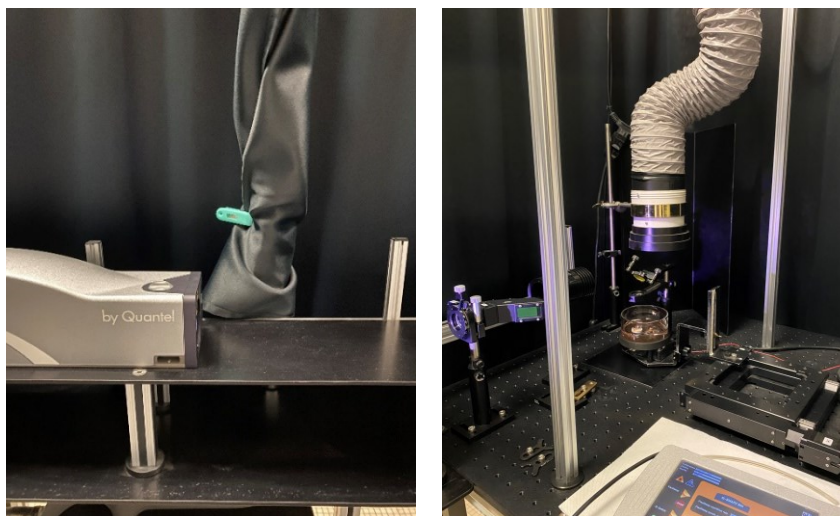


Figura 4.1 Set-up sperimentale della LAL

Per la sintesi, un target metallico di oro puro (da MaTecK) è stato posto sul fondo di una cella contenente una soluzione di NaCl  $10^{-4}$  M. Il materiale è stato ablatato per una durata di due ore circa con una fluensa di  $14 \text{ mJ/cm}^2$ .

Una volta conclusa la sintesi, si raccoglie lo spettro UV-Visibile della soluzione di AuNP per osservare l'andamento della banda di assorbimento, controllare che le particelle non siano aggregate, e determinare il quantitativo di AuNP ottenuto per confronto con l'assorbanza di soluzioni precedenti sottoposte ad analisi ICP-MS.

La soluzione colloidale risultante è sottoposta a un processo di funzionalizzazione mediante l'aggiunta di un polimero idrofilo, nello specifico il polietilenglicole tiolato (mPEG-SH, peso molecolare 800 Da). Tale procedura mira a favorire il ricoprimento superficiale attraverso la formazione di legami oro-zolfo. Il polimero viene quindi aggiunto alla soluzione colloidale e lasciato reagire per una notte a temperatura ambiente. La quantità di mPEG-SH da aggiungere è determinata in base al valore di assorbanza delle NP a 450 nm, correlato al numero di particelle di oro presenti in soluzione e alla loro superficie totale. L'aggiunta di mPEG-SH è eseguita in leggero eccesso per garantire un completo rivestimento superficiale delle NP. Successivamente, la soluzione di NP è sottoposta a un trattamento con ultrasuoni della durata di 5-10 minuti. È da notare che la decisione di aggiungere mPEG-SH in un momento successivo alla sintesi LAL è stata preferita rispetto all'aggiunta in situ durante la sintesi al fine di evitare l'utilizzo di quantità eccessive di polimero, che poi

viene eliminato nelle successive fasi di purificazione. Inoltre, l'impiego di un surplus di tioli durante la sintesi comporta la formazione di particelle con una distribuzione dimensionale eterogenea o bimodale.<sup>7</sup>

Dopo l'incubazione notturna, la dispersione di NP viene concentrata con un *Rotavapor* a 30°C.



Figura 4.2 Concentrazione delle NP mediante uso del Rotavapor.

Dopo l'evaporazione del solvente, la soluzione concentrata di nanoparticelle è sottoposta a ripetuti lavaggi con acqua bidistillata. Il processo di “pulizia”, mirante a eliminare l'eccesso di reagenti, viene eseguito mediante la tecnica di dialisi, volta a “lavare via” le sostanze residue non legate alle NP. Al fine di garantire una completa eliminazione del solvente residuo, sono necessari almeno quattro cicli di lavaggio con acqua bidistillata. Per tale scopo, viene impiegato un dispositivo di dialisi, specificamente una Falcon (*Vivaspin da 20 mL*) dotata di membrana da 30 kDa. La procedura di dialisi è condotta mediante centrifugazione utilizzando una centrifuga da tavolo modello MPW-352RH (MPW *Med. Instrument*) con una forza centrifuga (RCF da “*Relative Centrifugal Force*”) pari a 550.

Successivamente le NP ottenute sono state ridisperse in 2 mL di acqua, sonicate per qualche minuto e ne è stato effettuato lo spettro UV-Visibile (*Fig. 4.4*). Gli spettri UV-Vis sono stati registrati con uno spettrofotometro JASCO V770 utilizzando celle al quarzo con un cammino ottico di 2 mm.

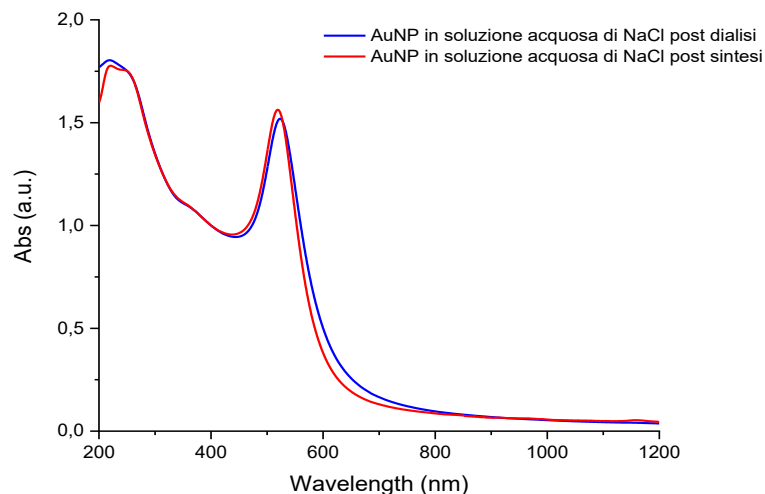


Figura 4.3 Spettri UV-Vis AuNP post sintesi e post dialisi.

Dall'analisi degli spettri riportati in *figura 4.3* è possibile rilevare la presenza della banda di risonanza plasmonica (LSPR) delle nanoparticelle d'oro (AuNP), centrata a 520 nm, con un valore di assorbanza pari a 1.17. L'impiego del polietilenglicole tiolato (PEG) come rivestimento superficiale conferisce una nitidezza e una posizione del picco plasmonico indicative di una forma sferica delle NP, oltre a suggerire una dispersione ottimale. La morfologia sferica è preferita in nanomateriali contenenti elementi facilmente ossidabili come il gadolinio, in quanto offre il massimo rapporto superficie/volume, fornendo una protezione ottimale all'elemento meno nobile all'interno delle NP. La conformazione sferica favorisce, inoltre, un rivestimento uniforme anche nei casi di ligandi a catena corta.

Dal valore di assorbanza a 450 nm è possibile determinare la quantità di NP ottenute, in quanto correlato in modo proporzionale alla concentrazione di AuNP.

Abs@450 nm	Volume campione	mg/mL	mol/L	mg totali	mol totali
0.73	4.6	3.7	0.02	17	0.09

Tabella 1 Valori di assorbanza e concentrazione ottenuti dallo spettro UV-Vis relativo alle AuNP dopo il processo di dialisi.

Per quanto riguarda i reagenti utilizzati:

- L'mPEG-SH (Poly(ethylene glycol) methyl ether thiol) (Sigma-Aldrich) è un solido ceroso di colore bianco/beige con un peso molecolare  $M_n = 800$  Da.

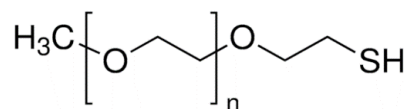


Figura 4.4 Struttura molecolare dell'mPEG-SH.

#### 4.1.2 Sintesi AuNP in etanolo

Sono state sintetizzate delle NP di oro in un ambiente costituito da etanolo puro, caratterizzato da un minor potenziale ossidante rispetto all'acqua. La sintesi è stata condotta mediante il medesimo *set-up* sperimentale utilizzato per le NP precedentemente descritte. La sintesi si è svolta in un volume di 120 mL di etanolo puro (grado HPLC, Sigma-Aldrich) all'interno di una cella con flusso continuo di argon (Ar), al fine di mitigare la formazione di specie ossidate, con una durata approssimativa di due ore. Conclusa la sintesi, si raccoglie lo spettro UV-Visibile della soluzione di NP ottenuta. Successivamente, è stata applicata la medesima procedura di funzionalizzazione mediante l'aggiunta in eccesso di polietilenglicole tiolato (mPEG-SH). La soluzione è stata sottoposta a trattamento di sonicazione per alcuni minuti e successivamente è stata lasciata reagire per una notte. In seguito, la soluzione è stata concentrata mediante l'utilizzo di un *Rotavapor*, mantenendo una temperatura di circa 30°C.

##### 4.1.2.1 Trattamento termico con EDTA

Una volta completata la fase di concentrazione, le NP sono soggette a un trattamento termico mediante l'utilizzo di acido etilendiamminotetraacetico diidrato disodico (EDTA disodico, Sigma-Aldrich) in una soluzione acquosa a concentrazione di 3 mg/mL, in un rapporto volumetrico 1:1 con la soluzione di NP. L'EDTA, in quanto agente complessante, agisce come purificatore della soluzione, rimuovendo gli ioni metallici liberi o le loro forme parzialmente ossidate che possono essere dissolte dall'azione dell'EDTA stesso. Questa operazione favorisce la pulizia della superficie delle NP e una migliore reazione con il PEG tiolato. Anche se tale trattamento è introdotto specificatamente per le NP di Au-Gd, viene applicato anche alle NP di Au puro per omogeneità della procedura di sintesi.

Dopo l'aggiunta di EDTA, la miscela è sottoposta a un trattamento di sonicazione della durata di 15 minuti, al fine di promuovere la reazione del complessante.

Il trattamento viene effettuato in un bagno di acqua a una temperatura di 60°C per circa 60 minuti, il tutto sotto agitazione magnetica (Fig. 4.5).

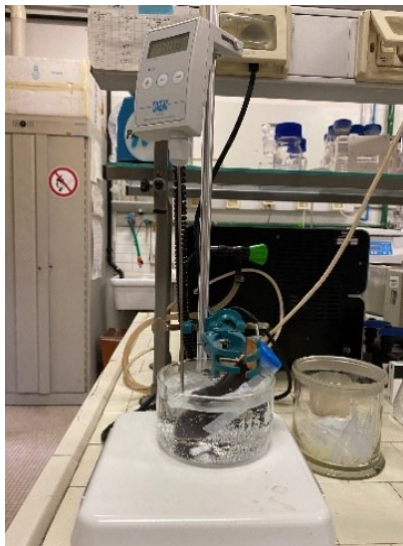


Figura 4.5 Trattamento termico con EDTA della soluzione di AuGd NP.

Terminata la fase di trattamento termico, la successiva operazione consiste nei lavaggi mediante dialisi utilizzando acqua bidistillata. Si procede con quattro cicli di lavaggio per garantire una completa rimozione di eventuali residui. Infine, le NP vengono risospese in 2 mL di acqua e sonicate per 5 minuti. Si raccoglie lo spettro UV-Visibile post dialisi e lo si confronta con quello raccolto dopo la sintesi LAL (Fig. 4.6).

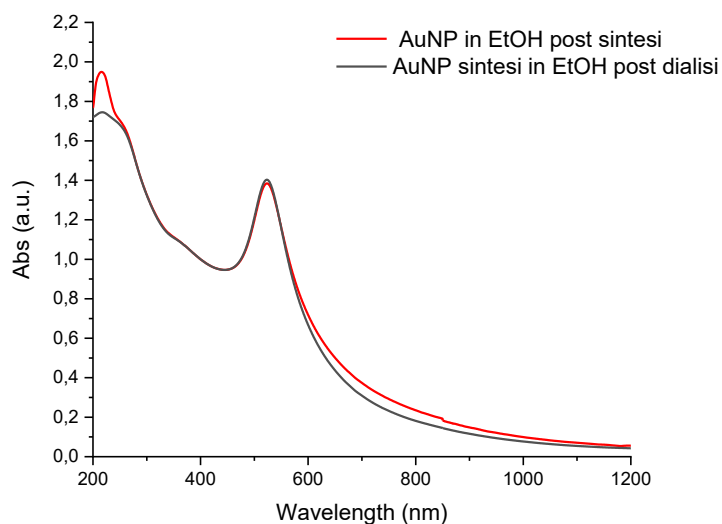


Figura 4.6 Spettri UV-Vis post sintesi e post dialisi di AuNP sintetizzate in etanolo.

La banda plasmonica dell'oro risulta localizzata a 523 nm, con un valore di assorbanza pari a 1.4, risultando leggermente più ampia rispetto a quella delle NP sintetizzate in ambiente acquoso. Tale effetto è dovuto probabilmente alle dimensioni o a una leggera aggregazione. Anche in questo caso si determina il quantitativo di NP ottenute mediante il valore di Assorbanza a 450 nm.

Abs@450 nm	Volume campione	mg/mL	mol/L	mg totali	mol totali
0.8	4.8	4.1	0.021	19.7	0.10

Tabella 2 Valori di assorbanza e concentrazione ottenuti dallo spettro UV-Vis relativo alle AuNP sintetizzate in etanolo dopo il processo di dialisi.

#### Reagenti utilizzati:

- Etanolo puro ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) (Sigma-Aldrich), un liquido incolore, di  $MM= 46.07 \text{ g/mol}$ , assoluto ( $\geq 99.8\%$ ), privo di additivi.
- EDTA (sale disodico di acido etilendiamminotetraacetico diidrato) (Sigma-Aldrich), una polvere bianca, di  $MM=372.24 \text{ g/mol}$ , con una solubilità pari a 160 mg/mL.

## 4.2 Sintesi Au-Gd NP

Il *set-up* sperimentale impiegato per la sintesi delle nanoparticelle di oro-gadolinio è analogo a quello precedentemente delineato per la produzione delle nanoparticelle d'oro. La sintesi è stata eseguita partendo da tre differenti proporzioni atomiche di Au-Gd:

- Au/Gd 99/1 at%;
- Au/Gd 90/10 at%;
- Au/Gd 25/75 at%.

### 4.2.1 AuGd NP 99/1 at%

Il procedimento sintetico è stato condotto in 120 mL di etanolo puro (grado HPLC, Sigma-Aldrich), all'interno di una cella con flusso continuo di argon, con una durata di due ore. È stato impiegato un target massivo di composizione atomica Au/Gd 99/1 at% (MaTeCK).



Le NP risultanti dalla sintesi sono state successivamente sottoposte alle seguenti fasi di trattamento:

- Aggiunta di mPEG-SH in eccesso, seguita da sonicazione;
- incubazione della soluzione durante la notte a temperatura ambiente;
- concentrazione mediante l'utilizzo del *Rotavapor* a una temperatura di circa 30°C;
- trattamento termico con EDTA (3 mg/mL, rapporto 1:1) a 60°C per 60 minuti, preceduto da un trattamento di sonicazione della durata di 15 minuti;
- lavaggi con acqua bidistillata mediante dialisi in centrifuga con forza centrifuga di 550 RCF;
- dispersione successiva in 2 mL di acqua, seguita da una fase di sonicazione.

Di seguito sono riportati gli spettri UV-Vis delle NP ottenute dalla sintesi e dopo il processo di dialisi (*Fig. 4.7*).

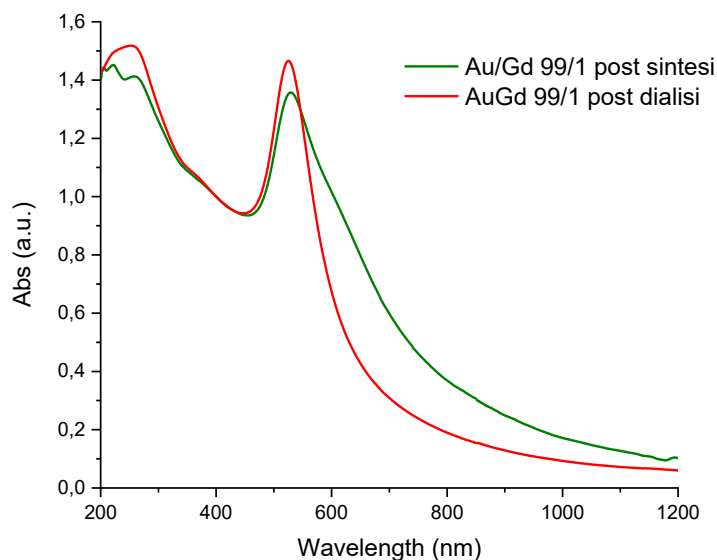


Figura 4.7 Spettri UV-Vis per le NP di AuGd 99/1 post sintesi e post dialisi.

La spettroscopia UV-Visibile si configura come un metodo di analisi di elevata efficacia per il monitoraggio simultaneo della stabilità colloidale e strutturale delle dispersioni di nanoleghe di oro in ambiente acquoso. Ciò è dovuto alla capacità di rilevare l'eventuale agglomerazione delle nanoparticelle attraverso l'osservazione degli spostamenti della banda di assorbimento verso il lato rosso dello spettro e

l'allargamento della stessa. Nel confronto tra i due spettri (*Figura 4.7*), è evidente che, dopo il processo di dialisi, il picco plasmonico dell'oro è significativamente più accentuato e definito, con una localizzazione a 525 nm. Inoltre, l'assorbimento nella regione compresa tra il picco plasmonico e i 650 nm risulta notevolmente minore. Questi risultati suggeriscono un'efficace dispersione e disaggregazione delle particelle conseguente al trattamento termico con EDTA, al rivestimento con mPEG-SH, e alla procedura di purificazione mediante dialisi.

Analogamente alle sintesi precedenti, è possibile quantificare la quantità di NP ottenute mediante la valutazione dell'assorbanza a 450 nm.

Abs@450 nm	Volume campione	mg/mL	mol/L	mg totali	mol totali
0.45	5.5	2.14	0.011	11.8	0.06

Tabella 3 Valori di assorbanza e concentrazione ottenuti dallo spettro UV-Vis relativo alle NP di AuGd 99/1 dopo il processo di dialisi.

#### 4.2.2 Sintesi AuGd NP 90/10 at%

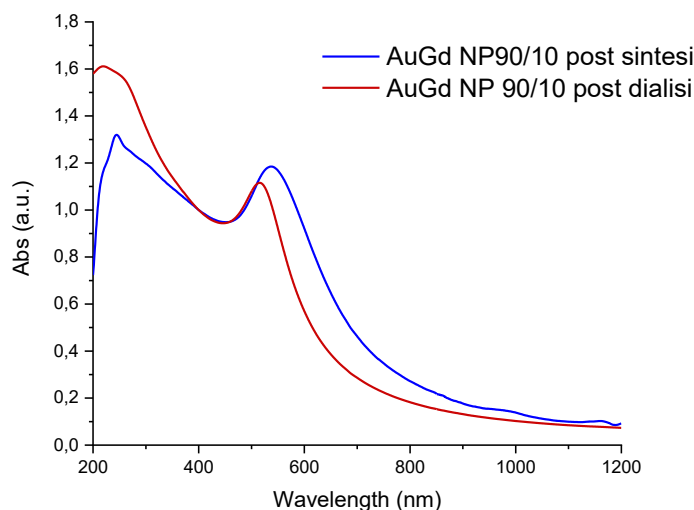
La procedura di sintesi mediante LAL è stata eseguita con lo stesso *set-up* sperimentale utilizzato per la produzione delle nanoparticelle AuGd al 99/1. Un target con composizione Au/Gd 90/10 at% (MaTecK) è stato immerso in 120 mL di etanolo assoluto all'interno di una cella sottoposta a flusso continuo di argon per una durata di circa 3 ore. Le successive fasi del processo hanno seguito le stesse procedure delineate in precedenza.

Le nanoparticelle risultanti dalla sintesi sono state sottoposte alle seguenti fasi di trattamento:

- Aggiunta di mPEG-SH in eccesso, seguita da una fase di sonicazione;
- Riposo della soluzione durante la notte a temperatura ambiente;
- Concentrazione mediante l'utilizzo del *Rotavapor* a una temperatura di circa 30°C;
- Trattamento termico con EDTA (3 mg/mL, rapporto 1:1) a 60°C per 60 minuti, preceduto da una fase di sonificazione della durata di 15 minuti;

- Dialisi in centrifuga con una forza centrifuga di 550 RCF, al fine di rimuovere il solvente di sintesi attraverso un processo di lavaggio con acqua bidistillata;
- Dispersione successiva delle NP in 2 mL di acqua.

Gli spettri UV-Vis delle NP sono stati registrati sia dopo la sintesi mediante LAL che dopo il processo di dialisi in centrifuga (*Figura 4.8*).



*Figura 4.8 Spettri UV-Vis raccolti post sintesi e post dialisi delle NP di AuGd 90/10.*

In questo caso, si osserva un lieve *blue-shift* e un decremento dell'ampiezza della banda di risonanza plasmonica di superficie (LSPR) dell'oro in seguito ai processi di funzionalizzazione e purificazione. Il picco plasmonico è localizzato a circa 515 nm ed è caratterizzato da un profilo più esteso e una minore intensità rispetto alle nanoparticelle sintetizzate precedentemente.

Abs@450 nm	Volume campione (mL)	mg/mL	mol/L	mg totali	mol totali
0.8	4.6	3.6	0.02	17	0.08

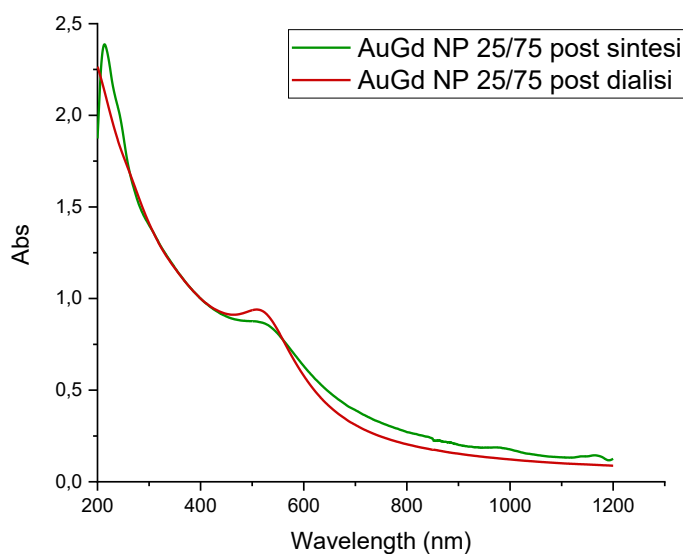
*Tabella 4 Valori di assorbanza e concentrazione ottenuti dallo spettro UV-Vis relativo alle NP di AuGd 90/10 dopo il processo di dialisi*

### 4.2.3 Sintesi AuGd NP 25/75 at%

La sintesi mediante LAL è stata condotta secondo i medesimi protocolli delineati nelle sezioni 4.3.1 e 4.3.2, con una durata complessiva di 3 ore. Le nanoparticelle conseguentemente ottenute sono state sottoposte alle seguenti fasi di trattamento:

- Aggiunta di mPEG-SH in eccesso, seguita da una fase di sonicazione.
- Riposo della soluzione durante la notte a temperatura ambiente.
- Concentrazione della soluzione contenente le NP attraverso l'utilizzo *del Rotavapor*, mantenuto a una temperatura di circa 30°C.
- Trattamento termico mediante EDTA (3 mg/mL, rapporto 1:1) a una temperatura di 60°C per una durata di 60 minuti, con agitazione magnetica.
- Dialisi delle NP al fine di rimuovere il solvente di sintesi, eseguita mediante quattro cicli di lavaggio in una centrifuga con una forza centrifuga di 550 RCF.
- Infine, le NP sono state risospese in 2 mL di acqua e sottoposte a una breve fase di sonificazione.

Gli spettri UV-Visibile delle NP sono stati acquisiti sia dopo la fase di sintesi, sia dopo il completamento del processo di dialisi (*Figura 4.9*).



*Figura 4.9 Spettri UV-Vis per le NP di AuGd 25/75, post sintesi e post dialisi.*

Il picco plasmonico dell'oro ha manifestato un *blue-shift* a 507 nm, con un'assorbanza registrata pari a 0.91. L'aumento dell'intensità della banda nella regione verso il rosso suggerisce una maggiore agglomerazione delle nanoparticelle, fenomeno che, tuttavia, viene mitigato in seguito ai trattamenti di funzionalizzazione con mPEG-SH e di purificazione. In effetti, l'analisi dello spettro post dialisi evidenzia un picco SPR leggermente più nitido e una diminuzione dell'intensità della banda nella regione compresa tra gli 800-1200 nm.

Dal valore di assorbanza a 450 nm, è stato determinato il quantitativo di NP, risultante in:

Abs@450 nm	Volume campione (mL)	mg/mL	mol/L	mg totali	mol totali
0.41	4.9	1.8	0.01	8.6	0.04

Tabella 5 Valori di assorbanza e relativa concentrazione delle NP di AuGd 25/75, ricavati dallo spettro UV-Vis.

### 4.3 Caratterizzazione delle NP

Per l'analisi delle proprietà chimico-fisiche delle nanoparticelle (NP), nonché per valutare la loro stabilità in soluzione e la loro idoneità per l'applicazione in ambito biomedico, sono stati impiegati vari metodi di caratterizzazione.

#### 4.3.1 Spettroscopia FT-IR

La spettroscopia infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR) è stata impiegata per ratificare il ricoprimento delle nanoparticelle sintetizzate con il polietilenglicole tiolato (mPEG-SH). Un singolo spettro è stato acquisito per ciascun campione e successivamente confrontato con uno spettro IR di un campione standard di PEG tiolato, ottenuto nelle medesime condizioni.

Gli spettri presentati sono stati registrati utilizzando uno spettrofotometro Perkin Elmer 1720X. Le NP sono state essiccate e collocate in un vial di vetro poiché, per l'analisi, devono essere ridisperse in diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e successivamente depositate su una capsula di KBr.

Dagli spettri riportati in *figura 4.10 A*) e dal confronto con lo spettro della stessa *figura B*) emerge che il ricoprimento delle NP con il mPEG-SH è avvenuto in modo efficace. I picchi caratteristici del polimero, sono:<sup>66</sup>

Frequenza di assorbimento (cm <sup>-1</sup> )	Modo vibrazionale
-2800 cm <sup>-1</sup>	Stretching (ν) della catena alifatica (C-H)
-1370 cm <sup>-1</sup>	Bending δ (C-H)
-1100 cm <sup>-1</sup>	Stretching (ν) di C-O-C
-843 cm <sup>-1</sup>	Bending δ (CH <sub>2</sub> )

Tabella 6 Numeri d'onda e relativi modi vibrazionali per mPEG-SH.

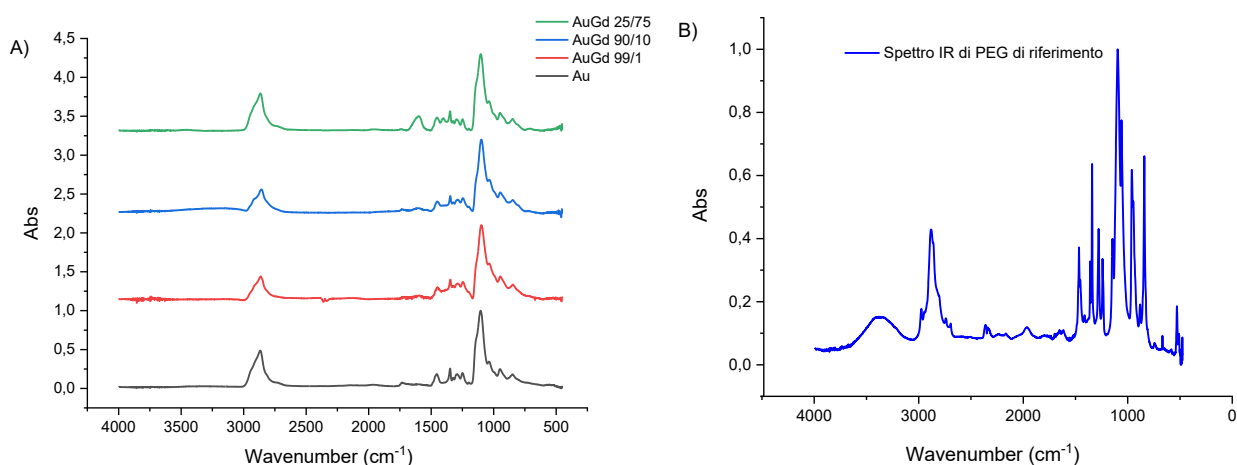


Figura 4.10 A) Spettri IR dei campioni di NP sintetizzate; B) spettro IR di PEG di riferimento.

Come evidenziato nella *Figura 4.11*, le bande spettrali manifestano una riduzione in intensità e allargamento rispetto al solo polietilenglicole tiolato (mPEG-SH); tuttavia, l'impronta vibrazionale della spina dorsale del mPEG-SH, caratterizzata dall'intenso stretching C-O-C a 1100 cm<sup>-1</sup> e dalla progressione vibrazionale nella zona compresa tra 800 e 1500 cm<sup>-1</sup>, è chiaramente identificata sia nelle nanoparticelle (NP) che nel campione di riferimento di mPEG-SH puro.

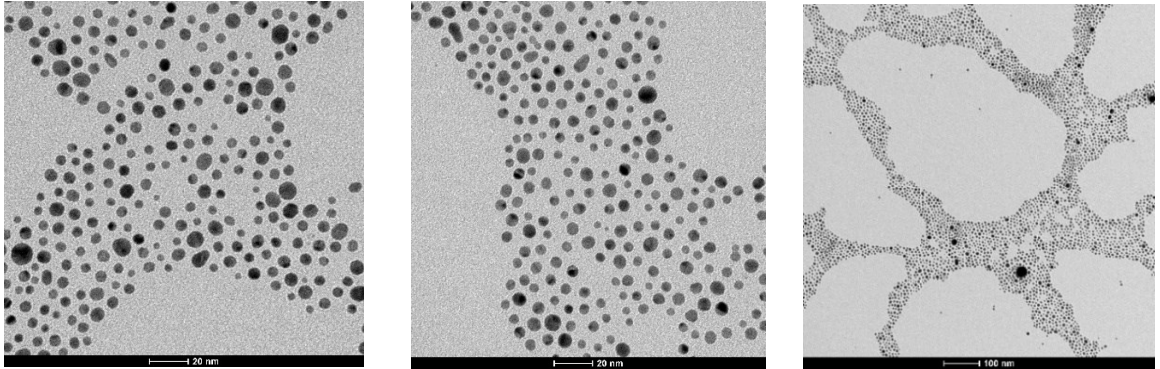
#### 4.3.2 Microscopia elettronica in trasmissione

L'analisi tramite microscopia elettronica in trasmissione (TEM) è stata condotta dopo la fase di dialisi mediante un microscopio elettronico a trasmissione FEI Tecnai G2 12, operante a 100 kV. In generale, i materiali con una densità elettronica superiore a quella del carbonio amorfo sono facilmente visualizzati. In questo specifico caso, i

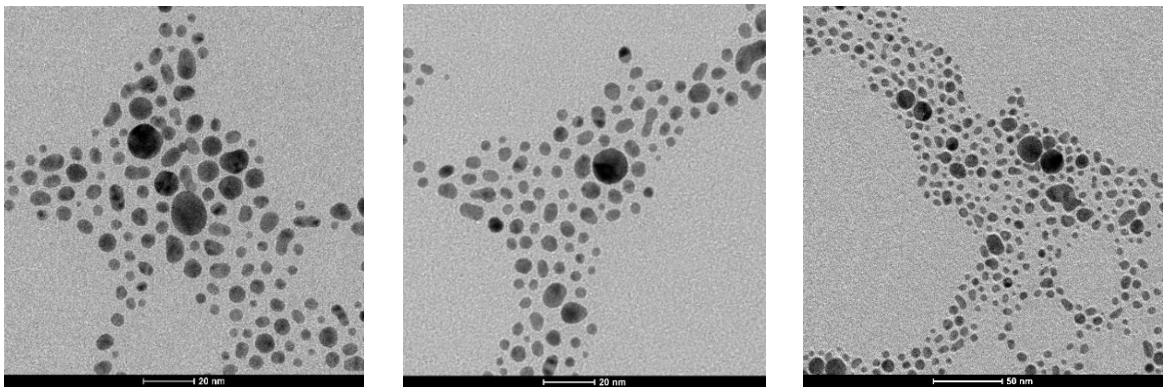
campioni sono stati preparati mediante l'asciugatura delle nanoparticelle su una griglia di rame rivestita con uno strato sottile di carbonio amorpho.

Sono state raccolte più immagini per ogni campione a diversi ingrandimenti (*Fig. 4.11 i), ii), iii), iv) e v)*).

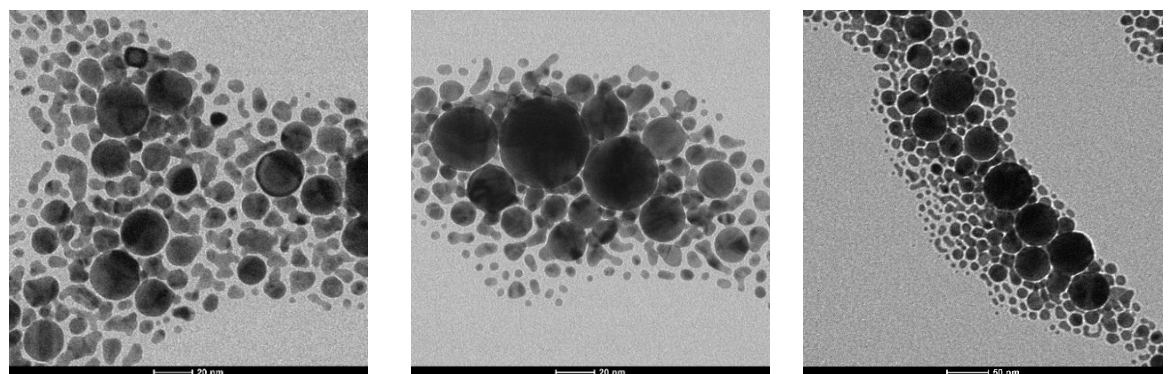
i) AuNP in soluzione acquosa di NaCl



ii) AuNP sintesi in etanolo



iii) AuGd NP 99/1 at%





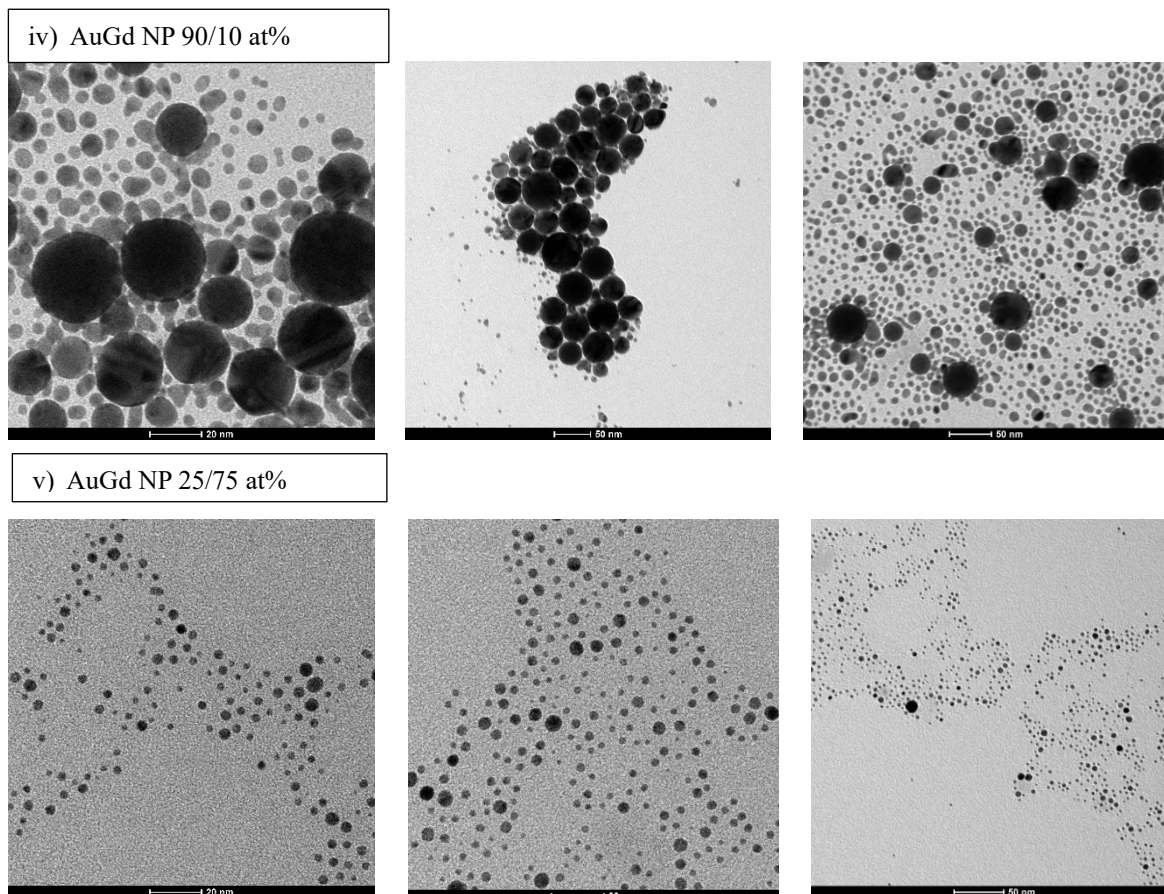


Figura 4.11 Immagini TEM a vari ingrandimenti di i) AuNP sintetizzate in soluzione acquosa di NaCl; ii) AuNP sintetizzate in etanolo; iii) AuGd NP 99/1; iv) AuGd NP 90/10 e v) AuGd NP 25/75.

Dalle immagini *i)* della figura 4.11 emerge che le NP di oro sintetizzate in soluzione acquosa di NaCl sono caratterizzate da dimensioni ridotte e da monodispersione. Al contrario, le NP di oro sintetizzate in etanolo (Fig. 4.11, *ii*) presentano dimensioni leggermente maggiori e una maggiore polidispersione. Per quanto concerne le NP di oro-gadolinio, il campione 99/1 (Fig. 4.11, *iii*) appare più polidisperso di quelli di Au. Le dimensioni delle NP sembrano inoltre superiori rispetto ai campioni di NP di oro. Nel caso delle NP di AuGd 90/10 (Fig. 4.11, *iv*)), si osserva una significativa polidispersione. Infine, le NP di AuGd 25/75 (Fig. 4.11, *v*)) appaiono di dimensioni molto ridotte e monodisperse, a differenza del campione 90/10.



L'analisi delle immagini TEM mediante l'utilizzo del software *ImageJ* permette di determinare la distribuzione dimensionale delle NP e la dimensione media con relativa deviazione standard, misurata su circa 500 particelle.

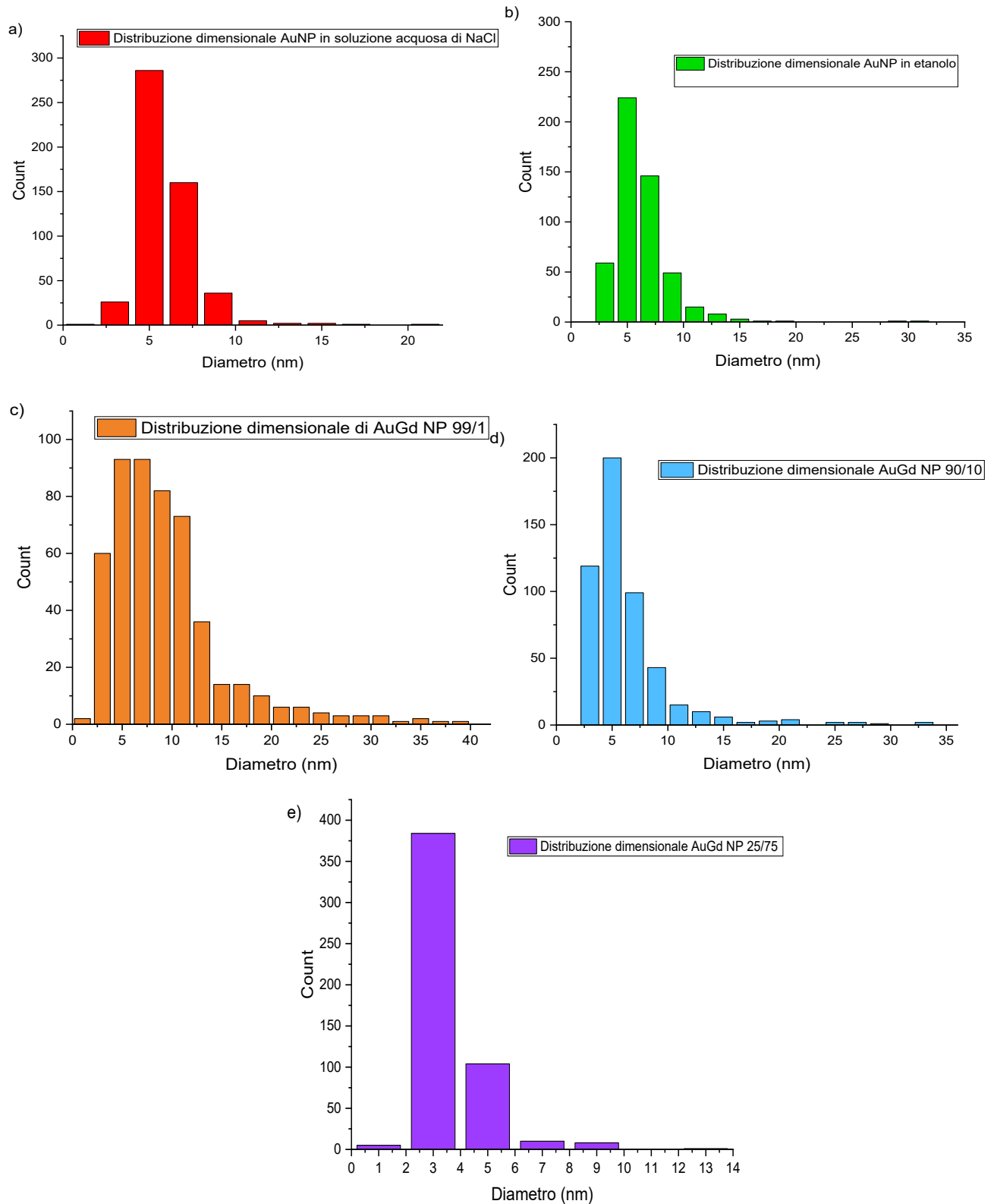


Figura 4.12 Istogrammi relativi alle distribuzioni dimensionali di a) AuNP sintetizzate in soluzione acquosa di NaCl; b) AuNP sintetizzate in etanolo; c) AuGd NP 99/1; d) AuGd NP 90/10 ed e) AuGd NP 25/75.

Dalla distribuzione dimensionale si deduce il diametro medio delle NP:

Campione	Diametro Medio (nm)	Standard Deviation
AuNP in sz acquosa di NaCl	6	$\pm 2$ nm
AuNP in etanolo	6	$\pm 3$ nm
AuGd NP 99/1	9	$\pm 6$ nm
AuGd NP 90/10	6	$\pm 4$ nm
AuGd NP 25/75	3	$\pm 1$ nm

Tabella 7 Diametro medio e relativa deviazione standard delle NP sintetizzate, ottenuti mediante analisi delle immagini TEM con il software ImageJ.

Sulla base dei risultati delle immagini TEM, è stata presa la decisione di utilizzare le NP di Au sintetizzate in etanolo puro come riferimento, essendo state sintetizzate nelle stesse condizioni.

Di seguito (Fig. 4.13) vengono presentati gli spettri UV-Vis delle NP generate mediante LAL, normalizzati a 400 nm per agevolare il confronto.

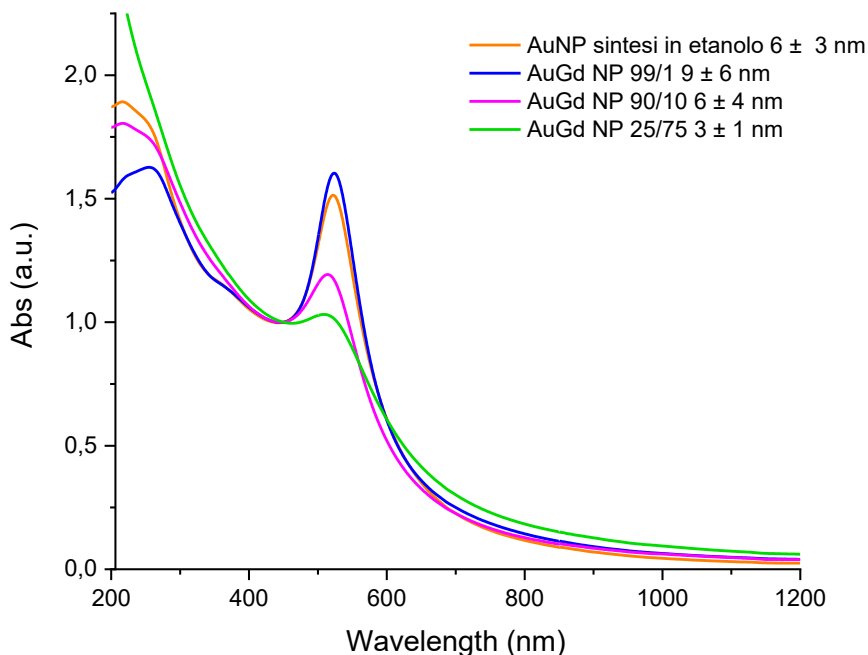


Figura 4.13 Spettri UV-Visibile dei diversi campioni di NP a confronto.

In tutti i casi, è evidente la presenza di una banda di assorbimento alle frequenze nella regione del visibile, risultante dalla risonanza plasmonica superficiale (SPR) delle

AuNP, associata a un assorbimento nella regione dell'UV, attribuibile alle transizioni interbanda dei singoli elettroni nel metallo. La posizione della SPR, prossima a 520 nm, è congruente con quella tipica di nanoparticelle sferiche, come comunemente osservato durante la sintesi mediante LAL di nanoparticelle di metalli nobili.<sup>7,4</sup> Risulta interessante notare che, nonostante le differenze nelle dimensioni delle AuNP e delle NP di AuGd 99/1, la forma della banda plasmonica è molto simile; al contrario, le NP di AuGd 90/10, pur presentando dimensioni simili alle AuNP, manifestano una LSPR meno intensa e un leggero *blue-shift*. Questi fenomeni sono riconducibili alla presenza di gadolinio all'interno della cella cristallina dell'oro. Infine, il campione di NP 25/75 presenta il maggiore LSPR *damping* (smorzamento del picco plasmonico), che è attribuibile sia alle dimensioni delle nanoparticelle, con l'ampiezza e l'intensità della LSPR che diminuiscono al diminuire delle dimensioni, sia al contenuto di gadolinio.

È noto che la LSPR delle nanoparticelle d'oro subisce lievi variazioni come risultato di un disordine strutturale, mentre la formazione di leghe con altri elementi induce una marcata modifica della LSPR quando tali elementi sono presenti come droganti sostitutivi nel reticolo FCC (cubico a facce centrate). Nel caso specifico, si osserva che all'aumentare della frazione di gadolinio, la banda di risonanza plasmonica viene spostata verso il blu e subisce uno smorzamento dal confronto con il riferimento di Au puro, in conseguenza delle modifiche nella struttura della lega. Gli spettri UV-Vis indicano che il gadolinio è incluso nel reticolo di oro, analogamente a quanto precedentemente osservato per nanoparticelle di leghe di elementi immiscibili come Ag e Fe, o Co, ottenute mediante ablazione laser in liquido.<sup>7</sup>

#### **4.3.3 Microscopia elettronica a scansione e spettroscopia a raggi X a dispersione di energia**

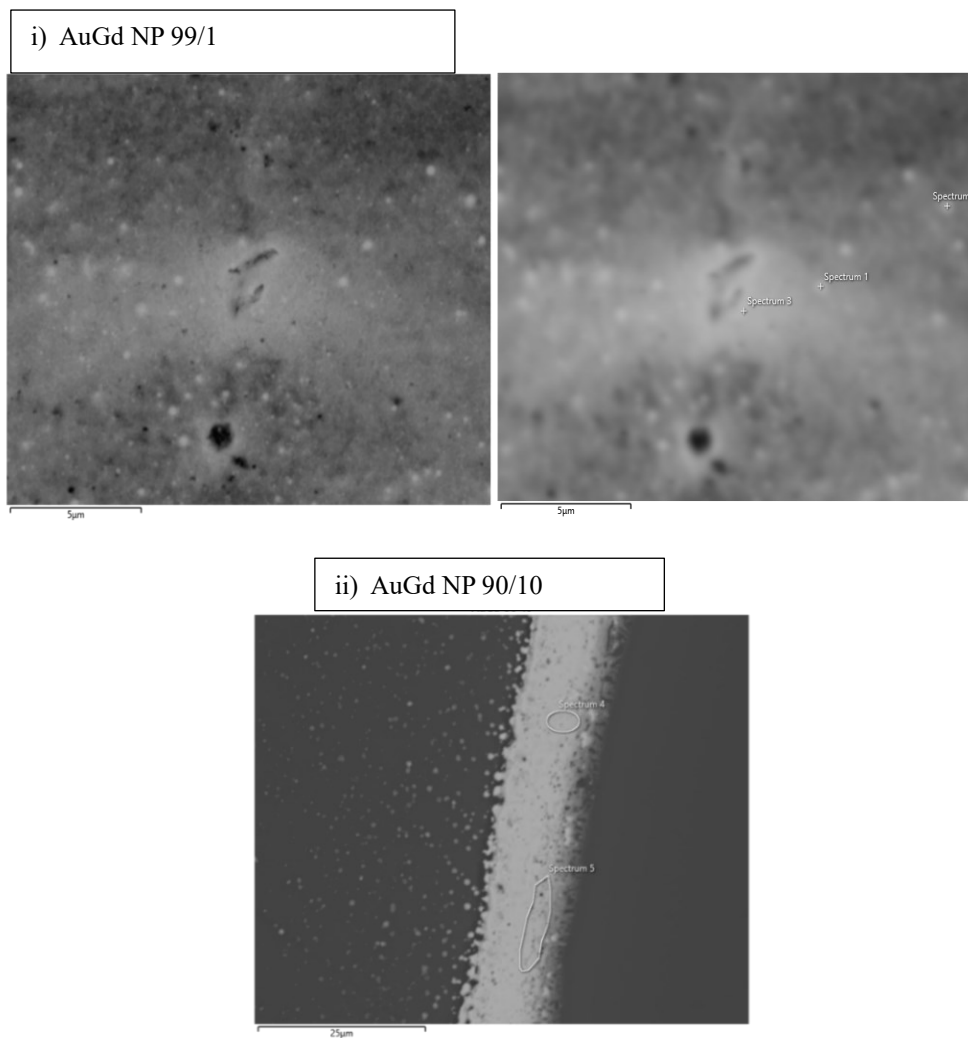
L'analisi SEM accoppiata con EDS consente di ottenere immagini ad alta risoluzione della morfologia della superficie del campione e di identificare quantitativamente gli elementi presenti nel campione stesso. L'analisi è stata condotta mediante l'utilizzo di un microscopio elettronico a scansione ambientale modello FEI Quanta 200.

Il campione, costituito da pochi microlitri di soluzione, è stato depositato su un substrato di silicio cristallino mediante la tecnica del drop casting e successivamente

essiccato a temperatura ambiente per garantire una distribuzione uniforme del materiale sulla superficie del substrato. Questo approccio consente di esaminare la morfologia della superficie e di acquisire informazioni sulla composizione chimica del campione attraverso la tecnica EDS.

#### 4.3.3.1 Analisi SEM

Per ciascun campione sono state acquisite diverse immagini a differenti ingrandimenti (*Fig. 4.14 i), ii), iii)*) in modalità "spot", focalizzando il fascio elettronico su diverse aree del campione selezionate manualmente, al fine di ottenere una mappatura dettagliata della superficie del campione.



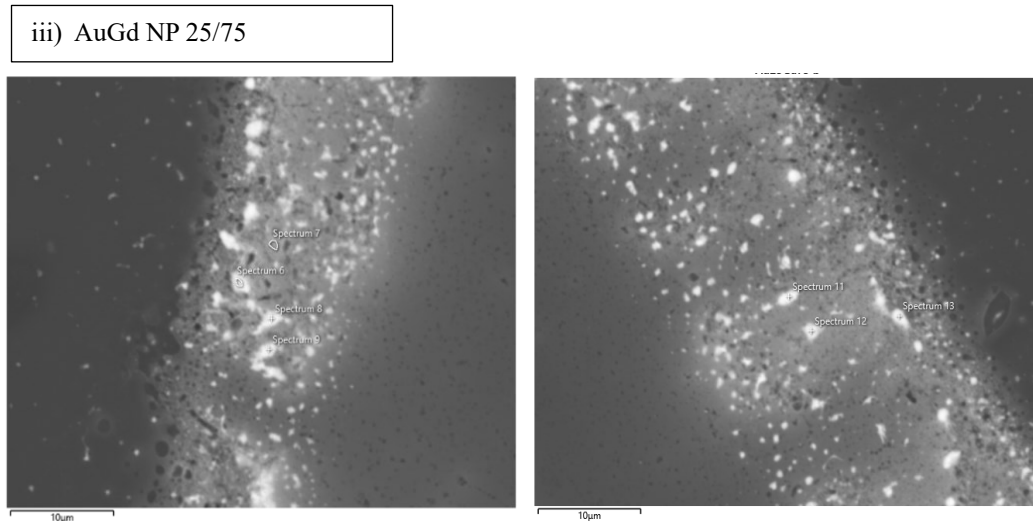
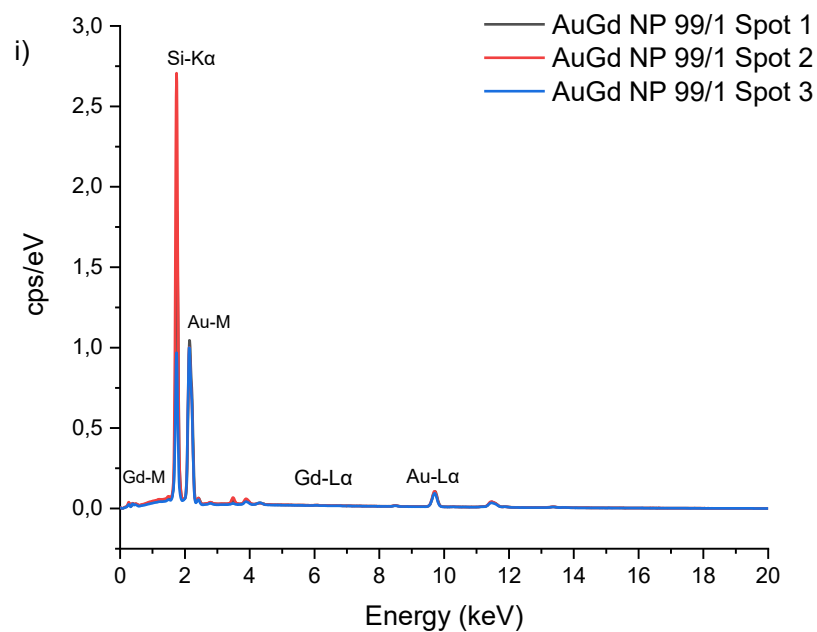


Figura 4.14 Immagini SEM dei campioni i) AuGd NP 99/1; ii) AuGd NP 90/10 e iii) AuGd NP 25/75.

#### 4.3.3.2 Analisi EDS

L'analisi chimica delle immagini acquisite è stata effettuata mediante spettroscopia elettronica a raggi X a dispersione di energia, che consente di identificare e quantificare gli elementi presenti negli spot analizzati attraverso la generazione di raggi X caratteristici.

Nell'analisi degli spettri (Fig. 4.15, a), b) e c)), i picchi corrispondenti alle transizioni caratteristiche dei diversi elementi sono riconosciuti utilizzando la *Energy Table* come riferimento per l'analisi EDS.<sup>67</sup>



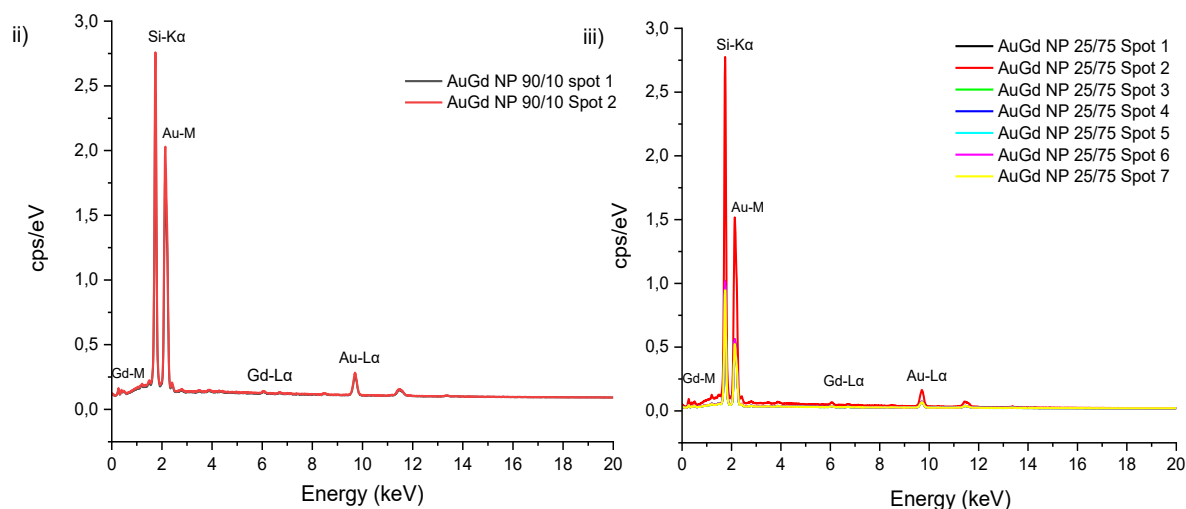


Figura 4.15 Spettri EDS dei campioni di NP di AuGd i) 99/1; ii) 90/10; iii) 25/75.

In tutti e tre gli spettri EDS acquisiti per i campioni di AuGd, sono chiaramente identificabili le transizioni M e La del gadolinio, le transizioni M e K $\alpha$  dell'oro, e infine la transizione K $\alpha$  del silicio, che risulta essere la più intensa, rappresentando il background.

Energy (keV)	Line
~1.48	Gd-M
~1.75	Si-K $\alpha$
~2.14	Au-M
~6.1	Gd-L $\alpha$
~9.7	Au-L $\alpha$

Tabella 8 Energie relative alle righe caratteristiche degli elementi identificati dall'analisi EDS.

Mediante il calcolo delle percentuali atomiche medie ottenute da ciascuno spot, è possibile determinare la quantità percentuale di gadolinio, carbonio e ossigeno presenti nel campione, con riferimento al contenuto di oro. Tale analisi permette di stimare il quantitativo effettivo di oro e gadolinio presenti nei campioni, fornendo così una stima affidabile della composizione della nanolega.

Campione	Au (at%)	Std. Dev.	Gd (at%)	Std. Dev.
AuGd 99/1	99.50	0.05	0.50	0.05
AuGd 90/10	96.97	0.04	3.03	0.05
AuGd 25/75	95.4	0.4	4.6	0.4

Tabella 9 Composizione % di Au e Gd all'interno dei campioni, ottenute dall'analisi EDS.

Campione	C at% (rif. Au)	Std. Dev.	O at% (rif. Au)	Std. Dev.
AuGd 99/1	10.60	2.23	0.9	0.4
AuGd 90/10	66.9	2.1	12.1	2.4
AuGd 25/75	73.85	2.15	19.4	6.8

Tabella 10 Contenuto % di C e O nelle NP di AuGd, calcolate in riferimento al contenuto totale d'oro.

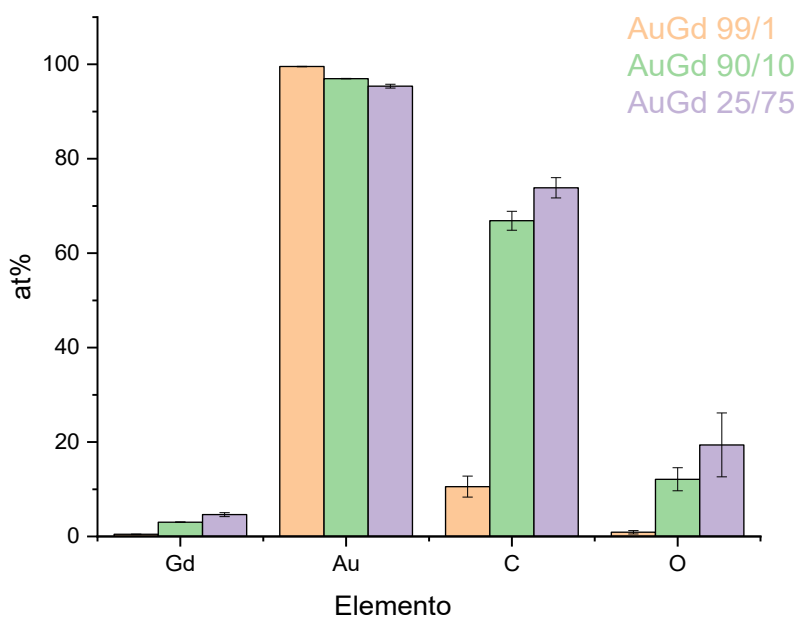


Figura 4.16 Istogramma rappresentante le % atomiche degli elementi presenti nei campioni, ottenute dall'analisi EDS, considerando 100% la somma Au+Gd e scalando in proporzione le quantità di C e O, che sono più soggette ad errore dovuto a contaminazione esterna.

Dai risultati ottenuti emerge che il contenuto di gadolinio aumenta progressivamente dal primo al terzo campione; tuttavia, nelle nanoparticelle di AuGd 25/75, il contenuto di Gd risulta significativamente inferiore rispetto alle aspettative. Tale discrepanza può essere attribuita a uno degli svantaggi della sintesi mediante ablazione laser in liquido, ovvero il limitato controllo sulla composizione delle nanoparticelle prodotte. Spesso, questo si traduce nella mancanza di corrispondenza tra la composizione del target massivo nelle particelle sintetizzate. Tuttavia, bisogna considerare che si tratta di leghe non termodinamicamente stabili e, inoltre, che è stato effettuato un trattamento termico con EDTA e successiva dialisi volto a selezionare le fasi metalliche stabili rispetto a fasi di Gd ossidato. Per cui il risultato rispecchia la tipologia di lega metastabile che resiste alle condizioni di sintesi ma

anche di purificazione successive. In caso contrario, si avrebbero prodotti non stabili, che rilasciano Gd nel tempo e non compatibili con applicazioni biomediche.

Per lo stesso motivo si tende a escludere che la presenza di ossigeno sia associata alla formazione di ossidi o idrossidi di gadolinio (come  $Gd_2O_3$  e  $Gd(OH)_3$ ) sulla superficie delle nanoparticelle. Infatti, analizzando i dati relativi al contenuto di ossigeno e carbonio riportati nella tabella 9, si osserva un aumento di entrambi gli elementi dal campione AuGd 99/1 al 25/75. Questo fenomeno potrebbe essere correlato al fatto che le dimensioni delle nanoparticelle diminuiscono progressivamente dal primo al terzo campione. Di conseguenza, la superficie delle particelle, a parità di massa, aumenta, evidenziando una maggiore presenza di carbonio e ossigeno, derivanti principalmente dalla presenza dell'mPEG-SH utilizzato per il ricoprimento.

#### 4.3.4 ICP-MS

Al fine di ottenere una stima più accurata della composizione delle nanoparticelle, in termini di % atomica degli elementi costituenti la nanolega, è stata condotta un'analisi mediante spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS). Le misurazioni sono state eseguite utilizzando uno strumento ICP-MS Agilent 7700x (*Agilent Technologies*), equipaggiato con una cella di collisione ottopolare che opera in modalità di discriminazione dell'energia cinetica per la rimozione di interferenze poliatomiche e interferenze basate sull'argon.

L'analisi ICP-MS è stata condotta su una piccola quantità (pochi  $\mu L$ ) di soluzione di NP a concentrazione nota, la quale è stata accuratamente pesata e sottoposta a digestione con una soluzione di acqua regia (miscela di HCl e  $HNO_3$  in rapporto 3:1) per circa un'ora e mezza. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Au (ppb)	Gd (ppb)
AuNP	905.2	/
AuGd 99/1	912.2	4.4
AuGd 90/10	997.9	28.3
AuGd 25/75	715.8	25.2

Tabella 11 Concentrazioni in ppb degli elementi presenti nei campioni, ottenute dall'analisi ICP-MS.



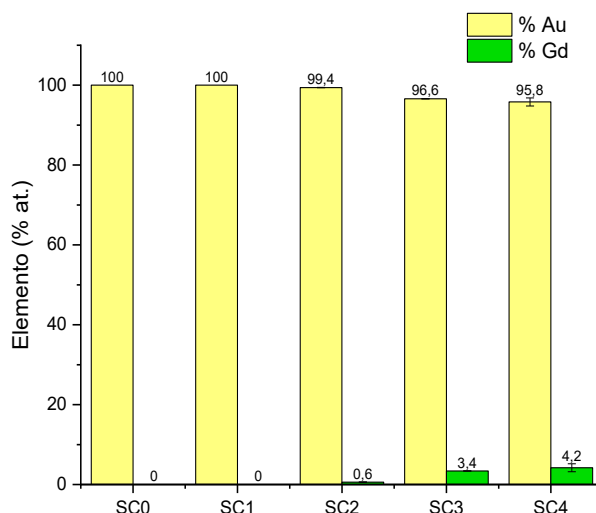


Figura 4.17 Istogramma rappresentante le % atomiche degli elementi presenti nelle NP, ottenute dall'analisi ICP-MS.

I dati ottenuti tramite l'ICP-MS ci consentono di determinare la percentuale di gadolinio e oro nelle nanoparticelle e confrontarla con la composizione percentuale degli stessi elementi nel target utilizzato nella sintesi mediante ablazione laser in liquido, nonché con i valori ricavati dall'analisi EDS.

Campione	Au %	Gd %
<b>AuNP</b>	100	/
<b>AuGd 99/1</b>	99.4	0.6
<b>AuGd 90/10</b>	96.6	3.4
<b>AuGd 25/75</b>	95.8	4.2

Tabella 12 Composizione % dei campioni di NP sintetizzate, calcolata sulla base dei valori ricavati dall'ICP-MS.

Le percentuali atomiche delle NP di AuGd 99/1 risultano sostanzialmente equivalenti a quelle presenti nel target massivo utilizzato nella LAL. Tuttavia, nei campioni AuGd 90/10 e AuGd 25/75, la percentuale di Gd è significativamente inferiore rispetto alle aspettative. Questi risultati sono in coerenza con le composizioni percentuali ottenute attraverso l'analisi EDS, confermando la discrepanza tra la composizione del target iniziale e quella effettiva delle nanoparticelle sintetizzate.

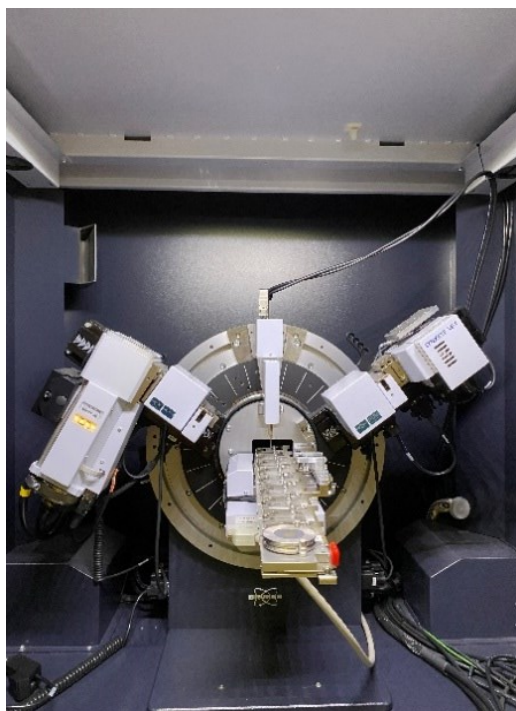
Reagenti utilizzati:

- Acido cloridrico (HCl,  $\geq 37\%$ ) (Sigma-Aldrich) è un liquido incolore di densità pari a 1.2 g/mL (25°C) e  $MM=36.46$  g/mol.
- Acido nitrico (HNO<sub>3</sub>, al 65%) (Carlo Erba) è un liquido incolore, di densità pari a  $1.4 \pm 0.01$  g/mL (20°C) e  $MM=63.013$  g/mol.

### 4.3.5 Diffrazione di raggi X

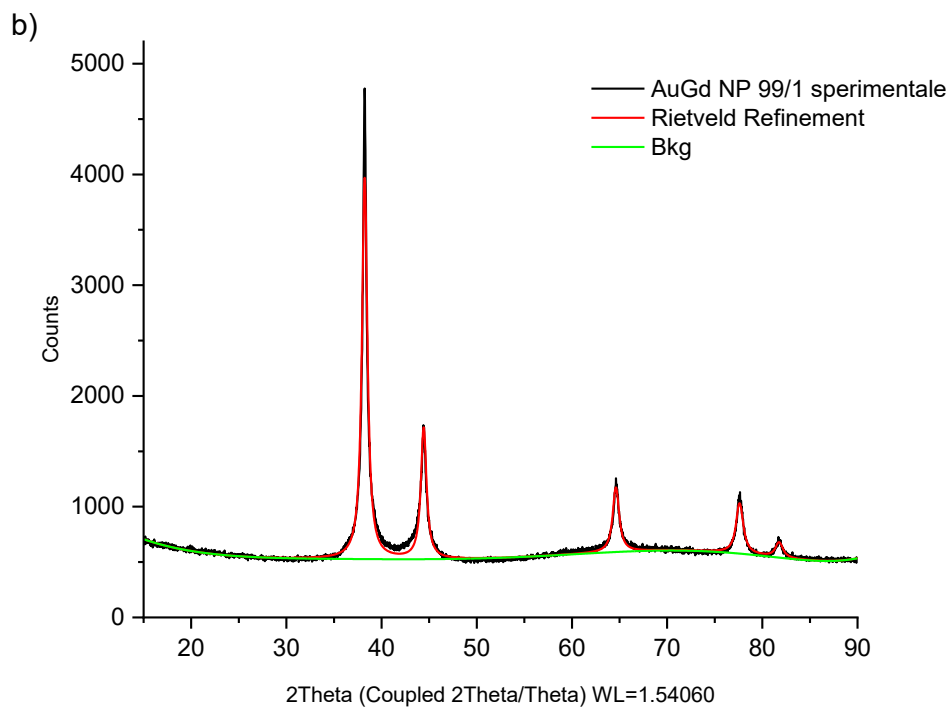
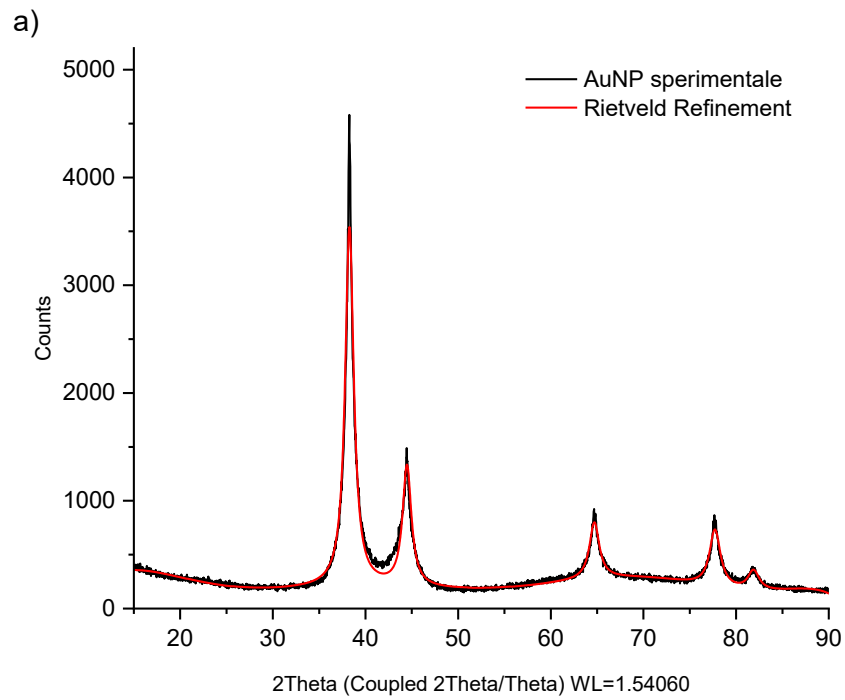
Al fine di acquisire informazioni sulla struttura cristallina delle nanoparticelle e, conseguentemente, sulla loro composizione, è stata condotta un'analisi mediante diffrazione dei raggi X (XRD). L'allargamento dei picchi di diffrazione permette di stimare la dimensione dei domini cristallini nelle NP utilizzando la formula di Scherrer, come dettagliato nel *Capitolo 3, paragrafo 3.6*. Inoltre, confrontando il diffrattogramma con i dati presenti in un database, è possibile identificare qualitativamente le fasi cristalline presenti nei campioni.

I campioni sono stati depositati su un substrato di silicio zero-background tramite la tecnica del drop-casting e successivamente essiccati a temperatura ambiente. Le misure sono state effettuate con un diffrattometro Panalytical XPert 3 Powder (*Fig. 4.18*), dotato di un tubo in rame (40 kV, 40 mA), uno specchio BBHD, uno spinner e un rivelatore PIXcel. Per l'identificazione delle fasi cristalline e l'analisi di Rietveld, è stato impiegato il software Panalytical High Score Plus 4 in combinazione con i database Panalytical ICSD, PDF2 e COD. L'analisi è stata condotta in geometria Bragg-Brentano, che prevede il posizionamento fisso del campione mentre la sorgente di raggi X e il rivelatore si muovono ad angolazioni predeterminate.



*Figura 4.18 Diffrattometro Panalytical Xpert 3 Powder, con cui sono state effettuate le misure.*

Di seguito sono riportati i diffrattogrammi relativi alle NP di Au, AuGd 99/1, AuGd 90/10 e AuGd 25/75 (Fig. 4.19 a), b), c) e d)).



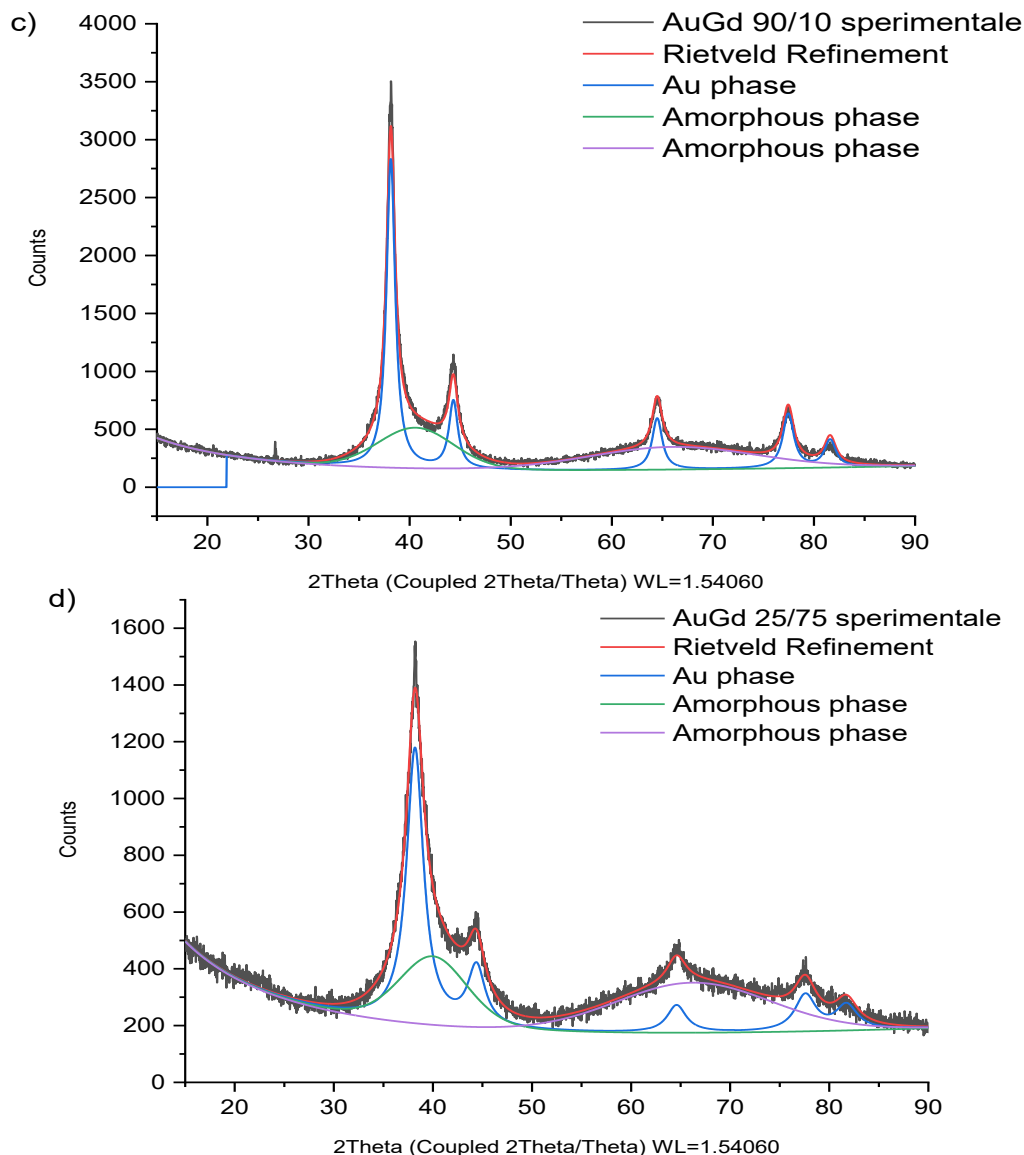


Figura 4.19 Diffratogrammi relativi alle NP di a) Au; b) AuGd 99/1; c) AuGd 90/10 e d) AuGd 25/75.

	<b>AuNP</b>	<b>AuGd 99/1</b>	<b>AuGd 90/10</b>	<b>AuGd 25/75</b>
<b>Parametro reticolare (Å)</b>	4.077	4.081	4.09	4.08
<b>Cristalliti (Scherrer) (nm)</b>	7.20	12.8	8.20	4.10

Tabella 13 Risultati ottenuti dall'analisi degli spettri di diffrazione mediante l'uso del Metodo di Rietveld e la formula di Scherrer

Il diffratogramma delle AuNP (Figura 4.19, a)) presenta un pattern di picchi caratteristici del reticolo FCC dell'oro, individuati ad un angolo di diffrazione  $2\theta$  di circa  $38.30^\circ$ ,  $44.7^\circ$ ,  $65^\circ$  e  $78.8^\circ$ . Inoltre, l'analisi di Rietveld ha restituito un parametro

reticolare di circa 4.077 Å, in accordo con il valore tipico della cella cristallina FCC dell'oro. Nel diffrattogramma delle nanoparticelle di oro-gadolinio 99/1 (*Figura 4.19, b*)), si osserva un pattern di picchi di riflessione molto simile a quello delle AuNP, indicando che la cella cristallina è del tipo FCC dell'oro, senza contributi significativi da altre fasi. La dimensione dei cristalliti, ottenuta mediante la formula di Scherrer, risulta essere leggermente superiore rispetto a quella delle AuNP, coerente con i valori ottenuti dall'analisi TEM. Per quanto concerne il parametro reticolare, si osserva un leggero aumento (4.081 Å) rispetto a quello dell'oro puro nelle nanoparticelle di AuGd 99/1. Nel campione di AuGd NP 90/10 (*Figura 4.19, c*)), si evidenzia un lieve allargamento dei picchi di riflessione, associato alla presenza di una componente strutturalmente disordinata nelle NP. Anche in questo caso, il parametro reticolare risulta differente rispetto a quello dell'oro puro FCC. Infine, nel diffrattogramma delle nanoparticelle di oro-gadolinio 25/75 (*Figura 4.19, d*)), si nota un ampliamento significativo dei picchi, correlabile alla ridotta dimensione delle nanoparticelle. La dimensione dei cristalliti, derivante dalla formula di Scherrer, è inferiore rispetto agli altri campioni (4.1 nm), in coerenza anche con i risultati dell'analisi TEM. Si evidenzia un fondo amorfo rilevante, e la fase cristallina è esclusivamente quella FCC dell'oro, analogamente a tutti gli altri campioni. L'applicazione del metodo di Rietveld ha rivelato un parametro reticolare di 4.080 Å, leggermente superiore a quello dell'oro puro.

I risultati dell'analisi XRD forniscono un'indicazione della formazione di una lega Au-Gd metastabile, poiché la presenza di gadolinio è associata alla dilatazione del reticolo FCC dell'oro, e tale variazione del parametro reticolare rispetto a quello dell'oro puro è attribuibile alla presenza del gadolinio come impurezza sostituzionale. Difatti, l'aumento del parametro reticolare della cella cristallina dell'oro è attribuibile al raggio atomico maggiore del gadolinio (180 pm) rispetto a quello dell'oro (144 pm). Ciononostante, il campione di NP di AuGd 25/75 più ricco in gadolinio, non presenta il maggior valore di parametro reticolare. È probabile che una buona parte degli ioni  $Gd^{3+}$  tenda ad aggregarsi intorno ai bordi dei grani sotto forma di ossido o idrossido di gadolinio, anziché essere presente come impurezza sostituzionale.<sup>68</sup> La presenza di gadolinio induce una contrazione o un allargamento del reticolo FCC dell'oro. La difettualità è evidenziata anche dall'ampiezza dei picchi e dalla conseguente ridotta dimensione dei cristalliti nei campioni più ricchi in gadolinio.

Infatti, la dimensione dei cristalliti diminuisce con l'aumento della concentrazione di ioni  $Gd^{3+}$ , portando a una dimensione piuttosto piccola, probabilmente perché la crescita dei grani cristallini è inibita dall'incorporazione degli ioni  $Gd^{3+}$  come difetti e/o dislocazioni che interferiscono con l'ordine e le dimensioni del reticolo cristallino dell'oro.

Questa ipotesi potrebbe essere ulteriormente confermata attraverso l'analisi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), che consentirebbe anche di valutare lo stato chimico del gadolinio nelle nanoparticelle.

#### 4.3.6 Dynamic Light Scattering

Le misurazioni DLS, volte a determinare il raggio idrodinamico delle nanoparticelle e la loro stabilità in soluzione, sono state eseguite utilizzando lo *strumento Malvern Zetasizer Nano ZS* nelle celle DTS1070.

Le misurazioni sono state condotte in tre diverse soluzioni al fine di esaminare la stabilità delle nanoparticelle in ambienti vari, simulando condizioni ricche di proteine che rispecchiano i fluidi biologici. Le soluzioni utilizzate sono le seguenti:

- $H_2O$ ;
- PBS, (Phosphate Buffered Saline), una soluzione tampone salina acquosa contenente cloruro di sodio, fosfato di sodio e, in alcune formulazioni, cloruro di potassio. Tale tampone contribuisce a mantenere costante il pH, mentre la concentrazione di sali e l'osmolarità sono generalmente correlate a quelle presenti nel corpo umano (soluzione isotonica);
- Siero fetale bovino (FBS o FCS da "Fetal Calf Serum") (Sigma-Aldrich) è una miscela complessa di biomolecole che include proteine, fattori di crescita, vitamine, ormoni e oligoelementi.

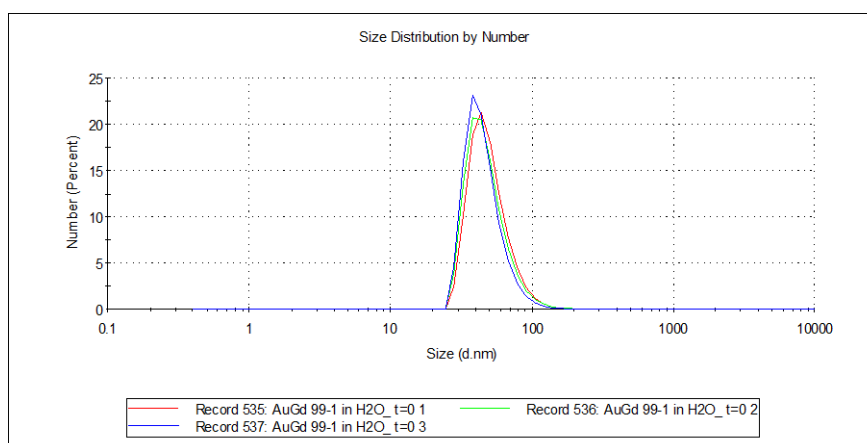
Le misurazioni sono state condotte in due fasi distinte: inizialmente, al tempo zero, rappresentato dal momento in cui i campioni di nanoparticelle sono preparati nelle tre soluzioni diverse; successivamente, dopo 48 ore. La valutazione dei campioni dopo 48 ore è stata effettuata mantenendo i campioni in un incubatore a  $37^\circ C$ , simulando così le condizioni di temperatura del corpo umano.

I campioni per le misure di DLS sono stati preparati in base al valore di assorbanza a 633 nm dello spettro UV-Visibile della soluzione contenente le NP da analizzare, che corrisponde al valore di  $\lambda$  del raggio laser dello strumento. L'assorbanza ottimale per effettuare le misure è stata mantenuta tra 0.2 e 0.3. Le misure sono state eseguite sui seguenti campioni:

- AuNP post dialisi;
- AuGd NP 99/1 post dialisi;
- AuGd NP 90/10 post dialisi;
- AuGd 25/75 post dialisi.

Di seguito (*Fig. 4.21*) è presentato un esempio delle condizioni sperimentali durante una delle misure DLS eseguite, con il corrispondente segnale di output fornito dallo strumento:

- Campione: AuGd NP 99/1 (valore di RI (indice di rifrazione): 0.20, Assorbimento: 0.4);
- Mezzo disperdente: Acqua (valore di RI: 1.330, viscosità: 0.8872 cP)
- Temperatura: 25°C
- Angolo di misura: 173° Backscatter
- Durata della misura: numero di run:10 e durata dei run: 50 secondi;
- Numero di misure: 3.



*Figura 4.20 esempio del segnale di output fornito dallo strumento Malvern Zetasizer NanoZS per le condizioni sopra riportate. L'esempio è relativo alle NP di AuGd 99/1 ottenuta mediante LAL post dialisi. La misura DLS è stata effettuata in acqua.*

In figura 4.21 ((i), (ii) e (iii)) sono riportati gli andamenti del raggio idrodinamico (nm) delle NP in funzione del tempo, rappresentando i valori ottenuti al tempo zero e dopo un'incubazione di 48 ore.

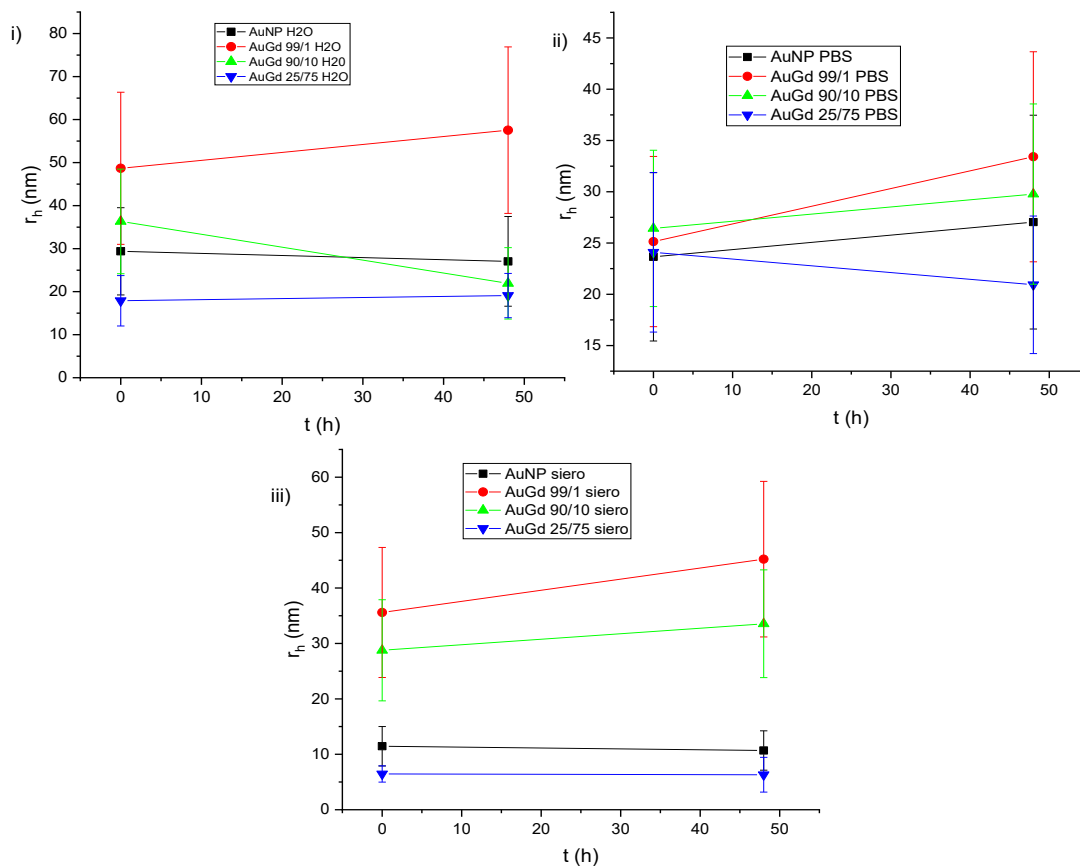


Figura 4.21 Andamento a diversi tempi (0, 48 h) del valore del raggio idrodinamico dei diversi campioni di NP i) in acqua; ii) in PBS; iii) in siero. Le barre di errore verticali indicano il valore della deviazione standard associata al valore di raggio idrodinamico (nm).

Dalle immagini in figura 4.21 emerge che le nanoparticelle di AuGd 99/1 mostrano un raggio idrodinamico maggiore rispetto alle altre, mentre le AuGd 25/75 sono le più piccole. Questi risultati sono coerenti con le dimensioni ottenute dall'analisi TEM.

In generale, l'incremento delle dimensioni dopo 48 ore potrebbe essere attribuito all'aggregazione delle nanoparticelle o all'adsorbimento di proteine, oligoelementi, ecc., sulla loro superficie. Tuttavia, ciò dovrebbe essere limitato grazie al ricoprimento con il PEG, il quale riduce l'adsorbimento di tali molecole e, di conseguenza, le interazioni indesiderate tra l'ambiente fisiologico e le nanoparticelle. L'adsorbimento di proteine sulla superficie delle nanoparticelle può causarne la degradazione.



La stabilità delle nanoparticelle risulta notevolmente più elevata in acqua, priva di interferenti. Ciononostante, le dimensioni non subiscono variazioni significative né all'interno del PBS né nel siero. In breve, il raggio idrodinamico rimane pressoché invariato dopo 48 ore di incubazione a 37°C nella stessa soluzione, suggerendo un'efficace stabilità delle nanoparticelle in caso di utilizzo in vivo. Tale risultato evidenzia la facilità di funzionalizzazione superficiale e bioconiugazione delle nanoparticelle di Au-Gd, paragonabile a quanto osservato nelle nanoparticelle di oro puro con molecole tiolate.

#### **4.4 Applicazioni teranostiche**

Le nanoparticelle di AuGd si presentano come candidati promettenti per svolgere il ruolo di agenti teranostici, destinate a fungere da mezzi di contrasto nell'Imaging di Risonanza Magnetica (MRI) e Tomografia Computerizzata (TC), nonché da radiosensibilizzanti nell'ambito della Radioterapia (XRT). Al fine di confermare la loro idoneità per tali applicazioni in campo biomedico, sono stati eseguiti esperimenti in collaborazione con altri gruppi di ricerca. Questi comprendono misure di MRI, TC e Radioterapia.

##### **4.4.1 Misure MRI**

Gli esperimenti di imaging mediante risonanza magnetica sono stati condotti in collaborazione con l'Università degli Studi di Verona. Attraverso queste misure, è stato possibile registrare la rilassività dei campioni di nanoparticelle di AuGd, al fine di valutare la loro potenziale applicazione come agenti di contrasto  $T_1$  o  $T_2$ . Le immagini sono state acquisite tramite un sistema Bruker operante a 7T (Bruker Biospin, Ettlingen, Germania) (*Fig. 4.22*). I campioni sono stati dispersi in acqua mediante diluizione a partire da una soluzione con concentrazione nota di oro e gadolinio. Quindi, per ogni campione (AuNP, AuGd 99/1, AuGd 90/10 e AuGd 25/75) sono state effettuate 9 misure.



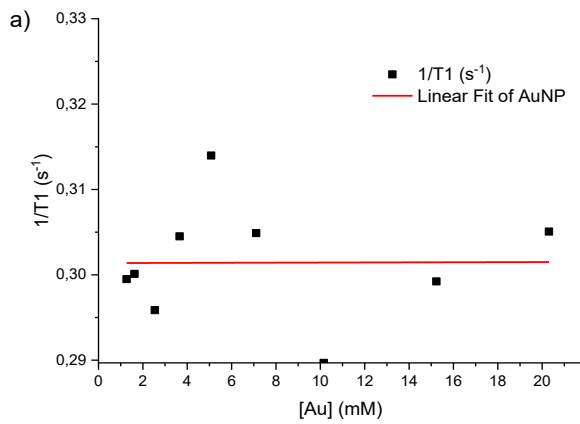
Figura 4.22 Rappresentazione del sistema Bruker con cui sono state effettuate le misure MRI dei campioni di NP.

Le immagini acquisite sono state analizzate attraverso il software *ImageJ*, il quale consente di estrarre i valori dei tempi di rilassamento longitudinale ( $T_1$ ) e trasversale ( $T_2$ ). L'intensità del segnale  $T_1$  o  $T_2$  viene normalizzata utilizzando come riferimento il segnale bianco generato da un campione contenente acqua pura.

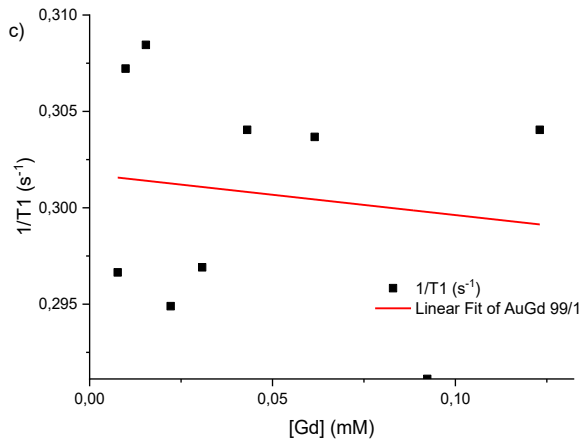
#### 4.4.1.1 Misure di rilassività longitudinale $r_1$

La capacità delle nanoparticelle di Au e AuGd di abbreviare il tempo di rilassamento longitudinale dei protoni dell'acqua durante la risonanza magnetica è stata valutata su campioni ottenuti mediante la diluzione di quattro soluzioni di nanoparticelle. Le concentrazioni delle soluzioni di NP di partenza sono di 20.3 mM in atomi di oro per le AuNP, 0.13 mM in atomi di gadolinio per le AuGd 99/1, 0.72 mM in atomi di gadolinio per le AuGd 90/10, e 0.89 mM in atomi di gadolinio per le AuGd 25/75.

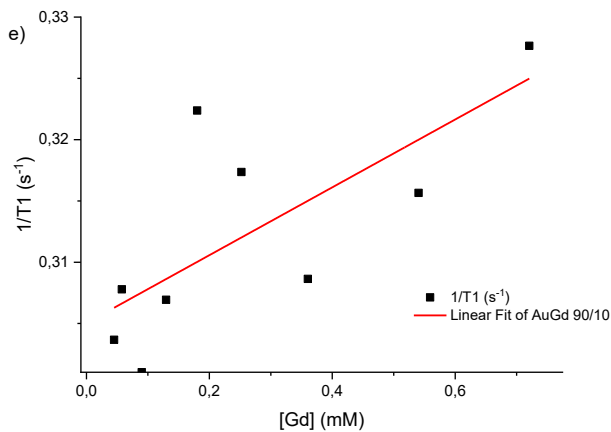
Dall'inverso del tempo di rilassamento  $T_1$  si derivano i valori di velocità di rilassamento corrispondenti,  $R_1$ , che sono successivamente tracciati in funzione della concentrazione (in mmol/L) di oro e gadolinio (*Fig. 4.23, a), c), e) e g)*). La rilassività  $r_1$  viene ottenuta dalla pendenza della migliore regressione lineare delle velocità di rilassamento ( $1/T_1$ ) rispetto alla concentrazione dell'agente di contrasto.

b) Immagini pesate in  $T_1$  dei campioni di AuNP

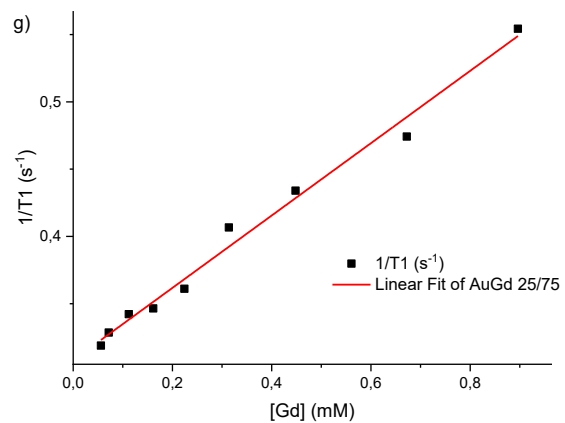
Au [mM]

H<sub>2</sub>O 1.3 1.6 2.5 3.7 5.1 7.1 10.2 15.2 20.3d) Immagini pesate in  $T_1$  dei campioni di AuGd 99/1

Gd [mM]

H<sub>2</sub>O 0.008 0.01 0.015 0.022 0.03 0.04 0.06 0.09 0.012f) Immagini pesate in  $T_1$  dei campioni di AuGd 90/10

Gd [mM]

H<sub>2</sub>O 0.05 0.06 0.09 0.13 0.2 0.3 0.4 0.54 0.72h) Immagini pesate in  $T_1$  dei campioni di AuGd 25/75

Gd [mM]

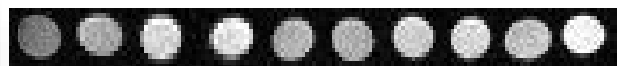
H<sub>2</sub>O 0.06 0.07 0.11 0.16 0.22 0.3 0.44 0.7 0.9

Figura 4.23 Velocità di rilassamento longitudinale ( $R_1=1/T_1$ ) rispetto alla concentrazione di a) Au da AuNP; c) Gd da AuGd 99/1; e) Gd da AuGd 90/10 e g) Gd da AuGd 25/75. Immagini pesate in  $T_1$  dei campioni di NP di b) Au; d) AuGd 99/1; f) AuGd 90/10 e h) AuGd 25/75.

Campione	$r_1$ ( $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ )	Std. Dev.
AuNP	0	0
AuGd 99/1	0	0
AuGd 90/10	0.028	$\pm 0.009$
AuGd 25/75	0.269	$\pm 0.011$

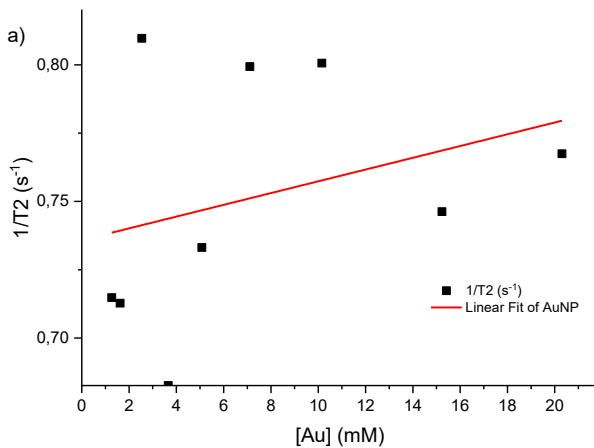
Tabella 14 Valori di rilassività longitudinale  $r_1$  ottenuti dalle misure MRI per i campioni di NP di Au, AuGd 99/1, AuGd 90/10 e AuGd 25/75.

I campioni di AuNP e AuGd 99/1 non manifestano segni di rilassività longitudinale, in accordo con la presenza minima o l'assenza di gadolinio. Per quanto concerne gli altri campioni, la maggiore rilassività  $r_1$  è riscontrata nella soluzione di NP più ricca in gadolinio, ossia AuGd 25/75, conforme alle previsioni. È da notare che, in generale, il valore di  $r_1$  aumenta linearmente con la concentrazione dell'agente di contrasto, confermando quanto riportato nella letteratura scientifica.

#### 4.4.1.2 Misure di rilassività trasversale $r_2$

Le misurazioni dei tempi di rilassamento trasversale sono state condotte nei medesimi campioni delle misure precedentemente descritte, ottenuti mediante diluizione delle quattro soluzioni di NP, con concentrazioni di 20.3 mM in atomi di Au per le AuNP, 0.13 mM in atomi di Gd per AuGd 99/1, 0.72 mM in atomi di Gd per AuGd 90/10, e 0.89 mM in atomi di Gd per AuGd 25/75.

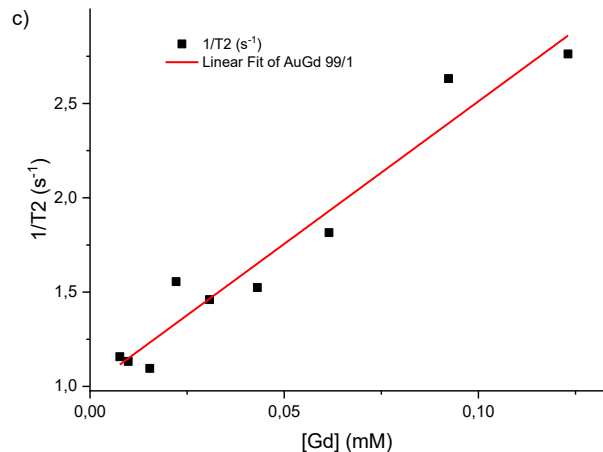
I valori di velocità di rilassamento trasversale ( $R_2=1/T_2$ ) rispetto alle concentrazioni di Au e Gd nei campioni di NP sono presentati nelle *figure 4.24 a), c), e), g)*, insieme alle corrispondenti immagini pesate in  $T_2$  (*Fig. 4.25 b), d), f), h)*). La rilassività  $r_2$  viene calcolata seguendo la medesima procedura utilizzata per la  $r_1$ .



b) Immagini pesate in  $T_2$  dei campioni di AuNP

Au [mM]

H<sub>2</sub>O 1.3 1.6 2.5 3.7 5.1 7.1 10.2 15.2 20.3

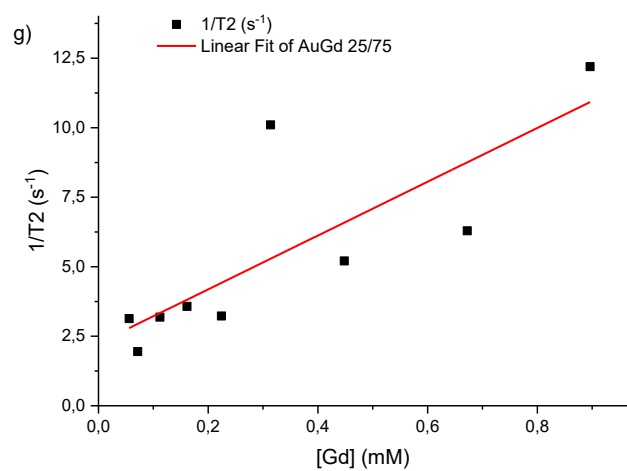
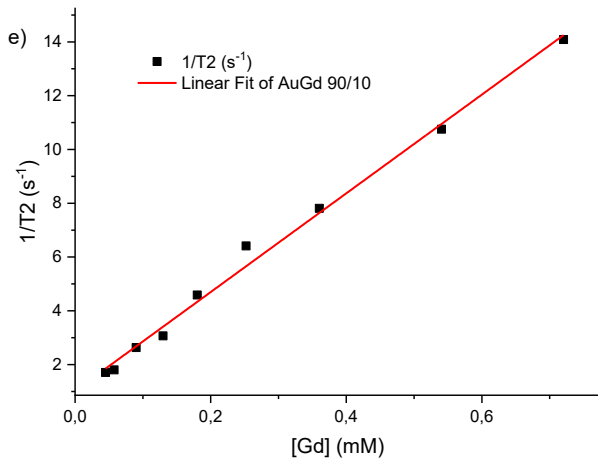


d) Immagini pesate in  $T_2$  dei campioni di AuGd 99/1

Gd [mM]

H<sub>2</sub>O 0.008 0.01 0.015 0.022 0.03 0.04 0.06 0.09 0.12



f) Immagini pesate in  $T_2$  dei campioni di AuGd 90/10

Gd [mM]

H<sub>2</sub>O 0.05 0.06 0.09 0.13 0.2 0.3 0.4 0.54 0.72h) Immagini pesate in  $T_2$  dei campioni di AuGd 25/75

Gd [mM]

H<sub>2</sub>O 0.06 0.07 0.11 0.16 0.22 0.3 0.44 0.7 0.9

Figura 4.24 Velocità di rilassamento trasversale ( $R_2=1/T_2$ ) rispetto alla concentrazione di a) Au da AuNP; c) Gd da AuGd 99/1; e) Gd da AuGd 90/10 e g) Gd da AuGd 25/75. Immagini pesate in  $T_1$  dei campioni di NP di b) Au; d) AuGd 99/1; f) AuGd 90/10 e h) AuGd 25/75.

Campione	$r_2$ ( $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ )	Standard Deviation.
<b>Au</b>	0	0
<b>AuGd 99/1</b>	15.1	$\pm 1.4$
<b>AuGd 90/10</b>	18.4	$\pm 0.6$
<b>AuGd 25/75</b>	9.7	$\pm 2.7$

Tabella 15 Valori di relassività trasversale  $r_2$  ottenuti dalle misure MRI dei campioni di NP di Au, AuGd 99/1, AuGd 90/10 e AuGd 25/75.

Dai risultati emersi, le nanoparticelle di AuGd 99/1 e AuGd 90/10 presentano una maggiore velocità di rilassamento trasversale ( $R_2$ ), la quale aumenta con l'aumentare della concentrazione di gadolinio. Al contrario, il campione AuGd 25/75 mostra un valore inferiore di  $r_2$  rispetto alle altre formulazioni, insieme a una perdita di linearità, probabilmente attribuibile all'agglomerazione delle nanoparticelle sottoposte a elevati campi magnetici statici, alle minori dimensioni delle nanoparticelle o alla presenza di ossido di gadolinio libero.

In sintesi, le nanoparticelle sintetizzate sembrano esprimere una maggiore attività come agenti di contrasto per  $T_2$  rispetto al  $T_1$ , che è quanto atteso per NP contenenti Gd. Come precedentemente discusso nel *Capitolo 2, paragrafo 2.1.2.2*, gli agenti di contrasto  $T_2$  dimostrano un elevato valore di relassività  $r_2$  e un ampio rapporto  $r_2/r_1$ .

Ad esempio, le nanoparticelle di AuGd 90/10, presentano, presentano un rapporto  $r_2/r_1$  pari a  $613.3 \pm 66.6$ .

#### 4.4.2 Misure di Tomografia Computerizzata

Al fine di valutare l'efficacia delle nanoparticelle di Au e AuGd come agenti di contrasto nella tomografia computerizzata (TC), sono stati condotti esperimenti in collaborazione con l'Ospedale San Raffaele di Milano. La TC sfrutta l'assorbimento di raggi X con un'energia compresa tra 30 e 120 keV, e gli atomi di Au ( $Z=79$ ) presentano un coefficiente di attenuazione lineare dei raggi X circa 300 volte maggiore rispetto agli elementi con un numero atomico più basso ( $Z$ ). Inoltre, il Gd ( $Z=64$ ) è anch'esso considerato un potenziale agente di contrasto per la TC, grazie al suo effetto di radiosensibilizzazione, come precedentemente delineato nel *Capitolo 2, paragrafo 2.3.2*.

Le misurazioni sono state effettuate utilizzando gli stessi campioni impiegati per le misure di risonanza magnetica, ottenuti attraverso diluizioni seriali delle soluzioni iniziali di nanoparticelle di Au, AuGd 99/1, AuGd 90/10 e AuGd 25/75, a concentrazioni precedentemente determinate mediante spettroscopia UV-Visibile. Le immagini TC sono state acquisite utilizzando un sistema TC per piccoli animali (X-RAD, SmART, Precision X-ray) ai seguenti parametri di acquisizione: tensione del tubo 80kVp, corrente di 3 mA, 300 views, dimensione voxel di 0.1 mm. Le acquisizioni delle immagini TC sono state eseguite in triplicato e successivamente ricostruite mediante l'utilizzo dell'algoritmo di Feldkamp specifico per la tomografia computerizzata a fascio conico. Per stimare l'attenuazione dei raggi X, è stato impiegato il software *ImageJ*. La valutazione della capacità di attenuazione dei raggi X da parte delle nanoparticelle è stata condotta in base alla dipendenza lineare del segnale, espresso in unità di Hounsfield (HU), dalla concentrazione di Au e Gd nelle NP (*Figura 4.25, i, ii, iii e iv*). L'intensità dell'acqua è stata utilizzata come riferimento, normalizzata a  $HU=0$ . Il calcolo della capacità di attenuazione dei raggi X in HU è stato effettuato considerando le pendenze delle migliori regressioni lineari dei valori di HU rispetto alla concentrazione di NP.

Le immagini TC delle sezioni trasversali delle soluzioni dei campioni di NP analizzati sono riportate in *figura 4.26, a), b), c) e d)*.

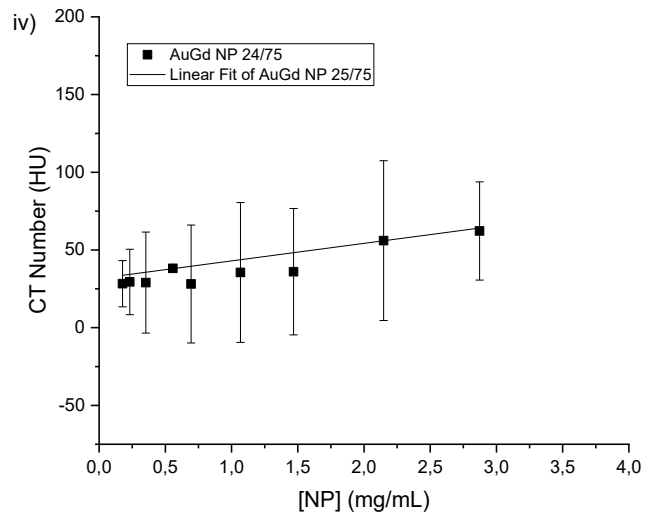
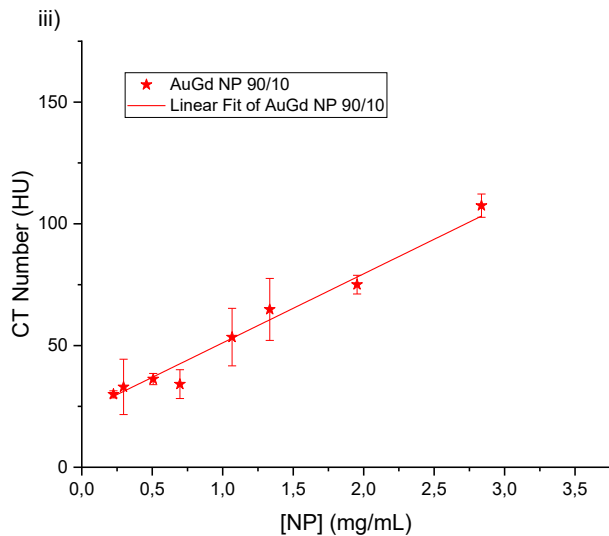
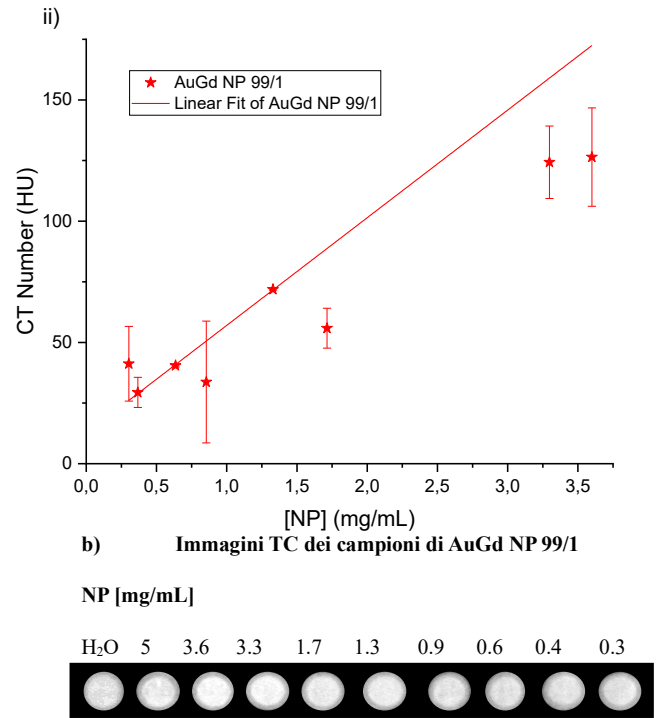
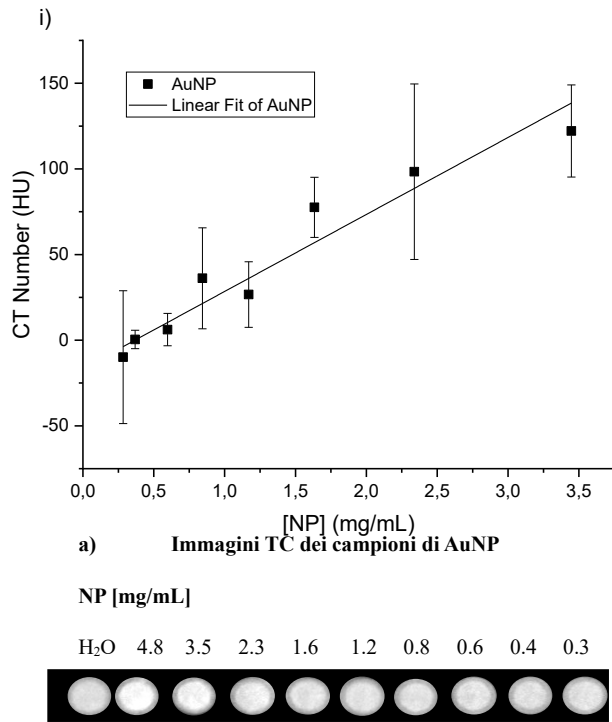


Figura 4.25 Rappresentazione del segnale TC in HU rispetto alla concentrazione di NP di i) Au; ii) AuGd 99/1; iii) AuGd 90/10; iv) AuGd 25/75. Rispettive immagini TC delle sezioni trasversali dei campioni di NP analizzate: a) Au; b) AuGd 99/1; c) AuGd 90/10; d) AuGd 25/75.

Campione	HU · mg/mL	Standard Deviation
<b>Au</b>	44.9	± 4.7
<b>AuGd 99/1</b>	44.39	± 2.06
<b>AuGd 90/10</b>	28.4	± 1.3
<b>AuGd 25/75</b>	31.7	± 2.9

Tabella 16 Valori delle pendenze dell'attenuazione dei raggi X in HU rispetto alla concentrazione delle NP di Au, AuGd 99/1, AuGd 90/10 e AuGd 25/75.

La capacità di contrasto è crescente con la concentrazione di NP, ma i valori più elevati restano quelli per le AuNP. Per una concentrazione di 3.5 mg/mL è stato misurato un valore di 122 HU per le AuNP, mentre per le NP di AuGd 25/75 alla concentrazione di 3.0 mg/mL è stato misurato un valore di 62 HU, che è circa la metà. Ad ogni modo, le misure presentano una elevata rumorosità che rende difficile spiegare con certezza i risultati ottenuti e ciò indica problemi di omogeneità delle soluzioni a causa delle diverse settimane trascorse tra la loro preparazione e l'analisi.

#### 4.5 Biocompatibilità *in vitro*

Preliminarmente agli esperimenti di XRT, sono stati condotti studi di biocompatibilità *in vitro* al fine di ottenere informazioni sperimentali sulla compatibilità delle nanoparticelle di Au-Gd per le applicazioni biomediche. La citotossicità include la vitalità cellulare, l'attività metabolica, l'internalizzazione, la necrosi e l'apoptosi delle nanoparticelle, e può variare a seconda del tipo di cellula.

##### 4.5.1 Vitalità cellulare *in vitro* – Ospedale San Raffaele di Milano

La vitalità cellulare è stata valutata da parte della dottoressa Clara Maria Goncalves De Faria, presso l'Ospedale San Raffaele di Milano, incubando le nanoparticelle di Au e AuGd con le cellule tumorali PC3 (metastasi ossee umane di adenocarcinoma prostatico di grado IV), utilizzate anche per gli esperimenti di radioterapia a raggi X. Gli endpoint relativi alla citotossicità sono stati misurati dopo un periodo di incubazione di 48 ore a dosi di nanoparticelle comprese tra 0 e 150 µg/mL.

La valutazione della vitalità cellulare (Fig. 4.26) è stata eseguita mediante il saggio colorimetrico MTT. Le cellule PC3 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti con una densità di  $3 \times 10^3$  cellule/pozzetto e coltivate in un incubatore a 37°C con una concentrazione di CO<sub>2</sub> al 5% per una notte. Dopo la rimozione del terreno di coltura, sono stati aggiunti 100 µL di soluzioni di nanoparticelle a varie concentrazioni a



ciascun pozzetto, seguite da un periodo di incubazione di 48 ore. Successivamente, il terreno è stato rimosso, i pozzetti sono stati lavati con tampone solfato fosfato, e al sistema è stato aggiunto il 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) a una concentrazione di 0.5 mg/mL. Dopo due ore di incubazione, l'MTT è stato rimosso e i cristalli di formazano sono stati solubilizzati in 100  $\mu$ L di dimetilsolfossido (DMSO); successivamente è stata eseguita la lettura dell'assorbanza a 590 nm mediante un lettore di piastre. La vitalità cellulare è stata calcolata come il rapporto tra l'assorbanza del pozzetto e l'assorbanza media del gruppo di controllo (soluzione di MTT senza cellule). Ciascuna condizione è stata preparata in triplice copia e sono stati condotti tre esperimenti indipendenti.

Le cellule trattate con le NP di AuGd 25/75 hanno mostrato la maggiore tendenza a ridurre la vitalità cellulare. Tuttavia, le cellule trattate con le diverse NP a concentrazioni fino a 150  $\mu$ g/mL hanno mantenuto la vitalità cellulare, indicando una trascurabile citotossicità nei confronti delle cellule PC3.

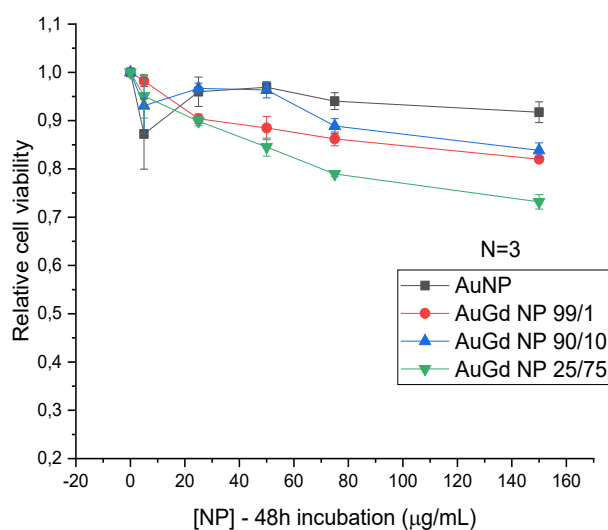


Figura 4.26 Vitalità cellulare in cellule PC3 dopo 48 ore di incubazione con NP di Au e AuGd, ricoperte con mPEG-SH da 800 Da, determinata mediante il test MTT.

#### 4.5.2 Citotossicità *in vitro*

Le seguenti misure di citotossicità sono state eseguite dal professor Miodrag Colic e Marina Bekic, dell'Università di Belgrado.

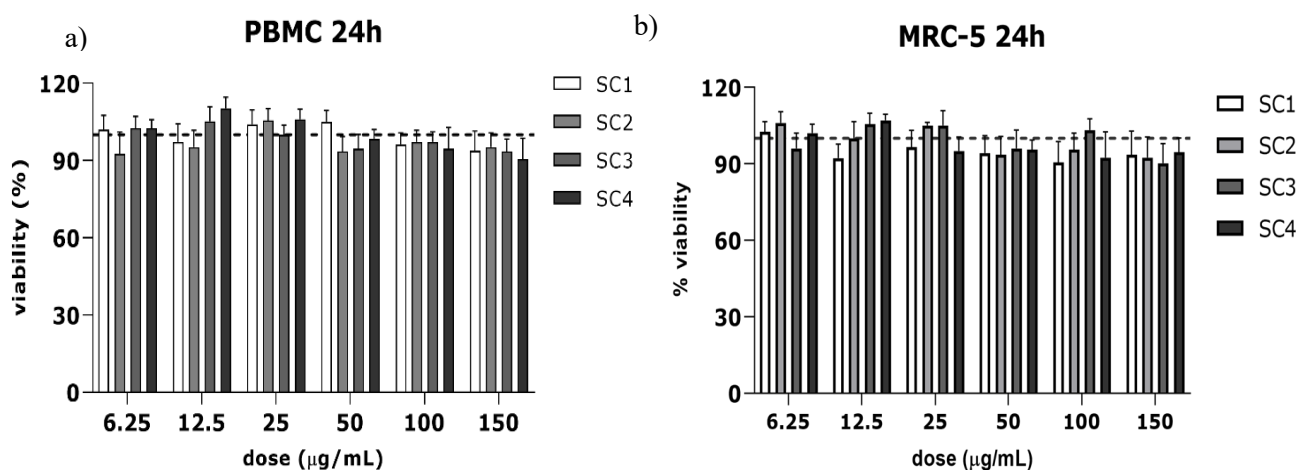
Come accennato nella *sezione 4.5*, la citotossicità può variare a seconda del tipo di cellula. Pertanto, l'analisi con diversi tipi di cellule potrebbe aiutare ad ottenere risultati più rappresentativi, poiché i tumori sono noti per essere eterogenei e le

cellule tumorali potrebbero avere caratteristiche distinte, come l'aggressività e la dipendenza ormonale.<sup>69</sup> Per questo motivo le misure sono state condotte su tre tipi di linee cellulari: cellule di melanoma maligno umano (A375), cellule mononucleari periferiche del sangue umano (PBMC) e cellule diploidi umane composte da fibroblasti (MRC-5), ottenuti da donatori volontari dopo aver firmato un consenso e l'approvazione dello studio da parte del Comitato Etico dell'INEP, Belgrado, Serbia.<sup>69</sup>

Per agevolare la discussione, i campioni sono identificati come segue: SC1 per le AuNP, SC2 per le NP di AuGd 99/1, SC3 per le NP di AuGd 90/10, e SC4 per le NP di AuGd 25/75.

#### 4.5.2.1 Vitalità cellulare

Per il test di vitalità cellulare, effettuato mediante il *saggio colorimetrico MTT* (descritto nella *sezione 4.5.1.*), dopo un periodo di incubazione di 24 ore in presenza di diverse concentrazioni di NP, si è proceduto alla colorazione delle cellule non vitali in base alla loro permeabilità al colorante legante del DNA. I dati sono espressi come percentuale media di cellule vitali  $\pm$  St. Dev., risultanti da tre esperimenti indipendenti. Le differenze con un livello di significatività  $*p < 0.05$  sono state considerate statisticamente significative. Le linee tratteggiate sul grafico a barre (*Fig. 4.27, a), b), c)*) indicano i valori del gruppo di controllo/non trattato.



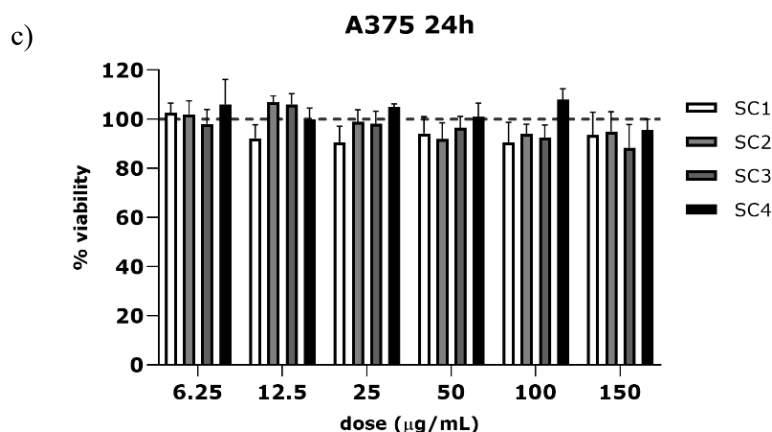


Figura 4.27 Effetto delle NP di Au e AuGd sulla vitalità cellulare di diverse linee cellulari, dopo 24h di incubazione.

È stato riscontrato che le NP non manifestano una risposta dose-dipendente e non aumentano in modo significativo gli effetti citotossici. In tutti e tre i tipi di cellule, la capacità delle NP di sopprimere la vitalità cellulare risulta modesta, mantenendo la vitalità cellulare simile a quella del gruppo di controllo, non trattato con NP. Solo a concentrazioni molto elevate di NP è possibile osservare una riduzione modesta della vitalità cellulare in tutte e tre le linee cellulari.

In conclusione, nessuna delle NP mostra citotossicità significativa fino a concentrazioni molto elevate (150 µg/mL).

#### 4.5.2.2 Test di Necrosi/Apoptosi

Il saggio consente la distinzione tra diverse popolazioni cellulari, comprese le cellule necrotiche, cellule viventi, e cellule apoptotiche totali (che includono cellule apoptotiche precoci e cellule necrotiche tardive apoptotiche/secondarie), fornendo così una valutazione dettagliata dell'influenza delle NP di Au e AuGd sulla morte cellulare.

I risultati sono presentati nel grafico presente in *figura 4.28* come media  $\pm$  St. Dev. di almeno tre esperimenti indipendenti condotti con linee cellulari di PBMC, MRC-5 e A375. Le differenze superiori a  $*p < 0.05$  sono state considerate statisticamente significative. Le linee tratteggiate sul grafico a barre indicano i valori del gruppo di controllo/non trattato.

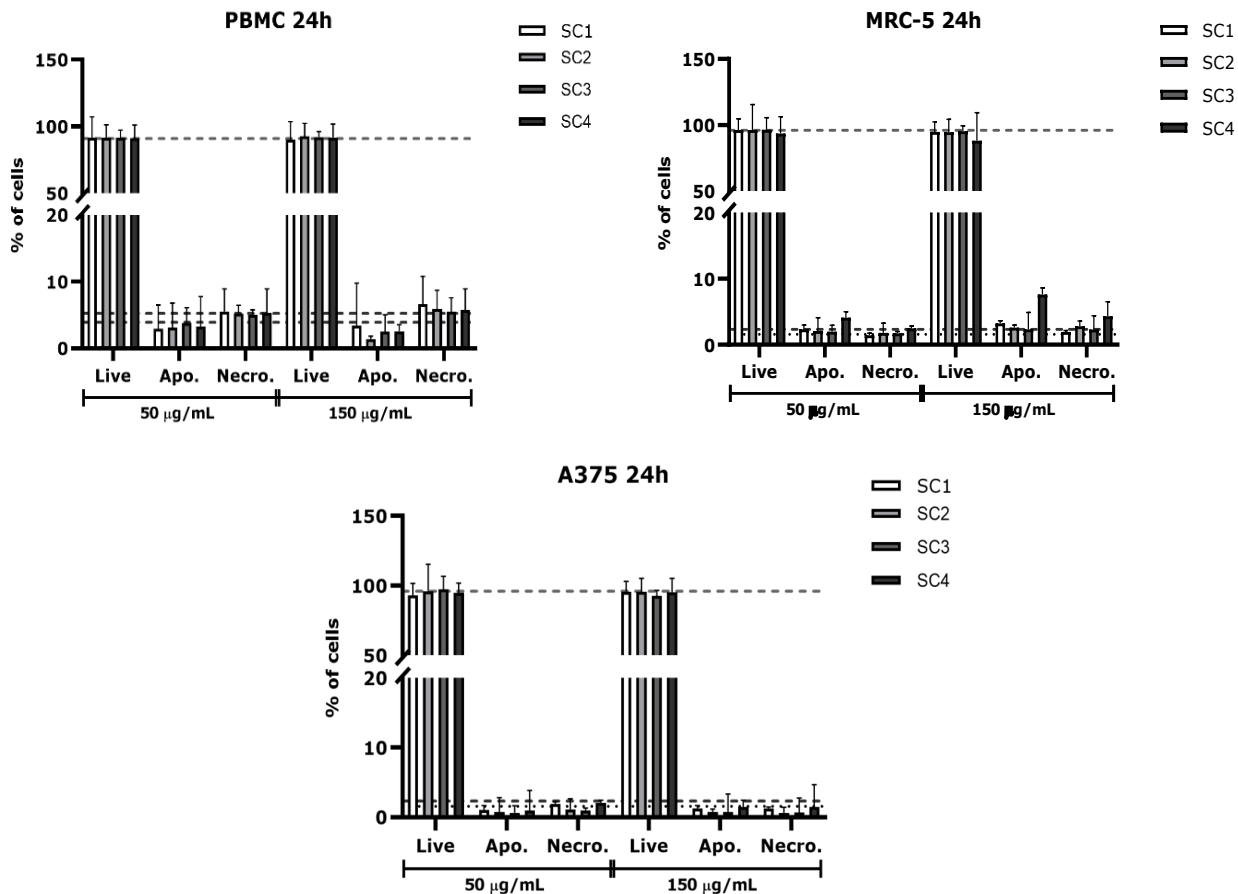


Figura 4.28 Risultati di Necrosi/Apoptosi dopo 24h di incubazione di diversi tipi di cellule con NP di Au e Au-Gd ricoperte con PEG da 800 Da.

In questo contesto, si evidenzia che nessuna delle NP ha significativamente ridotto la vitalità cellulare rispetto ai gruppi di controllo, se non a concentrazioni molto elevate di NP. Nei risultati relativi alle cellule PBMC, è stata osservata una maggiore propensione delle AuNP (SC1) ad aumentare la morte cellulare per necrosi. Nel caso delle cellule MRC-5, le NP di AuGd 25/75 (SC4) hanno mostrato un aumento percentuale di cellule morte, principalmente per apoptosi, soprattutto a concentrazioni molto elevate di NP (150 µg/mL). Per quanto riguarda le cellule A375, i valori di morte cellulare indotti dalle NP sono simili o inferiori rispetto ai gruppi di controllo.

#### 4.5.2.3 Assorbimento cellulare di NP

Per valutare l'internalizzazione delle NP di Au e Au-Gd, è stata analizzata l'intensità media della luce diffusa lateralmente (SSC) attraverso la citometria a flusso. L'incremento dell'SSC, che riflette la granularità cellulare o la complessità interna, è proporzionale all'internalizzazione, per concentrazioni di NP di 50 µg/mL, di rispetto alle cellule di controllo/non trattate. I dati sono presentati come istogrammi sovrapposti da un esperimento rappresentativo o come barre che indicano il *fold change* rispetto alle cellule di controllo/non trattate (Fig. 4.29, linea 1 tratteggiata).

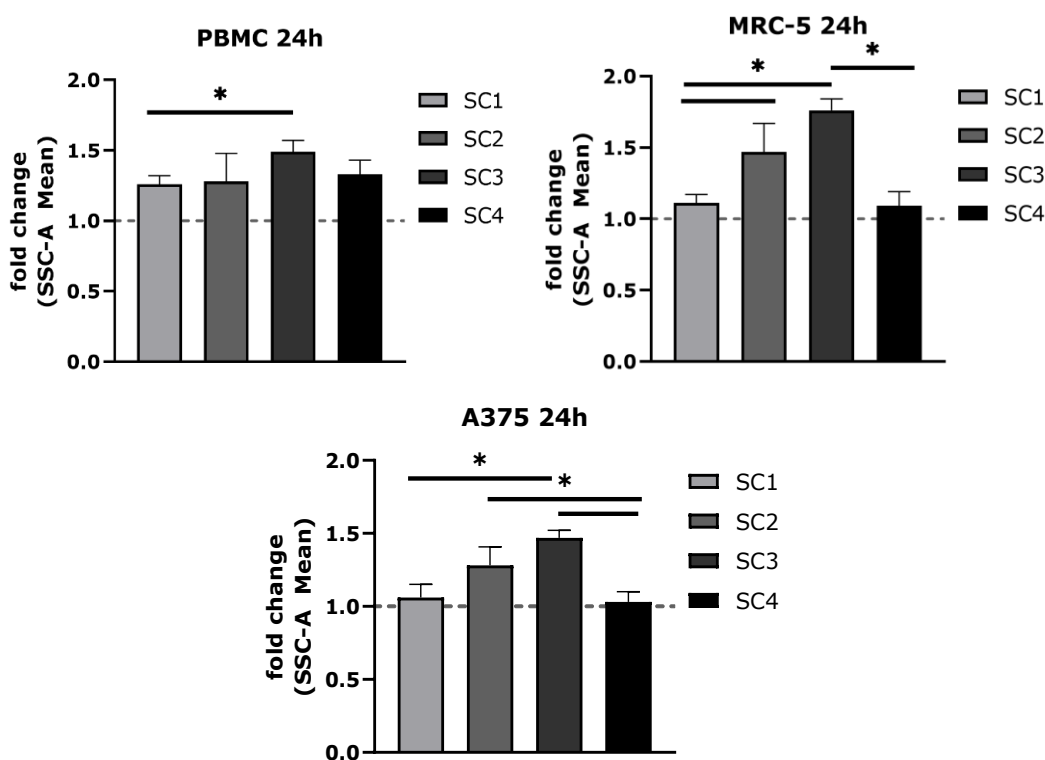


Figura 4.29 Risultati dell'internalizzazione cellulare delle NP di Au e AuGd dopo 24h di incubazione in diverse linee cellulari.

La maggiore internalizzazione è stata ottenuta per il campione SC3, relativo alle NP di AuGd 90/10. Ciò suggerisce che le NP sono state assorbite dalle cellule attraverso il processo di endocitosi. Tuttavia, è importante sottolineare che, in generale, l'internalizzazione è risultata meno efficiente rispetto a studi precedenti, presumibilmente a causa del PEG utilizzato per il rivestimento, caratterizzato da catene polimeriche eccessivamente lunghe che potrebbero limitare l'interazione delle NP con la membrana cellulare. Pertanto, ulteriori indagini sono necessarie per determinare se l'utilizzo di PEG con catene più corte possa favorire un maggiore assorbimento mediante endocitosi. Inoltre, è essenziale approfondire la

comprensione delle differenze tra i campioni di NP che inducono il maggiore assorbimento nel campione SC3 rispetto agli altri.

#### **4.6 Esperimenti di radioterapia a raggi X**

L'efficace assorbimento di raggi X da parte delle nanoparticelle di Au-Gd trova applicazione nella radiosensibilizzazione ai raggi X, operando nelle condizioni terapeutiche proprie della radioterapia (XRT), ovvero a dosi terapeutiche di fotoni X. La radiosensibilizzazione XRT mediante elementi ad alto numero atomico, come Au e Gd, sfrutta l'emissione di fotoelettroni, elettroni Compton e elettroni Auger dopo l'assorbimento di un fotone di raggi X. Questi tipi di radiazioni ionizzanti possono indurre apoptosi e necrosi cellulare attraverso il danno diretto al DNA o, più frequentemente, attraverso l'interazione con l'acqua per la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (*vedi Capitolo 2, paragrafo 2.3.*). La potenziale applicazione delle NP in XRT è stata valutata *in vitro* utilizzando un modello di cellula tumorale rappresentativo (PC3, metastasi ossee umane di adenocarcinoma prostatico di grado IV). Le cellule PC3 sono state selezionate per la loro notorietà e l'ampio utilizzo in studi XRT *in vitro*, sia in assenza di sensibilizzanti che in presenza di AuNP o altri nano-sensibilizzanti.<sup>7</sup> Al fine di investigare se le NP in questione possano migliorare l'efficacia della radioterapia mediante un aumento della radiosensibilizzazione delle cellule bersaglio, gli esperimenti sono stati condotti da parte della dottoressa Clara Maria Goncalves De Faria, membro del laboratorio di ricerca del Prof. Amendola distaccata presso l'Ospedale San Raffaele di Milano.

##### **4.6.1 Esperimenti di XRT *in vitro***

Per gli esperimenti di XRT *in vitro*, le cellule PC3 sono state seminate in triplicato a una densità di  $4 \times 10^3$  cellule per pozzetto e lasciate ad aderire durante la notte nell'incubatore. Successivamente, il terreno di coltura è stato rimosso e le nanoparticelle sono state incubate a una concentrazione di 50  $\mu\text{g/mL}$  in 100  $\mu\text{L}$  di terreno per pozzetto. Dopo 24 ore, il terreno contenente le NP è stato rimosso, le cellule sono state lavate accuratamente (tre volte) con una soluzione tampone salina (PBS). Subito dopo, le piastre sono state sottoposte a irradiazione. Dopo l'irradiazione, le cellule sono state staccate dalle piastre mediante tripsina, utilizzando un protocollo standard. Ciascuna condizione sperimentale è stata contata separatamente mediante un contatore automatico (BioRad T10 Automated Cell

Counter). Successivamente, ogni gruppo di cellule è stato seminato in triplicato a una densità di 500 cellule per pozzetto in una piastra da 6 pozzetti, utilizzando 6 mL di terreno per pozzetto. Dopo 8 giorni di incubazione, le piastre sono state codificate in modo anonimo e le colonie risultanti sono state colorate con una soluzione di crystal violet (0.1% crystal violet, 11% etanolo). Dopo 5 minuti, la soluzione colorante è stata rimossa, le lastre sono state risciacquate e lasciate asciugare a temperatura ambiente. Le colonie sono state quindi contate, e la frazione di sopravvivenza relativa è stata calcolata rispetto ai controlli negativi. L'intero processo è stato ripetuto in tre esperimenti indipendenti per garantire la robustezza delle osservazioni.

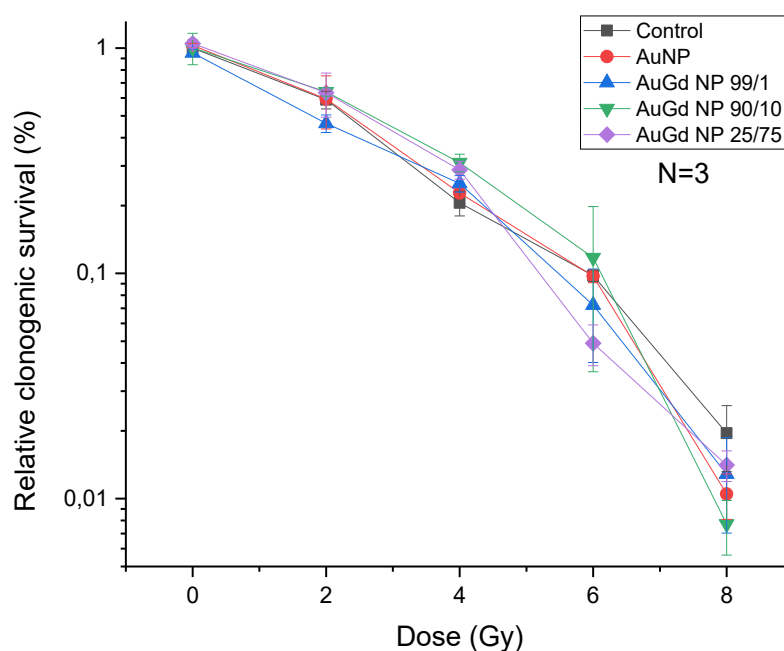


Figura 4.30 Esperimenti di sopravvivenza cellulare a dosi di radiazioni X nell'intervallo tra 0 e 8 Gy in cellule PC3 trattate con le NP di Au e Au-Gd, ricoperte con mPEG-SH 800 Da.

Nel grafico in figura 4.30 è riportata la sopravvivenza cellulare relativa (%) rispetto alla dose di irradiazione di raggi X, compresa nell'intervallo tra 0 e 8 Gy.

Complessivamente, in presenza di una dose cumulativa di radiazioni pari a 8 Gy, tutte le NP hanno contribuito a una modesta riduzione della frazione di sopravvivenza rispetto al controllo. I risultati evidenziano una maggiore capacità delle NP di Au-Gd 90/10 di agire come agenti sensibilizzanti, determinando una sopravvivenza cellulare relativa (a 8 Gy) di  $0.008 \pm 0.002$ , rispetto a  $0.02 \pm 0.01$  riscontrato nel campione di controllo. Date le barre di errore, le differenze tra AuNP e gli altri due campioni di

NP di AuGd, o il controllo stesso, risultano non significative e non indicano un aumento chiaro di efficacia nella radiosensibilizzazione.

#### **4.7 Sintesi di NP di Au e AuGd ricoperte con mPEG-SH 350 Da**

Dati i risultati degli esperimenti di XRT sulle nanoparticelle di AuGd funzionalizzate con l'mPEG-SH da 800 Da, e la concomitante indicazione di una scarsa internalizzazione delle NP nelle cellule, si è presa la decisione di sintetizzare la medesima tipologia di NP, variando tuttavia il rivestimento superficiale. In questo caso, il polimero utilizzato per il rivestimento è un mPEG-SH da 350 Da, un tipo di polietilenglicole più corto, il quale è generalmente associato a una migliore internalizzazione nelle cellule, una caratteristica auspicabile per un agente radiosensibilizzante.<sup>7</sup> Il polietilenglicole conferisce ai nanofarmaci la proprietà di risultare invisibili, ovvero queste catene polimeriche impediscono l'adsorbimento delle proteine opsoniniche, ostacolando il processo di riconoscimento e rimozione da parte del Sistema Reticoloendoteliale (RES). Questo comporta una maggiore permanenza delle NP in circolazione nel sangue, elemento cruciale per favorire il loro accumulo nei tessuti tumorali. Tuttavia, per favorire l'internalizzazione cellulare, che include processi come l'endocitosi, la fusione e la penetrazione diretta della membrana, è essenziale un'adeguata interazione delle nanoparticelle con la membrana cellulare. Lo strato stealth idrofilo derivante dal polietilenglicole indebolisce questa interazione, rallentando di conseguenza l'assorbimento cellulare delle NP. Pertanto, è necessario generare uno strato di PEG che rimanga stabile sulle NP durante la circolazione sanguigna, ma che possa essere rimosso nel sito extracellulare. La soluzione a questo problema può essere ottenuta utilizzando un PEG che presenti un equilibrio ottimale tra la catena idrofilica e quella idrofobica, in modo da poter essere rimosso in risposta a specifici stimoli come pH, agenti riducenti o enzimi.

Il *set-up* impiegato per la sintesi delle nanoparticelle è analogo a quello descritto per la sintesi delle NP precedenti, le quali erano ricoperte con l'mPEG-SH da 800 Da.

#### ***Sintesi NP di Au in etanolo (riferimento), AuGd 99/1, AuGd 90/10, AuGd 25/75***

Le procedure di sintesi, funzionalizzazione e purificazione sono le medesime per tutti e quattro i campioni di NP.

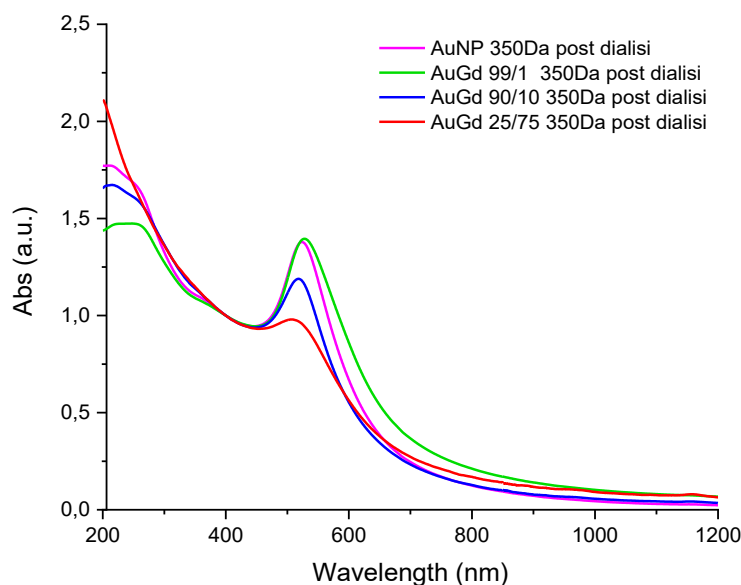


Le nanoparticelle sono state sintetizzate in 120 mL di etanolo (HPLC grade, Sigma-Aldrich) mediante ablazione di un target metallico (oro puro al 99.99 at%, Au/Gd 99/1 at%, Au/Gd 90/10 at%, Au/Gd 25/75 at%) (MaTecK) per una durata di circa un'ora e mezza. L'intera procedura è stata condotta sotto flusso costante di argon al fine di ridurre la formazione di specie ossidate.

Le NP ottenute sono state successivamente trattate nel seguente modo:

- Aggiunta in eccesso di mPEG-SH da 350 Da, seguita da ultrasonificazione;
- Riposo della soluzione colloidale durante la notte a temperatura ambiente;
- Concentrazione della soluzione di NP mediante l'utilizzo del *Rotavapor* a 30°C;
- Trattamento termico con EDTA (3 mg/mL, rapporto 1:1) a 60°C per 60 minuti, con agitazione magnetica;
- Dialisi delle NP per eliminare il solvente di sintesi, con quattro lavaggi a 550 RCF in centrifuga;
- Risospensione finale delle NP in 2 mL di acqua, seguita da un breve periodo di sonicazione.

In *figura 4.31* sono riportati gli spettri UV-Vis delle NP ottenute mediante sintesi LAL, normalizzati a 400 nm per un confronto semplificato.



*Figura 4.31 Spettri UV-Vis post dialisi delle NP ottenute dalla sintesi LAL, funzionalizzate con mPEG-SH da 350 Da.*

Come osservato per le NP ricoperte con mPEG-SH da 800 Da, in tutti e quattro i campioni è chiaramente identificabile la presenza della banda di assorbimento nella regione del visibile, derivante dalla risonanza plasmonica superficiale (SPR) delle AuNP. La banda è accompagnata dalla banda di assorbimento nella regione dell'UV vicino, attribuibile alle interazioni interbanda dei singoli elettroni nelle soluzioni solide metalliche. Nel caso delle AuNP, la posizione del picco plasmonico è a 523 nm, coerente con quella tipica delle AuNP sferiche. Per le NP di AuGd 99/1, il picco si posiziona a 528 nm, con un leggero ampliamento della banda a lunghezze d'onda maggiori, probabilmente causato da una leggera aggregazione delle particelle. L'intensità della LSPR e la lunghezza d'onda sono comunque molto simili, come osservato nelle NP precedentemente sintetizzate, indicando sostanzialmente similitudine nelle composizioni e dimensioni simili. Le NP di AuGd 90/10 evidenziano nuovamente un lieve *blue-shift* della LSPR a 518 nm, insieme a una minore intensità della banda, risultati associati alla presenza del gadolinio nella cella FCC dell'oro. Infine, per le NP di AuGd 25/75 si osserva ancora il maggiore smorzamento della LSPR e il maggiore *blue-shift* del picco, posizionato a 507 nm.

In conclusione, gli andamenti degli spettri di assorbimento UV-Visibile delle NP ricoperte con mPEG-SH da 350 Da sono simili e concordi con quelli riscontrati per le NP precedentemente sintetizzate. Questi risultati confermano ulteriormente la modifica del reticolo FCC dell'oro indotta dal gadolinio, suggerendo la probabile formazione della lega. Inoltre, la sostanziale riproducibilità del processo è evidenziata mantenendo invariati il *set-up* sperimentale della sintesi LAL e i successivi trattamenti di purificazione.

### **Esperimenti di XRT *in vitro***

Gli esperimenti di XRT *in vitro* per le NP di Au e AuGd ricoperte con mPEG-SH da 350 Da sono stati condotti mediante la medesima procedura descritta nella *sezione 4.4.3.1*. La concentrazione di NP utilizzate è di 50 µg/mL, e le misure sono state eseguite irradiando le cellule PC3 con dosi di irradiazione di raggi X comprese tra 0 e 8 Gy. Di seguito (*Fig. 4.32*) è riportato l'andamento della sopravvivenza cellulare relativa rispetto alla dose di radiazioni X.

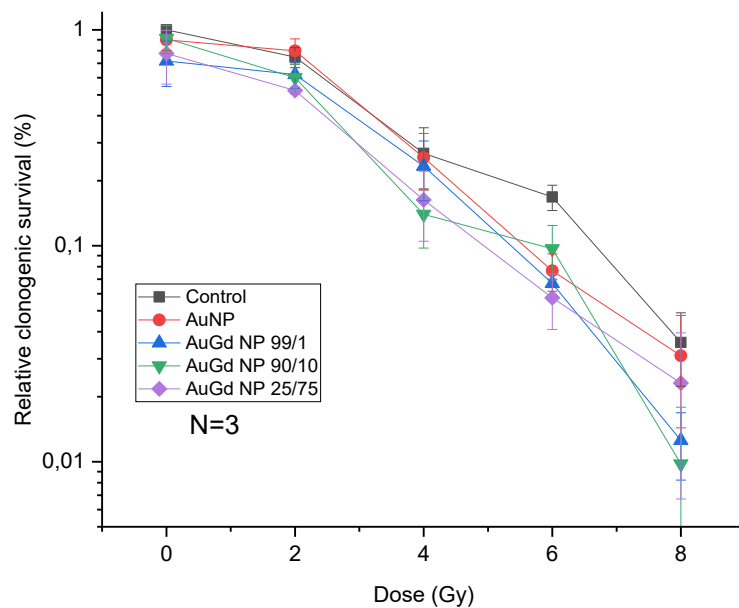


Figura 4.32 Esperimenti di sopravvivenza cellulare a 0 e 8 Gy in cellule PC3 trattate con le NP di Au e Au-Gd ricoperte con mPEG-SH 350 Da.

Come per le NP precedentemente analizzate, è emerso che il campione con un maggiore effetto di radiosensibilizzazione è quello di NP di Au-Gd 90/10. Quest'ultimo ha ridotto la sopravvivenza cellulare fino al valore di  $0.01 \pm 0.01$  alla dose di radiazioni di 8 Gy, in confronto al controllo che ha registrato un valori di  $0.04 \pm 0.01$ .

Diversamente dalle NP ricoperte con mPEG-SH da 800 Da, si è osservato in questo contesto un incremento dell'effetto radiosensibilizzante da parte delle NP di Au-Gd 99/1 e 25/75 rispetto alle AuNP.

## Conclusioni

La nanomedicina in ambito oncologico ha continuato a svilupparsi nel corso dei decenni; tuttavia, solo un numero limitato di nanoformulazioni ha finora ottenuto un successo clinico. Il problema principale è la mancanza di comprensione meccanicistica su come le nanostrutture interagiscono e influiscono sul corpo umano. Di conseguenza, molte nanoformulazioni alla fine hanno prestazioni inferiori o producono effetti collaterali inaspettati quando vengono tradotte da modelli animali a pazienti umani. Per un'efficace traduzione clinica, le proprietà fisico-chimiche dei nanofarmaci devono essere progettate in modo da bilanciare l'efficacia e la tossicità del trattamento. Lo sviluppo di nuovi vettori teranostici multifunzionali è fondamentale per ampliare la gamma di approcci terapeutici contro il cancro. Le nanotecnologie forniscono gli strumenti adatti per affrontare nuove sfide, come la combinazione di più tecniche di imaging, quali TC e MRI, con la radioterapia con raggi X. Tuttavia, la realizzazione su larga scala di questo tipo di nanomedicine è ancora molto impegnativa, soprattutto se si considera la riproducibilità, la sostenibilità ambientale e l'accessibilità dei costi del processo di sintesi.

Per affrontare questa sfida, in questo lavoro di tesi le NP in lega bimetallica di Au e Gd sono state sintetizzate a partire da una strategia di sintesi sempre più promettente, l'ablazione laser in liquido. Le NP di Au-Gd, essendo composte da una fase metastabile, sono difficili da ottenere sotto forma di dispersione colloidale mediante altre procedure di sintesi. Il percorso sintetico assistito da laser garantisce la sintesi di una vasta gamma di NM, grazie al fatto che opera in condizioni chimico-fisiche

lontane dall'equilibrio, permettendo di superare i limiti termodinamici di miscibilità. Inoltre, la sintesi LAL opera in condizioni di reazione ecosostenibili, semplici e veloci.

Le NP sono state rivestite con un polimero biocompatibile, ovvero il polietilenglicole tiolato (mPEG-SH), il quale ha conferito ottima stabilità colloidale e assicurato l'idoneità delle NP alle applicazioni biomediche.

Nonostante la difficoltà di rilevare il gadolinio all'interno della matrice di Au e la mancanza di informazioni sui sistemi Au-Gd su scala nanometrica, le analisi strutturali hanno rilevato la coesistenza di entrambi gli elementi all'interno delle NP di Au-Gd, che rappresenta una novità nel campo delle nanotecnologie. Mediante l'analisi di diffrazione XRD, è stato possibile verificare l'ottenimento della lega metastabile di Au-Gd, avente una struttura cristallina FCC dell'oro deformata dalla presenza del gadolinio come impurezza sostituzionale, difetto e/o dislocazione. Gli effetti della presenza del Gd nel reticolo cristallino dell'oro sono stati osservati negli spettri di assorbimento UV-Visibile delle NP. Infatti, confrontando gli spettri dei quattro diversi campioni di NP, si è potuto osservare lo smorzamento e il *blue-shift* della banda LSPR nelle leghe Au-Gd rispetto alle NP di Au puro. La natura dei due effetti risiede in una variazione della struttura elettronica nella lega dovuta alla presenza del gadolinio, oltre che all'influenza di fattori dimensionali.

Per confermare ulteriormente la presenza di entrambi i metalli nelle NP ottenute e determinare la composizione atomica percentuale, sono state condotte le analisi EDS e ICP-MS. Negli spettri EDS si sono osservate le transizioni caratteristiche del gadolinio, M e  $L\alpha$ , e quelle dell'oro, M e  $L\alpha$ , ed entrambe le tecniche hanno fornito valori di composizione percentuale simili. Il contenuto di gadolinio, però, è risultato significativamente inferiore rispetto alle aspettative, in particolare nelle NP AuGd 25/75, composte dal 4.2 at% di Gd (valore da ICP-MS). La discrepanza è presumibilmente dovuta al mancato controllo sulla composizione delle NP mediante la sintesi LAL. Tuttavia, il risultato indica il tipo di lega metastabile che è possibile ottenere tramite la procedura di sintesi LAL e di successiva purificazione, e che risulta essere priva di fasi di Gd ossidato, poco stabile e non biocompatibile. Le misure FTIR ed EDS hanno inoltre confermato l'efficace ricoprimento superficiale delle NP con mPEG-SH, mostrando nel caso dell'EDS un contenuto di ossigeno e

carbonio crescente al diminuire delle dimensioni dei campioni. Pertanto, è emerso che le NP di Au-Gd hanno mantenuto la vantaggiosa chimica superficiale con i composti tiolati delle AuNP. Infatti, le misure di diffusione dinamica della luce hanno indicato che il raggio idrodinamico delle NP di Au-Gd all'interno di soluzioni fisiologiche resta pressoché invariato nel tempo, indicando l'efficace stabilità delle NP in caso di utilizzo in vivo.

Per quanto riguarda le applicazioni teranostiche, le NP hanno dimostrato un promettente carattere come agenti di contrasto per  $T_2$  per l'imaging di risonanza magnetica, che è quanto atteso per NP contenenti Gd. In particolare, le NP di Au-Gd 90/10 hanno mostrato i valori più elevati di rilassività trasversale, pari a  $18.4 \pm 0.6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ . Le misure di tomografia computerizzata hanno confermato che le NP di Au-Gd hanno capacità di contrasto equivalenti alle NP di Au a concentrazioni simili.

I risultati dei test di biocompatibilità *in vitro*, effettuati sia presso l'Ospedale San Raffaele di Milano, sia presso l'Università di Belgrado, hanno indicato una citotossicità trascurabile nei confronti di diverse linee cellulari, mostrando una riduzione della vitalità cellulare solamente a concentrazioni molto elevate di NP. D'altra parte, l'efficacia dell'endocitosi cellulare/captazione di NP da parte delle cellule potrebbe influenzare i risultati, perché l'effetto della struttura delle NP sulla vitalità cellulare differisce in base ai tipi di cellule. I test di necrosi/apoptosi, utili per distinguere tra le popolazioni di cellule viventi e le popolazioni di cellule necrotiche e apoptotiche, hanno confermato la biocompatibilità osservata nei test di citotossicità appena citati. Infine, l'analisi dell'internalizzazione delle NP di Au e Au-Gd mediante citometria a flusso ha permesso di valutare la capacità di assorbimento cellulare di NP. I risultati hanno mostrato che le NP assorbite in maniera più efficace mediante endocitosi sono quelle di Au-Gd 90/10. Ciononostante, l'internalizzazione nel complesso è risultata poco efficiente presumibilmente a causa del PEG utilizzato per il ricoprimento, avente delle catene polimeriche troppo lunghe (mPEG-SH da 800 Da) che riducono l'interazione NP-membrana cellulare.

Per questa ragione sono state sintetizzate delle nuove NP di Au e Au-Gd, nelle stesse condizioni di LAL ma variando il ricoprimento superficiale usando un mPEG-SH da 350 Da che, essendo più corto, dovrebbe favorire un migliore assorbimento cellulare, con conseguente maggiore radiosensibilizzazione.

Il saggio clonogenico è ampiamente utilizzato per studiare il danno cellulare indotto dalle radiazioni in presenza delle NP. I nostri risultati hanno mostrato che le NP di Au-Gd 90/10 presentano la maggiore capacità di radiosensibilizzazione, sia nelle NP ricoperte con mPEG-SH da 800 Da, sia con mPEG-SH da 350 Da. Inoltre, le NP ricoperte con il polietilenglicole più corto hanno mostrato un maggior effetto sensibilizzante, in linea con le aspettative, e tutti e tre i campioni di nanolega risultano più radiosensibilizzanti rispetto alle NP di oro puro.

In prospettiva futura, sono utili ulteriori studi al fine di determinare le caratteristiche chimico-fisiche, quali morfologia, composizione e ricoprimento superficiale, e le proprietà funzionali idonee a rendere le NP di Au-Gd degli agenti teranostici ancora più efficienti.

Inoltre, le NP di Au-Gd possono essere facilmente funzionalizzate in superficie con anticorpi, peptidi o proteine, per il targeting attivo e l'internalizzazione cellulare, che sono cruciali per un'appropriata localizzazione intracellulare.

Pertanto, in prospettiva futura si prevede di bio-coniugare le NP di Au-Gd con anticorpi che riconoscono in maniera specifica antigeni presenti sulla superficie di particolari cellule tumorali e valutarne gli effetti per la teranostica del cancro.

## Bibliografia

- (1) Amendola, V.; Meneghetti, M. What Controls the Composition and the Structure of Nanomaterials Generated by Laser Ablation in Liquid Solution? *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (9), 3027–3046. <https://doi.org/10.1039/C2CP42895D>.
- (2) Amendola, V.; Amans, D.; Ishikawa, Y.; Koshizaki, N.; Scirè, S.; Compagnini, G.; Reichenberger, S.; Barcikowski, S. Room-Temperature Laser Synthesis in Liquid of Oxide, Metal-Oxide Core-Shells, and Doped Oxide Nanoparticles. *Chem. – A Eur. J.* **2020**, *26* (42), 9206–9242. <https://doi.org/10.1002/chem.202000686>.
- (3) Amendola, V.; Meneghetti, M. Laser Ablation Synthesis in Solution and Size Manipulation of Noble Metal Nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (20), 3805. <https://doi.org/10.1039/b900654k>.
- (4) Scaramuzza, S.; Agnoli, S.; Amendola, V. Metastable Alloy Nanoparticles, Metal-Oxide Nanocrescents and Nanoshells Generated by Laser Ablation in Liquid Solution: Influence of the Chemical Environment on Structure and Composition. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (42), 28076–28087. <https://doi.org/10.1039/C5CP00279F>.
- (5) Amendola, V. Laser-Assisted Synthesis of Non-Equilibrium Nanoalloys. *ChemPhysChem* **2021**, *22* (7), 622–624. <https://doi.org/10.1002/cphc.202000987>.
- (6) Lin, Z.; Yue, J.; Liang, L.; Tang, B.; Liu, B.; Ren, L.; Li, Y.; Jiang, L. Rapid Synthesis of Metallic and Alloy Micro/Nanoparticles by Laser Ablation towards Water. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *504*, 144461. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144461>.
- (7) Scaramuzza, S.; de Faria, C. M. G.; Coviello, V.; Forrer, D.; Artiglia, L.; Badocco, D.; Pastore, P.; Ghigna, P.; Postuma, I.; Cansolino, L.; Ferrari, C.; Bortolussi, S.; Vago, R.; Spinelli, A. E.; Bekić, M.; Čolić, M.; Amendola, V. A Laser Synthesis Route to Boron-Doped Gold Nanoparticles Designed for X-Ray Radiotherapy and Boron Neutron Capture Therapy Assisted by CT Imaging. *Adv. Funct. Mater.* **2023**, *33* (42). <https://doi.org/10.1002/adfm.202303366>.



- (8) Rojas-Aguirre, Y.; Aguado-Castrejón, K.; González-Méndez, I. La Nanomedicina y Los Sistemas de Liberación de Fármacos: ¿la (r)Evolución de La Terapia Contra El Cáncer? *Educ. Química* **2016**, *27* (4), 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>.
- (9) Varadan, V. K.; Chen, L.; Xie, J. *Nanomedicine*; Wiley, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470715611>.
- (10) Lee, D.-E.; Koo, H.; Sun, I.-C.; Ryu, J. H.; Kim, K.; Kwon, I. C. Multifunctional Nanoparticles for Multimodal Imaging and Theragnosis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2656–2672. <https://doi.org/10.1039/C2CS15261D>.
- (11) Li, S.-D.; Huang, L. Pharmacokinetics and Biodistribution of Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, *5* (4), 496–504. <https://doi.org/10.1021/mp800049w>.
- (12) Han, X.; Xu, K.; Taratula, O.; Farsad, K. Applications of Nanoparticles in Biomedical Imaging. *Nanoscale* **2019**, *11* (3), 799–819. <https://doi.org/10.1039/C8NR07769J>.
- (13) Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G. The Effect of Nanoparticle Size on in Vivo Pharmacokinetics and Cellular Interaction. *Nanomedicine* **2016**, *11* (6), 673–692. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.5>.
- (14) Fass, L. Imaging and Cancer: A Review. *Mol. Oncol.* **2008**, *2* (2), 115–152. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2008.04.001>.
- (15) Kim, D.; Kim, J.; Park, Y. Il; Lee, N.; Hyeon, T. Recent Development of Inorganic Nanoparticles for Biomedical Imaging. *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4* (3), 324–336. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00574>.
- (16) Wolbarst, A. B.; Capasso, P.; Wyant, A. R. *Medical Imaging*; Wiley, 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118480267>.
- (17) Popovtzer, R.; Agrawal, A.; Kotov, N. A.; Popovtzer, A.; Balter, J.; Carey, T. E.; Kopelman, R. Targeted Gold Nanoparticles Enable Molecular CT Imaging of Cancer. *Nano Lett.* **2008**, *8* (12), 4593–4596. <https://doi.org/10.1021/nl8029114>.
- (18) Rabin, O.; Manuel Perez, J.; Grimm, J.; Wojtkiewicz, G.; Weissleder, R. An X-Ray Computed Tomography Imaging Agent Based on Long-Circulating Bismuth

- Sulphide Nanoparticles. *Nat. Mater.* **2006**, *5* (2), 118–122. <https://doi.org/10.1038/nmat1571>.
- (19) Aime, S.; Castelli, D. D.; Crich, S. G.; Gianolio, E.; Terreno, E. Pushing the Sensitivity Envelope of Lanthanide-Based Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents for Molecular Imaging Applications. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (7), 822–831. <https://doi.org/10.1021/ar800192p>.
- (20) Atkins, P.; de Paula, J. *Chimica Fisica*, Quinta edi.; Zanichelli editore S.p.A., Ed.; 2012.
- (21) Padhani, A. R. Dynamic Contrast-enhanced MRI in Clinical Oncology: Current Status and Future Directions. *J. Magn. Reson. Imaging* **2002**, *16* (4), 407–422. <https://doi.org/10.1002/jmri.10176>.
- (22) Wai-Yan Chan, K.; Barra, S.; Botta, M.; Wong, W.-T. Novel Gadolinium(III) Polyaminocarboxylate Macrocyclic Complexes as Potential Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98* (5), 677–682. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.02.008>.
- (23) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2293–2352. <https://doi.org/10.1021/cr980440x>.
- (24) Jeon, M.; Halbert, M. V.; Stephen, Z. R.; Zhang, M. Iron Oxide Nanoparticles as T<sub>1</sub> Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: Fundamentals, Challenges, Applications, and Prospectives. *Adv. Mater.* **2021**, *33* (23). <https://doi.org/10.1002/adma.201906539>.
- (25) Briley-Saebo, K. C.; Geninatti-Crich, S.; Cormode, D. P.; Barazza, A.; Mulder, W. J. M.; Chen, W.; Giovenzana, G. B.; Fisher, E. A.; Aime, S.; Fayad, Z. A. High-Relaxivity Gadolinium-Modified High-Density Lipoproteins as Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (18), 6283–6289. <https://doi.org/10.1021/jp8108286>.
- (26) Penfield, J. G.; Reilly, R. F. What Nephrologists Need to Know about Gadolinium. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **2007**, *3* (12), 654–668. <https://doi.org/10.1038/ncpneph0660>.

- (27) Murata, N.; Gonzalez-Cuyar, L. F.; Murata, K.; Fligner, C.; Dills, R.; Hippe, D.; Maravilla, K. R. Macrocyclic and Other Non-Group 1 Gadolinium Contrast Agents Deposit Low Levels of Gadolinium in Brain and Bone Tissue: Preliminary Results From 9 Patients With Normal Renal Function. *Invest. Radiol.* **2016**, *51* (7), 447–453. <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000252>.
- (28) Kim, J.; Piao, Y.; Hyeon, T. Multifunctional Nanostructured Materials for Multimodal Imaging, and Simultaneous Imaging and Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 372–390. <https://doi.org/10.1039/B709883A>.
- (29) Kim, J.; Kim, H. S.; Lee, N.; Kim, T.; Kim, H.; Yu, T.; Song, I. C.; Moon, W. K.; Hyeon, T. Multifunctional Uniform Nanoparticles Composed of a Magnetite Nanocrystal Core and a Mesoporous Silica Shell for Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging and for Drug Delivery. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47* (44), 8438–8441. <https://doi.org/10.1002/anie.200802469>.
- (30) Debouttière, P. -J.; Roux, S.; Vocanson, F.; Billotey, C.; Beuf, O.; Favre-Réguillon, A.; Lin, Y.; Pellet-Rostaing, S.; Lamartine, R.; Perriat, P.; Tillement, O. Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16* (18), 2330–2339. <https://doi.org/10.1002/adfm.200600242>.
- (31) Bjørnerud, A.; Johansson, L. The Utility of Superparamagnetic Contrast Agents in MRI: Theoretical Consideration and Applications in the Cardiovascular System. *NMR Biomed.* **2004**, *17* (7), 465–477. <https://doi.org/10.1002/nbm.904>.
- (32) Thomas, R.; Park, I.-K.; Jeong, Y. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Multimodal Imaging and Therapy of Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (8), 15910–15930. <https://doi.org/10.3390/ijms140815910>.
- (33) Amendola, V.; Scaramuzza, S.; Litti, L.; Meneghetti, M.; Zuccolotto, G.; Rosato, A.; Nicolato, E.; Marzola, P.; Fracasso, G.; Anselmi, C.; Pinto, M.; Colombatti, M. Magneto-Plasmonic Au-Fe Alloy Nanoparticles Designed for Multimodal SERS-MRI-CT Imaging. *Small* **2014**, *10* (12), 2476–2486. <https://doi.org/10.1002/sml.201303372>.
- (34) Kircher, M. F.; de la Zerda, A.; Jokerst, J. V.; Zavaleta, C. L.; Kempen, P. J.; Mittra, E.; Pitter, K.; Huang, R.; Campos, C.; Habte, F.; Sinclair, R.; Brennan, C. W.;

- Mellinghoff, I. K.; Holland, E. C.; Gambhir, S. S. A Brain Tumor Molecular Imaging Strategy Using a New Triple-Modality MRI-Photoacoustic-Raman Nanoparticle. *Nat. Med.* **2012**, *18* (5), 829–834. <https://doi.org/10.1038/nm.2721>.
- (35) Elsabahy, M.; Wooley, K. L. Design of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Delivery Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2545. <https://doi.org/10.1039/c2cs15327k>.
- (36) Janib, S. M.; Moses, A. S.; MacKay, J. A. Imaging and Drug Delivery Using Theranostic Nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (11), 1052–1063. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.004>.
- (37) Torresan, V.; Guadagnini, A.; Badocco, D.; Pastore, P.; Muñoz Medina, G. A.; Fernández van Raap, M. B.; Postuma, I.; Bortolussi, S.; Bekić, M.; Čolić, M.; Gerosa, M.; Busato, A.; Marzola, P.; Amendola, V. Biocompatible Iron–Boron Nanoparticles Designed for Neutron Capture Therapy Guided by Magnetic Resonance Imaging. *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10* (6). <https://doi.org/10.1002/adhm.202001632>.
- (38) Haume, K.; Rosa, S.; Grellet, S.; Śmiałek, M. A.; Butterworth, K. T.; Solov'yov, A. V.; Prise, K. M.; Golding, J.; Mason, N. J. Gold Nanoparticles for Cancer Radiotherapy: A Review. *Cancer Nanotechnol.* **2016**, *7* (1), 8. <https://doi.org/10.1186/s12645-016-0021-x>.
- (39) Laprise-Pelletier, M.; Simão, T.; Fortin, M. Gold Nanoparticles in Radiotherapy and Recent Progress in Nanobrachytherapy. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7* (16). <https://doi.org/10.1002/adhm.201701460>.
- (40) McMahon, S. J.; Paganetti, H.; Prise, K. M. Optimising Element Choice for Nanoparticle Radiosensitisers. *Nanoscale* **2016**, *8* (1), 581–589. <https://doi.org/10.1039/C5NR07089A>.
- (41) Chen, Q.; Chen, J.; Zhang, Q.; Yang, P.; Gu, R.; Ren, H.; Dai, Y.; Huang, S.; Wu, J.; Wu, X.; Hu, Y.; Yuan, A. Combining High-Z Sensitized Radiotherapy with CD73 Blockade to Boost Tumor Immunotherapy. *ACS Nano* **2023**, *17* (13), 12087–12100. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c11403>.
- (42) Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A. M.; Goldsmith, E. C.; Baxter, S. C. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular

- Imaging. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (12), 1721–1730. <https://doi.org/10.1021/ar800035u>.
- (43) Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Poly(Ethylene Glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49* (36), 6288–6308. <https://doi.org/10.1002/anie.200902672>.
- (44) Jokerst, J. V.; Lobovkina, T.; Zare, R. N.; Gambhir, S. S. Nanoparticle PEGylation for Imaging and Therapy. *Nanomedicine* **2011**, *6* (4), 715–728. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.19>.
- (45) Fernández-López, C.; Mateo-Mateo, C.; Álvarez-Puebla, R. A.; Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M. Highly Controlled Silica Coating of PEG-Capped Metal Nanoparticles and Preparation of SERS-Encoded Particles. *Langmuir* **2009**, *25* (24), 13894–13899. <https://doi.org/10.1021/la9016454>.
- (46) Tiwari, P.; Vig, K.; Dennis, V.; Singh, S. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials* **2011**, *1* (1), 31–63. <https://doi.org/10.3390/nano1010031>.
- (47) Nikazar, S.; Barani, M.; Rahdar, A.; Zoghi, M.; Kyzas, G. Z. Photo- and Magnetothermally Responsive Nanomaterials for Therapy, Controlled Drug Delivery and Imaging Applications. *ChemistrySelect* **2020**, *5* (40), 12590–12609. <https://doi.org/10.1002/slct.202002978>.
- (48) Bogart, L. K.; Pourroy, G.; Murphy, C. J.; Puentes, V.; Pellegrino, T.; Rosenblum, D.; Peer, D.; Lévy, R. Nanoparticles for Imaging, Sensing, and Therapeutic Intervention. *ACS Nano* **2014**, *8* (4), 3107–3122. <https://doi.org/10.1021/nn500962q>.
- (49) Hendel, T.; Wuthschick, M.; Kettemann, F.; Birnbaum, A.; Rademann, K.; Polte, J. In Situ Determination of Colloidal Gold Concentrations with UV–Vis Spectroscopy: Limitations and Perspectives. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (22), 11115–11124. <https://doi.org/10.1021/ac502053s>.
- (50) Amendola, V.; Pilot, R.; Frasconi, M.; Maragò, O. M.; Iati, M. A. Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles: A Review. *J. Phys. Condens. Matter* **2017**, *29* (20), 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.

- (51) Berthomieu, C.; Hienerwadel, R. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Photosynth. Res.* **2009**, *101* (2–3), 157–170. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>.
- (52) Gerwert, K.; Kötting, C. Fourier Transform Infrared ( <sc>FTIR</Sc> ) Spectroscopy. In *Encyclopedia of Life Sciences*; Wiley, 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003112.pub2>.
- (53) Malatesta, M. Transmission Electron Microscopy for Nanomedicine: Novel Applications for Long-Established Techniques. *Eur. J. Histochem.* **2016**, *60* (4). <https://doi.org/10.4081/ejh.2016.2751>.
- (54) Goodhew, P. General Introduction to Transmission Electron Microscopy (TEM). In *Aberration-Corrected Analytical Transmission Electron Microscopy*; Wiley, 2011; pp 1–19. <https://doi.org/10.1002/9781119978848.ch1>.
- (55) Nasrazadani, S.; Hassani, S. Modern Analytical Techniques in Failure Analysis of Aerospace, Chemical, and Oil and Gas Industries. In *Handbook of Materials Failure Analysis with Case Studies from the Oil and Gas Industry*; Elsevier, 2016; pp 39–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100117-2.00010-8>.
- (56) Newbury\*, D. E.; Ritchie, N. W. M. Is Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive <sc>X</Sc> -ray Spectrometry ( <sc>SEM</Sc> / <sc>EDS</Sc> ) Quantitative? *Scanning* **2013**, *35* (3), 141–168. <https://doi.org/10.1002/sca.21041>.
- (57) *No* *Title.*  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Physical\\_Methods\\_in\\_Chemistry\\_and\\_Nano\\_Science\\_\(Barron\)/01%3A\\_Elemental\\_Analysis/1.12%3A\\_An\\_Introduction\\_to\\_Energy\\_Dispersive\\_X-ray\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/01%3A_Elemental_Analysis/1.12%3A_An_Introduction_to_Energy_Dispersive_X-ray_Spectroscopy).
- (58) Laborda, F.; Bolea, E.; Jiménez-Lamana, J. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (5), 2270–2278. <https://doi.org/10.1021/ac402980q>.
- (59) Allabashi, R.; Stach, W.; de la Escosura-Muñiz, A.; Liste-Calleja, L.; Merkoçi, A. ICP-MS: A Powerful Technique for Quantitative Determination of Gold Nanoparticles without Previous Dissolving. *J. Nanoparticle Res.* **2009**, *11* (8), 2003–

2011. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9561-2>.
- (60) Giannini, C.; Ladisa, M.; Altamura, D.; Siliqi, D.; Sibillano, T.; De Caro, L. X-Ray Diffraction: A Powerful Technique for the Multiple-Length-Scale Structural Analysis of Nanomaterials. *Crystals* **2016**, *6* (8), 87. <https://doi.org/10.3390/cryst6080087>.
- (61) Evans, J. S. O.; Evans, I. R. Structure Analysis from Powder Diffraction Data: Rietveld Refinement in Excel. *J. Chem. Educ.* **2021**, *98* (2), 495–505. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c01016>.
- (62) Falke, S.; Betzel, C. Dynamic Light Scattering (DLS); 2019; pp 173–193. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9_6).
- (63) Amendola, V.; Guadagnini, A.; Agnoli, S.; Badocco, D.; Pastore, P.; Fracasso, G.; Gerosa, M.; Vurro, F.; Busato, A.; Marzola, P. Polymer-Coated Silver-Iron Nanoparticles as Efficient and Biodegradable MRI Contrast Agents. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *596*, 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.03.096>.
- (64) Alexander, D. T. L.; Forrer, D.; Rossi, E.; Lidorikis, E.; Agnoli, S.; Bernasconi, G. D.; Butet, J.; Martin, O. J. F.; Amendola, V. Electronic Structure-Dependent Surface Plasmon Resonance in Single Au–Fe Nanoalloys. *Nano Lett.* **2019**, *19* (8), 5754–5761. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02396>.
- (65) Guadagnini, A.; Agnoli, S.; Badocco, D.; Pastore, P.; Coral, D.; Fernández van Raap, M. B.; Forrer, D.; Amendola, V. Facile Synthesis by Laser Ablation in Liquid of Nonequilibrium Cobalt-Silver Nanoparticles with Magnetic and Plasmonic Properties. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *585*, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.11.089>.
- (66) Massoumi, B.; Abbasian, M.; Jahanban-Esfahlan, R.; Motamedi, S.; Samadian, H.; Rezaei, A.; Derakhshankhah, H.; Farnudiyani-Habibi, A.; Jaymand, M. PEGylated Hollow PH-responsive Polymeric Nanocapsules for Controlled Drug Delivery. *Polym. Int.* **2020**, *69* (5), 519–527. <https://doi.org/10.1002/pi.5987>.
- (67) *Energy Table for EDS Analyses*. <http://www.jeol.com/>.
- (68) Jadhav, S. V.; Shewale, P. S.; Shin, B. C.; Patil, M. P.; Kim, G. D.; Rokade, A. A.;

- Park, S. S.; Bohara, R. A.; Yu, Y. S. Study of Structural and Magnetic Properties and Heat Induction of Gadolinium-Substituted Manganese Zinc Ferrite Nanoparticles for in Vitro Magnetic Fluid Hyperthermia. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *541*, 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.01.063>.
- (69) Soares, S.; Faria, I.; Aires, F.; Monteiro, A.; Pinto, G.; Sales, M. G.; Correa-Duarte, M. A.; Guerreiro, S. G.; Fernandes, R. Application of Gold Nanoparticles as Radiosensitizer for Metastatic Prostate Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (4), 4122. <https://doi.org/10.3390/ijms24044122>.





## **Ringraziamenti**

Desidero esprimere la mia gratitudine al Prof. Vincenzo Amendola, il quale mi ha offerto l'opportunità di partecipare a questo progetto di tesi magistrale nel suo laboratorio di ricerca LASP, introducendomi al campo delle nanotecnologie. La dedizione con cui il Prof. Amendola affronta il suo lavoro quotidiano è stata una fonte ispiratrice, e ho potuto constatarne la solidità nel corso di questi mesi di tirocinio. Lo ringrazio per le esperienze che mi ha permesso di fare, a partire dagli esperimenti presso l'Università di Verona, fino ai laboratori di ricerca presso l'Ospedale San Raffaele di Milano. Sono grata al professore di aver svolto la mia tesi di ricerca nel suo laboratorio e di aver dato un contributo a quello che è il suo lavoro.

Ringrazio fortemente Vito Coviello e Michael Bissoli, che mi hanno aiutato nello svolgimento delle attività di laboratorio, dandomi consigli davvero utili, e facendomi sentire in una famiglia fin dal primo giorno in cui ho messo piede nel laboratorio LASP. Grazie, senza di voi questa esperienza non sarebbe stata la stessa.

Con profonda gratitudine, desidero ringraziare voi, Mamma e Papà, i veri pilastri della mia vita. Siete le persone che hanno sostenuto ogni mia decisione, che hanno creduto in me e nelle mie capacità anche quando non riuscivo a farlo io stessa. La vostra presenza costante, nei momenti belli e in quelli difficili, mi dà la forza e la motivazione necessarie per dare sempre il massimo. Spero di potervi rendere sempre fieri e di restituirvi tutto ciò che avete fatto per me.

Cara Alessia, sei la migliore sorella che avrei potuto desiderare. La tua fiducia in me è stata incondizionata, hai sempre creduto nelle mie capacità. So che posso contare

su di te e Nicolò in qualsiasi momento e sono grata di avere delle persone come voi nella mia vita. Vi voglio molto bene.

Voglio ringraziare te, Tommaso, che nonostante sei entrato da poco nella mia vita hai già saputo stravolgermela. Grazie, che negli ultimi mesi della mia Laurea Magistrale, periodo più difficile e stressante in assoluto, hai saputo far splendere sempre il sole. Mi hai sempre regalato gioia, fatto dimenticare le paure, mi hai fatto credere in me ancora di più e mi hai fatto capire quanto non ci si deve accontentare nella vita. Grazie di essere così speciale, grazie per tutto quello che fai per me ogni giorno e sono felice di poter condividere questo momento importante con te oggi.

Un grazie speciale va ai miei cari compagni di corso, i chimici Tommy, Zamp e Lissa, che hanno reso la mia esperienza universitaria unica e più piacevole. Custodirò per sempre nel mio cuore tutti gli aperitivi ai Giardini dell'Arena, le sessioni di studio condivise, i viaggi in treno verso Padova, le cene al Decasa e tutte le avventure che abbiamo vissuto insieme. Grazie per aver sempre saputo regalarmi un sorriso. Vi voglio bene.

Un ringraziamento speciale va al mio adorabile cagnolino Pablo, compagno instancabile durante tutte le sessioni e le giornate trascorse chiusa in casa a studiare. Con il suo affetto sincero e le coccole, ha reso ogni momento più leggero e confortante. Pablo, sei l'amico peloso più fedele che si possa desiderare.

Ringrazio in modo speciale i miei zii e tutta la mia famiglia. Ognuno di voi, in maniera diversa, ha contribuito a farmi sentire sempre supportata e mai sola. Siete e rimarrete il porto sicuro della mia vita.

Infine, vorrei ringraziare anche me stessa per essere giunta fino a questo punto oggi. Nonostante i momenti più difficili, durante i quali ho dubitato di farcela, ringrazio la mia determinazione e l'incessante richiesta di eccellenza che mi impongo, che mi permette di fare sempre del mio meglio. Posso finalmente affermare con orgoglio di aver completato questo percorso, che porterò sempre nel cuore, ansiosa di intraprendere il prossimo nuovo ed emozionante capitolo della mia vita.