

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Tesi di Laurea Magistrale

Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle magnetoplasmoniche per applicazioni biomediche



Relatore:

Prof.ssa Enrica Verné

Correlatore:

Dott.ssa Marta Miola

Candidato:

Tiziano li Quadri

Luglio 2019

Indice

Ringraziamenti	v
Premessa	vi
1. Nanotecnologia e nanomateriali	
1.1 Introduzione	1
1.2 Classificazione dei nanomateriali	2
1.3 Strategie generali di sintesi	4
1.4 Campi di applicazione	5
2. Nanoparticelle magnetiche	
2.1 Introduzione	8
2.2 Nanoparticelle di ossido di ferro	10
2.3 Metodi di fabbricazione	12
2.3.1 Co-precipitazione	13
2.3.2 Decomposizione termica	14
2.3.3 Microemulsione	15
2.3.4 Sintesi idrotermale	16
2.4 Stabilizzazione e funzionalizzazione superficiale	18
2.4.1 Rivestimenti organici	19
2.4.2 Rivestimenti inorganici	22

3. Biodistribuzione, farmacocinetica, biodegradazione e tossicità

3.1	Introduzione	25
3.1.1	<i>Clearance</i> attraverso il sistema reticoloendoteliale	26
3.1.2	<i>Clearance</i> renale	27
3.2	<i>Targeting</i> tumorale	28
3.2.1	<i>Targeting</i> passivo	28
3.2.2	<i>Targeting</i> attivo	29
3.3	Parametri di interesse	31
3.4	Biodegradazione e tossicità	34

4. Proprietà magnetiche e ipertermia

4.1	Introduzione	36
4.2	Classificazione dei materiali magnetici	38
4.3	Curve di magnetizzazione	39
4.4	Trattamenti ipertermici	42
4.4.1	Ipertermia convenzionale	42
4.4.2	Ipertermia magnetica	43
4.5	Meccanismi di generazione del calore	44
4.5.1	Perdite per isteresi	44
4.5.2	Perdite residue	45
4.5.3	SAR	47
4.6	Ipertermia e morte cellulare	48

5. Nanoparticelle magnetoplasmoniche

5.1	Introduzione	51
5.2	Risonanza plasmonica di superficie localizzata	52
5.3	Terapia fototermica	53
5.4	Nanocompositi	55

6. Materiali e metodi

6.1 Introduzione	58
6.2 Preparazione di nanoparticelle magnetoplasmoniche: <i>Metodo 1</i>	60
6.3 Preparazione di nanoparticelle magnetoplasmoniche: <i>Metodo 2</i>	65
6.4 Tecniche di caratterizzazione	67

7. Risultati e discussione

7.1 Dimensione e morfologia	73
7.2 Analisi strutturale e composizionale	83
7.3 Caratterizzazione termica	90
7.4 Proprietà ottiche	92

8. Conclusioni

Bibliografia

Ringraziamenti

Vorrei innanzitutto ringraziare la professoressa Enrica Verné, relatore di questa tesi di laurea, per aver reso possibile l'intero lavoro e per essersi sempre dimostrata disponibile e comprensiva sin dal percorso di studi.

Ci tengo poi a ringraziare la dottoressa Marta Miola per le indicazioni e l'aiuto fornito per la stesura della tesi.

Un grande ringraziamento va a Cristina Multari, pronta a darmi una mano in ogni momento durante le attività di laboratorio e per l'immensa pazienza e gentilezza dimostrata nei miei confronti.

Un ringraziamento speciale va a mia madre e mio padre che mi hanno sostenuto sia moralmente che economicamente in questi lunghi anni, ai miei fratelli e, in generale, a chi ha sempre creduto in me e mi è stato vicino.

Dedico questo lavoro di tesi a mia nonna Tonina, venuta a mancare due mesi fa, che mi ha sempre incoraggiato e voluto un grandissimo bene e che avrò reso sicuramente soddisfatta in questo giorno speciale.

Occuperei per sempre un pezzo del mio cuore.

Premessa

L'attività di tesi svolta presso il Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT) del Politecnico di Torino consiste nella preparazione e caratterizzazione di nanoparticelle magnetoplasmoniche potenzialmente utilizzabili *in vivo* per teranostica.

L'idea alla base del lavoro è quella di realizzare nanostrutture magnetoplasmoniche composte da nanoparticelle di magnetite, sintetizzate tramite co-precipitazione di sali di ferro in soluzione acquosa, e nanoparticelle di argento od oro, ridotte direttamente, tramite l'acido tannico, sulla superficie delle nanostrutture magnetiche, al fine di ottenere un'unica particella composta che integri nella sua struttura le caratteristiche peculiari delle singole formulazioni.

Applicando un campo magnetico e sfruttando le proprietà superparamagnetiche dell'unità di magnetite, è possibile manipolare dall'esterno le nanoparticelle magnetoplasmoniche ottenute e veicarle verso il microambiente tumorale, diminuendone l'assorbimento in organi o tessuti sani.

Una volta garantito un accumulo efficace nel sito di interesse, al fine di distruggere le cellule cancerose si può utilizzare la terapia fototermica plasmonica sulle particelle metalliche nel caso di tumori superficiali, o l'ipertermia magnetica per trattare tumori più profondi; nel secondo caso, la presenza dell'unità di argento o di oro può essere sfruttata per garantire antibattericità o per la funzionalizzazione con biomolecole.

Rispetto a terapie termiche convenzionali, in questo modo si va direttamente a incorporare la fonte di riscaldamento all'interno dell'ambiente tumorale, rendendo il trattamento più specifico, dal momento che il calore va a danneggiare esclusivamente le cellule cancerose.

Nella prima parte della tesi vengono fornite informazioni riguardo la nanotecnologia e i nanomateriali (capitolo 1), le nanoparticelle magnetiche (capitolo 2), la biodistribuzione, la farmacocinetica, la biodegradazione e la tossicità (capitolo 3), le proprietà magnetiche e l'ipertermia (capitolo 4), le nanostrutture di argento e oro e le nanoparticelle magnetoplasmoniche (capitolo 5).

La seconda parte presenta, invece, i due diversi metodi di sintesi utilizzati per ottenere i nanocompositi e le tecniche di caratterizzazione adoperate (capitolo 6), i risultati ottenuti e la loro discussione (capitolo 7), le conclusioni (capitolo 8) e, infine, i riferimenti bibliografici utilizzati.

Capitolo 1

Nanotecnologia e nanomateriali

1.1 Introduzione [1,2]

La nanotecnologia è il termine utilizzato per descrivere le aree della scienza e dell'ingegneria in cui i fenomeni che si verificano su scala dimensionale dell'ordine del nanometro (10^{-9} metri) sono sfruttati nella progettazione, caratterizzazione, produzione e applicazione di materiali, strutture, dispositivi e sistemi.

Nonostante il termine nanotecnologia sia stato coniato solo negli anni '60, *clusters* di nanoparticelle d'oro venivano già utilizzati più di 2000 anni fa da parte dei Romani per creare colori vividi nei vetri e, più tardi, a partire dal X secolo, l'uso di nanomateriali è diventato sempre più diffuso nell'arte ceramica e del vetro.

Ma il vero passo verso la progettazione di nanomateriali per scopi specifici è avvenuto solamente nell'ultimo quarto del XX secolo quando, grazie alla scoperta del fullerene (C_{60}) e dei nanotubi di carbonio, all'aumento di interesse nei processi di sintesi e a importanti progressi nella caratterizzazione dei materiali tramite l'invenzione del microscopio a forza atomica (AFM) e del microscopio a scansione a effetto tunnel (STM), è stato possibile iniziare a modificare attivamente e intenzionalmente molecole e strutture alla nanoscala.

Oggi la nanotecnologia è uno strumento dal potenziale immenso, in grado di avere un impatto molto significativo non solo sulla società attuale, ma anche futura, poiché teoricamente capace di migliorare qualsiasi campo tecnologico e industriale.

I vantaggi nel suo uso risiedono nell'impiego di particelle in scala nanoscopica, da circa 1 nm fino a circa 100 nm; è, infatti, in questo intervallo che i materiali presentano proprietà sostanzialmente diverse rispetto alle stesse sostanze aventi dimensioni maggiori, sia perché possiedono un'area di superficie molto elevata in rapporto al volume e sia perché gli effetti quantici, non visibili a dimensioni maggiori, iniziano a giocare un ruolo importante a questi intervalli di grandezza.

1.2 Classificazione dei nanomateriali [3,4]

Come precedentemente accennato, i nanomateriali, anche noti come nanoparticelle o nanopolveri, sono sostanze ingegnerizzate e fabbricate per avere proprietà specifiche e una o più dimensioni tipicamente comprese tra 1 e 100 nm.

In Figura 1.1 è possibile avere un'idea dell'ordine di grandezza delle nanoparticelle rispetto a varie entità biologiche od oggetti comuni.

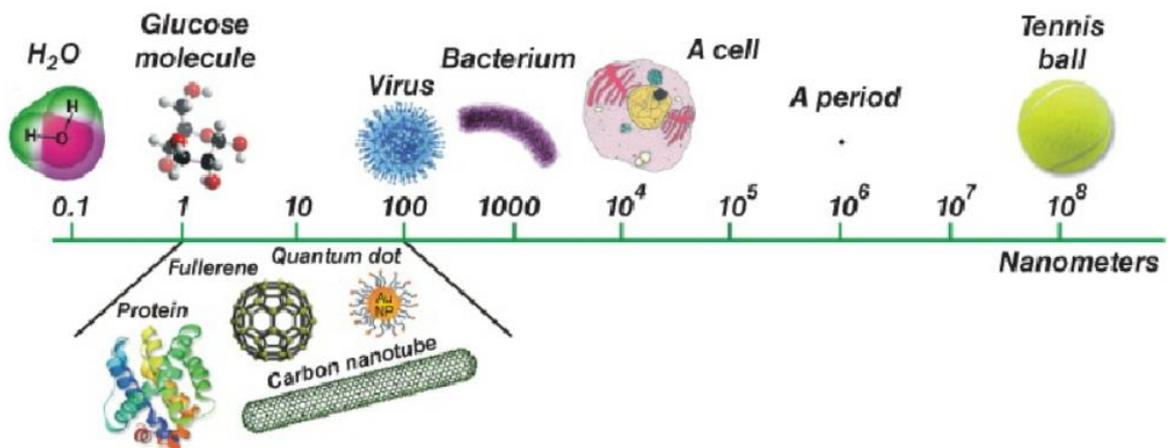


Figura 1.1 Confronto dimensionale di nanomateriali, biomolecole e oggetti [4]

In termine di composizione chimica i nanomateriali possono essere distinti in:

- nanostrutture di natura organica: dendrimeri, *nanocarriers* polimerici e lipidici;
- nanostrutture inorganiche: nanoparticelle metalliche/plasmoniche, di materiali semiconduttori (*quantum dots*), magnetiche, a base di ossidi di metallo, di silice, di carbonio (nanotubi, grafene e fullereni).

Questa classificazione non può però essere considerata così netta; è necessario, infatti, tener presente che buona parte dei nanomateriali è sintetizzata utilizzando sostanze di natura organica al fine di stabilizzare e funzionalizzare le nanoparticelle inorganiche e, pertanto, sarebbe più opportuno considerare queste nanostrutture come sostanze di natura ibrida.

Oltre alla classificazione in base alla composizione chimica, un'ulteriore distinzione può essere fatta considerando dimensioni e forma; è, quindi, possibile suddividere le nanoparticelle in quattro categorie:

- nanomateriali 0D con diametro dell'ordine del nanometro quali, ad esempio, sfere e *clusters*;
- nanomateriali 1D con una dimensione su scala nanometrica, ad esempio film sottili e rivestimenti superficiali;
- nanomateriali 2D con due dimensioni su scala nanometrica, ad esempio nanotubi, nanofibre, nanofili;
- nanomateriali 3D con tutte e tre le dimensioni su scala nanometrica, ad esempio nanocristalli.

1.3 Strategie generali di sintesi [4,5]

La maggior parte delle tecniche di sintesi di nanomateriali può essere ricondotta a due modelli di fabbricazione differenti:

- approccio *top-down*: le nanostrutture sono “scolpite” da un blocco di materiale *bulk* e la suddivisione in pezzi più piccoli avviene attraverso metodi che sfruttano energia meccanica, chimica o altre forme energetiche;
- approccio *bottom-up*: le nanostrutture sono sintetizzate assemblando gradualmente precursori atomici o molecolari fino a ottenere la struttura desiderata, oppure facendo crescere in dimensione specie atomiche o molecolari tramite reazioni chimiche o *self-assembly*.

Viene presentata in Figura 1.2 una schematizzazione delle due strategie generali di sintesi.

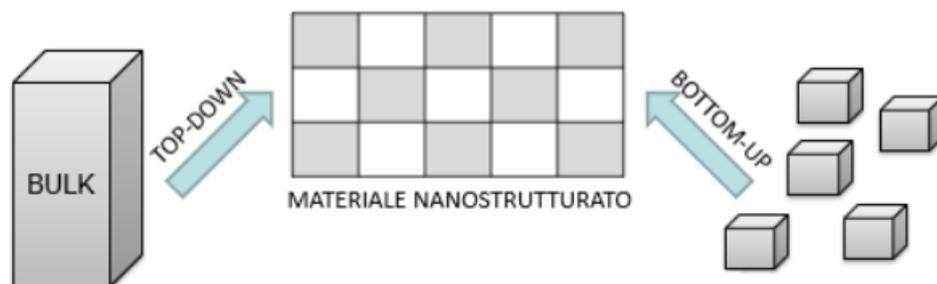


Figura 1.2 Approccio *top-down* e *bottom-up* per la produzione di nanomateriali [5]

In entrambi gli approcci, risultano fondamentali il controllo delle condizioni di fabbricazione (ad esempio, l'energia del fascio di elettroni) e delle condizioni ambientali (ad esempio, la presenza di contaminanti).

In ogni caso, qualunque sia il metodo utilizzato, è di notevole importanza la capacità di controllare dimensione, forma, composizione, distribuzione dimensionale e grado di agglomerazione delle nanoparticelle.

1.4 Campi di applicazione [6]

Di seguito vengono illustrate alcune tra le innumerevoli applicazioni attuali o potenziali della nanotecnologia in campo scientifico e tecnologico.

Settore tessile

La realizzazione di tessuti contenenti particelle o fibre di dimensioni nanometriche permette un miglioramento delle proprietà senza un significativo aumento di peso, spessore o rigidità.

Le attuali applicazioni riguardano, tra le altre, l'impiego di *nanowhiskers* per la realizzazione di pantaloni di materiale idrorepellente e antimacchia o l'uso di nanoparticelle di argento al fine di uccidere i batteri e rendere gli indumenti antiodore.

Nanoelettronica

La nanotecnologia può migliorare le caratteristiche dei dispositivi elettronici riducendone il peso e il consumo energetico, migliorandone la capacità attraverso l'aumento della densità dei *chip* di memoria e diminuendo le dimensioni dei *transistor* utilizzati nei circuiti integrati al fine di creare dispositivi più piccoli e potenti.

Ambiente

La nanotecnologia può aiutare a ridurre sia l'inquinamento atmosferico che delle acque.

La qualità dell'aria può essere migliorata agendo, ad esempio, sulle prestazioni dei catalizzatori utilizzati per trasformare in gas innocui i vapori che fuoriescono da automobili

o impianti industriali. La maggior area superficiale dei catalizzatori nanotecnologici permette loro di interagire simultaneamente con più sostanze chimiche, dimostrando un'efficacia maggiore rispetto alla controparte utilizzata convenzionalmente.

Nel miglioramento della qualità dell'acqua, invece, si sta cercando attraverso la nanotecnologia di sviluppare soluzioni a problemi diversi. Una sfida è la rimozione dell'inquinamento idrico industriale utilizzando nanoparticelle per convertire la sostanza contaminante, attraverso reazioni chimiche, e renderla innocua. Un'altra sfida è la rimozione di sale o metalli dall'acqua: metodi di deionizzazione basati su elettrodi composti da fibre nanometriche risultano promettenti nel ridurre costi e fabbisogno energetico di trasformazione dell'acqua salata in acqua potabile.

Sensori chimici

Nanotubi di carbonio, nanofili di ossido di zinco o nanoparticelle di palladio possono essere utilizzati come elementi di rilevamento in sensori nanotecnologici.

Il principio di funzionamento è basato sul cambiamento delle caratteristiche elettriche, quali resistenza o capacità, dell'elemento sensibile in seguito all'assorbimento di poche molecole di gas; ciò permette di rilevare concentrazioni anche molto basse di vapori chimici.

Una possibile applicazione potrebbe riguardare il montaggio di questi sensori in luoghi in cui si vuole verificare la presenza di vapori emessi da dispositivi esplosivi, al fine di garantire la sicurezza.

Agroalimentare

La nanotecnologia può influenzare diversi aspetti delle scienze alimentari, da come il cibo viene coltivato a come viene confezionato, ma anche la sicurezza alimentare o i benefici per la salute offerti dal cibo.

Un'applicazione in fase di sviluppo consiste nell'impiego di nanosensori in grado di rilevare batteri e altri contaminanti in impianti di confezionamento. Ciò permetterebbe

test frequenti e a un costo inferiore rispetto all'invio di campioni a un laboratorio di analisi e avrebbe, come conseguenza, la notevole riduzione del rischio che il cibo contaminato possa raggiungere gli scaffali dei negozi.

Sport

La nanotecnologia è in grado di offrire vantaggi anche nel settore sportivo andando a migliorare non solo le attrezzature, ma anche elevando il livello di prestazioni dell'atleta così da ridurre il rischio di infortuni e rendere l'esperienza sportiva più piacevole per atleti e spettatori [7].

Alcune delle applicazioni attuali prevedono l'aggiunta di nanoparticelle al telaio delle racchette da tennis che consentono un migliore controllo e una maggiore potenza quando si colpisce la palla, o il riempimento con nanoparticelle di silice degli spazi tra le fibre di carbonio nelle canne da pesca, al fine di rafforzarle senza aumentarne il peso.

Nanomedicina [4,8]

Si occupa di diagnosticare, monitorare, trattare e prevenire malattie al fine di migliorare e rendere più efficaci i trattamenti già esistenti e sviluppare nuove terapie.

Il contributo delle nanotecnologie nel settore medico è molto ampio e comprende nuovi strumenti diagnostici, agenti e metodi di *imaging*, sistemi per la somministrazione di farmaci, terapie, impianti e costrutti in grado di riparare e rigenerare tessuti e organi.

Il tutto è reso possibile dalla manipolazione di atomi e molecole alla nanoscala per produrre strutture dalle proprietà desiderate e di dimensioni comparabili a quelle delle biomolecole, in grado di interagire con le cellule del corpo umano.

Nei prossimi capitoli si illustreranno in maniera più approfondita le potenzialità delle nanoparticelle in campo biomedico.

Capitolo 2

Nanoparticelle magnetiche

2.1 Introduzione [9,10]

Le nanoparticelle magnetiche rappresentano uno dei più promettenti candidati nella progettazione di nanosistemi teranostici multifunzionali, in grado sia di identificare uno stato patologico, che di somministrare, simultaneamente, la terapia adeguata.

L'utilizzo di questo tipo di nanoparticelle risulta particolarmente vantaggioso: sfruttando un campo magnetico esterno, esse possono essere facilmente manipolate e trasportate all'interno del corpo umano verso tessuti e cellule bersaglio.

Nella sua forma più elementare, una nanoparticella magnetica è costituita da un nucleo magnetico di materiale inorganico.

In molti casi è poi presente un rivestimento superficiale biocompatibile utile per minimizzare le interazioni indesiderate con l'ambiente a contatto, garantire la stabilità in condizioni fisiologiche ed evitare l'agglomerazione, dal momento che le particelle possono attrarsi a vicenda come risultato delle forze attrattive di tipo van der Waals.

È possibile la presenza di un ulteriore rivestimento esterno rappresentato da biomolecole, farmaci, coloranti o agenti di *targeting* specifici, come peptidi e acidi nucleici.

Questa funzionalizzazione permette alle nanoparticelle di oltrepassare le barriere tissutali e cellulari e di poter, quindi, esplicare la propria funzione teranostica.

Viene mostrato in Figura 2.1 uno schema generale relativo alla progettazione di una nanoparticella magnetica: partendo da precursori di origine diversa, attraverso metodi di sintesi opportuni, si arriva alla sua realizzazione, cui segue una fase di modifica superficiale e, infine, di funzionalizzazione.

I vari passaggi verranno descritti dettagliatamente nei paragrafi successivi.

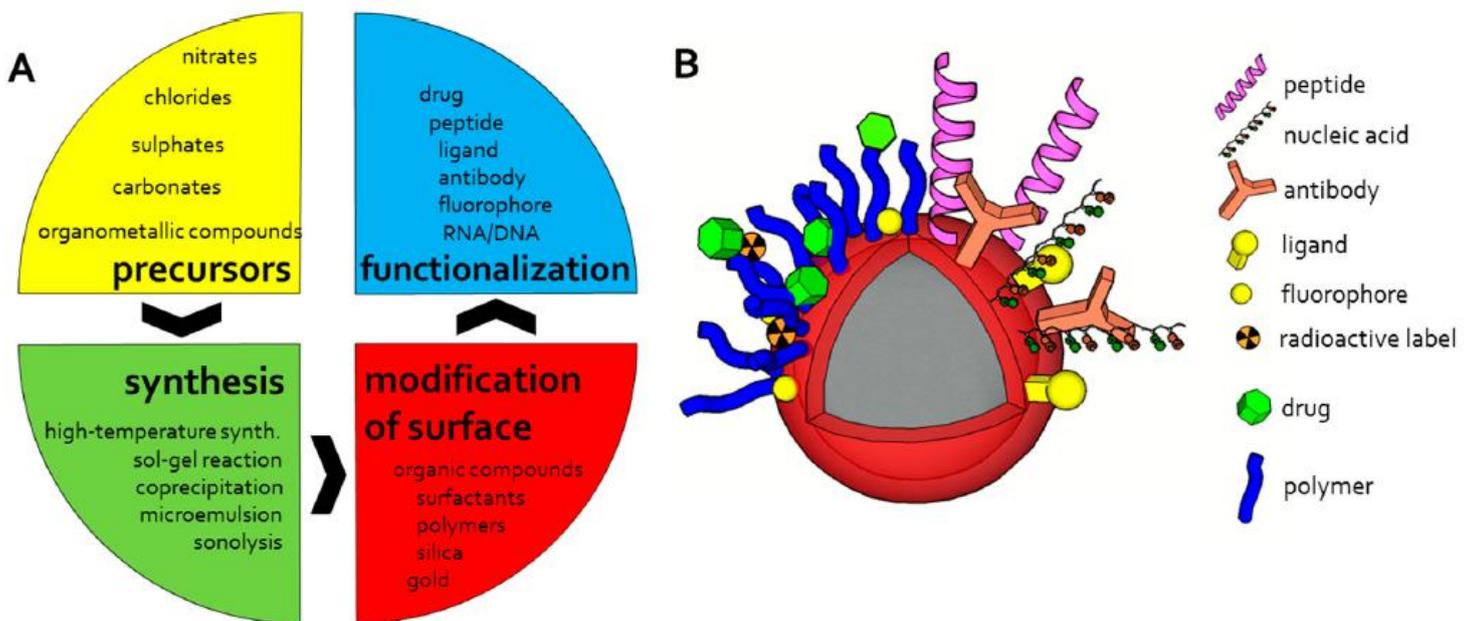


Figura 2.1 (A) Progettazione di nanoparticelle magnetiche, (B) possibile modifica e funzionalizzazione [11]

2.2 Nanoparticelle di ossido di ferro

La magnetite (Fe_3O_4) e la maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sono ritenute le nanoparticelle magnetiche più adatte per applicazioni biomediche *in vivo* e vengono preferite ad altre nanostrutture per la loro biocompatibilità e stabilità.

Nuclei magnetici a base di cobalto, nichel o neodimio-ferro-boro offrirebbero migliori proprietà magnetiche, ma con il rischio di risultare facilmente suscettibili all'ossidazione o essere tossici, se non adeguatamente trattati [10,12,13].

La magnetite, in particolare, risulta quella più ampiamente studiata.

Presenta una struttura a spinello inverso in cui gli anioni O^{2-} formano un impacchettamento chiuso, cubico a facce centrate e gli ioni bi- e trivalenti del ferro occupano i siti tetraedrici interstiziali e quelli ottaedrici.

Più precisamente, gli ioni ferrici Fe^{3+} sono distribuiti su tutti i siti tetraedrici e metà di quelli ottaedrici, mentre gli ioni ferrosi Fe^{2+} occupano il resto dei siti ottaedrici (Figura 2.2) [14,15].

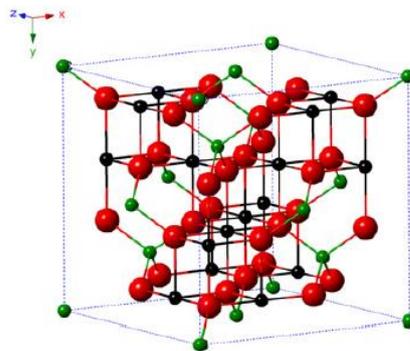


Figura 2.2 *Struttura cristallina della magnetite* (le sfere nere rappresentano gli ioni Fe^{2+} , le sfere verdi gli ioni Fe^{3+} , le sfere rosse gli ioni O^{2-}) [16]

Le proprietà magnetiche della magnetite derivano proprio dalla presenza di ioni, sia in numero, che con valenza diversa nella struttura cristallina.

Gli ioni di ferro trivalente (III) distribuiti in posizioni ottaedriche sono allineati parallelamente ma in direzione opposta a quelli in posizioni tetraedriche, e il loro accoppiamento fa sì che i momenti magnetici generati si annullino reciprocamente.

Gli ioni di ferro bivalente (II), invece, occupando i soli siti ottaedrici, generano momenti magnetici paralleli e allineati che non si annullano e che, quindi, sono responsabili della magnetizzazione netta della magnetite (Figura 2.3) [17,18].

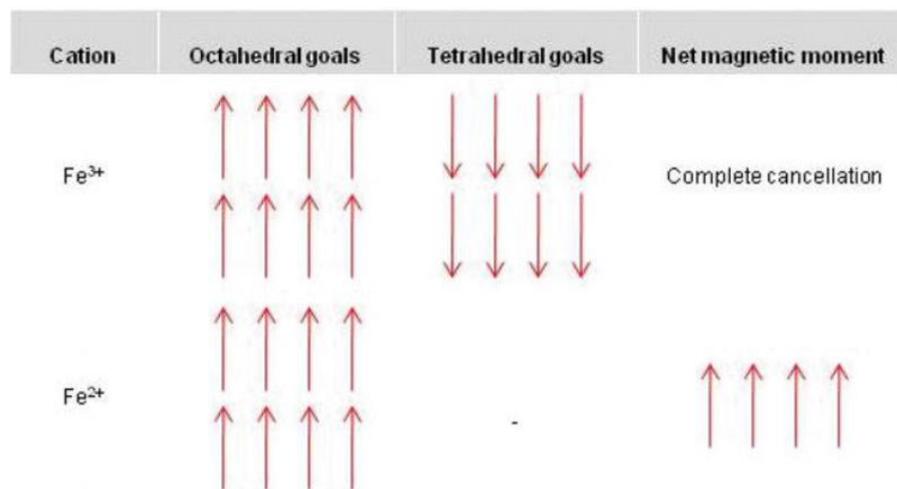


Figura 2.3 Distribuzione dei momenti magnetici prodotti dagli ioni Fe^{2+} e Fe^{3+} nella struttura cristallina della magnetite [18]

2.3 Metodi di fabbricazione [13,14]

Le diverse tecniche di produzione di nanoparticelle magnetiche possono essere raggruppate in tre macrocategorie:

- metodi fisici come ad esempio la deposizione fisica da vapore e la litografia a fascio di elettroni. Sono, tendenzialmente, procedure elaborate che non garantiscono un controllo dimensionale adeguato alla nanoscala.

Tecniche più recenti quali la sintesi tramite ablazione laser, risultano, invece, efficaci nel produrre polveri fini con dimensione media delle particelle di 20-50 nm e distribuzione dimensionale relativamente stretta.

- Metodi di preparazione chimica a umido includono la co-precipitazione chimica, reazioni idrotermali, sol-gel, metodi elettrochimici, la decomposizione termica, la microemulsione.

Sono le tecniche di fabbricazione di nanoparticelle più diffuse e sono, per la maggior parte, procedure di tipo *bottom-up*. Riescono, generalmente, a fornire un buon controllo su dimensioni, composizione e forma.

- Metodi microbici in cui le nanoparticelle magnetiche si formano in un processo di biomineralizzazione.

Il prodotto naturale di batteri magnetotattici è costituito da particelle uniformi il cui nucleo ha un diametro di 20-45 nm e cristalli a dominio singolo.

La co-precipitazione di ioni ferrosi e ferrici in condizioni cinetiche di crescita dei cristalli simili a quelle di crescita di magnetite nei batteri magnetotattici, può fornire nanoparticelle di magnetite relativamente grandi o particelle multidominio.

Sono metodi ad alta resa, con buona riproducibilità, scalabilità e controllo dimensionale.

Di seguito si illustrano nel dettaglio, le tecniche di preparazione di nanoparticelle magnetiche maggiormente utilizzate tra i metodi di preparazione chimica.

2.3.1 Co-precipitazione [19,20]

È una tecnica semplice e conveniente per sintetizzare, per lo più, nanoparticelle di ossido di ferro (Fe_3O_4 o $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a partire da soluzioni acquose di sali $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ tramite l'aggiunta di una base in atmosfera inerte o in aria, a temperatura ambiente o poco più elevata (Figura 2.4).

Parametri quali il tipo di sali impiegati (ad esempio cloruri, solfati, nitrati), il rapporto tra ioni $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, la temperatura di reazione, il pH e la forza ionica del mezzo, influenzano considerevolmente composizione, forma e dimensione delle particelle ottenute.

Una volta fissate le condizioni di sintesi, il metodo risulta completamente riproducibile e permette di ottenere nanostrutture dalle caratteristiche desiderate.

Poiché le nanoparticelle di magnetite risultano instabili in condizioni ambiente e possono essere facilmente ossidate a maghemite, può essere necessario uno step di passivazione tramite l'aggiunta di nitrato ferrico; ciò porta alla formazione di un guscio di maghemite utile a prevenire il verificarsi di un'ossidazione incontrollata.

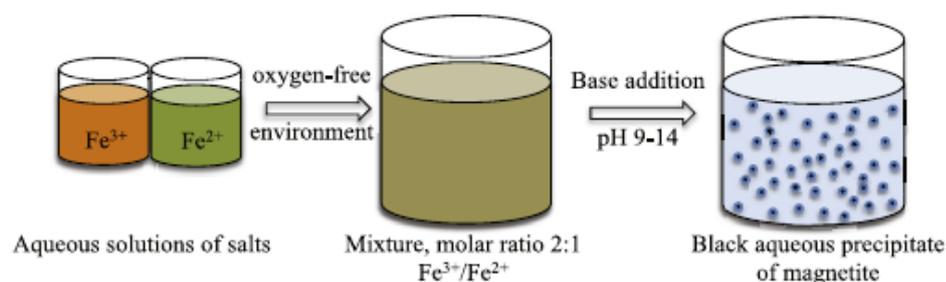


Figura 2.4 Sintesi di nanoparticelle di ossido di ferro tramite co-precipitazione [20]

2.3.2 Decomposizione termica [20,21]

Nanocristalli magnetici monodispersi possono essere sintetizzati per decomposizione termica di composti organometallici in solventi organici ad elevata temperatura, contenenti tensioattivi stabilizzanti (Figura 2.5).

Tra i precursori organometallici sono solitamente utilizzati metalli acetilacetoni, cupferroni o metallocarbonili e come tensioattivi acidi grassi, acido oleico ed esadecilammina.

La tecnica consente di avere un controllo molto accurato su forma, dimensione e struttura cristallina. Fattori importanti in tal senso sono la scelta dei precursori, dei surfattanti e dei solventi, nonché i rapporti tra i reagenti di partenza [16].

Rispetto ad altri metodi, le particelle ottenute sono più piccole e risultano maggiormente monodisperse.

Poiché solitamente la reazione si verifica in solventi organici contenenti stabilizzanti idrofobi, sono necessarie modifiche superficiali affinché le nanoparticelle risultino stabili in un mezzo acquoso e non siano tossiche, cosicché da essere impiegate in applicazioni biomediche.

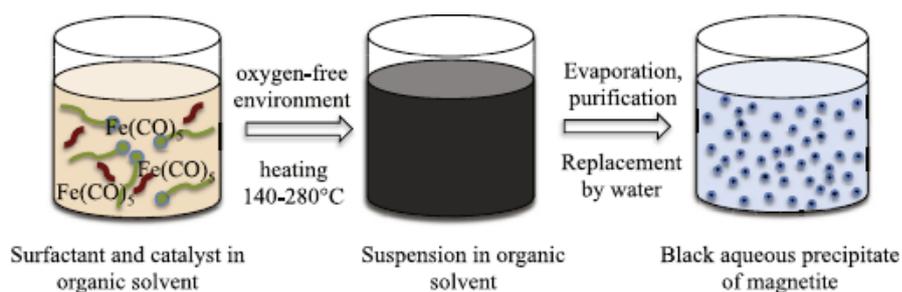


Figura 2.5 Sintesi di nanoparticelle di ossido di ferro tramite decomposizione termica

[20]

2.3.3 Microemulsione [19]

Miscelando due microemulsioni acqua-in-olio identiche contenenti i reagenti opportuni, la fase acquosa risulta dispersa sotto forma di microgocce dal diametro tipicamente compreso tra 1 e 50 nm, che si scontrano ripetutamente tra di loro.

Ciò porta alla formazione di aggregati più grandi per effetto della coalescenza, a una nuova separazione e, infine, alla formazione di un precipitato che è possibile estrarre, tramite filtrazione o centrifugazione, aggiungendo alle microemulsioni un solvente come l'acetone o l'etanolo (Figura 2.6).

Una microemulsione può essere, quindi, utilizzata come un nanoreattore per la formazione di nanoparticelle di forma diversa.

La resa di questo metodo è piuttosto bassa se confrontata a quella delle due tecniche precedentemente illustrate.

Inoltre, per sintetizzare quantità apprezzabili è necessario usare molto solvente e, pertanto il processo risulta poco efficiente, oltre ad avere anche bassa scalabilità.

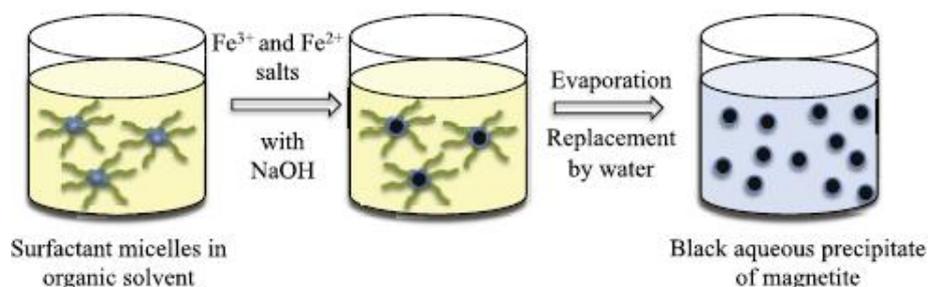


Figura 2.6 Sintesi di nanoparticelle di ossido di ferro tramite microemulsione [20]

2.3.4 Sintesi idrotermale [21]

È un metodo utilizzato per la fabbricazione di polveri ultrafini, oltre che per nanoparticelle magnetiche.

La reazione avviene in mezzo acquoso, all'interno di un'autoclave o un reattore con pressioni che possono arrivare fino a 138 bar e temperature fino a 200 °C.

Il processo permette di ottenere particelle con un miglior grado di cristallinità rispetto ad altre procedure.

La sintesi idrotermale risulta il metodo più efficace per produrre cristalli dei materiali più svariati, ma presenta lo svantaggio di avere una cinetica di reazione troppo lenta, qualunque sia la temperatura; la soluzione a questo inconveniente può essere rappresentata dall'uso del riscaldamento a microonde.

Nella tabella presentata di seguito (Tabella 2.1), si evidenziano le principali caratteristiche dei quattro processi di sintesi appena descritti.

Synthetic method	Synthesis	Reaction temp. [°C]	Reaction period	Solvent	Surface-capping agents	Size distribution	Shape control	Yield
co-precipitation	very simple, ambient conditions	20–90	minutes	water	needed, added during or after reaction	relatively narrow	not good	high/ scalable
thermal decomposition	complicated, inert atmosphere	100–320	hours–days	organic compound	needed, added during reaction	very narrow	very good	high/ scalable
microemulsion	complicated, ambient conditions	20–50	hours	organic compound	needed, added during reaction	relatively narrow	good	low
hydrothermal synthesis	simple, high pressure	220	hours ca. days	water-ethanol	needed, added during reaction	very narrow	very good	medium

Tabella 2.1 *Confronto tra i metodi di sintesi comunemente utilizzati per la produzione di nanoparticelle magnetiche [19]*

In base a quanto detto precedentemente e osservando lo schema riportato, risulta evidente come la co-precipitazione sia il metodo di sintesi più semplice, nonché il più veloce per ottenere nanoparticelle magnetiche. La tecnica, tuttavia, soffre dell'incapacità di avere un controllo preciso su dimensioni e forma.

In tal senso, la decomposizione termica e la sintesi idrotermale risultano più affidabili, ma presentano lo svantaggio di essere metodi più complicati e con tempi di reazione molto lunghi, oltreché richiedere temperature e/o pressioni piuttosto elevate affinché la reazione di sintesi possa avvenire.

La microemulsione sembra essere, invece, il metodo peggiore, in quanto è un processo non del tutto semplice da realizzare, che richiede tempi di reazione piuttosto lunghi, con controllo dimensionale non troppo accurato e resa molto bassa.

2.4 Stabilizzazione e funzionalizzazione superficiale [16,19]

Nonostante negli anni ci siano stati grandi miglioramenti nella preparazione di nanoparticelle magnetiche, un problema inevitabile associato al loro uso rimane l'instabilità intrinseca nel tempo, che si manifesta sotto forma di:

- perdita di disperdibilità: le nanoparticelle tendono ad aggregarsi formando *clusters* più grandi al fine di ridurre la propria energia superficiale;
- perdita di magnetismo: le nanoparticelle tendono ad ossidarsi nell'aria a causa della loro reattività chimica.

La stabilità è un requisito fondamentale in applicazioni biomediche.

Per impedire o perlomeno minimizzare l'agglomerazione e l'ossidazione, le nanoparticelle magnetiche possono essere rivestite da una matrice solitamente di tipo polimerico o anche in silice o carbonio.

In tal modo, risulteranno fisse nello spazio l'una rispetto all'altra e ciò non è spesso desiderato.

Un metodo alternativo che lascia le nanoparticelle libere di muoversi e al contempo impedisce l'agglomerazione e l'ossidazione, consiste nell'applicazione di un *layer* superficiale impenetrabile [21].

Si realizza in tal modo una struttura *core-shell* in cui la nanoparticella magnetica rappresenta il nucleo ed è incapsulata in un rivestimento che la isola dall'ambiente a contatto.

Se, invece, la nanoparticella non si trova al centro del rivestimento funzionale, la struttura è solitamente definita *yolk-shell* (Figura 2.7).

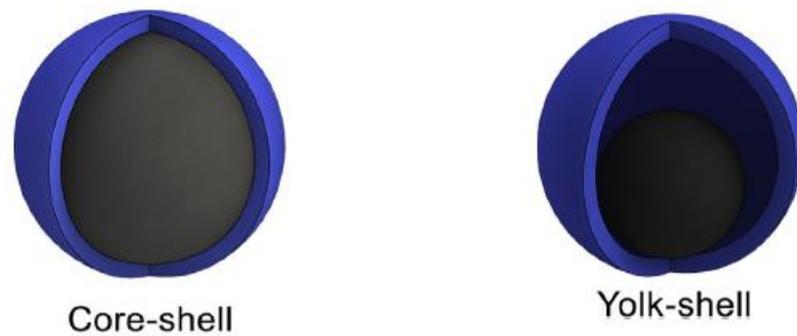


Figura 2.7 *Tipiche morfologie di nanomateriali magnetici composti (la parte magnetica è colorata in nero, il rivestimento in blu) [22]*

In entrambi i casi, l'impiego di uno strato superficiale non solo migliora la stabilità della nanoparticella, ma la rende più biocompatibile, può introdurre nuove proprietà fisiche e fungere da supporto per biomolecole.

Il rivestimento può essere di tipo organico o inorganico.

Alternativamente, per preservare le particelle è possibile indurre un'ossidazione controllata del loro strato superficiale esterno attraverso una tecnica chiamata passivazione.

2.4.1 Rivestimenti organici [16]

Includono polimeri, tensioattivi e piccole molecole.

Polimeri

La funzionalizzazione tramite questo tipo di materiali (Figura 2.8) non solo fornisce gruppi multifunzionali e stabilità colloidale alle nanoparticelle magnetiche, ma svolge anche un ruolo significativo per quanto riguarda il loro destino biologico (biodistribuzione e farmacocinetica).

Possono essere adoperati diverse classi di polimeri biodegradabili, sia di origine naturale che sintetici come polisaccaridi, chitosano, alginato, glicole polietilenico (PEG), acido polilattico (PLA), polimetilmetacrilato (PMMA).

Gli approcci comunemente utilizzati sono il rivestimento *in situ* e post-sintesi. Dal momento che il primo metodo non riesce sempre a garantire una stabilità colloidale adeguata e a controllare lo spessore del guscio, il secondo approccio è da preferire.

Negli ultimi anni, in biomedicina ha suscitato notevole interesse la funzionalizzazione con polimeri cosiddetti *smart*, capaci di conferire proprietà speciali alle nanoparticelle magnetiche. Le nanostrutture così realizzate sono, infatti, in grado di esplicare la propria funzione in risposta a stimoli ambientali come una variazione di pH o di temperatura e trovano impiego in risonanza magnetica, come biosensori e per la somministrazione di farmaci.

È bene sottolineare che, in alcuni casi, il rivestimento polimerico può avere un'influenza negativa sulle proprietà magnetiche delle nanoparticelle e, pertanto, è necessario sceglierlo in maniera adeguata.

Inoltre, se il guscio è sottile, può rivelarsi incapace di evitare l'ossidazione delle particelle se queste sono molto reattive. Un ultimo inconveniente è rappresentato, infine, dalla stabilità intrinseca relativamente bassa del rivestimento di tipo polimerico a temperature più elevate [19].



Figura 2.8 Nanoparticella magnetica rivestita con polimero [23]

Tensioattivi e piccole molecole

La fabbricazione di nanoparticelle di ossido di ferro solubili in olio è molto importante affinché esse risultino monodisperse.

I composti organici comunemente utilizzati a tal proposito sono l'acido oleico e l'oleilamina.

Il primo, in particolare, permette di formare un monostrato protettivo molto denso, consentendo la sintesi di nanoparticelle altamente uniformi.

In più, non causa cambiamenti apprezzabili nel comportamento magnetico delle particelle [24].

Affinché le nanoparticelle possano essere impiegate in applicazioni biologiche, è, però, necessario trasferirle dalla fase organica alla fase acquosa e il rivestimento tensioattivo idrorepellente deve essere sostituito da uno idrofilo e biocompatibile.

In alternativa, è possibile sintetizzare nanoparticelle magnetiche che siano direttamente solubili in acqua, utilizzando nel processo di reazione piccole molecole come amminoacidi, acido citrico, vitamine, ciclodestrine.

Tra di esse, particolarmente utilizzato è l'acido citrico che presenta gruppi carbossilici (-COOH); alcuni di questi si legano ai cationi di ferro sulla superficie delle nanoparticelle di magnetite in modo da formare un rivestimento robusto, mentre i gruppi non coordinati si estendono nel mezzo acquoso, conferendo un alto grado di stabilità per repulsione elettrostatica, oltreché permettere ulteriori modifiche superficiali [25,26].

Per legare vari tipi di molecole bioattive, le nanoparticelle di ossido di ferro possono essere funzionalizzate con i già citati gruppi -COOH, ma anche con gruppi di tipo -OH, -NH₂, -SH, che ne permettono l'uso in diverse applicazioni biomediche.

Viene spesso utilizzato a tal proposito il silano e in particolare il 3-amminopropiltriethossilano (APTES, Figura 2.9).

La funzionalizzazione con molecole di questo composto permette di mantenere pressoché inalterati i valori di magnetizzazione di saturazione rispetto a nanoparticelle magnetiche non modificate e di preservarne la morfologia [27].

Inoltre, la presenza dei gruppi $-NH_2$ può rendere le nanoparticelle, intrinsecamente idrofobe, dispersibili in acqua.

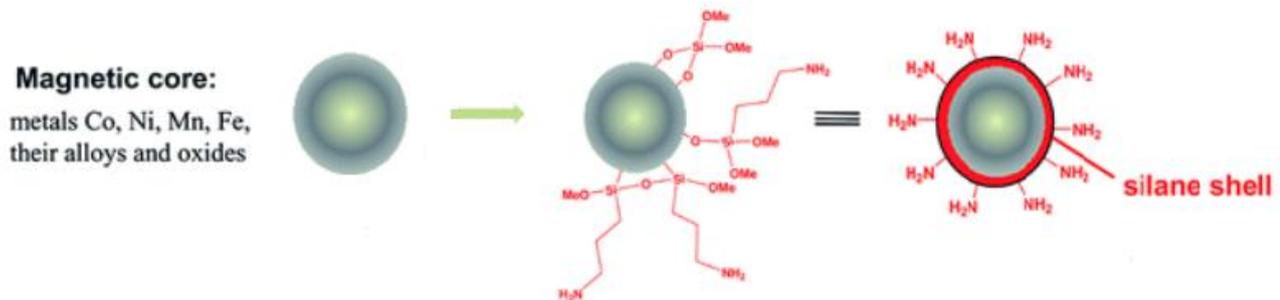


Figura 2.9 Nanoparticella magnetica funzionalizzata con APTES [23]

2.4.2 Rivestimenti inorganici [16,19]

Componenti inorganici con cui è possibile rivestire le nanoparticelle magnetiche sono la silice, il carbonio, metalli preziosi come oro e argento.

Silice

Gusci formati da questo materiale (Figura 2.10 A) oltre a proteggere i nuclei magnetici, possono anche impedire il contatto diretto della nanoparticella con agenti addizionali legati superficialmente evitando, così, interazioni indesiderate [21].

Ad esempio, l'ancoraggio diretto di agenti fluorescenti alle nanoparticelle magnetiche può portare alla cessazione del fenomeno di luminescenza; ciò può essere evitato tramite l'impiego di un guscio di silice [28].

Il rivestimento con silice garantisce stabilità in ambiente acido e in condizioni acquose se il pH è sufficientemente basso, e permette di aggiungere facilmente gruppi funzionali, in modo tale da consentire l'impiego in applicazioni quali il *biolabeling* e il rilascio controllato e mirato di farmaci.

Tuttavia, nonostante i progressi fatti nella sintesi di nanoparticelle così rivestite, risulta difficile ottenere gusci di silice che abbiano uno spessore controllato alla nanoscala, ma soprattutto che siano uniformi. La presenza di pori è quindi inevitabile e, pertanto, questo tipo di rivestimento risulta spesso incapace di prevenire la diffusione di ossigeno o altre specie chimiche.

Inoltre, la silice è instabile in condizioni basiche.

Carbonio

Negli ultimi anni le nanoparticelle magnetiche protette dal carbonio (Figura 2.10 B) hanno ricevuto più attenzione in quanto questo materiale presenta una maggiore stabilità sia dal punto di vista chimico che termico ed è più biocompatibile rispetto ai polimeri o alla silice.

Tuttavia, nanoparticelle magnetiche rivestite di carbonio sono spesso ottenute sotto forma di *clusters*, a causa della mancanza di un metodo di sintesi efficace e di una scarsa comprensione del meccanismo di formazione.

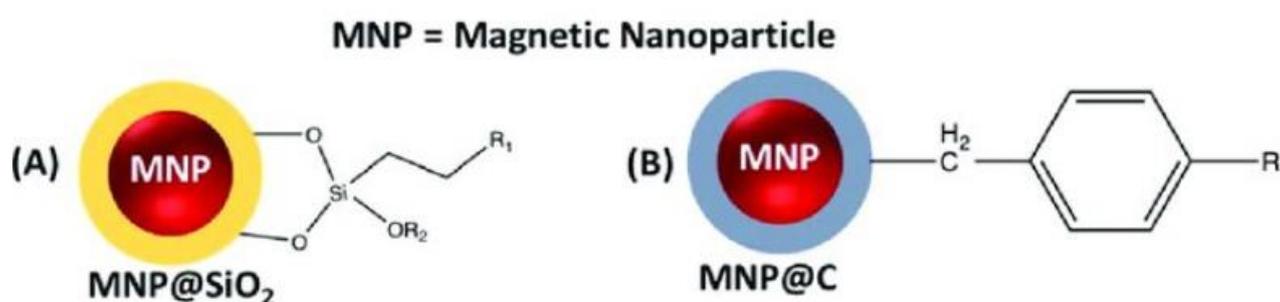


Figura 2.10 Nanoparticella magnetica rivestita con: (A) silice, (B) carbonio [29]

Metalli

I metalli presentano interessanti proprietà ottiche alla nanoscala quali la risonanza plasmonica di superficie localizzata o l'effetto *Raman*.

Il rivestimento di nanoparticelle magnetiche di ossido di ferro con metalli permette di combinare le proprietà fisico-chimiche dei due materiali (Figura 2.11).

L'oro, in particolare, sembra essere un candidato ideale grazie alla sua bassa reattività e perché è capace di stabilizzare le nanoparticelle di magnetite sia in condizioni acquose neutre che acide.

Inoltre, la superficie d'oro può essere ulteriormente funzionalizzata con gruppi tiolo, consentendo alle nanoparticelle di formare legami con ligandi funzionali che le rendono adatte per applicazioni ottiche o come catalizzatori.

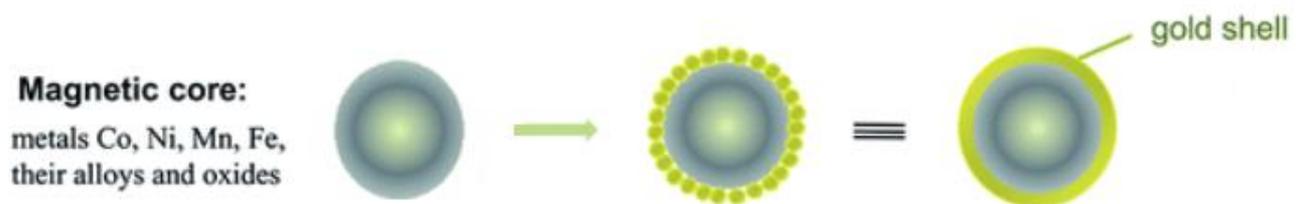


Figura 2.11 Nanoparticella magnetica rivestita con oro [23]

Capitolo 3

Biodistribuzione, farmacocinetica, biodegradazione e tossicità

3.1 Introduzione [30]

Non appena le nanoparticelle magnetiche vengono introdotte all'interno del corpo umano, il sistema immunitario mette in atto una serie di meccanismi fisiologici volti a riconoscere queste sostanze estranee, a raccoglierle e a indirizzarle verso i principali percorsi di escrezione.

Si instaura, quindi, una sorta di “competizione” tra la distribuzione delle nanoparticelle in organi o tessuti specifici (biodistribuzione desiderata) e il loro tasso di riconoscimento e di eliminazione (farmacocinetica).

Risulta, dunque, di fondamentale importanza conoscere i parametri che regolano questi due aspetti, al fine di migliorare la funzionalità prevista delle nanoparticelle, aumentarne l'efficacia terapeutica e la biosicurezza, minimizzandone, al contempo, gli effetti tossici.

A seconda dell'applicazione biomedica cui sono destinate, le nanoparticelle possono essere somministrate in diversi modi, ma l'iniezione endovenosa rappresenta l'approccio più comunemente usato.

Indipendentemente dalle barriere biologiche specifiche per ciascun metodo di somministrazione, il corpo umano risponde rapidamente alla loro presenza, cercando di eliminarle attraverso due diversi meccanismi di *clearance*.

3.1.1 *Clearance* attraverso il sistema reticoloendoteliale [30,31]

Il sistema reticoloendoteliale (RES), anche noto come sistema fagocitario mononucleare (MPS), rappresenta il principale percorso di *clearance* all'interno del corpo umano.

Come riportato in molti studi, più del 75% delle nanostrutture magnetiche vengono assorbite dal RES e in particolare dal fegato (cellule di Kupffer) [9].

In generale, il fegato e la milza sono gli organi principalmente impegnati nella *clearance* delle nanoparticelle dalla circolazione sanguigna, tuttavia, se iniettate in alte dosi, i macrofagi presenti in questi organi sono in grado di eliminarne solo una frazione e quelle in eccesso vengono accumulate in altri siti quali i polmoni.

Il processo di cattura è basato su tre eventi: opsonizzazione, riconoscimento e fagocitosi (Figura 3.1).

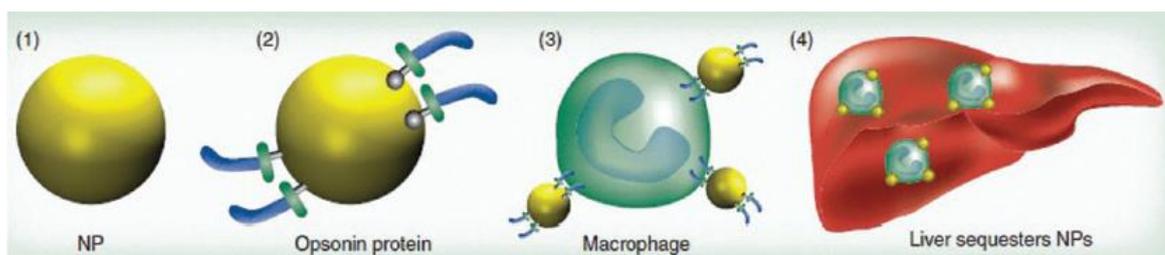


Figura 3.1 Adsorbimento di opsonine sulla superficie di nanoparticelle magnetiche, riconoscimento da parte dei macrofagi e accumulo nel fegato [30]

Le cellule fagocitarie del RES non sono in grado di identificare direttamente le nanoparticelle all'interno del flusso sanguigno, ma riconoscono sostanze chiamate opsonine che ricoprono la loro superficie.

Si tratta di macromolecole e, tra le più comuni, vi sono le immunoglobuline, i componenti del sistema del complemento C3, C4 e C5 e proteine plasmatiche come la laminina, la fibronectina, il collagene di tipo I.

L'esatto meccanismo attraverso il quale avviene il processo di opsonizzazione non è ancora del tutto compreso; si pensa che le opsonine presenti nel sangue entrino in contatto con le nanoparticelle iniettate attraverso moti browniani e, non appena risultano sufficientemente vicine alla loro superficie, ci si leghino tramite forze attrattive di tipo van der Waals, elettrostatico, idrofobico.

Il passo successivo consiste nel riconoscimento delle nanoparticelle da parte delle cellule fagocitarie.

Ciò avviene grazie al fatto che le opsonine ad esse legate subiscono cambiamenti conformazionali da proteina inattiva presente nel siero a struttura proteica attivata individuabile dai macrofagi, le cui superfici contengono recettori specializzati che, interagendo con la conformazione modificata delle opsonine, vengono allertate della presenza di sostanze estranee.

L'ultimo passaggio consiste nell'ingestione delle nanoparticelle e nella decomposizione del materiale fagocitato attraverso la secrezione di enzimi digestivi e radicali ossidanti.

3.1.2 Clearance renale [30,32,33]

La *clearance* renale rappresenta il secondo più importante meccanismo di rimozione di materiali indesiderati dal corpo umano e costituisce un processo biologico essenziale per proteggere l'organismo da eventuali danni e possibili forme di tossicità.

Il sistema di filtrazione nei reni è fisicamente diverso da quello presente nel fegato e nella milza.

Mentre in questi ultimi le nanoparticelle più grandi di una certa dimensione vengono intrappolate nei capillari sinusoidi e prelevate rispettivamente dalle cellule di Kupffer o dai macrofagi splenici, l'endotelio fenestrato dei capillari glomerulari agisce da filtro che

consente solo a specie più piccole di una certa dimensione (10-15 nm) di passare e, quindi, lasciare il flusso sanguigno ed essere espulse dal corpo tramite l'urina.

Per via dei limiti dimensionali imposti dalla grandezza di queste *fenestrate*, solitamente, nessun *report* attesta la presenza di nanoparticelle di ossido di ferro non degradate nelle urine.

Tuttavia, attraverso i reni è possibile che si verifichi l'eliminazione di piccole molecole di rivestimento qualora queste ultime, a causa di legami deboli, si staccassero dalla superficie delle nanoparticelle.

3.2 Targeting tumorale [31,34]

Affinché un vettore teranostico possa esplicare la propria funzione deve essere presente nel flusso sanguigno abbastanza a lungo da raggiungere e riconoscere il proprio sito d'azione, evitando il più possibile i processi di opsonizzazione o di rimozione da parte del RES.

È a tal proposito che risulta importante il concetto di *targeting* tumorale inteso come accumulo selettivo e assorbimento delle nanoparticelle nel microambiente tumorale.

Ciò può essere ottenuto passivamente attraverso il cosiddetto effetto EPR o attivamente attraverso l'uso di agenti e/o altri meccanismi di *targeting*.

3.2.1 Targeting passivo [34,35,36]

Nel *targeting* passivo macromolecole e nanoparticelle si accumulano in maniera preferenziale nei tessuti neoplastici come risultato dell'effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (EPR), descritto per la prima volta da Maeda e Matsumura nel 1986 (Figura 3.2 A).

Una volta che un tumore raggiunge dimensioni superiori a 2-3 mm³, il normale apporto di ossigeno e sostanze nutritive non è più sufficiente a soddisfare le crescenti richieste delle cellule maligne in rapida crescita.

Pertanto, il tessuto neoplastico si adegua attraverso meccanismi di angiogenesi volti a formare nuovi vasi sanguigni utili a sostenere il proprio sviluppo.

Lo squilibrio risultante dei fattori angiogenici e delle metalloproteasi della matrice (MMP) si traduce in una vascolarizzazione altamente disorganizzata e con ampie fenestrature che permette l'extravasazione delle nanoparticelle dal circolo sanguigno sistemico, facilitandone l'accumulo all'interno del microambiente tumorale (aumentata permeabilità).

Inoltre, poiché questi tessuti non sono dotati di un sistema linfatico adeguatamente sviluppato, il drenaggio è ridotto e, quindi, le nanoparticelle tendono a rimanere al loro interno (aumentata ritenzione).

L'effetto EPR può essere ulteriormente accentuato dal fatto che i vasi tumorali sono spesso privi dello strato di muscolatura liscia che circonda, solitamente, le cellule endoteliali; ciò fa sì che il sistema vascolare associato al tumore risulti in una condizione di vasodilatazione permanente che aumenta ulteriormente l'apporto di sangue e soluti al suo interno.

3.2.2 Targeting attivo [9,17,34,35,37,38]

Rispetto al *targeting* passivo, i meccanismi di *targeting* attivo mostrano una maggiore specificità ed efficacia in quanto rendono l'assorbimento delle nanoparticelle più selettivo e consentono di ottenere una migliore distribuzione nel sito tumorale.

La sfida più importante nel *targeting* attivo è la definizione delle strategie più idonee per il trasporto delle nanoparticelle nei tessuti cancerosi.

Esse si basano principalmente sulla funzionalizzazione delle nanoparticelle con ligandi specifici (ad esempio anticorpi, aptameri, peptidi), capaci di riconoscere e legarsi

esclusivamente ad antigeni o a determinati recettori sovraespressi sulla superficie delle cellule neoplastiche, in modo da innescare il processo di endocitosi mediata da recettore.

In tal modo si riducono le interazioni non specifiche indesiderate e si evita qualsiasi tipo di tossicità.

Un'altra strategia di *targeting* attivo potrebbe consistere nello sfruttare l'aumentata attività metabolica delle cellule neoplastiche, legando molecole quali il glucosio o l'acido folico sulla superficie delle particelle.

Un'altra ancora consiste nell'impiego di un campo magnetico esterno per veicolare le nanoparticelle di ossido di ferro verso il sito tumorale (Figura 3.2 B); questo migliorerebbe notevolmente la capacità di *targeting* e diminuirebbe l'assorbimento in organi o tessuti sani.

Tuttavia l'efficacia di questo metodo oltre a dipendere dalle caratteristiche delle nanostrutture utilizzate, è influenzata da altri fattori quali l'intensità del campo magnetico, la profondità del tessuto bersaglio e la velocità del flusso sanguigno.

Infine, un approccio meno convenzionale consisterebbe nell'inibire il sistema reticoloendoteliale con farmaci prima dell'impiego di nanoparticelle.

A tal proposito, Abdollah et al. hanno dimostrato che la soppressione delle cellule di Kupffer nel fegato con destrano solfato può aumentare significativamente l'emivita delle nanoparticelle magnetiche e l'efficacia di *targeting* dei tessuti di interesse [39].

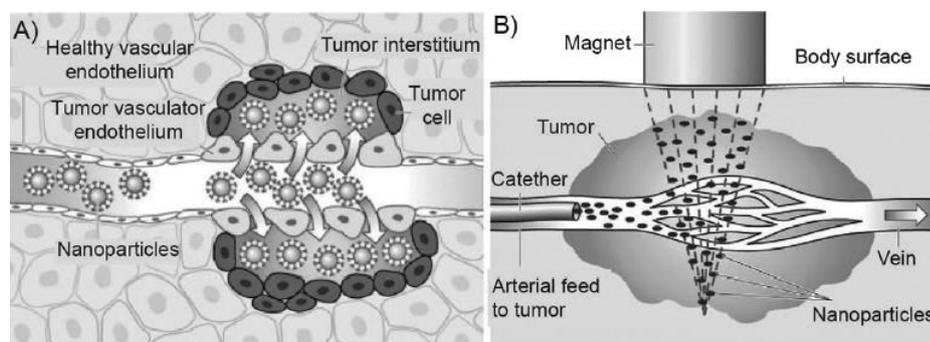


Figura 3.2 (A) Effetto EPR nel *targeting* passivo, (B) utilizzo di un campo magnetico esterno nel *targeting* attivo [30]

3.3 Parametri di interesse [9,40]

Caratteristiche quali morfologia, dimensione, carica e chimica superficiale influenzano in maniera significativa la prestazione delle nanoparticelle *in vivo*.

Morfologia [30,41]

Come riportato in alcuni studi, le strutture sferiche sembrerebbero rimanere nella circolazione sistemica generalmente meno a lungo rispetto a particelle 1D, principalmente perché quest'ultime tendono ad allinearsi con il flusso sanguigno.

È stato, inoltre, osservato che nanostrutture sferiche si accumulano in misura minore nei tumori rispetto a controparti dalla forma filamentosa.

Questi risultati hanno fornito, negli ultimi anni, la base per l'esplorazione di diverse morfologie.

È, però, importante sottolineare che è difficile fabbricare costrutti di forma differente mantenendo gli altri parametri identici (numero delle molecole di rivestimento, polidispersità, stabilità) e, pertanto, il confronto di risultati di questo tipo, relativi a geometrie diverse, non è molto sensato.

Dimensione [9,13,34,40,41]

Solitamente, la grandezza delle particelle (Figura 3.3 A) è il fattore che più influisce su aspetti quali l'emivita, la biodistribuzione e la *clearance*.

La dimensione idrodinamica di una nanoparticella definita come dimensione combinata del nucleo e del rivestimento, deve essere sufficientemente piccola da evitare l'assorbimento da parte degli organi del sistema reticoloendoteliale, ma abbastanza grande da eludere la *clearance* renale.

Più precisamente, nanoparticelle con dimensioni maggiori di 200 nm rimangono intrappolate nella zona marginale e nella polpa rossa e vanno incontro a filtrazione

splenica, mentre nanostrutture più grandi di circa 100 nm sono catturate dalle cellule di Kupffer nel fegato.

Al contrario, un diametro inferiore a 10-15 nm comporta una rapida *clearance* renale.

Pertanto, la dimensione idrodinamica ideale si attesta tra 10 e 100 nm, in quanto permette un assorbimento delle nanoparticelle molto ridotto da parte degli organi del RES e dei reni e offre, generalmente, un'emivita abbastanza lunga da garantire un'efficienza di *targeting* migliore.

Carica superficiale [9,13,41]

Oltre alle dimensioni, anche la carica superficiale (Figura 3.3 B) gioca un ruolo fondamentale nel determinare l'emivita, influenzare i meccanismi di *clearance* e migliorare l'accumulo selettivo in specifici siti di interesse.

Come riportato nello studio di Osaka et al., nanoparticelle cariche positivamente dimostrano un assorbimento più efficiente da parte delle cellule di carcinoma mammario rispetto a quelle con carica negativa [42].

Tuttavia, hanno un tasso di assorbimento non specifico più alto nella maggior parte delle cellule umane e tendono a essere riconosciute più rapidamente dal sistema reticoloendoteliale come risultato dell'adsorbimento di proteine plasmatiche.

Al contrario, nanoparticelle con carica superficiale neutra o leggermente negativa sono meno soggette a meccanismi di opsonizzazione e hanno un'emivita maggiore.

Inoltre, considerato che le nanoparticelle devono essere emocompatibili e che, quindi, non devono rilasciare sostanze tossiche, causare reazioni avverse da parte dell'organismo o andare incontro ad alterazioni, e dal momento che l'emocompatibilità è legata in parte alla carica superficiale, nanoparticelle cariche negativamente sono preferibili a quelle di segno opposto: infatti, una carica negativa garantisce repulsione elettrostatica con le piastrine sanguigne, cariche anch'esse negativamente, evitando fenomeni di trombogenesi [43].

In base a quanto detto si può quindi affermare che, in un primo momento, sarebbe ideale avere nanoparticelle con carica negativa, affinché si possa avere una minore *clearance* da parte del RES, garantire un'emivita superiore ed evitare la formazione di trombi ma, successivamente, si preferirebbe il passaggio a una carica positiva per un miglior *targeting* tumorale; ciò è possibile grazie a nanoparticelle zwitterioniche con carica commutabile in risposta a stimoli ambientali.

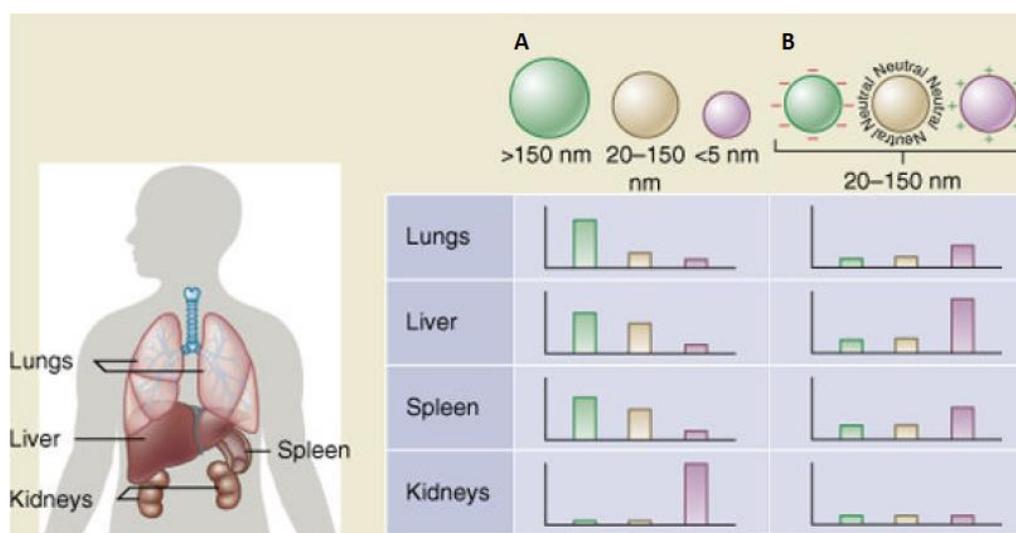


Figura 3.3 Confronto della biodistribuzione di nanoparticelle magnetiche nei polmoni, nel fegato, nella milza e nei reni in base a (A) dimensione, (B) carica superficiale [41]

Funzionalizzazione superficiale [31,34,35,40]

La funzionalizzazione superficiale rappresenta un ulteriore stratagemma progettuale per minimizzare i fenomeni di *clearance* mediata da macrofagi.

Affinché sia possibile eludere la cattura da parte degli organi del sistema reticoloendoteliale è necessario impedire che si verifichino le interazioni elettrostatiche e idrofobe che aiutano le opsonine a legarsi alla superficie delle particelle.

L'utilizzo di tensioattivi polimerici anfifilici è di grande aiuto in tal senso: la presenza di un rivestimento di questo tipo fornisce, infatti, uno strato protettivo idrofilo sulla superficie delle nanoparticelle che, oltre a prevenire l'aggregazione tra le stesse, riduce significativamente le interazioni con i componenti del sangue.

A tale scopo, il glicole polietilenico (PEG) rappresenta il polimero più comunemente utilizzato; una valida alternativa a materiali polimerici è rappresentata dagli zwitterioni.

Nella figura riportata di seguito (Figura 3.4), si presentano le varie barriere fisiologiche incontrate tipicamente da una nanoparticella di ossido di ferro in seguito a somministrazione endovenosa e si riassumono i limiti da queste imposti e i principali stratagemmi che è possibile adottare per eluderli.

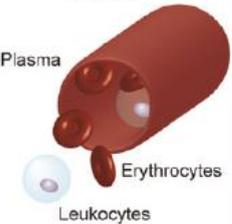
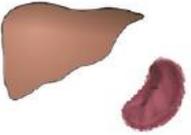
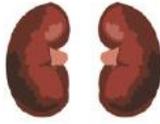
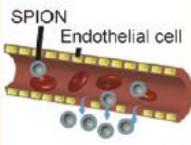
	Blood	Liver and Spleen	Kidneys	Extravasation
Barrier				
Restrictions	<ul style="list-style-type: none"> Highly complex fluid Enzyme degradation Immune recognition 	<ul style="list-style-type: none"> Objects larger than 100 nm recognized and removed from circulation 	<ul style="list-style-type: none"> Objects smaller than the 10 nm pores of the glomerulus are filtered out of the blood 	<ul style="list-style-type: none"> Gaps between endothelial cells restrict material escape from the blood
Strategies	<ul style="list-style-type: none"> PEGylation Zwitterionic polymers Encapsulation of drug or biotherapeutic 	<ul style="list-style-type: none"> Hydrodynamic size less than 100 nm 	<ul style="list-style-type: none"> Hydrodynamic size greater than 10 nm 	<ul style="list-style-type: none"> Enhanced permeability and retention effect Hydrodynamic size 30 - 100 nm

Figura 3.4 Confronto tra le diverse barriere fisiologiche incontrate dalle nanoparticelle, limiti e strategie per permettere un efficace accumulo nel sito di interesse [34]

3.4 Biodegradazione e tossicità [9,30,40,44,45,46]

Mentre in un primo momento la biodistribuzione delle nanoparticelle di ossido di ferro è regolata da parametri volti ad eludere, per quanto possibile, i meccanismi di *clearance* e ad aumentarne l'efficacia di *targeting*, più tardi, una volta esplicita la propria funzione,

entrano in gioco altri fattori, quali i meccanismi di regolazione metabolica dei livelli di ferro sistemico e cellulare.

In seguito a processi di degradazione intracellulari delle nanoparticelle c'è, infatti, un eccesso di ferro negli organi che deve essere regolato, dal momento che l'accumulo di ferro libero può aumentare lo stress ossidativo e causare tossicità.

Il modo in cui il corpo metabolizza le nanoparticelle dipende dalla loro composizione chimica e in special modo dal tipo di rivestimento o ligandi presenti, ma in ogni caso i nuclei di ossido di ferro entrano solitamente nella normale riserva di ferro corporea e seguono gli stessi percorsi di escrezione della controparte endogena.

In particolare, la ferritina e la transferrina sono i due principali complessi ferro-proteici che si occupano della gestione dei sottoprodotti derivanti dalla degradazione delle nanoparticelle di magnetite all'interno del corpo umano.

I dati di tossicità in vivo sulle nanoparticelle magnetiche dimostrano che il loro uso non ha implicazioni a lungo termine se somministrate a concentrazioni clinicamente rilevanti attraverso i principali metodi di somministrazione.

Va sottolineato, però, che modifiche superficiali volte ad assicurare una maggiore efficacia di somministrazione intracellulare o una migliore elusione dei meccanismi di *clearance* del RES tendono solitamente ad aumentare la loro potenziale tossicità.

Diversi *reports* riportano l'accumulo di ferro nei tessuti, ma con cambiamenti istologici insignificanti negli organi vitali, attestando la sicurezza delle rispettive formulazioni.

A titolo di esempio, in un soggetto sano in età adulta il livello totale di ferro si aggira normalmente su circa 3500 mg, di cui, mediamente, nel fegato sono contenuti circa 0.2 mg per grammo.

La dose attualmente approvata per *imaging* a risonanza magnetica in un adulto varia tra i 50 e i 200 mg, valore relativamente piccolo se confrontato al livello totale presente nel corpo umano.

Si andrebbe incontro a tossicità cronica soltanto qualora la concentrazione di ferro raggiungesse un livello di 4 mg per grammo di fegato.

Capitolo 4

Proprietà magnetiche e ipertermia

4.1 Introduzione [13,19,47,48,49]

Le proprietà magnetiche osservabili macroscopicamente dipendono da fenomeni microscopici legati al movimento di particelle dotate sia di massa che di carica elettrica, quali elettroni, protoni, cationi e anioni.

I dipoli magnetici generati da queste particelle sono raggruppati nei materiali in volumi definiti domini di Weiss, ciascuno dei quali costituisce una regione con una propria magnetizzazione uniforme, poiché al suo interno i momenti di dipolo risultano tutti allineati nella stessa direzione.

Il concetto di domini magnetici distingue il ferromagnetismo dal paramagnetismo.

Materiali *bulk* ferromagnetici presentano una struttura multidominio, configurazione favorita dal punto di vista energetico in quanto minimizza l'energia magnetostatica tanto più, quanto maggiore è il numero dei domini contenuti.

La presenza di più domini implica l'esistenza di confini di separazione definiti pareti di dominio, la cui formazione avviene spendendo una certa quantità di energia.

Se la dimensione del materiale diminuisce al di sotto di una certa soglia critica, la spesa energetica per formare questi confini risulta troppo alta e, pertanto, la configurazione

multidominio diviene energeticamente sfavorevole e lascia il posto a una struttura a dominio singolo.

Per una particella sferica, il diametro critico è calcolabile come:

$$D_c \approx 18 \frac{\sqrt{A \cdot k_{eff}}}{\mu_0 \cdot M^2}$$

con A costante di scambio, k_{eff} costante di anisotropia, μ_0 permeabilità magnetica del vuoto e M valore della magnetizzazione di saturazione.

Se il diametro è pari o inferiore a D_c l'energia di anisotropia, responsabile del mantenimento dei momenti magnetici lungo un asse preferenziale di magnetizzazione, è data dal prodotto della costante di anisotropia k_{eff} per il volume V della particella:

$$E = k_{eff} \cdot V$$

Quando la dimensione diminuisce ulteriormente, l'energia termica $k_b \cdot T$, con k_b costante di Boltzmann e T temperatura, può superare la forza di anisotropia e invertire spontaneamente la magnetizzazione da un asse preferenziale all'altro, anche in assenza di un campo applicato.

Questo fenomeno è chiamato superparamagnetismo: in questo stato la particella mostra un momento magnetico complessivo qualitativamente simile a quello presentato dai singoli dipoli dei materiali paramagnetici, ma di intensità maggiore.

La temperatura alla quale è raggiunta la condizione di superparamagnetismo è chiamata temperatura di bloccaggio T_b ed è uguale a:

$$T_b = \frac{k_{eff} \cdot V}{30 \cdot k_b}$$

Nanoparticelle di magnetite mostrano comportamento superparamagnetico per un diametro minore o uguale a circa 25 nm [50].

4.2 Classificazione dei materiali magnetici [51,52]

Il comportamento di un materiale sotto l'azione di un campo magnetico esterno è determinato da due fattori: la suscettibilità e la permeabilità.

La suscettibilità (χ) descrive il livello di magnetizzazione (\overline{M}) di un materiale in presenza del campo magnetico (\overline{H}):

$$\overline{M} = \chi \cdot \overline{H}$$

La permeabilità (μ) indica, invece, la variazione dell'induzione magnetica (\overline{B}) indotta dal campo (\overline{H}):

$$\overline{B} = \mu \cdot \overline{H}$$

In base al valore di suscettibilità è possibile classificare le sostanze magnetiche in:

- materiali diamagnetici: presentano un momento magnetico debole opposto al campo che lo ha generato. Hanno, quindi, un valore di suscettibilità piccolo e negativo, tipicamente dell'ordine di -10^{-5} .

Una volta rimosso il campo esterno, i momenti di dipolo tornano nella posizione iniziale e il materiale non mostra caratteristiche magnetiche.

- Materiali ferromagnetici: possiedono una magnetizzazione non nulla anche in assenza di un campo magnetico esterno. Se presente, i momenti magnetici si allineano nella sua direzione.

La suscettibilità per le sostanze ferromagnetiche assume valori positivi e molto alti, fino a un ordine pari a 10^6 .

Conservano una magnetizzazione residua una volta rimosso il campo esterno.

- Materiali paramagnetici: presentano momenti magnetici che si allineano nella direzione del campo applicato producendo una debole magnetizzazione [13].
Il valore di suscettibilità di queste sostanze è positivo ed è compreso nell'intervallo tra 10^{-5} e 10^{-3} .
Dopo la rimozione del campo, la magnetizzazione non persiste.

4.3 Curve di magnetizzazione [47,51,53,54]

Applicando un campo magnetico esterno di intensità \bar{H} a un materiale ferromagnetico si ottiene una curva di magnetizzazione come quella mostrata in Figura 4.1 (curva blu), in cui si può osservare che il valore di magnetizzazione \bar{M} cresce all'aumentare del campo \bar{H} fino a raggiungere un valore massimo di saturazione M_s .

La curva mostra un ciclo di isteresi perché non tutti i momenti magnetici associati ai domini della struttura ferromagnetica ritornano al loro orientamento originale all'annullarsi del campo magnetico.

È, infatti, presente una magnetizzazione residua definita rimanenza, la quale può essere rimossa solamente applicando un campo coercitivo \bar{H}_c nella direzione opposta al campo applicato inizialmente.

Aumentando l'intensità del campo nella nuova direzione, il materiale risulterà nuovamente saturo magneticamente ma nella direzione opposta.

Riducendo \bar{H} a zero si ha di nuovo magnetizzazione residua uguale in modulo a quella raggiunta nell'altra direzione.

Infine, invertendo nuovamente la direzione del campo applicato, il valore di magnetizzazione \bar{M} tornerà di nuovo a zero e aumentando ulteriormente \bar{H} il ciclo è chiuso.

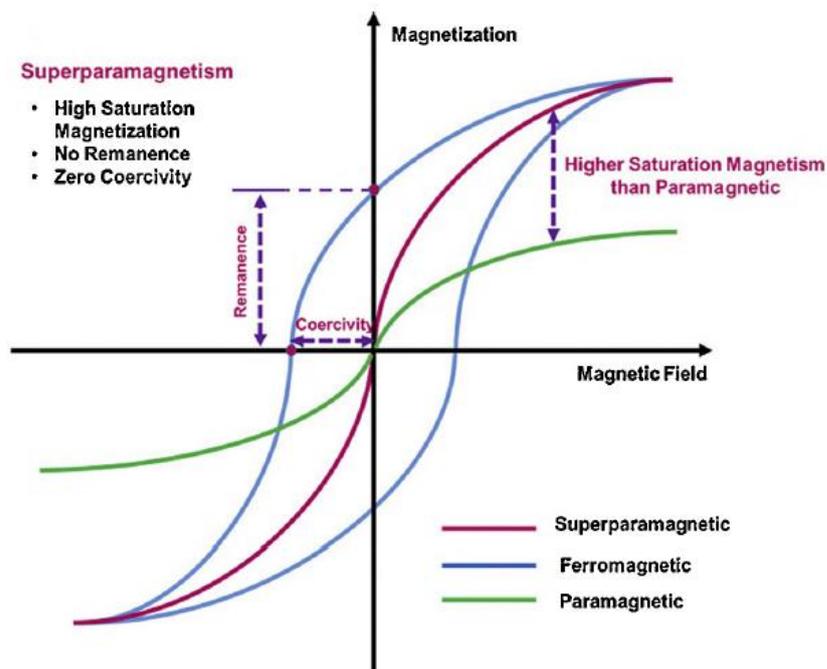


Figura 4.1 Curve di magnetizzazione tipiche per diverse classi di materiali magnetici (per un ferromagnete la curva è riportata in blu, per un superparamagnete in viola, per un paramagnete in verde) [13]

Il valore di rimanenza (M_r) e quello di coercitività (H_c) sono i parametri che descrivono la reazione di un materiale ferromagnetico all'applicazione del campo esterno.

Il secondo risulta particolarmente interessante; come descritto nel paragrafo 4.1, quando la dimensione del materiale ferromagnetico diminuisce fino a un valore corrispondente al diametro critico D_c , la coercitività raggiunge un massimo e si passa da una struttura multidominio a una configurazione a dominio singolo.

Per dimensioni ancora più piccole, la coercitività diventa pari a zero e la particella mostra caratteristiche superparamagnetiche (Figura 4.2).

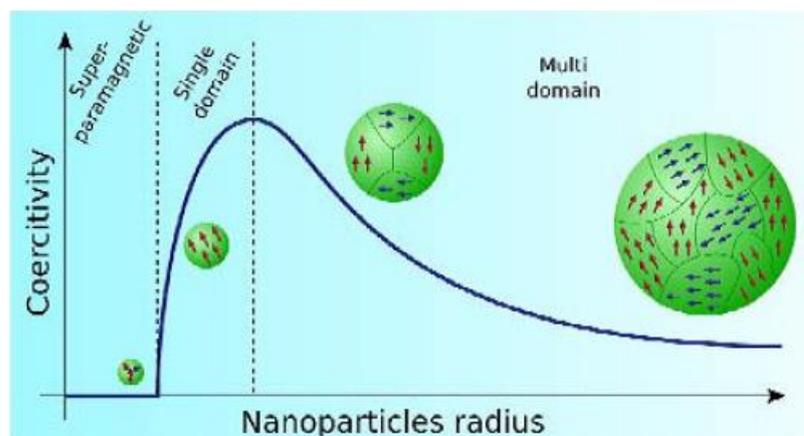


Figura 4.2 Relazione coercività-dimensione per particelle multidominio, a dominio singolo e superparamagnetiche [47]

Le nanoparticelle superparamagnetiche hanno, quindi, coercività pari a zero e non producono alcuna isteresi (Figura 4.1, curva viola).

Ciò comporta che la magnetizzazione residua sia pari a zero in seguito alla rimozione del campo.

Questa proprietà evita un comportamento "attivo" delle nanoparticelle quando non c'è un campo applicato e fa sì che, introdotte nei sistemi viventi, siano "magnetiche" solo in sua presenza.

L'assenza di una magnetizzazione residua, assieme alle dimensioni ridotte tipiche delle nanoparticelle superparamagnetiche, impedisce anche che si verifichino interazioni dipolari, migliorando la loro stabilità colloidale ed evitandone l'aggregazione.

Le nanoparticelle superparamagnetiche presentano, inoltre, un valore più alto di magnetizzazione di saturazione rispetto alla controparte paramagnetica (Figura 4.1, curva verde).

Ciò rende possibile controllarne il movimento nel circolo sanguigno e migliorarne il *targeting* attivo direzionandole verso il tessuto patologico bersaglio.

Le proprietà appena discusse rendono le nanoparticelle superparamagnetiche ottimi candidati per applicazioni di ipertermia magnetica.

4.4 Trattamenti ipertermici [55,56]

L'utilizzo di alte temperature nel campo della medicina è una pratica comune da moltissimi secoli.

Già ai tempi dell'antica Grecia, il filosofo e scienziato Ippocrate usò con successo il calore per trattare un tumore al seno.

Egli era profondamente convinto dell'efficacia dell'ipertermia, come dimostrano le parole a lui attribuite:

<<Ciò che i farmaci non riescono a curare, il bisturi può curare; ciò che il bisturi non riesce a curare, il calore può curare e se il calore non può curare, deve essere considerato incurabile>>.

In tempi più recenti, uno dei primi *reports* sull'utilizzo dell'ipertermia risale a uno studio tedesco del 1910 in cui centinaia di pazienti con diversi tipi di tumori avanzati furono trattati tramite radioterapia e diatermia, tecnica per riscaldare localmente tessuti corporei mediante l'utilizzo di correnti elettriche.

Un terzo di questi pazienti mostrarono una regressione tumorale completa, mentre altrettanti beneficiarono di miglioramenti temporanei.

4.4.1 Ipertermia convenzionale [57]

In generale l'ipertermia consiste nell'aumentare la temperatura di un'area localizzata, di una regione specifica o dell'intero corpo da un valore fisiologico di 37°C fino a valori nel range tra 41 e 45°C.

Il suo utilizzo come terapia antitumorale risulta particolarmente vantaggioso dal momento che l'ambiente neoplastico è più sensibile al riscaldamento rispetto ai tessuti sani: ciò è dovuto all'elevata acidità conseguente all'aumento delle attività glicolitiche all'interno delle cellule malate.

Inoltre, mentre nei tessuti sani, la velocità del sangue, in seguito al surriscaldamento, può aumentare fino a venti volte e, quindi, dissipare il calore velocemente, la portata volumica nel tumore tende al più a raddoppiare.

Pertanto, gli effetti dannosi comportati dall'aumento di temperatura risultano irreversibili per le cellule tumorali, ma reversibili per quelle sane [18].

Nonostante i risultati promettenti, i trattamenti ipertermici convenzionali basati sull'applicazione di ultrasuoni, radiazioni a microonde o riscaldamento a radiofrequenza faticano a essere accettati clinicamente, poiché spesso inefficaci se applicati come unica modalità terapeutica.

Risultano, infatti, scarsamente specifici non essendo sempre in grado di fornire calore in maniera sufficiente e mirata al tumore senza riscaldare i tessuti sani.

Inoltre, le onde usate hanno bassa capacità di penetrazione per cui è difficile trattare tumori profondi.

4.4.2 Ipertermia magnetica [17,57]

Conseguentemente a quanto detto, negli ultimi anni si è sviluppato un interesse significativo nell'ipertermia magnetica basata sul *targeting* tumorale realizzato tramite la somministrazione endovenosa di nanoparticelle di ossido di ferro e l'utilizzo di un campo magnetico a corrente alternata.

Consiste in un trattamento minimamente invasivo che assicura una migliore localizzazione dell'energia nell'area tumorale, in quanto va a incorporare la fonte di riscaldamento, ossia le particelle magnetiche, direttamente nel tessuto canceroso [58].

Permette, inoltre, un controllo adeguato della quantità di calore applicata che riscaldi solo nell'intorno delle nanoparticelle in modo da ridurre al minimo gli effetti collaterali.

Infine, può essere usata per trattare tumori di geometrie complesse o tumori nascosti in organi vitali per i quali l'asportazione chirurgica non è praticabile.

L'ipertermia magnetica è stata valutata in numerosi studi preclinici e clinici e diversi *reports* hanno dimostrato che è in grado da sola di generare energia sufficiente a causare una regressione tumorale completa.

4.5 Meccanismi di generazione del calore [57,59,60]

Una volta che le nanoparticelle magnetiche hanno raggiunto il sito tumorale, l'attivazione del campo magnetico esterno genera calore al loro interno attraverso una conversione di energia basata sul principio delle perdite per isteresi o delle perdite residue.

Considerate le ridotte dimensioni delle particelle e le basse frequenze di campo utilizzate, è possibile trascurare il calore prodotto da correnti parassite, ossia quelle correnti elettriche indotte, a causa della variazione del campo magnetico, all'interno di un conduttore, in tal caso il corpo umano.

4.5.1 Perdite per isteresi [57,59,60]

Rappresenta il meccanismo di riscaldamento dominante per nanoparticelle ferromagnetiche.

In questo caso viene prodotto calore tramite dissipazione di energia termica in seguito al processo di inversione dei domini magnetici.

La quantità di calore generata per unità di volume è data dalla frequenza moltiplicata per l'area del ciclo di isteresi, secondo la formula:

$$P = \mu_0 \cdot f \oint H \cdot dM$$

Al diminuire del diametro dei nuclei magnetici la transizione dal comportamento ferromagnetico a quello superparamagnetico comporta il cambiamento dei meccanismi di perdita e, conseguentemente, dell'effetto responsabile del riscaldamento.

4.5.2 Perdite residue [19,57,58,59,60,61]

Nel caso di nanoparticelle superparamagnetiche il calore è generato dalle perdite residue, ossia dal rilassamento di Néel e quello di Brown.

Rilassamento di Néel

Si riferisce al riscaldamento dovuto alle perdite di energia prodotte dalla rotazione dei singoli momenti magnetici interni alle particelle e dipende essenzialmente dalle proprietà magnetiche intrinseche, come l'anisotropia magnetica.

Come già discusso nel paragrafo 4.1, quando le fluttuazioni termiche $k_b \cdot T$ superano l'energia di anisotropia $k_{eff} \cdot V$, si ha il riorientamento dei vettori di magnetizzazione.

L'energia fornita dal campo magnetico esterno aiuta a superare la barriera energetica rappresentata dall'energia di anisotropia; si ha, quindi, produzione di calore.

Il processo è caratterizzato da un tempo di rilassamento caratteristico indicato come τ_N che dipende, appunto, dal rapporto tra l'energia di anisotropia e l'energia termica, secondo la formula:

$$\tau_N = \tau_0 \cdot e^{\frac{k_{eff} \cdot V}{k_b \cdot T}}$$

con τ_0 dell'ordine di 10^{-9} s

Rilassamento di Brown

Il secondo tipo di perdita residua è rappresentato dal rilassamento browniano in cui la generazione di calore è dovuta alla rotazione fisica delle nanoparticelle stesse, in seguito all'allineamento dei momenti magnetici con il campo applicato.

In questo caso, la barriera energetica è determinata dall'attrito che il fluido oppone alla rotazione delle nanoparticelle presenti al suo interno.

Per il rilassamento di Brown, τ_B dipende principalmente dalle proprietà idrodinamiche del fluido:

$$\tau_B = \tau_0 \cdot \frac{3\eta \cdot V_h}{k_b \cdot T}$$

dove η è la viscosità della sospensione fluida e V_h il volume idrodinamico che differisce dal volume geometrico della particella, in quanto tiene conto degli strati fluidi a essa aderenti

In realtà questo tipo di perdita residua nonostante sia caratteristico delle nanoparticelle superparamagnetiche, può verificarsi anche per particelle più grandi qualora la viscosità del fluido risulti sufficientemente bassa da permetterne la rotazione.

Tuttavia, poiché i meccanismi di morte cellulare per ipertermia comportano solitamente la presenza delle nanoparticelle nella matrice extracellulare o la loro internalizzazione nelle cellule tumorali stesse, e poiché questi ambienti sono caratterizzati da un alto valore di viscosità, il rilassamento browniano rappresenta, spesso, un meccanismo di rilascio termico trascurabile rispetto a quello di Néel e alle perdite per isteresi.

Nella figura riportata di seguito (Figura 4.3), si riassumono i tre differenti meccanismi di generazione del calore appena descritti.

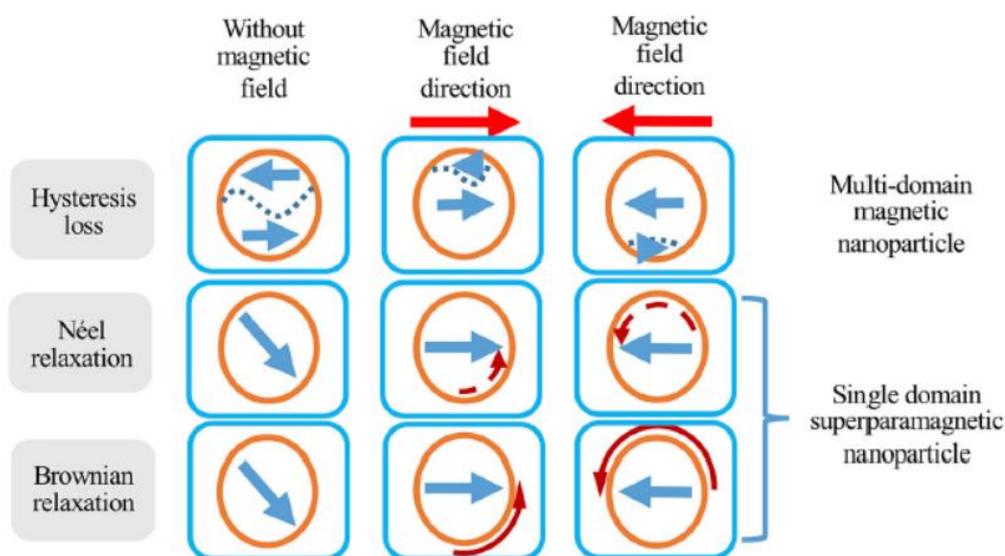


Figura 4.3 Confronto tra le perdite per isteresi in nanoparticelle multidominio e rilassamento di Néel e di Brown in strutture a dominio singolo (i cerchi arancioni rappresentano le nanoparticelle, i trattini blu le pareti di dominio, le frecce blu la direzione dei vettori di magnetizzazione, quelle rosse, curve, tratteggiate il cambiamento di direzione dei momenti magnetici e quelle rosse, curve, continue la rotazione delle particelle) [17]

4.5.3 SAR [59,60]

In ogni caso, qualunque sia il meccanismo di perdita coinvolto, il calore generato può essere espresso attraverso una grandezza definita tasso di assorbimento specifico (SAR) o potenza di perdita specifica, definita come:

$$SAR = C \cdot \left(\frac{dT}{dt}\right) \cdot \left(\frac{m_s}{m_m}\right)$$

con C capacità termica specifica della sospensione, $\left(\frac{dT}{dt}\right)$ tasso di riscaldamento al secondo, m_s massa della sospensione e m_m massa del materiale magnetico in sospensione

Il vantaggio nell'utilizzo delle nanoparticelle superparamagnetiche risiede nel fatto che, per ampiezze di campo limitate, il SAR risulta essere maggiore di quello ottenuto con particelle multidominio.

4.6 Ipertermia e morte cellulare [17,56,57]

Come dimostrato da esperimenti *in vitro*, la riduzione della vitalità cellulare indotta dal riscaldamento non dipende solamente dalla temperatura, ma è influenzata anche dalla durata del trattamento ipertermico.

In Figura 4.3 è possibile osservare che, a parità di percentuale di cellule sopravvissute, sono richiesti tempi tanto più brevi quanto maggiore è la temperatura.

Inoltre, si può constatare che anche una piccola variazione, pari solo a mezzo grado centigrado, può avere un impatto sostanziale sul tasso di morte cellulare.

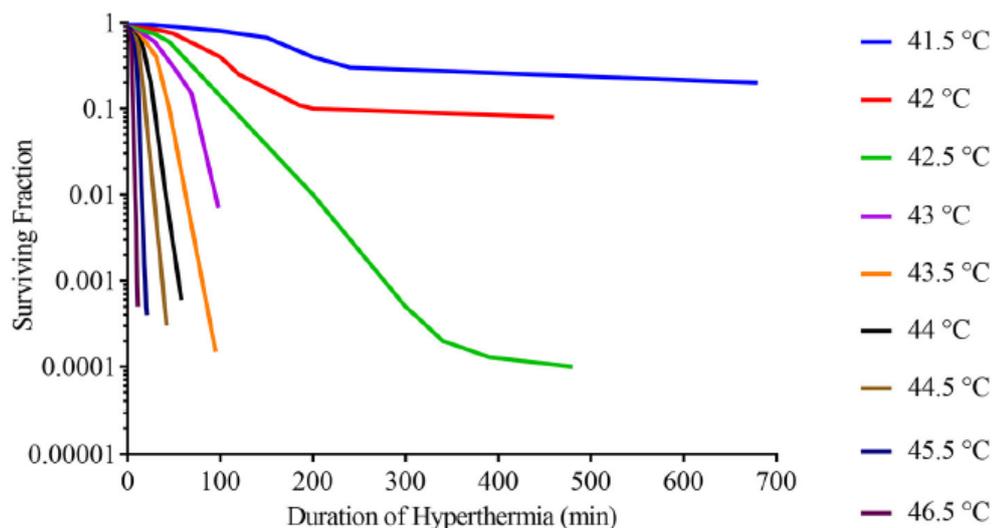


Figura 4.4 Legame sopravvivenza cellulare-durata del trattamento ipertermico per diverse temperature [17]

L'ipertermia può ridurre la vitalità cellulare attraverso diversi meccanismi tra i quali la denaturazione proteica.

Ciascuna proteina ha una propria soglia di temperatura che ne causa la denaturazione.

Questo fenomeno si osserva a partire da circa 40°C per proteine sia all'interno di cellule sane che all'interno di cellule cancerose e, tanto più è elevata la temperatura, maggiore ne è il numero coinvolto.

Gli innalzamenti di temperatura comportano, inoltre, processi di aggregazione delle proteine che, combinati al fenomeno di denaturazione, possono portare all'inattivazione della sintesi proteica e all'inibizione dei processi di riparazione del DNA.

L'ipertermia può avere un impatto negativo anche sul citoscheletro, sugli organelli, sul trasporto intracellulare e sull'elaborazione dell'RNA.

Un ulteriore potenziale contributo alla riduzione della vitalità cellulare sono le alterazioni indotte dal calore nelle membrane plasmatiche e in quelle subcellulari degli organelli, così come sulle proteine di membrana.

L'ipertermia può, inoltre, rendere l'ambiente tumorale più visibile al sistema immunitario comportando una maggiore migrazione di cellule effettrici al suo interno, la loro proliferazione, la produzione di citochine pro-infiammatorie e l'aumento dell'effetto citotossico nei confronti delle cellule neoplastiche.

Oltre a utilizzare l'ipertermia come singolo trattamento antitumorale, è possibile combinarla alla radioterapia e alla chemioterapia per un'azione multimodale ad efficacia terapeutica maggiore.

Le aree tumorali essendo ipossiche possono, a volte, risultare radioresistenti: grazie a trattamenti ipertermici si ha una maggiore perfusione vascolare e quindi un aumento dell'apporto di ossigeno, e si accresce, così, la sensibilità delle cellule neoplastiche alla radioterapia.

Inoltre, poiché l'ipertermia tende a denaturare le proteine e inattivare quelle coinvolte nei processi di riparazione cellulare, è possibile impedire la guarigione delle cellule maligne in seguito ai danni al DNA indotti dai trattamenti radioterapici.

Per quanto riguarda la chemioterapia, l'innalzamento della temperatura può migliorare l'efficacia degli agenti chemioterapici, facilitandone l'accumulo nel sito tumorale e aumentandone la citotossicità nei confronti delle cellule cancerose.

Capitolo 5

Nanoparticelle magnetoplasmoniche

5.1 Introduzione [62,63,64,65]

Negli ultimi decenni la ricerca scientifica si è interessata a una varietà di nanoparticelle costituite da materiali diversi come i metalli nobili (oro, argento, platino), i semiconduttori, i composti magnetici (maghemite, magnetite) e le loro possibili combinazioni.

Tra queste, le nanoparticelle e i nanocomplessi ibridi di metalli nobili hanno attratto grande attenzione per via delle loro proprietà e la possibilità di impiego in vari campi di applicazione.

I metalli preziosi risultano resistenti alla corrosione e all'ossidazione, non sono reattivi, ma, soprattutto, presentano alla nanoscala proprietà ottiche ed elettroniche molto particolari.

Tra tutti i metalli nobili l'argento e l'oro risultano essere i più interessanti.

L'argento ha un prezzo relativamente basso, così da facilitare l'uso diffuso delle sue nanoparticelle e presenta attività antimicrobica che è particolarmente accentuata a dimensioni nanometriche per via dell'elevata area di superficie e, conseguentemente, l'alto numero di atomi superficiali presenti.

Le nanoparticelle d'argento dimostrano, infatti, un buon effetto inibitorio su diversi batteri e virus, come lo *Staphylococcus aureus* e il virus dell'immunodeficienza umana.

Per quanto riguarda l'oro, negli ultimi anni nanoparticelle di questo materiale sono state portate alla ribalta della ricerca sul cancro per via della loro facilità di sintesi e modifica superficiale, l'ottima biocompatibilità e l'assenza di tossicità.

5.2 Risonanza plasmonica di superficie localizzata [66,67,68]

Le nanoparticelle di argento e oro (nanoparticelle plasmoniche), presentano un fenomeno fotofisico unico, chiamato risonanza plasmonica di superficie localizzata (LSPR), risultante dall'interazione con radiazioni luminose.

Quando una particella metallica viene esposta alla luce, il campo elettrico dell'onda incidente induce una polarizzazione degli elettroni liberi presenti all'interno della banda di conduzione.

Si ha, pertanto, uno spostamento delle cariche negative rispetto a quelle positive, considerate fisse, e la differenza di carica netta risultante dà origine a una forza di richiamo per gli elettroni.

L'eccitazione coerente di tutti gli elettroni liberi porta a un'oscillazione collettiva in fase con il campo elettrico (Figura 5.1).

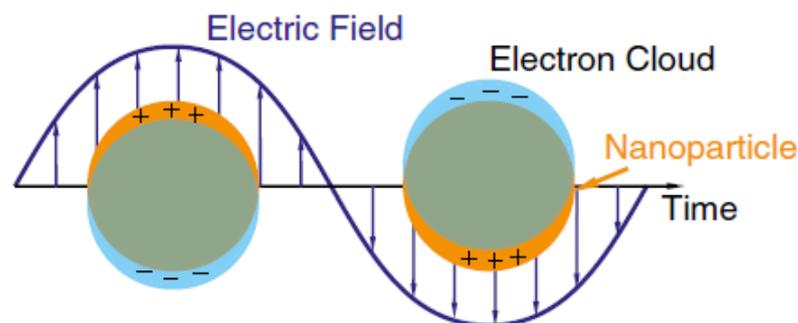


Figura 5.1 Interazione tra la radiazione luminosa incidente e una nanoparticella plasmonica [69]

La radiazione luminosa che interagisce con le nanoparticelle plasmoniche subisce un processo di estinzione dato dal contributo di due fenomeni: *scattering* e assorbimento.

Lo *scattering* si verifica quando le oscillazioni elettroniche causate dall'esposizione alla luce comportano l'emissione di parte dell'energia elettromagnetica incidente in tutte le direzioni.

In aggiunta a questo fenomeno, le cariche elementari eccitate possono trasformare e, quindi, dissipare l'energia fotonica sotto forma di energia termica (assorbimento).

È possibile valutare questi due fenomeni utilizzando la teoria di Mie o l'approssimazione di dipolo discreto (DDA).

In generale, per nanoparticelle plasmoniche piccole l'assorbimento domina il processo di estinzione della radiazione luminosa, ma con l'aumentare delle dimensioni compare anche lo *scattering*.

5.3 Terapia fototermica [65,66]

La terapia fototermica (PTT) è un trattamento minimamente invasivo che consiste nello sfruttare radiazioni luminose nel visibile (Vis) o nel vicino infrarosso (NIR) per produrre calore in una specifica regione bersaglio del corpo al fine di uccidere le cellule cancerose.

Nella sua forma classica è necessario impiegare nel sito tumorale coloranti organici in grado di assorbire le radiazioni.

Ciò rappresenta uno svantaggio in quanto questo tipo di fotosensibilizzatori ha una bassa efficienza di assorbimento ed è soggetto al fenomeno del *photobleaching* per cui perde nel tempo la capacità di fluorescenza.

Negli ultimi anni la PTT ha ottenuto nuovamente interesse nella comunità scientifica grazie all'utilizzo, come agenti fotosensibilizzanti, di nanoparticelle plasmoniche (terapia fototermica plasmonica, PPTT).

Queste particelle mostrano una capacità di assorbimento milioni di volte superiore rispetto alle molecole di colorante convenzionali, sono fotostabili, biocompatibili e hanno un'elevata efficienza di conversione della luce assorbita in calore.

Il processo di trasformazione energetica inizia nel momento in cui si verifica una perdita di fase degli elettroni coerentemente eccitati, a causa di fenomeni di collisione che ne comportano il riscaldamento.

L'energia termica viene allora trasmessa dagli elettroni ai fononi, ossia ai quanti di vibrazione nel reticolo, causando il riscaldamento dell'intera struttura cristallina.

Nel tempo il reticolo si raffredda per via di fenomeni di rilassamento del tipo fonone-fonone e si ha, pertanto, dissipazione di calore dalle nanoparticelle plasmoniche all'ambiente tumorale.

Per via del calore prodotto, le nanostrutture alterano le funzionalità cellulari provocandone la distruzione.

I meccanismi di morte cellulare si basano sulla denaturazione proteica, su danni da cavitazione indotti da bolle formatesi in seguito all'espansione termica delle nanoparticelle, sulla rottura della struttura cellulare e, infine, sull'evaporazione del citosol.

La terapia fototermica plasmonica che impiega radiazioni nel visibile è limitata a studi *in vitro*, a causa della loro scarsa capacità di penetrazione nei tessuti biologici.

Affinché il trattamento abbia successo *in vivo*, bisogna utilizzare luce nel vicino infrarosso, in quanto queste radiazioni penetrano più in profondità poiché subiscono un assorbimento minimo da parte dell'emoglobina e delle molecole d'acqua.

Infine, per far sì che l'assorbimento della radiazione nel NIR da parte delle nanoparticelle plasmoniche sia massimale, è importante che ci sia sovrapposizione tra la frequenza dell'onda incidente e la banda di assorbimento (spettro LSPR) delle particelle.

Generalmente, per nanoparticelle di oro e argento dalla forma sferica questa banda cade nella regione della luce visibile, ma può essere spostata verso il rosso a lunghezze d'onda superiori utilizzando nanostrutture che abbiano dimensioni maggiori e/o una morfologia differente.

Per quanto riguarda le nanoparticelle d'oro, un altro modo per ottenere un picco di risonanza a lunghezze d'onda superiori consiste nell'utilizzo di coloranti cationici, quali il blu di toluidina: lo spostamento del picco è dovuto all'aggregazione delle nanoparticelle in *clusters* in seguito all'aggiunta di queste molecole di colorante [70].

5.4 Nanocompositi [71,72]

Le nanoparticelle plasmoniche, oltre a presentare le interessanti proprietà di cui si è discusso, presentano anche alcuni svantaggi.

In particolare, mostrano un'emivita piuttosto breve nel circolo sanguigno, poiché sono velocemente eliminate dai meccanismi di *clearance* messi in atto dall'organismo.

Inoltre, dal momento che non è possibile manipolarle esternamente, solamente una piccola parte di quelle somministrate riesce di solito a legarsi all'organo o ai tessuti di interesse.

Infine, anche se si utilizzano radiazioni nel vicino infrarosso che hanno maggiore capacità di penetrazione rispetto alla luce visibile, l'applicazione di trattamenti fototermici basati sull'impiego di nanoparticelle plasmoniche è comunque limitata a tessuti superficiali.

L'idea è quindi di legarle a nanoparticelle magnetiche in modo da creare materiali compositi (nanoparticelle magnetoplasmoniche) che, oltre a integrare diverse funzionalità in un'unica particella composta, permettano di superare gli svantaggi propri di ogni singola formulazione.

A tal proposito, risulta particolarmente promettente la combinazione di magnetite e oro.

Da un lato, l'impiego di nanoparticelle d'oro crea un rivestimento in grado di garantire la stabilità dei nuclei di magnetite, di evitarne l'aggregazione e rende possibile il legame con una vasta gamma di biomolecole sfruttando l'affinità dell'oro con gruppi amminici e

tiolo; dall'altro, la presenza di nanostrutture di magnetite permette un'efficienza di *targeting* maggiore e quindi un migliore accumulo delle nanoparticelle magnetoplasmoniche negli organi e tessuti di interesse, grazie alla possibilità di controllare la componente magnetica tramite l'applicazione di un campo esterno.

All'interno di questi nanocompositi si possono modificare e ottimizzare in maniera indipendente i parametri relativi a ogni unità presente, affinché ciascuna possa esplicare la propria funzione, ma è anche possibile regolarli al fine di indurre fenomeni sinergici [15].

L'unione di due formulazioni all'interno di un'unica struttura cambia però, inevitabilmente, le singole proprietà plasmoniche e magnetiche.

In particolare, la presenza dell'unità magnetica provoca uno spostamento del picco di risonanza dallo spettro visibile verso il vicino infrarosso, poiché comporta la modifica di parametri quali l'indice di rifrazione e la costante dielettrica che influenzano la risonanza plasmonica secondo la teoria di Mie.

In base a quanto detto nel paragrafo precedente, questo cambiamento è in realtà ben accetto ed estremamente conveniente se si vuole garantire un'adeguata efficacia della terapia fototermica.

Anche le proprietà magnetiche cambiano, ma, in questo caso, in maniera sconveniente.

Come dimostrato nello studio di D. K. Kirui et al., nanoparticelle magnetoplasmoniche date dalla combinazione di magnetite e oro, presentano una curva di magnetizzazione senza isteresi per cui conservano un comportamento superparamagnetico, ma peggiore, in quanto mostrano una diminuzione del valore della magnetizzazione di saturazione M_s .

Anche il valore di relassività r_2 , importante per l'*imaging* a risonanza magnetica, risulta minore.

In entrambi i casi, ciò è attribuito al contributo debolmente magnetico dell'oro, che va sì a peggiorare le proprietà magnetiche, ma non al punto tale da compromettere l'efficacia dell'unità di magnetite e, quindi, dell'intera nanoparticella magnetoplasmonica [73].

Pertanto, combinando le proprietà magnetiche e ottiche delle singole unità, si possono ottenere vettori teranostici multifunzionali che risultano efficienti e potenzialmente

utilizzabili sia nell'*imaging* multimodale e, in particolare, in risonanza magnetica e in tomografia computerizzata (grazie alle nanoparticelle d'oro), sia per scopi terapeutici quali l'ipertermia magnetica per tumori profondi, la terapia fototermica plasmonica per quelli più superficiali e il trasporto e rilascio mirato di farmaci (*targeted drug delivery*).

Ad esempio, Wagstaff et al. hanno preparato nanoparticelle di ossido di ferro rivestite d'oro e caricate con il componente attivo del farmaco antitumorale cisplatino.

I *nanocarriers* sono stati valutati in vitro e hanno dimostrato un effetto citotossico centodieci volte maggiore rispetto al cisplatino su linee cellulari di carcinoma ovarico umano A2780.

Inoltre, per capire se questi nanosistemi di *drug delivery* potessero essere controllati magneticamente in un ambiente biologico, le cellule sono state trattate con le nanoparticelle in presenza di un magnete a barra posto al di sotto della piastra di coltura.

Si è dimostrato che è possibile attrarre le nanoparticelle magneticamente e che la localizzazione che ne deriva determina l'inibizione della crescita delle cellule tumorali in quelle specifiche regioni [74].

L'attività di tesi, descritta nelle pagine a seguire, è finalizzata a ottenere nanoparticelle magnetoplasmoniche che conservino le caratteristiche peculiari di entrambi i nanomateriali.

La sintesi di questi nanocompositi è ottenuta in maniera semplice e facilmente riproducibile ed è basata sull'uso innovativo dell'acido tannico, composto di origine naturale, ecocompatibile e dalle proprietà antiossidanti e antitumorali.

Capitolo 6

Materiali e metodi

6.1 Introduzione

L'obiettivo principale del lavoro di tesi consiste nel preparare e caratterizzare nanoparticelle magnetoplasmoniche che permettano di combinare magnetite e argento o magnetite e oro all'interno di un unico nanomateriale che possa essere utilizzato *in vivo* per teranostica.

L'idea è quella di sfruttare le proprietà superparamagnetiche delle particelle di magnetite per veicolare i sistemi nanocompositi nel microambiente tumorale al fine di uccidere le cellule cancerose.

Ciò è possibile utilizzando la terapia fototermica plasmonica sull'unità di argento o di oro nel caso di tumori superficiali o l'ipertermia magnetica per tumori più profondi; nel secondo caso, la presenza dell'unità di argento o di oro può essere sfruttata per garantire antibattericità o per la funzionalizzazione con biomolecole.

Rispetto a trattamenti termici convenzionali, in questo modo si va direttamente a incorporare la fonte di riscaldamento all'interno del sito tumorale, garantendo una più precisa localizzazione energetica.

Vengono pertanto presentati due diversi metodi di sintesi di nanoparticelle magnetoplasmoniche, entrambi basati sulla co-precipitazione chimica di sali $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ in soluzione acquosa per la realizzazione di nanoparticelle di ossido di ferro (magnetite - Fe_3O_4), cui segue una fase di stabilizzazione, una di funzionalizzazione superficiale e, infine, la decorazione con nanoparticelle di argento o di oro.

I due percorsi di sintesi si differenziano tra loro per il modo in cui le nanoparticelle magnetiche vengono stabilizzate, per la presenza o meno di uno step di funzionalizzazione e per come le nanoparticelle metalliche vengono sintetizzate e legate a quelle di magnetite.

È possibile schematizzare il *Metodo 1* nelle seguenti fasi:

- a. Sintesi delle nanoparticelle di Fe_3O_4 tramite co-precipitazione chimica;
- b. Stabilizzazione con acido citrico;
- c. Funzionalizzazione superficiale con APTES (3-amminopropiltri-etossisilano);
- d. Sintesi e ancoraggio delle nanoparticelle di argento o di oro tramite riduzione *in situ* di precursori metallici utilizzando l'acido tannico come agente riducente.

Il *Metodo 2*, più rapido, risulta invece caratterizzato dai seguenti passaggi:

- a. Sintesi delle nanoparticelle di Fe_3O_4 tramite co-precipitazione chimica;
- b. Sintesi e ancoraggio delle nanoparticelle metalliche tramite riduzione *in situ* di precursori, mediante l'impiego dell'acido tannico sia come agente stabilizzante che riducente.

Di seguito, vengono illustrati nello specifico i due diversi percorsi di sintesi e sono, infine, presentate le tecniche di caratterizzazione utilizzate per descrivere e confrontare le nanoparticelle magnetoplasmoniche ottenute secondo i due metodi.

Tutti i reagenti usati nel corso delle varie fasi sono stati acquistati, se non diversamente specificato, da Sigma-Aldrich®.

6.2 Preparazione di nanoparticelle magnetoplasmoniche: *Metodo 1*

Sintesi di nanoparticelle di magnetite

Come precedentemente accennato, le nanoparticelle di ossido di ferro (Fe_3O_4) sono state sintetizzate a partire da soluzioni acquose di sali $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, tramite l'aggiunta di una base di idrossido di ammonio (NH_4OH) a temperatura ambiente.

Per prima cosa, utilizzando una bilancia digitale di precisione sono stati pesati accuratamente 1.02 g di cloruro ferroso tetraidrato ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e 1.3 g di cloruro ferrico esaidrato ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), entrambi in polvere.

Ciascuno dei due è stato quindi inserito all'interno di un becher contenente 50 ml di acqua bidistillata, poi posto su un agitatore magnetico al fine di ottenere la completa dissoluzione del precursore presente.

A questo punto, 37.5 ml di soluzione di cloruro ferroso sono stati versati nel becher contenente 50 ml di cloruro ferrico e miscelati utilizzando un agitatore meccanico a immersione.

Per indurre la formazione di nanoparticelle di magnetite, è stato aggiunto alla soluzione idrossido di ammonio (NH_4OH) goccia a goccia, sotto agitazione continua, fintanto che da un valore iniziale di pH inferiore a 2 misurato tramite pH-metro, si è raggiunto un valore compreso tra 9.5 e 10.

Al variare del pH, la soluzione partendo da un colore giallo ha acquistato una colorazione nera.

Il colore per gli ossidi di ferro dipende molto dalla composizione chimica e ne consente l'identificazione: la colorazione nera dovuta al raggiungimento di un valore finale di pH nel

range 9.5 ÷ 10 indica l'avvenuta sintesi di magnetite pura senza nessun altro ossido di ferro associato [75].

La sospensione ottenuta è stata quindi posta all'interno di un bagno a ultrasuoni (SONICA® Ultrasonic Cleaner) per 20 minuti a temperatura ambiente.

Una volta terminato il trattamento è stato posizionato un magnete al di sotto del becher contenente la soluzione, al fine di indurre la sedimentazione delle nanoparticelle di Fe₃O₄ e si è, quindi, proceduto a rimuovere i residui dei reagenti e l'idrossido di ammonio tramite tre cicli di lavaggio con acqua bidistillata.

Stabilizzazione con acido citrico

Come già accennato nel capitolo 2, le nanoparticelle di magnetite mostrano un'instabilità intrinseca che con il passare del tempo le porta ad aggregarsi al fine di minimizzare la propria energia superficiale.

Per evitare che questo fenomeno avvenga è necessario impiegare agenti stabilizzanti: a tal proposito, particolarmente utilizzato è l'acido citrico.

Pertanto, al termine dell'ultimo ciclo di lavaggio relativo allo step precedente, le nanoparticelle sintetizzate sono state disperse in 120 ml di soluzione di acido citrico monoidrato (C₆H₈O₇·H₂O) 0.05 M.

Tramite agitatore meccanico si è posta la soluzione in agitazione continua e si è aggiunto idrossido di ammonio (NH₄OH), goccia a goccia, fino ad arrivare a un valore di pH pari a 5.2, per consentire la deprotonazione di due dei gruppi COOH caratteristici dell'acido citrico.

La sospensione è stata quindi inserita all'interno di un orbital shaker (bagno termostatico con agitazione-Julabo SW23) per 90 minuti a 150 giri/min e 80°C, affinché due gruppi carbossilici deprotonati (-COO⁻) dell'acido citrico reagissero con i gruppi idrossili (-OH) esposti dalle nanoparticelle di magnetite in modo da permetterne l'adsorbimento sulla loro superficie.

Una volta ritirata dall'orbital shaker si è proceduto al lavaggio delle nanoparticelle attraverso un dispositivo di ultrafiltrazione posto su un agitatore magnetico.

Questo passaggio e i due successivi cicli di lavaggio da 50 ml di acqua bidistillata sono stati necessari per far sì che le nanoparticelle stabilizzate venissero filtrate e separate dall'acido citrico non reagito.

Le nanoparticelle sono state, infine, disperse in 120 ml di acqua bidistillata e il pH della soluzione così ottenuta è stato regolato a 10.2 tramite aggiunta, goccia a goccia e sotto agitazione continua, di idrossido di ammonio (NH_4OH).

In tal modo anche l'ultimo gruppo carbossilico dell'acido citrico risulta deprotonato e ciò conferisce alle nanoparticelle di magnetite una carica negativa superficiale tale da creare una forza repulsiva che ne impedisce le interazioni dipolari garantendo, quindi, una migliore stabilità ed evitando la formazione di *clusters*.

Funzionalizzazione con molecole di APTES

L'APTES ($\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$) è considerato un ottimo candidato per la modifica e la funzionalizzazione superficiale di nanoparticelle di magnetite, poiché è biocompatibile e ha un'alta densità di gruppi funzionali amminici ($-\text{NH}_2$) che ne permettono il legame con nanoparticelle metalliche, migliorando l'interazione tra le due nanostrutture [16,76].

Per prima cosa, 30 ml di soluzione contenente nanoparticelle di magnetite stabilizzate con acido critico sono stati aggiunti a 450 ml di etanolo puro ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) assieme a 255 μl di APTES.

La sospensione così ottenuta è stata inserita nell'orbital shaker per 180 minuti a 150 giri/min e 80°C .

Terminato il trattamento, si è atteso che la soluzione si raffreddasse a temperatura ambiente prima di raccogliere il soluto depositato sul fondo e di disperderlo in 30 ml di acqua bidistillata.

Per assicurarsi che tutto il solvente in eccesso fosse stato accuratamente eliminato, sono stati effettuati due lavaggi della soluzione utilizzando una centrifuga (HERMLE Z 326 K), impostando il tempo di ciascun ciclo a 5 min e la velocità a 7500 giri/min.

Una volta terminato, le nanoparticelle di magnetite stabilizzate con acido citrico e funzionalizzate con APTES sono state disperse in 75 ml di acqua bidistillata.

Infine, per indurre una carica positiva superficiale, è stata aggiunta alla sospensione, goccia a goccia e sotto agitazione continua, una soluzione costituita da 0.05 ml di acido nitrico (HNO_3) 6 M diluita in 20 ml di etanolo.

In tal modo il pH della soluzione, inizialmente prossimo a 8, è stato abbassato fino a raggiungere un valore pari a 5.1 per generare repulsione tra le nanoparticelle funzionalizzate in modo da evitarne l'aggregazione.

Sintesi e legame delle nanoparticelle di argento

Come già accennato, per produrre nanoparticelle magnetoplasmoniche costituite da magnetite e argento si è effettuata, tramite l'impiego dell'acido tannico, una riduzione *in situ* del nitrato di argento sulla superficie delle nanoparticelle di ossido di ferro precedentemente stabilizzate e funzionalizzate.

L'acido tannico è un composto polifenolico estratto dalle piante che presenta una struttura in cui il glucosio occupa la posizione centrale ed è collegato a molecole di acido digallico; risulta particolarmente studiato per le sue proprietà antiossidanti, antimutagene e antitumorali.

Dal momento in cui, presi singolarmente il glucosio si comporta come buon agente stabilizzante ma come debole riducente e, al contrario, l'acido gallico come buon riducente ma cattivo stabilizzante, l'acido tannico, essendo costituito da entrambe le formulazioni, presenta buone capacità riducenti e stabilizzanti in condizioni alcaline a temperatura ambiente [77,78].

Prendendo spunto da un lavoro precedente [79], la sintesi è stata effettuata mantenendo i rapporti tra i reagenti di partenza e i tempi di reazione, ma andando a variare il pH della soluzione di nitrato d'argento.

Per prima cosa, sono stati accuratamente pesati su bilancia digitale di precisione 10 mg di nitrato d'argento (AgNO_3 , acquistato da PanReac AppliChem) e 5 mg di acido tannico ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$).

L'acido tannico è stato aggiunto a 40 ml di acqua bidistillata e tramite idrossido di ammonio il pH, da un valore iniziale prossimo a 2, è stato portato a un valore compreso tra 8 e 9.

La soluzione così ottenuta è stata inserita in un becher contenente 20 ml di nanoparticelle di magnetite funzionalizzate con APTES, successivamente posto all'interno dell'orbital shaker per 15 minuti a 150 giri/min e 37°C.

Contemporaneamente, il nitrato d'argento è stato disciolto in 20 ml di acqua bidistillata e tramite la soluzione di acido nitrico diluita in etanolo, aggiunta goccia a goccia, ne è stato abbastato il pH a un valore compreso tra 2.5 e 3.

A questo punto, la soluzione acquosa di nitrato di argento è stata aggiunta alla magnetite e acido tannico appena preparata e la soluzione ottenuta è stata nuovamente inserita all'interno dell'orbital shaker per 15 minuti a 150 giri/min e 37°C.

Come ultimo passaggio, tramite l'impiego di un magnete posto al di sotto del becher, si è effettuato il lavaggio per rimuovere i residui dei composti non reagiti.

Ciò ha permesso di raccogliere le nanoparticelle di argento legatesi alla magnetite che sono state, infine, disperse in 20 ml di acqua bidistillata.

Sintesi e legame delle nanoparticelle d'oro

Anche in questo caso, al fine di ottenere nanoparticelle composite di magnetite e oro si è applicata una riduzione *in situ* di precursori d'oro sulla superficie delle nanoparticelle di ossido di ferro precedentemente stabilizzate e funzionalizzate.

Di nuovo, basandosi su un lavoro precedente [79], la sintesi è stata effettuata mantenendo i rapporti tra i reagenti di partenza e i tempi di reazione, ma andando a variare il pH della soluzione di acido cloroaurico.

Per prima cosa, 3.37 mg di acido cloroaurico (HAuCl_4) sono stati disciolti in 20 ml di acqua bidistillata e il pH è stato regolato a circa 8.5 tramite l'impiego di idrossido di sodio (NaOH , acquistato da Riedel-de Haën) permettendo così l'idrolisi dell'acido cloroaurico e la formazione della sospensione di idrossido d'oro ($\text{Au}(\text{OH})_3$).

La soluzione è stata poi unita a 20 ml di sospensione contenente nanoparticelle di magnetite funzionalizzate con APTES e inserita all'interno dell'agitatore orbitale per 5 minuti a 150 giri/min e 70°C.

Contemporaneamente, 30 mg di acido tannico sono stati aggiunti a 20 ml di acqua bidistillata e il pH è stato aggiustato a un valore compreso tra 8 e 9 con idrossido di ammonio.

La soluzione di acido tannico è stata quindi combinata a quella ritirata dall'orbital shaker e la soluzione ottenuta è stata reinserta al suo interno per un trattamento della stessa durata, alla stessa velocità e temperatura.

Infine, si è proceduto al lavaggio raccogliendo tramite un magnete le nanoparticelle di magnetite decorate con oro, poi disperse in 20 ml di acqua bidistillata.

6.3 Preparazione di nanoparticelle magnetoplasmoniche: *Metodo 2*

Sintesi di nanoparticelle di magnetite

Seguendo la stessa procedura utilizzata per il *Metodo 1*, le nanoparticelle di ossido di ferro (Fe_3O_4) sono state sintetizzate tramite co-precipitazione chimica a partire da soluzioni acquose di sali $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ con l'aggiunta di una base di idrossido di ammonio (NH_4OH) a temperatura ambiente.

Sintesi e legame delle nanoparticelle di argento

Nel *Metodo 2* la sintesi di nanoparticelle magnetoplasmoniche avviene senza né stabilizzare la magnetite con l'acido citrico, né funzionalizzarla superficialmente con l'APTES.

Una volta ottenute le nanoparticelle di ossido di ferro si è, infatti, proceduto direttamente a ridurre *in situ* i precursori di argento attraverso l'impiego dell'acido tannico che agisce sia come riducente che come disperdente.

Anche in questo caso si è preso spunto da un lavoro precedente [79] e la sintesi è stata effettuata mantenendo i rapporti tra i reagenti di partenza, ma variando i tempi di reazione.

Per prima cosa, 0.3 g di nitrato d'argento (AgNO_3) sono stati aggiunti direttamente in 6.25 ml di nanoparticelle di Fe_3O_4 e la soluzione è stata sonicata per 15 minuti a 40°C all'interno del bagno ad ultrasuoni.

Nel frattempo, 0.15 g di acido tannico sono stati disciolti in 5 ml di acqua bidistillata e il valore del pH è stato portato tra 8 e 9 tramite idrossido di ammonio.

A questo punto, la soluzione di acido tannico è stata aggiunta a quella ritirata dal bagno a ultrasuoni e di nuovo sonicata per 5 minuti, a 40°C .

Utilizzando un magnete, la soluzione è stata lavata per rimuovere i residui dei composti non reagiti e le nanoparticelle d'argento non legate alla magnetite.

Così facendo, le nanoparticelle di argento che si sono combinate alla magnetite sono state raccolte per poi essere disperse in 20 ml di acqua bidistillata.

Sintesi e legame delle nanoparticelle d'oro

Anche in questo caso, per ottenere nanoparticelle composite di magnetite e oro si è applicata una riduzione *in situ* di precursori d'oro sulla superficie delle nanoparticelle di ossido di ferro, utilizzando l'acido tannico che funge sia da agente stabilizzante che riducente.

Per effettuare questo tipo di sintesi ci si è basati su un lavoro precedente [80], ma in tal caso come reagente di partenza si è utilizzata magnetite pura invece che magnetite stabilizzata con acido citrico e funzionalizzata con APTES.

Innanzitutto, adoperando la bilancia digitale di precisione sono stati accuratamente pesati 2.55 mg di acido tannico e 60 mg di acido cloroaurico (HAuCl_4), successivamente disciolti, rispettivamente, in 1.2 ml e 12 ml di acqua bidistillata.

Una volta uniti, la soluzione risultante è stata inserita all'interno dell'orbital shaker per 5 minuti a 150 giri/min e 70°C.

A fine processo, sono stati aggiunti 3.9 ml di nanoparticelle di Fe_3O_4 e si è di nuovo effettuato lo stesso tipo di trattamento, mantenendo invariate durata, velocità e temperatura.

Infine, sempre per mezzo di un magnete, si è effettuato il lavaggio della soluzione e le nanoparticelle di magnetite decorate con oro sono state disperse in 20 ml di acqua bidistillata.

6.4 Tecniche di caratterizzazione

Per ogni fase relativa ai due percorsi di sintesi, le nanoparticelle sono state caratterizzate al fine di ottenere informazioni di diversa natura.

In particolare, per valutare la dimensione e la morfologia delle nanostrutture ottenute, sono stati utilizzati un microscopio elettronico a trasmissione TEM (FEI Tecnai F20 TWIN) e un microscopio elettronico a scansione a emissione di campo FE-SEM in modalità STEM (Zeiss Supra 40 GEMINI).

Per un'analisi strutturale e composizionale è stato invece adoperato uno spettrometro a infrarossi a trasformata di Fourier: FT-IR (Thermo Scientific™ Nicolet™ iS50 FTIR Spectrometer) e l'acquisizione spettrale è stata perfezionata tramite software OMNIC™, utilizzando il metodo di indagine Smart iTX Diamond.

Al fine di valutare l'efficacia delle magnetiti nel generare calore, le diverse formulazioni sono state sottoposte a un campo magnetico per mezzo di un forno a induzione (EGMA 6, Felmi srl).

Infine, è stata condotta un'analisi sulle proprietà ottiche mostrate dalle nanoparticelle magnetoplasmoniche sintetizzate, attraverso uno spettrofotometro UV-Vis (UV-2600 Shimadzu), utilizzando il software UV-Probe per l'acquisizione spettrale.

Si riporta di seguito una descrizione delle tecniche usate.

Microscopia elettronica a trasmissione [81]

La microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è basata sull'utilizzo di un fascio di elettroni che, presentando una lunghezza d'onda molto minore di quella dei fotoni del raggio luminoso in un microscopio ottico, consente di ottenere immagini con una migliore risoluzione.

Il fascio viene generato riscaldando un filamento di tungsteno in un sistema in cui è necessario creare il vuoto spinto per prevenire collisioni tra elettroni e molecole d'aria, al fine di evitare assorbimento energetico da parte di quest'ultime.

Il contrasto nell'immagine finale è prodotto dalla *scattering* degli elettroni in seguito alla loro interazione con gli atomi che costituiscono il campione.

In particolare, le aree più luminose sono dovute a una maggiore trasmissione delle cariche elettriche negative, mentre quelle più scure corrispondono a zone in cui si ha più *scattering*, solitamente a causa della presenza di atomi più pesanti o del maggiore spessore del campione in quel punto.

Microscopia elettronica a scansione in trasmissione [82]

Mentre la microscopia di tipo TEM sfrutta un fascio elettronico parallelo per generare un'onda incidente in buona approssimazione piana, nel caso della microscopia elettronica a scansione in trasmissione (STEM) la sorgente di elettroni è focalizzata sul campione.

Si ha, infatti, un insieme di vettori d'onda con stesso modulo che possono essere direzionati all'interno del cono d'illuminazione in modo da localizzare il fascio in zone di diametro inferiore a 0.1 nm.

L'immagine è, quindi, formata muovendo la sonda su tutta l'area d'interesse e raccogliendo, per mezzo di opportuni rivelatori, il segnale generato a seguito dell'interazione degli elettroni incidenti con gli atomi del materiale.

Per questo tipo di analisi, così come per quella al TEM, la preparazione dei campioni è avvenuta collocando qualche microlitro di soluzione su retini di rame (SPI Supplies Lacey Carbon Coated 200 Mesh Copper Grids), posti su un porta-campioni.

Prima di eseguire l'indagine, le soluzioni sono state lasciate a essiccare a temperatura ambiente.

Spettroscopia a infrarossi a trasformata di Fourier, FT-IR [83]

La spettroscopia a infrarossi permette di studiare i legami chimici fornendo informazioni sui gruppi funzionali presenti nelle molecole attraverso la formazione di segnali che possono essere legati alla presenza di gruppi noti a frequenze caratteristiche, oppure di tipo *fingerprint*, cioè propri della molecola in questione e quindi non ritrovabili altrove.

La sorgente luminosa di uno spettrometro FT-IR emette radiazioni infrarosse che, nel colpire il campione, possono essere assorbite comportando il passaggio delle molecole da uno stato fondamentale ad uno stato vibrazionale eccitato.

Le transizioni vibrazionali corrispondono a uno stiramento del legame chimico (stretching) o a una deformazione dell'angolo di legame (bending) e possono essere simmetrici o asimmetrici.

Il segnale originato nell'operazione (interferogramma) viene convertito, per mezzo della trasformata di Fourier, in un tradizionale spettro infrarosso, tipicamente da 4000 a 400 cm^{-1} , in cui la variazione dell'intensità del segnale è in funzione del numero d'onda della radiazione.

Per eseguire questo tipo di analisi, al termine delle diverse fasi di sintesi si sono prelevati pochi millilitri di soluzione che sono stati posti in piastre di Petri e lasciati a essiccare in un incubatore per qualche giorno, al fine di ottenere campioni sotto forma di polveri.

Caratterizzazione termica

Per valutare la possibilità di impiego delle nanoparticelle sintetizzate in trattamenti ipertermici, è stata condotta una caratterizzazione termica *in vitro* utilizzando un campo magnetico alternato, applicato tramite un forno a induzione operante a una potenza di 3 kW e a una frequenza pari a 220 kHz.

In particolare, si vuole quantificare l'aumento medio di temperatura in un volume di acqua simulante il liquido interstiziale di un tessuto tumorale, in seguito al calore dissipato dalle nanoparticelle disperse al suo interno.

L'analisi è stata eseguita ponendo la soluzione da testare in una provetta in vetro a sua volta inserita in un cilindro di polistirene che agisce da coibente ed evita dissipazioni di energia termica verso l'ambiente esterno.

Il cilindro è stato, quindi, messo all'interno della bobina del forno a induzione in modo che quest'ultima si trovasse alla stessa altezza della soluzione.

La corrente prodotta in uscita, scorrendo all'interno della bobina, comporta la formazione di un campo magnetico che interagisce con le nanoparticelle contenute nella provetta e si ha, quindi, generazione di calore al loro interno che viene dissipato nel fluido circostante in cui sono disperse.

Ciascuna soluzione è stata sottoposta al campo magnetico per un tempo complessivo pari a 20 minuti e le misure di temperatura sono state eseguite ogni 2 minuti andando a spegnere momentaneamente il campo per evitare interferenze.

I valori di temperatura sono stati registrati tramite un termometro digitale collegato a una termocoppia di tipo K che viene inserita all'interno della soluzione attraverso un foro nella parte superiore del cilindro che circonda la provetta.

Per far sì che i valori ottenuti per ogni soluzione di nanoparticelle fossero comparabili, prima di eseguire la caratterizzazione termica si è proceduto a misurare le diverse concentrazioni.

Dal momento che la minore è risultata essere pari a $1 \frac{mg}{ml}$, si è provveduto a diluire con acqua bidistillata le altre soluzioni in modo tale che ognuna presentasse la stessa concentrazione e che, per tutte, la quantità complessiva di solvente fosse pari a 3 ml.

Spettroscopia ultravioletta/visibile [84]

La spettroscopia ultravioletta/visibile è utilizzata per misurare l'assorbimento delle radiazioni ultraviolette e visibili da parte di un campione.

L'assorbimento è associato all'eccitazione degli elettroni dal loro stato fondamentale a uno stato eccitato ma, poiché i livelli energetici della materia sono quantizzati, una specifica lunghezza d'onda è assorbita solamente se ha associata una determinata quantità di energia tale da causare una transizione elettronica.

La sorgente luminosa di uno spettrofotometro UV-Vis è data dalla combinazione di lampade al tungsteno e al deuterio e fornisce un fascio di radiazioni visibili e ultraviolette che viene scomposto da parte di un reticolo di diffrazione in più fasci a diverse lunghezze d'onda.

Per determinare lo spettro di assorbimento delle nanoparticelle magnetoplasmoniche sintetizzate, si è dispersa qualche goccia di ciascun campione in acqua bidistillata all'interno di una cuvetta otticamente trasparente.

Per ogni lunghezza d'onda viene misurata l'intensità della luce che attraversa sia la cuvetta contenente il campione (I) sia quella di riferimento (I_0) in cui è posto unicamente il solvente, comunemente indicato come bianco.

Se I è inferiore a I_0 , il campione ha assorbito parte della luce.

L'assorbanza (A) è correlata a I e I_0 , secondo l'equazione:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

Il rivelatore converte, infine, l'intensità della radiazione che ha attraversato il campione in un segnale di corrente che viene elaborato e trasformato in uno spettro elettromagnetico.

Capitolo 7

Risultati e discussione

7.1 Dimensione e morfologia

Al fine di ricavare informazioni riguardo la dimensione e la morfologia delle nanostrutture ottenute nei due metodi di sintesi utilizzati, sono state effettuate, come già anticipato, analisi con un microscopio elettronico a trasmissione (TEM) e con un microscopio elettronico a scansione a emissione di campo (FE-SEM) in modalità STEM.

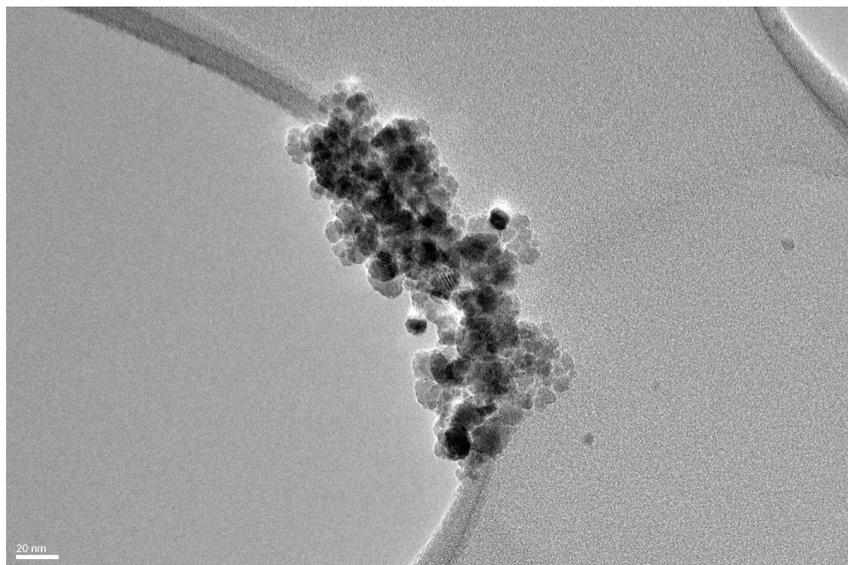


Figura 7.1 Immagine TEM delle nanoparticelle di magnetite (M) sintetizzate secondo il Metodo 1 e il Metodo 2

Come è possibile osservare dalla Figura 7.1, le nanoparticelle di magnetite (M) ottenute sia tramite il *Metodo 1* che il *Metodo 2* presentano forma sferica, dimensione variabile compresa tra 5 e 15 nm e risultano piuttosto aggregate.

Quest'ultimo aspetto è dovuto al fatto che, come più volte discusso, le nanoparticelle di ossido di ferro risultano di per sé instabili e quindi tendono a formare *clusters* se non stabilizzate.

Inoltre, anche il metodo stesso di preparazione dei campioni per eseguire le analisi tende a far aggregare la soluzione una volta posta sul retino: le nanoparticelle infatti vengono preparate per l'analisi ponendo una goccia di soluzione su un retino di rame che viene poi lasciata ad essiccare; ciò comporta inevitabilmente che si verifichi la sovrapposizione e l'aggregazione delle nanoparticelle contenute nel campione, come visibile in Figura 7.1 e nelle immagini successive.

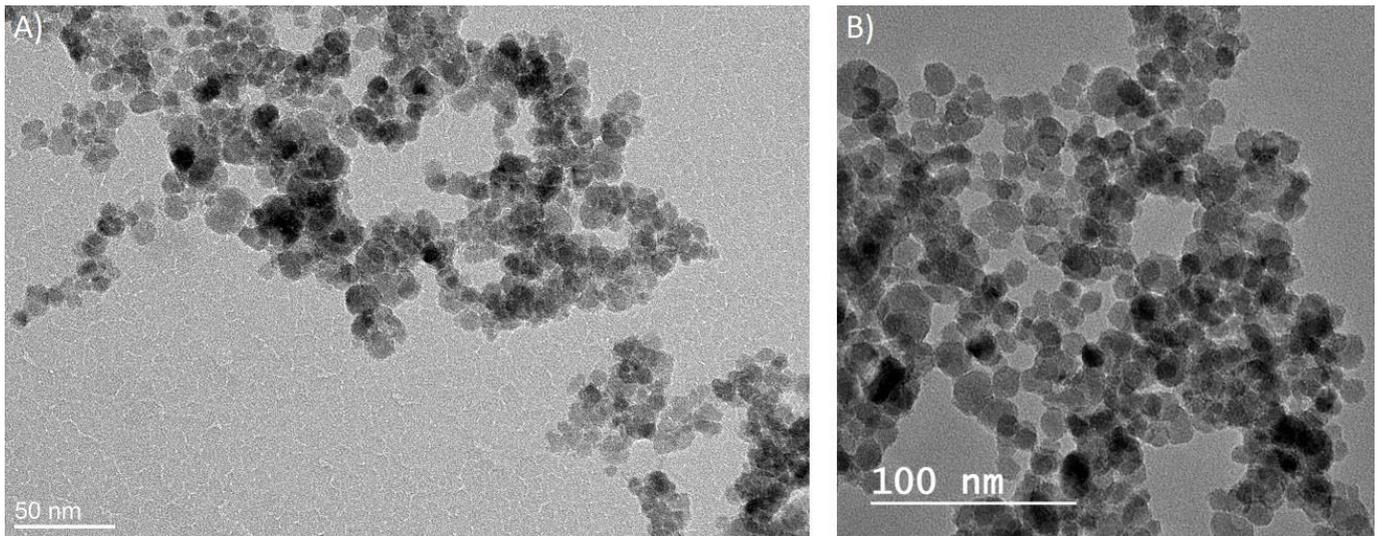


Figura 7.2 Immagini TEM di (A) nanoparticelle di magnetite stabilizzate con acido citrico (M+AC), (B) nanoparticelle di magnetite stabilizzate con acido citrico e funzionalizzate con APTES (M+AC+APTES), entrambe secondo il Metodo 1

Come osservabile nelle immagini TEM in Figura 7.2 A e 7.2 B, lo step di stabilizzazione con acido citrico e quello successivo di funzionalizzazione con APTES, entrambi eseguiti esclusivamente nel *Metodo 1*, non vanno ad alterare la morfologia delle nanoparticelle che preservano, quindi, una forma pseudo-sferica.

Anche la distribuzione dimensionale si può considerare pressoché inalterata rispetto a quella che si aveva inizialmente per le nanoparticelle di magnetite (Figura 7.1); la risoluzione, infatti, non è sufficiente per poter apprezzare le variazioni molto piccole che si hanno in seguito a queste due fasi e che comportano la formazione di un sottile *layer* che circonda le nanoparticelle.

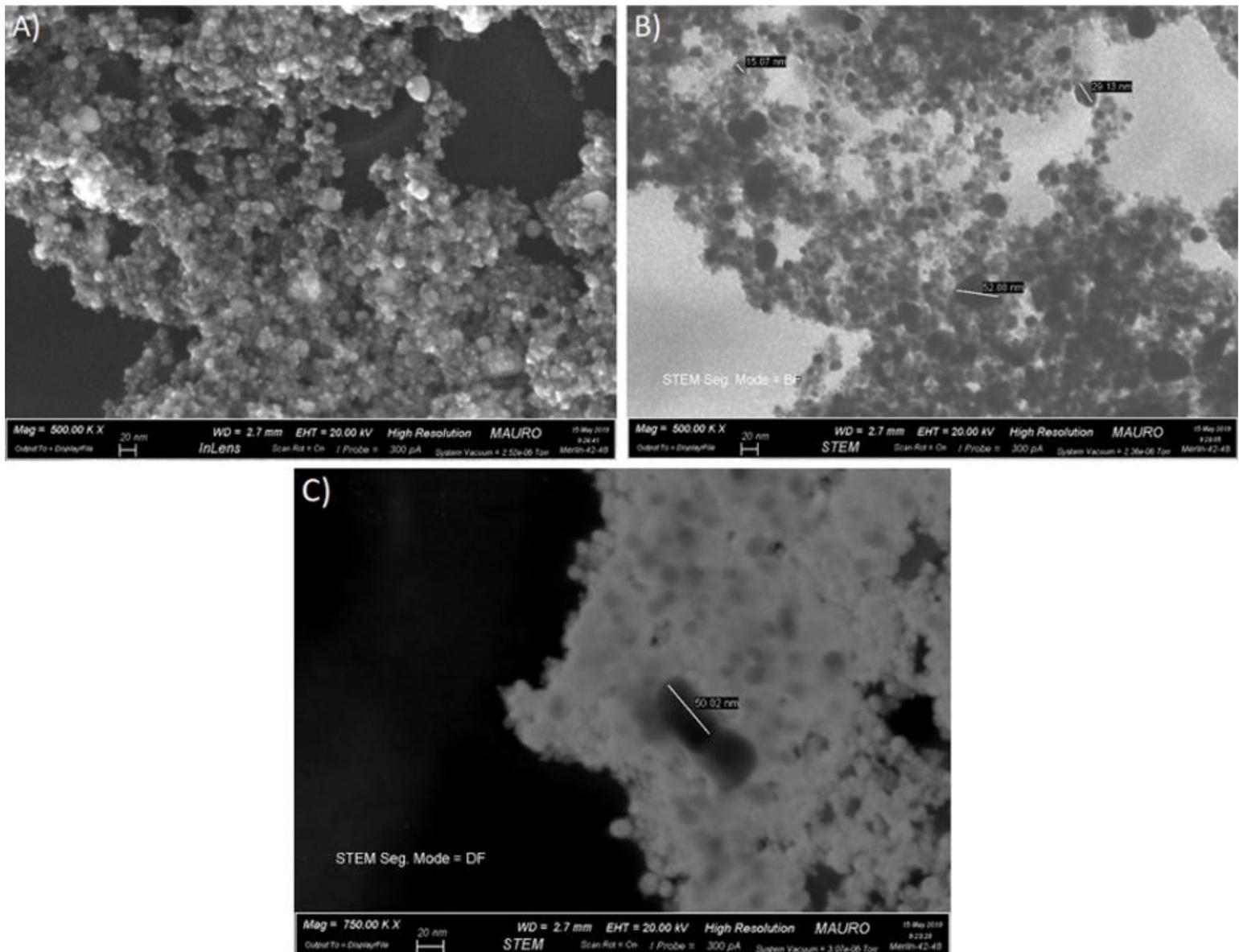


Figura 7.3 Immagini STEM di nanoparticelle di magnetite decorate con argento ($M+AC+APTES+TA+Ag$) secondo il Metodo 1, ottenute in modalità differenti (gli spots più chiari in (A) corrispondenti a quelli più scuri in (B) rappresentano le nanoparticelle di argento, la cui dimensione massima è evidenziata in (C))

Nelle immagini riportate in Figura 7.3, ottenute con microscopio FE-SEM, risultano visibili le nanoparticelle magnetoplasmoniche di magnetite e argento ($M+AC+APTES+TA+Ag$) ottenute tramite il Metodo 1 che prevede una fase di

stabilizzazione e funzionalizzazione della magnetite prima della decorazione con argento, tramite riduzione *in situ* per mezzo dell'acido tannico.

In particolare, l'immagine in Figura 7.3 A offre una visione morfologica complessiva del campione che mostra la distribuzione delle nanoparticelle di argento, di forma pressoché sferica, sulla superficie delle nanostrutture di magnetite.

In Figura 7.3 B, acquisita in modalità campo chiaro, è invece mostrato il range dimensionale di queste nanoparticelle metalliche, compreso tra circa 15 e 53 nm.

Infine, nell'immagine in Figura 7.3 C (in campo scuro) ottenuta con un ingrandimento maggiore, si mette in evidenza una delle particelle più grandi presenti nel campione.

Si nota che, nelle immagini STEM sopra riportate così come vedremo nelle successive, le nanoparticelle metalliche sono legate superficialmente a quelle di magnetite che costituiscono, invece, lo strato più profondo e che sono inglobate in una sorta di matrice che tende a unirle tra loro.

Questo tipo di struttura non viene riscontrata nelle fasi precedenti di sintesi, stabilizzazione e funzionalizzazione delle nanoparticelle di ossido di ferro e pertanto, è possibile affermare che la sua presenza è dovuta all'utilizzo dell'acido tannico come agente riducente nella decorazione con nanoparticelle metalliche.

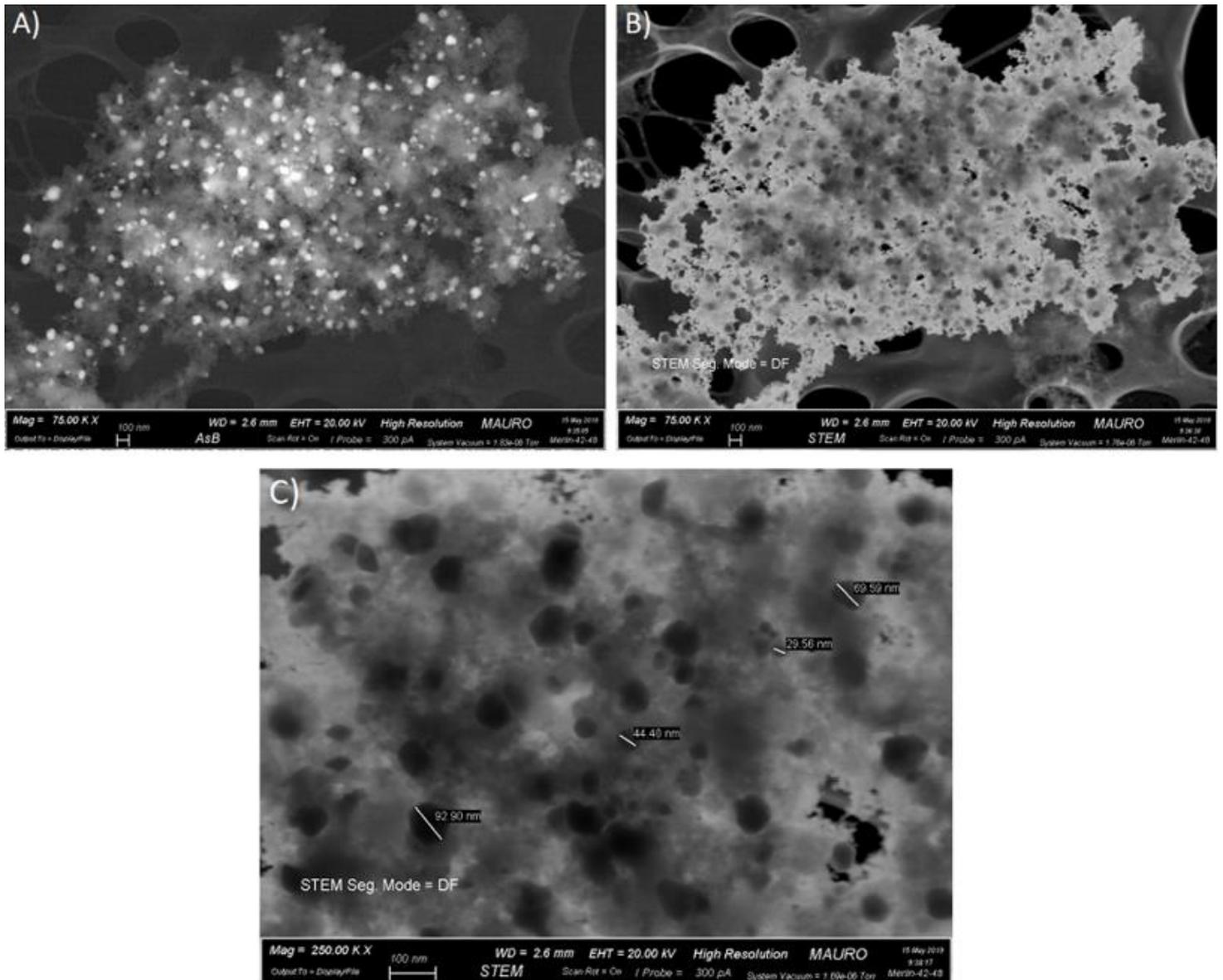


Figura 7.4 Immagini STEM di nanoparticelle di magnetite decorate con argento (M+Ag+TA) secondo il Metodo 2, acquisite in modalità differenti (i punti più chiari in (A) corrispondenti a quelli più scuri in (B) indicano le nanoparticelle di argento, le cui dimensioni sono evidenziate in (C))

Le immagini in Figura 7.4 A, 7.4 B e 7.4 C mostrano nanocompositi di magnetite e argento (M+Ag+TA) preparate secondo il Metodo 2 nel quale, alla sintesi delle nanostrutture di ossido di ferro, segue direttamente la riduzione *in situ* dei precursori d'argento, utilizzando l'acido tannico come agente stabilizzante e riducente.

In particolare, in Figura 7.4 C, acquisita in modalità campo scuro, è possibile osservare che le nanoparticelle metalliche, di forma pressoché sferica, mostrano dimensioni comprese tra circa 29 e 93 nm.

Dal confronto tra l'immagine in Figura 7.4 C e quella in Figura 7.3 B, è inevitabile constatare che le nanoparticelle di argento sintetizzate secondo il *Metodo 2* (Figura 7.4 C) risultano più grandi e con distribuzione dimensionale più ampia rispetto a quelle ottenute secondo il *Metodo 1* (Figura 7.3 B).

Inoltre, osservando le immagini in Figura 7.4 le nanoparticelle metalliche preparate tramite il *Metodo 2* sembrano più numerose e con distribuzione più omogenea rispetto a quelle sintetizzate secondo il *Metodo 1* (Figura 7.3).

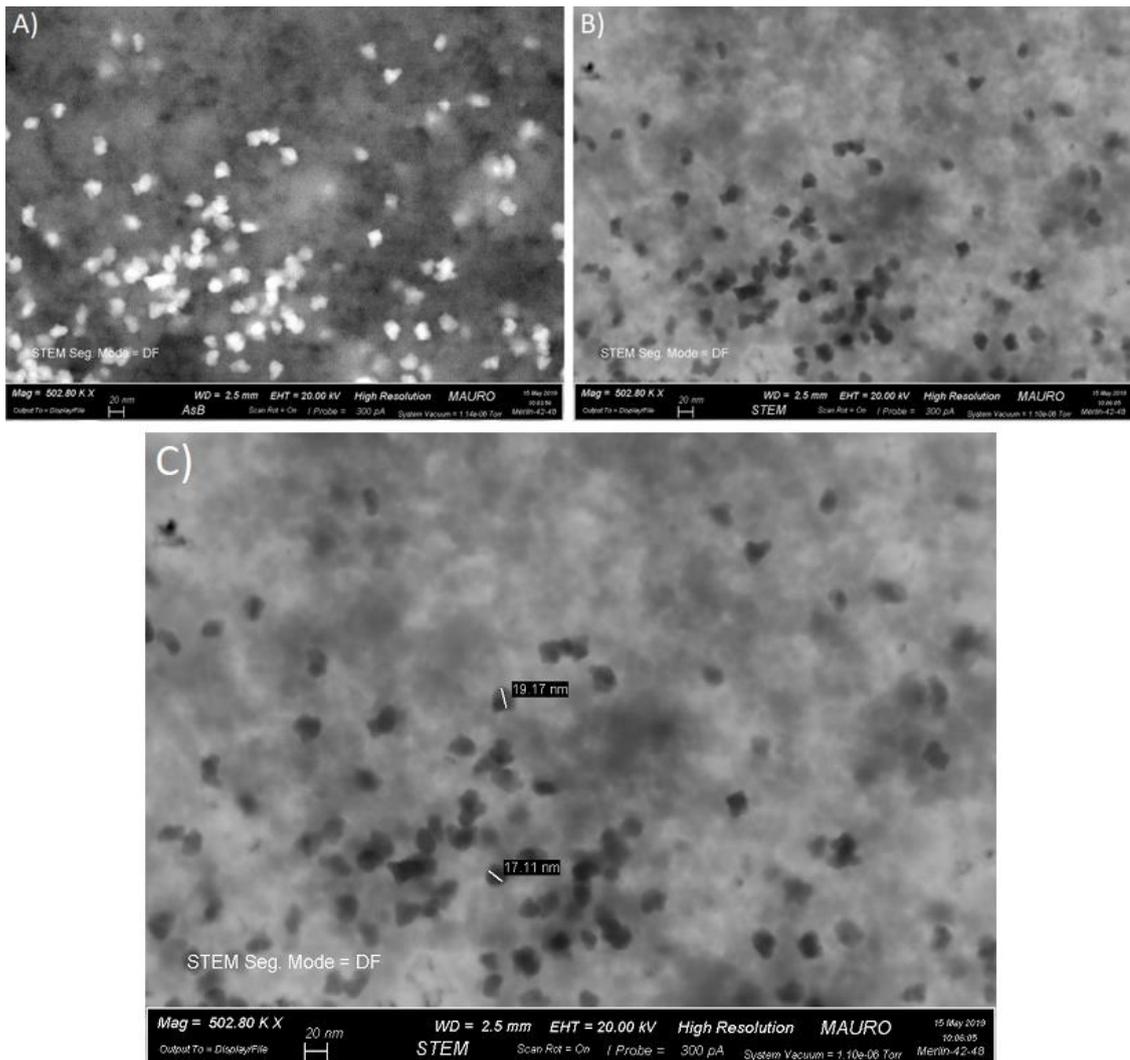


Figura 7.5 Immagini STEM di nanoparticelle di magnetite decorate con oro ($M+AC+APTES+Au+TA$) secondo il Metodo 1, ottenute in modalità differenti (gli spots più chiari in (A) corrispondenti a quelli più scuri in (B) rappresentano le nanoparticelle di oro, le cui dimensioni sono evidenziate in (C))

Nelle immagini riportate in Figura 7.5 risultano visibili le nanoparticelle magnetoplasmoniche di magnetite e oro ($M+AC+APTES+Au+TA$) ottenute tramite il Metodo 1 che prevede uno step di stabilizzazione e funzionalizzazione della magnetite prima della decorazione con oro.

In particolare, in Figura 7.5 C, acquisita in modalità campo scuro, è possibile notare un buon controllo dimensionale e si osserva che le nanoparticelle metalliche tendono a legarsi

tra loro a formare una struttura di tipo *dumbbell* in cui ogni singola particella ha dimensioni molto piccole, inferiori a 20 nm.

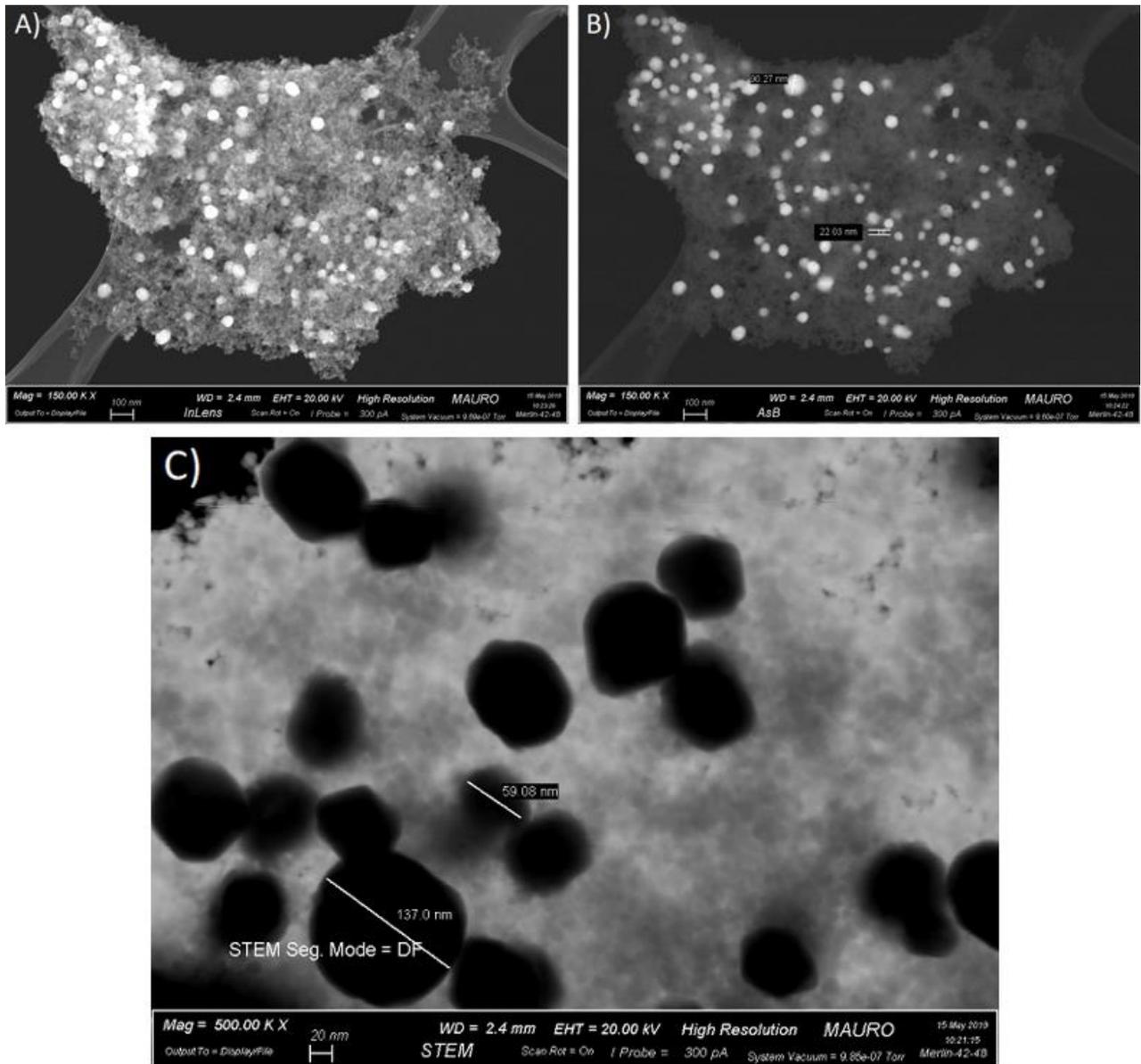


Figura 7.6 Immagini STEM di nanoparticelle di magnetite decorate con oro ($M+TA+Au$) secondo il Metodo 2, acquisite in modalità differenti (i punti più chiari in (A) corrispondenti a quelli più scuri in (B) rappresentano le nanoparticelle di oro, la cui dimensione massima è mostrata in (C))

Le immagini di Figura 7.6 sopra riportate mostrano, invece, i nanocompositi di magnetite e oro (M+TA+Au) preparate secondo il *Metodo 2* nel quale, dopo la sintesi delle nanostrutture di ossido di ferro, si va direttamente a ridurre *in situ* i precursori d'oro.

In particolare, l'immagine in Figura 7.6 A permette di avere una visione morfologica complessiva del campione in cui si può osservare che le nanoparticelle d'oro, piuttosto ravvicinate tra loro, ben distribuite e di forma pressoché sferica, risultano legate superficialmente alla magnetite.

Nell'immagine in Figura 7.6 B, acquisita in modalità *back scattering*, è visibile la più piccola nanoparticella metallica presente nel campione che ha una dimensione prossima a 22 nm, mentre in quella in Figura 7.6 C (in campo scuro e con ingrandimento maggiore) la più grande, di 137 nm.

Andando a confrontare le immagini 7.6 B e 7.6 C con quella in Figura 7.5 C risulta evidente che decorando superficialmente la magnetite con l'oro, le nanoparticelle metalliche preparate secondo il *Metodo 2* (Figura 7.6 B e 7.6 C) risultano notevolmente più grandi e con distribuzione dimensionale nettamente più ampia rispetto a quelle ottenute secondo il *Metodo 1* (Figura 7.5 C).

Inoltre, dall'osservazione delle immagini in Figura 7.6 le nanoparticelle d'oro sintetizzate secondo il *Metodo 2* presentano una distribuzione più omogenea rispetto a quelle preparate secondo il *Metodo 1* (Figura 7.5).

Lo stesso risultato si era osservato per le nanoparticelle d'argento ottenute nel *Metodo 2* (Figura 7.4) rispetto a quelle sintetizzate tramite il *Metodo 1* (Figura 7.3).

7.2 Analisi strutturale e composizionale

Per ottenere informazioni di tipo strutturale/composizionale e quindi identificare i materiali presenti nelle nanoparticelle magnetoplasmoniche ottenute, è stata invece condotta un'analisi di spettroscopia a infrarossi a trasformata di Fourier (FT-IR).

In particolare, si vuole confermare l'avvenuta realizzazione delle diverse fasi previste nei due metodi di sintesi utilizzati.

Pertanto, nelle pagine a seguire, gli spettri sono presentati in maniera coerente a questo obiettivo, ossia vengono mostrati per ogni sezione solamente gli spettri relativi alla fase di sintesi presa in analisi e sono indicati esclusivamente i picchi che confermano l'avvenuta realizzazione della fase considerata.

Stabilizzazione con acido citrico (Metodo 1)

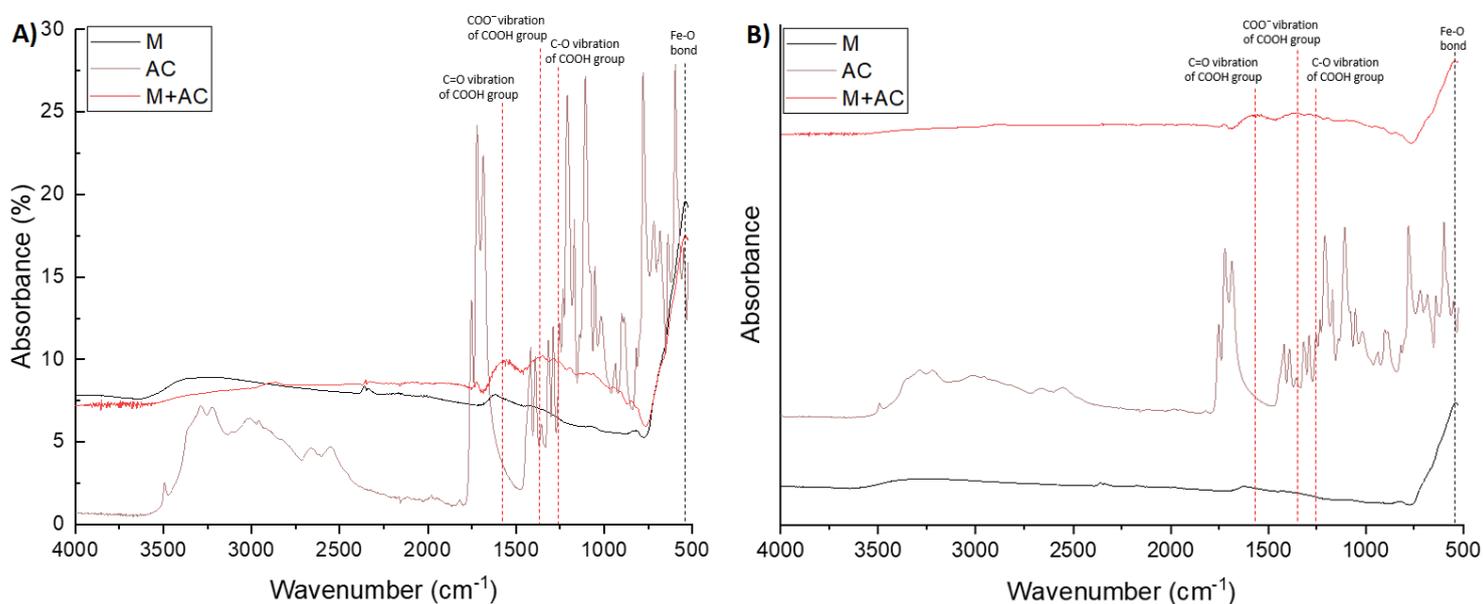


Figura 7.7 Spettri FT-IR di: nanoparticelle di magnetite (M) in nero, acido citrico (AC) in marrone, nanoparticelle stabilizzate con acido citrico (M+AC) in rosso.
(Nell'immagine in Figura 7.7 B sono riportati gli stessi spettri visibili in Figura 7.7 A, ma con *offset* per una maggiore chiarezza visiva)

La Figura 7.7 mostra gli spettri FT-IR relativi alle nanoparticelle di magnetite (M, curva nera), all'acido citrico puro (AC, curva marrone) e alle nanoparticelle stabilizzate con acido citrico (M+AC, curva rossa).

In particolare, è possibile osservare a circa 575 cm^{-1} il picco relativo al legame Fe-O sia per la curva nera (M) che per quella rossa (M+AC) [26].

Ciò attesta il successo del metodo di co-precipitazione chimica adoperato, basato sull'aggiunta delle base di idrossido di ammonio a partire da soluzioni acquose di sali $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, nell'indurre la formazione di nanoparticelle di magnetite.

Il picco a circa 1710 cm^{-1} assegnabile alla vibrazione del legame C=O (stretching asimmetrico), visibile nello spettro relativo all'acido citrico (AC), si sposta a circa 1600 cm^{-1} per le nanoparticelle stabilizzate (M+AC) e indica che gli ioni carbossilato (COO^-) dell'acido citrico formano complessi con gli atomi di ferro sulla superficie delle nanoparticelle di magnetite [26].

Le bande a 1400 e a 1250 cm^{-1} sono invece relative, rispettivamente, allo stretching simmetrico del COO^- e allo stretching simmetrico del legame C-O del gruppo carbossilico ($-\text{COOH}$) dell'acido citrico [26].

La presenza di questi due picchi e di quello a circa 1710 cm^{-1} nello spettro in rosso (M+AC) rispetto a quello iniziale in nero (M) attesta l'avvenuta stabilizzazione delle nanoparticelle di magnetite nel *Metodo 1*.

Funzionalizzazione con APTES (Metodo 1)

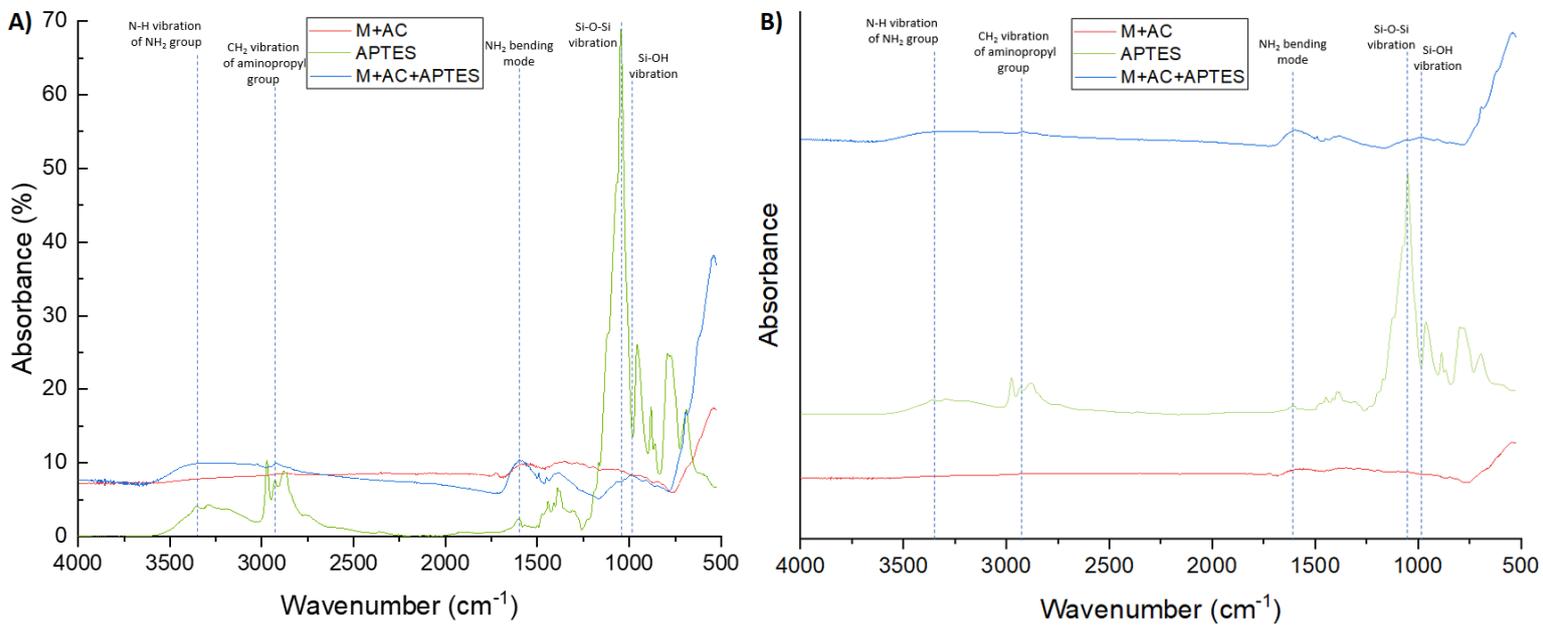


Figura 7.8 Spettri FT-IR di: nanoparticelle di magnetite stabilizzate con acido citrico (M+AC) in rosso, APTES (APTES) in verde, nanoparticelle funzionalizzate con APTES (M+AC+APTES) in blu. (Nell'immagine in Figura 7.8 B sono riportati gli stessi spettri visibili in Figura 7.8 A, ma con *offset* per una maggiore chiarezza visiva)

In Figura 7.8 vengono presentati gli spettri FT-IR relativi alle nanoparticelle di magnetite stabilizzate con acido citrico (M+AC, curva rossa), all'APTES (APTES, curva verde) e alle nanoparticelle stabilizzate con acido citrico e funzionalizzate con APTES (M+AC+APTES, curva blu).

L'introduzione di gruppi amminopropile sulla superficie delle nanoparticelle è confermata da due ampie bande a circa 3358 e 1644 cm^{-1} (nella curva blu rispetto a quella rossa), dovute rispettivamente alla vibrazione del legame N-H (stretching) e alla deformazione dell'angolo di legame (bending) nei gruppi NH_2 liberi [85].

Nello spettro blu la presenza di molecole di APTES ancorate alla superficie è, inoltre, confermata dalla vibrazione del legame CH_2 (stretching) a 2922 cm^{-1} , anch'esso assente nella curva rossa [86].

Infine, i picchi a circa 1089 e a 990 cm^{-1} (quest'ultimo spostato nello spettro blu rispetto a quello verde) sono relativi, rispettivamente, alla vibrazione del legame Si-O-Si e del legame Si-OH e confermano la condensazione tra i gruppi idrossile sulla superficie delle nanoparticelle e l'alcoossilano [87].

Pertanto, l'individuazione di queste bande caratteristiche nello spettro in blu (M+AC+APTES) rispetto a quello di partenza in rosso (M+AC) attesta l'avvenuta funzionalizzazione con l'APTES delle nanoparticelle di magnetite precedentemente stabilizzate nel *Metodo 1*.

Decorazione con nanoparticelle di argento od oro tramite riduzione con acido tannico (Metodo 1)

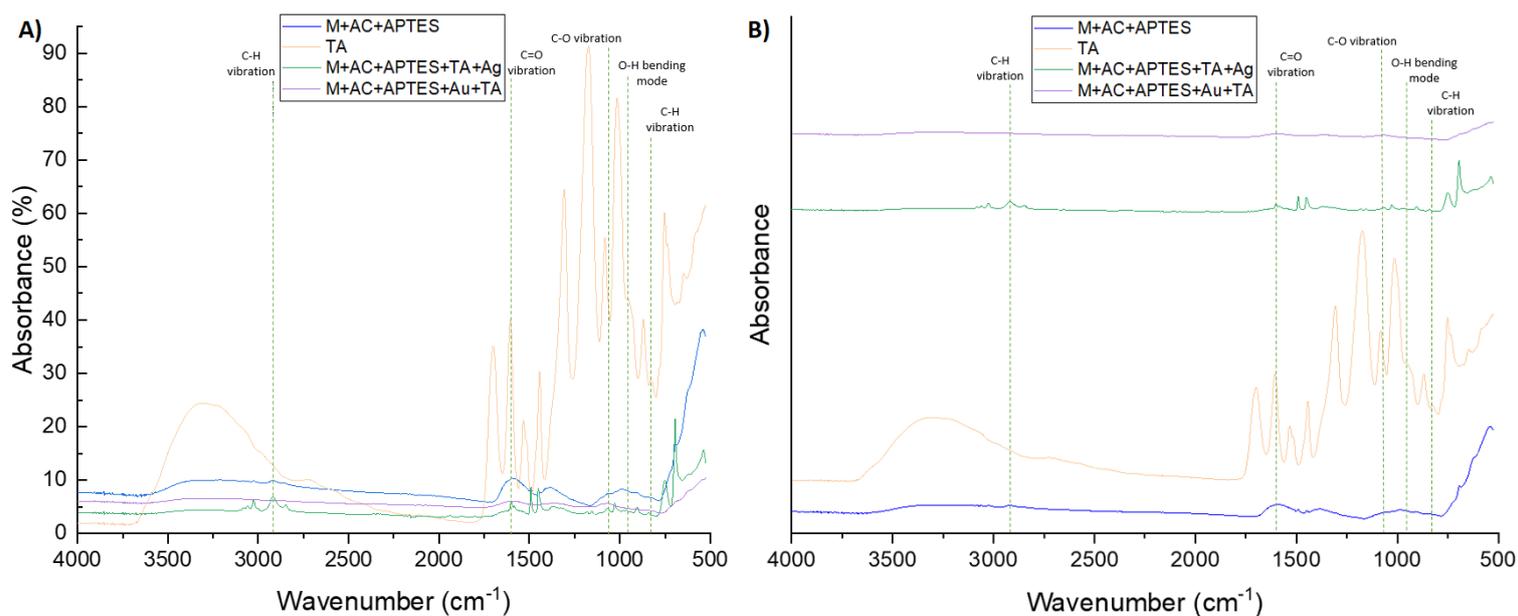


Figura 7.9 Spettri FT-IR di: nanoparticelle di magnetite funzionalizzate con APTES (M+AC+APTES) in blu, acido tannico (TA) in arancione, nanoparticelle decorate con argento (M+AC+APTES+TA+Ag) in verde e decorate con oro (M+AC+APTES+Au+TA) in viola. (Nell'immagine in Figura 7.9 B sono riportati gli stessi spettri visibili in Figura 7.9 A, ma con *offset* per una maggiore chiarezza visiva)

La Figura 7.9 mostra gli spettri FT-IR relativi alle nanoparticelle di magnetite stabilizzate con acido citrico e funzionalizzate con APTES (M+AC+APTES, curva blu), all'acido tannico puro (TA, curva arancione), alle nanoparticelle funzionalizzate decorate con argento (M+AC+APTES+TA+Ag, curva verde) e decorate con oro tramite riduzione con acido tannico (M+AC+APTES+Au+TA, curva viola).

In particolare, è possibile osservare a circa 2922 cm^{-1} il picco relativo alla vibrazione del legame C-H (stretching) sia per la curva verde (M+AC+APTES+TA+Ag) che per quella viola (M+AC+APTES+Au+TA), per la quale, però è molto meno pronunciato [88].

Questo picco risulta essere molto spostato rispetto alla posizione nello spettro dell'acido tannico (banda a circa 2725 cm^{-1} nella curva arancione [89]) e, in realtà, la sua presenza si riscontra anche nello spettro relativo alle nanoparticelle di magnetite funzionalizzate con APTES (curva blu), come già evidenziato osservando la Figura 7.8.

La banda a circa 1620 cm^{-1} , attribuibile alla vibrazione del legame C=O (stretching) e visibile sia per M+AC+APTES+TA+Ag che per M+AC+APTES+Au+TA, è anch'essa dovuta alla riduzione con acido tannico (TA) [88].

Anche in tal caso il picco è riconoscibile nella curva blu ma, come discusso nella sezione precedente, per questo spettro è dovuto alla deformazione dell'angolo di legame (bending) nei gruppi NH_2 in seguito alla funzionalizzazione con APTES.

Un'ulteriore banda è presente sia nella curva verde (M+AC+APTES+TA+Ag) che in quella viola (M+AC+APTES+Au+TA) a 1080 cm^{-1} e corrisponde alla vibrazione del legame C-O (stretching) [88].

Anche quest'ultima viene ritrovata nello spettro relativo alle nanoparticelle di magnetite funzionalizzate con APTES ma, come già evidenziato per la Figura 7.8, la sua presenza è dovuta alla vibrazione del legame Si-O-Si.

La conferma dell'attribuibilità dei picchi a 2922 , 1620 e 1080 cm^{-1} anche alla riduzione con acido tannico è data nella sezione a seguire.

Infine, le bande di assorbimento a 923 e a circa 800 cm^{-1} potrebbero essere dovute, rispettivamente, alla deformazione dell'angolo di legame (bending) dell'O-H e del C-H [88].

La presenza di tutti questi picchi nello spettro verde (M+AC+APTES+TA+Ag) e in quello viola (M+AC+APTES+Au+TA) attesta l'avvenuta riduzione dei precursori metallici tramite acido tannico nella formazione delle nanoparticelle magnetoplasmoniche per il *Metodo 1*.

Si fa notare che la decorazione con nanoparticelle di argento e oro può al più alterare l'intensità e la posizione dei picchi, ma non dà segnali specifici nel campo di misura degli spettrometri FT-IR convenzionali ($4000 \div 400 \text{ cm}^{-1}$) in quanto le frequenze vibrazionali dei legami metallo-metallo sono al di là di questo range [88,90].

Decorazione con nanoparticelle di argento od oro tramite riduzione con acido tannico (Metodo 2)

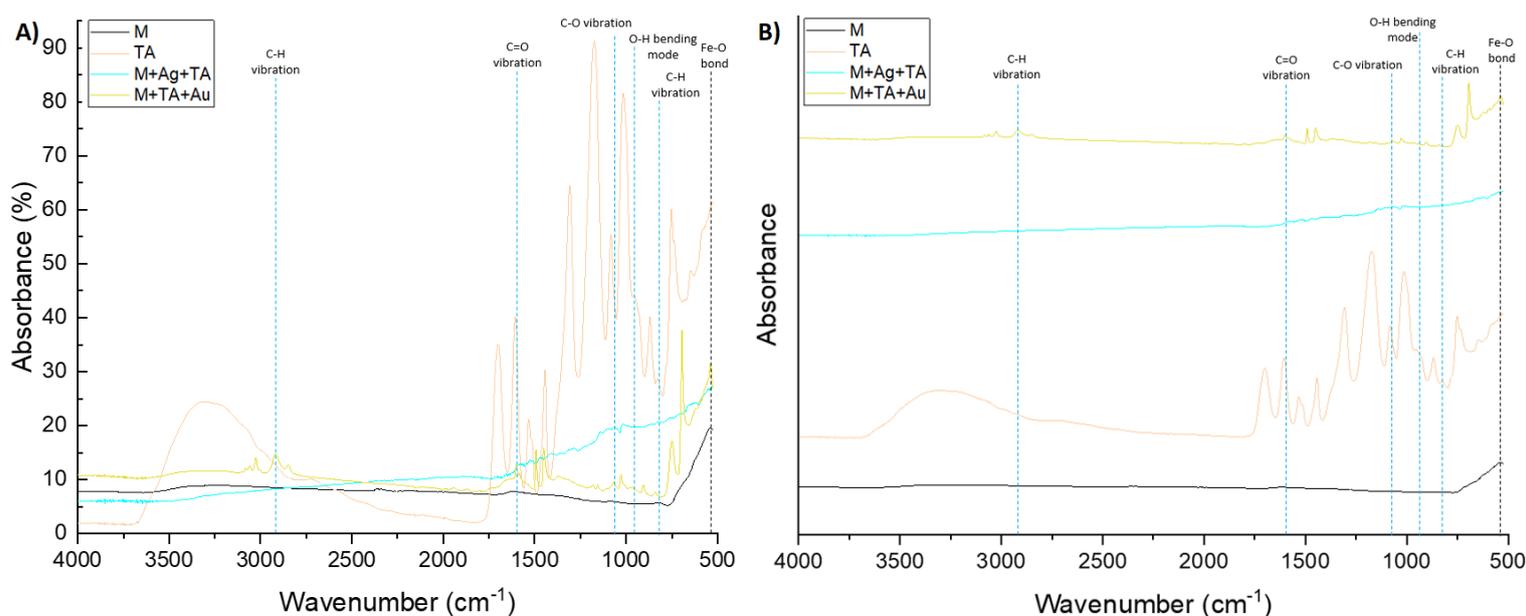


Figura 7.10 Spettri FT-IR di: nanoparticelle di magnetite (M) in nero, acido tannico (TA) in arancione, nanoparticelle decorate con argento (M+Ag+TA) in azzurro e decorate con oro (M+TA+Au) in giallo. (Nell'immagine in Figura 7.10 B sono riportati gli stessi spettri visibili in Figura 7.10 A, ma con *offset* per una maggiore chiarezza visiva)

In Figura 7.10 vengono presentati gli spettri FT-IR relativi alle nanoparticelle di magnetite (M, curva nera), all'acido tannico puro (TA, curva arancione), alle nanoparticelle

decorate con argento (M+Ag+TA, curva azzurra) e decorate con oro tramite riduzione con acido tannico (M+TA+Au, curva gialla).

In particolare, si nota a circa 575 cm^{-1} il picco corrispondente al legame Fe-O per le nanoparticelle di magnetite (M), per quelle decorate con argento (M+Ag+TA) e per quelle decorate con oro (M+TA+Au).

Ciò attesta il successo del metodo di co-precipitazione chimica utilizzato, basato sull'aggiunta delle base di idrossido di ammonio a partire da soluzioni acquose di sali $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, nell'indurre la formazione di nanoparticelle di magnetite.

Poiché anche per il *Metodo 2* la formazione delle nanostrutture magnetoplasmoniche avviene tramite riduzione *in situ* dei precursori metallici, tutti i picchi dovuti alla presenza dell'acido tannico che sono stati riscontrati negli spettri della Figura 7.9 (relativa al *Metodo 1*) vengono ritrovati qui.

Nella curva azzurra (M+Ag+TA) e in quella gialla (M+TA+Au) si nota, infatti, la presenza di bande a circa 2922, 1620, 1080, 923 e 800 cm^{-1} , mostrate inoltre dalla curva arancione (TA), che attestano l'avvenuta riduzione dei precursori metallici tramite acido tannico anche per il *Metodo 2*.

Si fa notare che i primi tre picchi citati non sono individuabili nello spettro nero relativo alla magnetite (M) e ciò conferma quanto anticipato nella sezione precedente: pur essendo già riscontrabili nella curva blu di partenza della Figura 7.9 (M+AC+APTES), la presenza dei picchi a questi numeri d'onda nelle nanoparticelle magnetoplasmoniche finali è anche dovuta alla fase di riduzione con l'acido tannico.

7.3 Caratterizzazione termica

Al fine di valutare l'efficacia nel generare calore in presenza di un campo magnetico, è stata condotta, come già anticipato, una caratterizzazione termica *in vitro*, ponendo le nanoparticelle sintetizzate in un volume di acqua volto a simulare il liquido interstiziale in un tessuto tumorale.

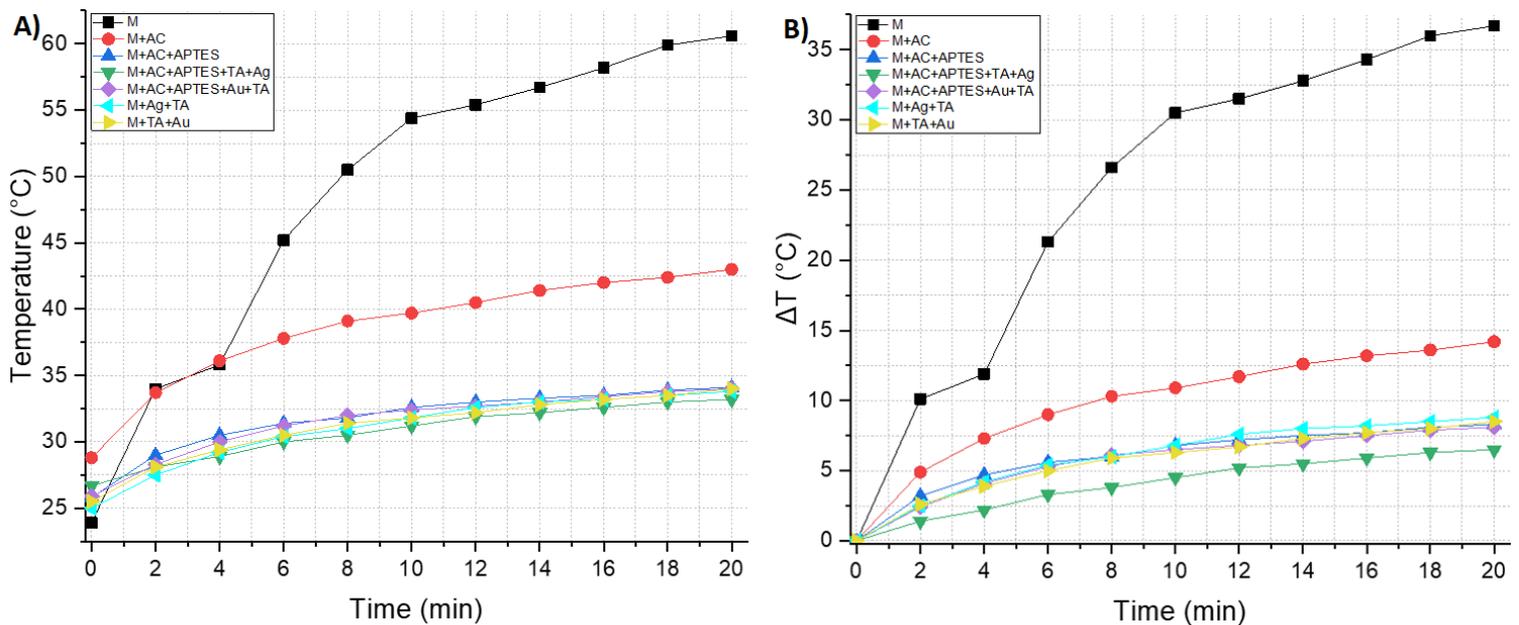


Figura 7.11 Curve temperatura-tempo per: nanoparticelle di magnetite (M) in nero, stabilizzate con acido citrico (M+AC) in rosso, funzionalizzate con APTES (M+AC+APTES) in blu, decorate con argento (M+AC+APTES+TA+Ag) in verde e decorate con oro (M+AC+APTES+Au+TA) in viola secondo il Metodo 1, nanoparticelle di magnetite decorate con argento (M+Ag+TA) in celeste e decorate con oro (M+TA+Au) in giallo secondo il Metodo 2

La Figura 7.11 mostra, per ogni formulazione, l'andamento della temperatura (Figura 7.11 A) e, per un miglior confronto, la sua variazione calcolata rispetto al valore iniziale

(Figura 7.11 B) in funzione del tempo, dopo 20 minuti di applicazione del campo magnetico tramite un forno ad induzione.

Dal momento che tutte le nanoparticelle sintetizzate contengono un'unità magnetica, in presenza del campo esterno sono in grado di generare calore al proprio interno che viene dissipato nel volume di acqua in cui sono disperse, provocandone l'aumento di temperatura osservabile in Figura 7.11.

In particolare, si nota che le nanoparticelle di magnetite (M, curva nera) producono un riscaldamento nettamente superiore rispetto a tutte le altre formulazioni, ossia rispetto allo stesso tipo di nanostrutture che però hanno subito successivi trattamenti di stabilizzazione, funzionalizzazione, decorazione con argento od oro in base a quanto previsto dai due metodi di sintesi.

Le altre nanoparticelle, ad eccezione di quelle stabilizzate con acido citrico (M+AC, curva rossa) per cui il riscaldamento è leggermente superiore, provocano aumenti di temperatura molto simili tra loro.

La grande differenza rispetto alla curva nera (M) potrebbe essere dovuta al fatto che le ulteriori modifiche, previste per arrivare ad ottenere le nanoparticelle magnetoplasmoniche, comportano la formazione di strati superficiali dal contributo magnetico nullo che vanno a circondare l'unità di magnetite, causando una perdita delle proprietà magnetiche e peggiorandone la capacità di generare calore.

Un'altra possibile spiegazione potrebbe consistere nel fatto che, pur essendo le concentrazioni identiche per tutte le soluzioni finali, la quantità di magnetite nella massa totale differisce da campione a campione e soprattutto rispetto alla soluzione contenente unicamente magnetite, per cui il riscaldamento è minore per quest'altre formulazioni semplicemente perché contengono meno magnetite.

Tuttavia, ciò non è così deleterio: osservando il grafico in Figura 7.11 B, infatti, si può notare che per tutte le formulazioni si ha un aumento di temperatura pari almeno a 6.5 °C (valore minimo registrato per la curva verde) dopo 20 minuti di applicazione del campo magnetico.

Pertanto, considerando che la temperatura fisiologica nel corpo umano è pari a 37 °C, ciascuna formulazione, partendo da questo valore, sarebbe potenzialmente in grado di provocare un aumento di temperatura tra 41 e 45°C, range di temperature utilizzate in ipertermia, e quindi di distruggere le cellule tumorali a contatto.

Ciò fa sì che le nanoparticelle magnetoplasmoniche prodotte secondo i due metodi di sintesi possano, teoricamente, essere impiegate in trattamenti di ipertermia magnetica *in vivo*.

7.4 Proprietà ottiche

Per ottenere informazioni riguardo le proprietà ottiche delle nanoparticelle magnetoplasmoniche sintetizzate, è stata condotta un'analisi di spettroscopia ultravioletta/visibile (UV-Vis).

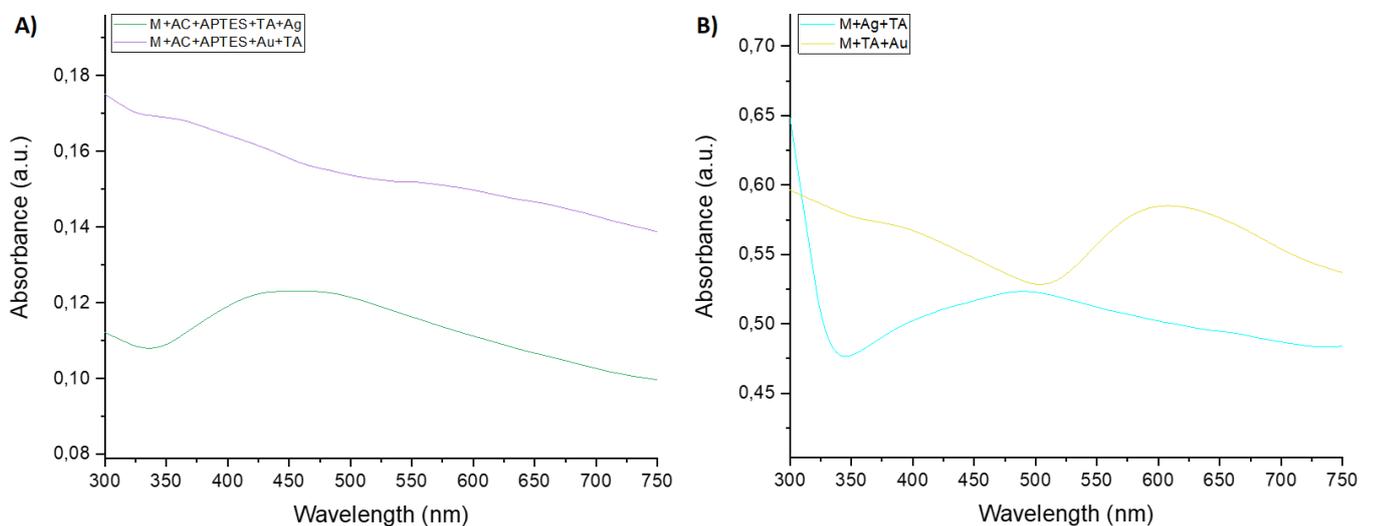


Figura 7.12 Spettri UV-Vis di (A) nanoparticelle di magnetite decorate con argento ($M+AC+APTES+TA+Ag$) in verde e decorate con oro ($M+AC+APTES+Au+TA$) in viola, (B) nanoparticelle di magnetite decorate con argento ($M+Ag+TA$) in celeste e decorate con oro ($M+TA+Au$) in giallo

In Figura 7.12 A sono presentati gli spettri UV-Vis relativi alle nanoparticelle magnetoplasmoniche costituite da magnetite e argento (M+AC+APTES+TA+Ag, curva verde) e da magnetite e oro (M+AC+APTES+Au+TA, curva viola) sintetizzate secondo il *Metodo 1*, mentre in Figura 7.12 B gli spettri dello stesso tipo di nanoparticelle composite (rispettivamente M+Ag+TA, curva celeste e M+TA+Au, curva gialla) sintetizzate secondo il *Metodo 2*.

Per quanto riguarda le nanostrutture composite costituite da magnetite e argento, dal confronto degli spettri è possibile osservare che quelle di M+AC+APTES+TA+Ag (curva verde, Figura 7.12 A) mostrano una banda di assorbimento a una lunghezza d'onda inferiore (456 nm) rispetto allo stesso tipo di nanostrutture (M+Ag+TA, curva celeste Figura 7.12 B) per le quali è, invece, a 490 nm.

Ciò è dovuto al fatto che all'aumentare delle dimensioni delle nanoparticelle plasmoniche, la frequenza di assorbimento diminuisce, cioè si sposta verso destra [65].

La conferma arriva dalle immagini STEM (paragrafo 7.1) in cui si era visto che la maggior parte delle nanoparticelle di argento ottenute nel *Metodo 1* mostra dimensioni generalmente inferiori (15 ÷ 53 nm) rispetto a quelle ottenute secondo il *Metodo 2* (29 ÷ 93 nm).

Inoltre per la curva celeste (M+Ag+TA) il picco appare più stretto rispetto a quello mostrato dalla curva verde (M+AC+APTES+TA+Ag) e questo conferma quanto già osservato nelle immagini STEM, ossia che le nanoparticelle metalliche ottenute tramite il *Metodo 2* (M+Ag+TA) risultano essere distribuite più omogeneamente rispetto a quelle preparate tramite il *Metodo 1* (M+AC+APTES+TA+Ag).

Osservando invece lo spettro di M+AC+APTES+Au+TA (curva viola, Figura 7.12 A) e quello di M+TA+Au (curva gialla, Figura 7.12 B) si nota che per il primo tipo di nanoparticelle il picco di assorbimento si trova presumibilmente a circa 552 nm, mentre per il secondo tipo è a 606 nm.

Anche in questo caso, ciò è dovuto al fatto che le particelle d'oro ottenute nel *Metodo 1*, come confermato dalle immagini STEM (paragrafo 7.1), sono nettamente più piccole

(per tutte il diametro è inferiore a 20 nm) rispetto a quelle ottenute nel Metodo 2 che sono generalmente molto grandi e con dimensione variabile tra 22 e 137 nm.

Inoltre per la curva gialla (M+TA+Au) il picco appare più intenso rispetto a quello mostrato dalla curva viola (M+AC+APTES+Au+TA) che è, invece, poco accentuato: come si è visto per le nanoparticelle di argento, anche per quelle d'oro gli spettri UV-Vis confermano quanto già osservato nelle relative immagini STEM, ossia che le particelle d'oro ottenute tramite il *Metodo 2* (M+TA+Au) risultano essere distribuite più omogeneamente rispetto a quelle preparate tramite *Metodo 1* (M+AC+APTES+Au+TA).

In generale, per tutti e quattro gli spettri si riscontra uno spostamento del picco di risonanza a lunghezze d'onda superiori rispetto ai dati riportati in letteratura sulle singole unità plasmoniche responsabili delle proprietà ottiche.

Come discusso nel capitolo 5, ciò è dovuto alla presenza dell'unità di magnetite nelle nanoparticelle magnetoplasmoniche sintetizzate e può essere considerato positivo [71,72].

Infatti, per aumentare le possibilità di successo della terapia fototermica *in vivo*, oltre a irradiare nel vicino infrarosso per far sì che le radiazioni penetrino in profondità, è preferibile che la frequenza dell'onda incidente sia per quanto possibile sovrapposta allo spettro delle nanoparticelle, affinché l'assorbimento della luce da parte dell'unità plasmonica sia maggiore.

Come suggerito da H. Kitching et al., un altro modo per spostare il picco di risonanza delle singole nanoparticelle d'oro verso il rosso, a lunghezze d'onda superiori consiste nell'utilizzo di coloranti, quali il blu di toluidina [70].

Prendendo spunto da quanto proposto dagli autori, si è voluto provare a osservare se lo stesso effetto potesse essere ottenuto su nanoparticelle magnetoplasmoniche.

A tal proposito, si è proceduto innanzitutto ad acquisire lo spettro di assorbimento di una soluzione contenente nanoparticelle di magnetite decorate con oro (M+TA+Au) disperse in 8 ml di acqua bidistillata.

Successivamente, sono stati aggiunti 10 μl di una soluzione di blu di toluidina 5mM e ne è stato determinato lo spettro.

Per vedere se l'effetto ottenuto fosse semplicemente dovuto alla presenza del colorante in soluzione, si è effettuato infine il lavaggio tramite l'utilizzo di un magnete posizionato sotto il becher, raccogliendo le nanoparticelle di magnetite decorate con oro poi disperse in 8 ml di acqua bidistillata.

Si è, quindi, calcolata quest'ultima curva di assorbimento ottenendo quanto mostrato di seguito.

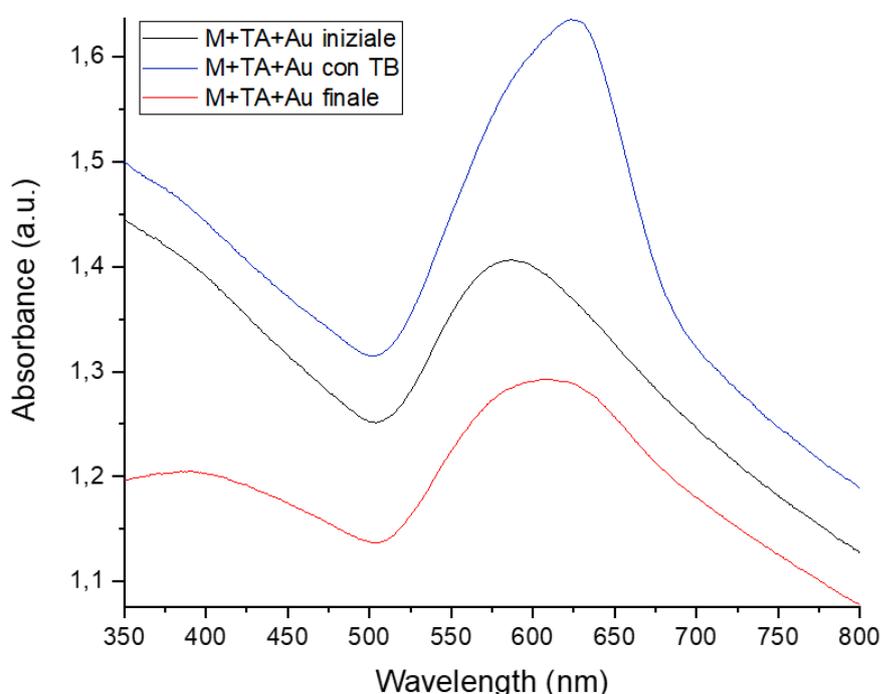


Figura 7.13 Spettri UV-Vis di: soluzione iniziale di nanoparticelle di magnetite decorate con oro (M+TA+Au iniziale) in nero, della stessa soluzione in presenza del blu di toluidina (M+TA+Au con TB) in blu e in seguito al lavaggio (M+TA+Au finale) in rosso

Come è possibile osservare dall'immagine, si nota che il picco di assorbimento si sposta da un valore di partenza pari a 586 nm (M+TA+Au iniziale, curva nera) a 623 nm nel caso della soluzione in cui le nanoparticelle sono a contatto con il blu di toluidina (M+TA+Au con TB, curva blu).

Lo spettro finale, per le particelle lavate (M+TA+Au finale, curva rossa) mostra invece un picco a 608 nm.

Pertanto il cambiamento persiste anche dopo aver eseguito il lavaggio per rimuovere il colorante, tuttavia, il valore ottenuto è inferiore a quello registrato in presenza del blu di toluidina.

Come suggerito nell'articolo, lo spostamento del picco è dovuto all'aggregazione delle nanoparticelle di oro in seguito all'aggiunta del colorante [70].

Capitolo 8

Conclusioni

L'attività svolta in questo lavoro di tesi è stata finalizzata a preparare nanomateriali compositi costituiti da un nucleo di magnetite decorato esternamente con nanoparticelle di argento od oro che preservino le caratteristiche peculiari delle singole formulazioni.

Lo sfruttamento sinergico delle loro proprietà ne consentirebbe l'uso *in vivo* in trattamenti tumorali per i quali l'accumulo nel sito di interesse può essere ottenuto manipolando dall'esterno i nuclei magnetici, e la distruzione delle cellule cancerose per mezzo delle nanoparticelle metalliche (terapia fototermica) o dei nuclei stessi (ipertermia magnetica).

I due metodi di sintesi proposti, semplici e facilmente riproducibili, hanno permesso di ottenere, tramite co-precipitazione chimica, nanoparticelle di magnetite dalla forma sferica e con dimensioni comprese tra 5 e 15 nm.

Nella decorazione con argento od oro tramite l'uso innovativo dell'acido tannico, composto di origine naturale, ecocompatibile e dalle proprietà antiossidanti e antitumorali, è risultato evidente che per il *Metodo 1*, per il quale era prevista un'ulteriore fase di stabilizzazione con acido citrico e funzionalizzazione con APTES dei nuclei di magnetite, le nanoparticelle metalliche sintetizzate presentano un range dimensionale più stretto rispetto a quelle ottenute con il *Metodo 2*, ma questa seconda procedura consente di ottenere una migliore distribuzione delle particelle metalliche.

La caratterizzazione strutturale/composizionale ha confermato la presenza delle sostanze impiegate per la preparazione delle nanoparticelle magnetoplasmoniche,

attestando l'avvenuta realizzazione delle diverse fasi previste nei due metodi di sintesi usati.

I risultati ottenuti nell'analisi termica hanno invece dimostrato che, nonostante i trattamenti di stabilizzazione, funzionalizzazione e la decorazione con argento od oro, tutti i nanocompositi sintetizzati sono in grado di sviluppare calore grazie alla presenza dell'unità di magnetite al loro interno e sono, pertanto, potenzialmente utilizzabili in trattamenti di ipertermia magnetica *in vivo*.

Infine, l'analisi di spettroscopia UV-Vis ha evidenziato che tutte le nanoparticelle magnetoplasmoniche sintetizzate presentano un picco di assorbimento molto evidente a eccezione dei nanocompositi di magnetite e oro ottenuti secondo il *Metodo 1* e ciò è probabilmente dovuto a una distribuzione non omogenea delle nanoparticelle plasmoniche e alla ridotta quantità di acido cloroaurico impiegata in questa sintesi.

In generale, tutti e quattro gli spettri, per via della presenza dell'unità magnetica, mostrano uno spostamento del picco di risonanza a lunghezze d'onda superiori rispetto ai dati riportati in letteratura sulle singole unità plasmoniche e ciò è conveniente se si vogliono utilizzare questi nanocompositi per terapia fototermica *in vivo*.

Si è, inoltre, mostrato che per nanoparticelle composite di magnetite e oro è possibile ottenere uno spostamento del picco di assorbimento utilizzando molecole di blu di toluidina che comportano, presumibilmente, l'aggregazione delle unità metalliche.

Con questo lavoro di tesi si è quindi dimostrato che l'impiego dell'acido tannico rappresenta una valida alternativa ecocompatibile ai riducenti chimici solitamente utilizzati nella sintesi di nanoparticelle metalliche.

In particolare, il suo utilizzo come unico agente riducente e stabilizzante permette di semplificare e rendere più rapida la sintesi di nanoparticelle magnetoplasmoniche come evidenziato nel *Metodo 2*, caratterizzato dall'assenza delle fasi di stabilizzazione con acido citrico e funzionalizzazione con APTES presenti, invece, nel *Metodo 1*.

Inoltre, il percorso di sintesi semplificato (*Metodo 2*) ha permesso di ottenere nanoparticelle plasmoniche che, pur essendo più grandi di quelle ottenute nel *Metodo 1*, mostrano una distribuzione spaziale più omogenea e un picco di assorbimento più intenso.

Sviluppi futuri potrebbero essere mirati a perfezionare l'utilizzo dell'acido tannico come unico riducente e stabilizzante provando, ad esempio, a ottimizzare i rapporti tra i reagenti di partenza e i tempi di reazione, al fine di diminuire le dimensioni delle nanoparticelle plasmoniche.

Bibliografia

- [1] Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), *The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies*, (2006)
- [2] Michael J. Pitkethly, *Nanomaterials – the driving force*, *Materials Today* 7 (2004), 20-29
- [3] <https://whatisnanomedicine.com/tag/organic-nanoparticles/>
- [4] Narendra Kumar, Sunita Kumbhat, *Essentials in Nanoscience and Nanotechnology*, John Wiley & Sons, Inc. (2016)
- [5] Gianluca Ciardelli, Gianni Ciofani, Valeria Chiono, *Appunti del corso di Bionanotecnologie*
- [6] <http://www.understandingnano.com/nanotech-applications.html>
- [7] <https://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=30661.php>
- [8] Narendra Kumar, Rajiv Kumar, *Nanotechnology and Nanomaterials in the Treatment of Life-threatening Diseases*, Elsevier (2014)
- [9] Catherine C Berry, *Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*, *Journal of Physics D: Applied Physics* (2009)
- [10] Laura L. Vatta, Ron D. Sanderson, Klaus R. Koch, *Magnetic nanoparticles: Properties and potential applications*, *Pure Appl. Chem.* 78 (2006), 1793-1801
- [11] Jiri Kudr, Yazan Haddad, Lukas Richtera, Zbynek Heger, Mirko Cernak, Vojtech Adam, Ondrej Zitka, *Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications*, *Nanomaterials* (2017)

-
- [12] Phuong Ha-Lien Tran, Thao Truong-Dinh Tran, Toi Van Vo, Beom-Jin Lee, *Promising Iron Oxide-based Magnetic Nanoparticles in Biomedical Engineering*, Archives of Pharmacal Research 35 (2012), 2045-2061
- [13] Leena Mohammed, Hassan G. Gomaa, Doaa Ragab, Jesse Zhu, *Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review*, Particuology (2016)
- [14] Ajay Kumar Gupta, Mona Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*, Biomaterials 26 (2005)
- [15] Katerina Hola, Zdenka Markova, Giorgio Zoppellaro, Jiri Tucek, Radek Zboril, *Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances*, Biotechnology Advances (2015)
- [16] Wei Wu, Zhaohui Wu, Taekyung Yu, Changzhong Jiang, Woo-Sik Kim, *Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications*, Science and Technology of Advanced Material 16 (2015)
- [17] David Chang, May Lim, Jeroen A. C. M. Goos, Ruirui Qiao, Yun Yee Ng, Friederike M. Mansfeld, Michael Jackson, Thomas P. Davis, Maria Kavallaris, *Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations*, Frontiers in Pharmacology 9 (2018)
- [18] Elena-Alina Moacă, Elena Dorina Coricovac, Codruta Marinela Soica, Iulia Andreea Pinzaru, Cornelia Silvia Păcurariu, Cristina Adriana Dehelean, *Preclinical Aspects on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles and Their Interventions as Anticancer Agents: Enucleation, Apoptosis and Other Mechanism*, IntechOpen (2018)
- [19] An-Hui Lu, E. L. Salabas, Ferdi Schüth, *Magnetic nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application*, Angew. Chem. Int. 46 (2007), 1222-1244
- [20] J. Gautier, E. Allard-Vannier, K. Hervé-Aubert, M. Soucé, I. Chourpa, *Design strategies of hybrid metallic nanoparticles for theragnostic applications*, Nanotechnology 24 (2013)
- [21] Pratiksha Srivastava, Pramod K. Sharma, Abdul Muheem, Musarrat H. Warsi, *Magnetic Nanoparticles: A Review on Stratagems of Fabrication and its Biomedical Applications*, Bentham Science Publishers (2017)
-

-
- [22] Mehmet Dinc, Cem Esen, Boris Mizaikoff, *Recent advances on core-shell magnetic molecularly imprinted polymers for biomacromolecules*, Trends in Analytical Chemistry 114 (2019), 202-217
- [23] Boris I. Kharisov, H. V. Rasika Dias, Oxana V. Kharissova, Alejandro Vazquez, Yolanda Pena, Idalia Gomez, *Solubilization, dispersion and stabilization of magnetic nanoparticles in water and non-aqueous solvents: recent trends*, RSC Advances 4 (2014) 45354-45381
- [24] V. B. Barbeta, R. F. Jardim, P. K. Kiyohara, F. B. Effenberger, L. M. Rossi, *Magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles coated with oleic and dodecanoic acids*, Journal of Applied Physics 107 (2010)
- [25] Elham Cheraghpour, Sirius Javadpour, Ali Reza Mehdizadeh, *Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy*, J. Biomedical Science and Engineering 5 (2012), 715-719
- [26] Saumya Nigam, K. C. Barick, D. Bahadur, *Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 323 (2011), 237-243
- [27] Wei Wu, Quanguo He, Hong Chen, *Silane Bridged Surface Tailoring on Magnetite Nanoparticles*, Proceedings of the 1st International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (2007)
- [28] Dongling Ma, Jingwen Guan, Stéphane Dénoommée, Gary Enright, Teodor Veres, Benoit Simard, *Multifunctional Nano-Architecture for Biomedical Applications*, Chem. Mater. 18 (2006), 1920-1927
- [29] Philani P. Mpungose, Zanele P. Vundla, Glenn E. M. Maguire, Holger B. Friedrich, *The Current Status of Heterogeneous Palladium Catalysed Heck and Suzuki Cross-Coupling Reactions*, Molecules 23 (2018)
- [30] Hamed Arami, Amit Khandhar, Denny Liggitt, Kannan M. Krishnan, *In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles*, Chem. Soc. Rev. 44 (2015), 8576-8607
-

-
- [31] Donald E. Owens III, Nicholas A. Peppas, *Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles*, International Journal of Pharmaceutics 307 (2006), 93-102
- [32] Weiming Xue, Yanyan Liu, Na Zhang, Youdong Yao, Pei Ma, Huiyun Wen, Saipeng Huang, Yane Luo, Haiming Fan, *Effects of core size and PEG coating layer of iron oxide nanoparticles on the distribution and metabolism in mice*, International Journal of Nanomedicine 13 (2018), 5719-5731
- [33] Bujie Du, Mengxiao Yu, Jie Zheng, *Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys*, Nature Reviews Materials (2018)
- [34] Forrest M. Kievit, Miqin Zhang, *Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy*, Accounts of Chemical Research 44 (2011), 857-862
- [35] Remon Bazak, Mohamad Hourri, Samar El Achy, Wael Hussein, Tamer Refaat, *Passive targeting of nanoparticles for cancer: A comprehensive review of the literature*, Molecular and Clinical Oncology 2 (2014), 904-908
- [36] Jun Fang, Hideaki Nakamura, Hiroshi Maeda, *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*, Advanced Drug Delivery Reviews 63 (2011), 136-151
- [37] Rajesh R. Wakaskar, *Passive and Active Targeting in Tumor Microenvironment*, International Journal of Drug Development and Research 9 (2017), 37-41
- [38] Nadda Muhamad, Tullayakorn, Plengsuriyakarn, Kesara Na-Bangchang, *Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review*, International Journal of Nanomedicine 13 (2018), 3921-3935
- [39] M. R. Abdollah, T. Kalber, B. Tolner, P. Southern, J. C. Bear, M. Robson, *Prolonging the circulatory retention of SPIONs using dextran sulfate: in vivo tracking achieved by functionalisation with near-infrared dyes*, Faraday Discussions 175 (2014), 41-58
- [40] Veronica I. Shubayev, Thomas R. Pisanic II, Sungho Jin, *Magnetic nanoparticles for theragnostics*, Advanced Drug Delivery Reviews 61 (2009)
-

-
- [41] Elvin Blanco, Haifa Shen, Mauro Ferrari, *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*, Nat Biotechnol. 33 (2015), 941-951
- [42] Tetsuya Osaka, Takuya Nakanishi, Sangaraju Shanmugam, Shintaro Takahama, Hong Zhang, *Effect of surface charge of magnetite nanoparticles on their internalization into breast cancer and umbilical vein endothelial cells*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 71 (2009), 325-330
- [43] Enrica Verné, Appunti del corso Materiali per la bioingegneria
- [44] G. Mandarano, J. Lodhia, P. Eu, N. J. Ferris, R. Davidson, S. F. Cowell, *Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 2): The application of iron oxide contrast agents in MRI*, Biomedical Imaging and Intervention Journal 6 (2010)
- [45] Miriam D. Rosenthal, Robert H. Glew, *Medical Biochemistry: Human Metabolism in Health and Disease*, Wiley (2009)
- [46] Bruno Bonnemain, *Superparamagnetic Agents in Magnetic Resonance Imaging: Physicochemical Characteristics and Clinical Applications A review*, J Drug Target 6 (1998), 167-174
- [47] Abolfazl Akbarzadeh, Mohamad Samiei, Soodabeh Davaran, *Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine*, Nanoscale Research Letters 7 (2012)
- [48] https://en.wikipedia.org/wiki/Magnetic_domain
- [49] Nicola A. Spaldin, *Magnetic Materials: Fundamentals and Applications*, Cambridge University Press (2011)
- [50] Kannan M. Krishnan, *Biomedical Nanomagnetism: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy*, IEEE Transactions on Magnetics 46 (2010), 2523-2558
- [51] Ali Yadollahpour, Samaneh Rashidi, *Magnetic Nanoparticles: A review of Chemical and Physical Characteristics Important in Medical Applications*, Oriental Journal of Chemistry 31 (2015), 25-30

-
- [52] Varun Chaudhary, Richa Chaudhary, *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Functionalization, and Applications*, Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology 28 (2018), 153-183
- [53] Aryn S. Teja, Pei-Yoong Koh, *Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles*, Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials 55 (2009), 22-45
- [54] <https://www.nde-ed.org/EducationResources/CommunityCollege/MagParticle/Physics/HysteresisLoop.htm>
- [55] Piotr Gas, *Essential Facts on the History of Hyperthermia and their Connections with Electromedicine*, Przegląd Elektrotechniczny, 87 (2011), 37-40
- [56] Mark Hurwitz, Paul R. Stauffer, *Hyperthermia, radiation and chemotherapy: the role of heat in multidisciplinary cancer care*, Department of Radiation Oncology Faculty Papers 69 (2014)
- [57] Suriyanto, E. Y. K. Ng, S. D. Kumar, *Physical mechanism and modelling of heat generation and transfer in magnetic fluid hyperthermia through Néelian and Brownian relaxation: a review*, BioMedical Engineering OnLine (2017)
- [58] Silvio Dutz, Rudolf Hergt, *Magnetic nanoparticle heating and heat transfer on a microscale: Basic principles, realities and physical limitations of hyperthermia for tumor therapy*, International Journal of Hyperthermia, 29 (2013), 790-800
- [59] V. M. Khot, A. B. Salunkhe, N. D. Thorat, R. S. Ningthoujam, S. H. Pawar, *Induction heating studies of dextran coated MgFe₂O₄ nanoparticles for magnetic hyperthermia*, Dalton Transactions, 42 (2013)
- [60] V. M. Khot, A. B. Salunkhe, N. D. Thorat, M. R. Phadatare, S. H. Pawar, *Induction heating studies of combustion synthesized MgFe₂O₄ nanoparticles for hyperthermia applications*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 332 (2013), 48-51
- [61] V. N. Nikiforov, *Magnetic Induction Hyperthermia*, Russian Physics Journal, 50 (2007)

-
- [62] Vikram Pareek, Arpit Bhargava, Rinki Gupta, Navin Jain, Jitendra Panwar, *Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review*, Advanced Science, Engineering and Medicine, 9 (2017), 527-544
- [63] Elham Abbasi, Morteza Milani, Sedigheh Fekri Aval, Mohammad Kouhi, Abolfazl Akbarzadeh, Hamid Tayefi Nasrabadi, Parisa Nikasa, San Woo Joo, Younes Hanifepour, Kazem Nejati-Koshki, Mohammad Samiei, *Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties*, Critical Reviews in Microbiology (2014), 1-8
- [64] Haohao Zhang, Guihuan Chen, Bing Yu, Hailin Cong, *Emerging advanced nanomaterials for cancer photothermal therapy*, Reviews on advanced materials science, 53 (2018), 131-146
- [65] Xiaohua Huang, Mostafa A. El-Sayed, *Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy*, Journal of Advanced Research, 1 (2010), 13-28
- [66] Xiaohua Huang, Mostafa A. El-Sayed, *Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT)*, Alexandria Journal of Medicine, 47 (2011), 1-9
- [67] Sujit Kumar Ghosh, Tarasankar Pal, *Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications*, Chemical Reviews, 107 (2007), 4797-4862
- [68] Craig F. Bohren, Donald R. Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, Wiley-VCH, (2004)
- [69] Derin Sevenler, Neşe Lortlar Ünlü, M. Selim Ünlü, *Nanoparticle Biosensing with Interferometric Reflectance Imaging*, Chapter, (2015)
- [70] H. Kitching, A. J. Kenyon, I. P. Parkin, *The interaction of gold and silver nanoparticles with a range of anionic and cationic dyes*, Physical Chemistry Chemical Physics, 16 (2014), 6050-6059
- [71] Akshay Pariti, *Gold-magnetite nanoparticle-biomolecule conjugates: synthesis, properties and toxicity studies*, Masters Theses, 7309 (2014)

-
- [72] Marites Melancon, Wei Lu, Chun Li, *Gold-Based Magneto/Optical Nanostructures: Challenges for In Vivo Applications in Cancer Diagnostics and Therapy*, Materials Research Bulletin, 34 (2009), 415-421
- [73] Dickson K. Kirui, Diego A. Rey, Carl A. Batt, *Gold hybrid nanoparticles for targeted phototherapy and cancer imaging*, Nanotechnology, 21 (2010)
- [74] Amelia J. Wagstaff, Sarah D. Brown, Megan R. Holden, Gemma E. Craig, Jane A. Plumb, Roisin E. Brown, Nial Wheate, *Cisplatin drug delivery using gold-coated iron oxide nanoparticles for enhanced tumor targeting with external magnetic*, Inorganica Chimica Acta, 393 (2012), 328-333
- [75] Ângela L. Andrade, Diana M. Souza, Márcio C. Pereira, José D. Fabris, Rosana Z. Domingues, *pH effect on the synthesis of magnetite nanoparticles by the chemical reduction-precipitation method*, Quim Nova, 33 (2010), 524-527
- [76] M. Yamaura, R. L. Camilo, L. C. Sampaio, M. A. Macêdo, M. Nakamura, H. E. Toma, *Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 279 (2004), 210-217
- [77] Sankar Kalidas Sivaraman, Iniyan Elango, Sanjeev Kumar, Venugopal Santhanam, *A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds*, Current science, 90 (2009)
- [78] Ahmad Tufail, *Reviewing the Tannic Acid Mediated Synthesis of Metal Nanoparticles*, Journal of Nanotechnology, (2014)
- [79] Cesare Ormelli, *Magnetoplasmonic nanoparticles for photothermal therapy*, Tesi di laurea magistrale, (2019)
- [80] C. Multari, M. Miola, F. Laviano, R. Gerbaldo, G. Pezzotti, D. Debellis, E. Verné, *Magnetoplasmonic nanoparticles for photothermal therapy*, Nanotechnology 30, (2019)

-
- [81] [https://chem.libretexts.org/courses/franklin_and_marshall_college/introduction_to_materials_characterization_-_chm_412_collaborative_text/electron_and_probe_microscopy/transmission_electron_microscopy_\(tem\)%3a_tem_versus_stem_and_haadf](https://chem.libretexts.org/courses/franklin_and_marshall_college/introduction_to_materials_characterization_-_chm_412_collaborative_text/electron_and_probe_microscopy/transmission_electron_microscopy_(tem)%3a_tem_versus_stem_and_haadf)
- [82] https://www.researchgate.net/publication/294580810_stem_eels_ovvero_microscopia_elettronica_a_scansione_in_trasmissione_e_spettroscopia_elettronica_a_perdita_d'energia
- [83] <https://biomateriali.files.wordpress.com/2012/12/ftir.pdf>
- [84] http://www.rsc.org/learn-chemistry/content/filerepository/cmp/00/001/304/uv-vis_student%20resource%20pack_english.pdf
- [85] Mevlüt Bayrakçıl, Esra Maltaş, Şengül Yigiter, Mustafa Özmen, *Synthesis and Application of Novel Magnetite Nanoparticle Based Azacrown Ether for Protein Recognition*, *Macromolecular Research*, 21 (2013), 1029-1035
- [86] Bassam Saif, Congli Wang, Dong Chuan, Shaomin Shuang, *Synthesis and Characterization of Fe₃O₄ Coated on APTES as Carriers for Morin-Anticancer Drug*, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 6 (2015), 267-275
- [87] Silvia Villa, Paola Riani, Federico Locardi, Fabio Canepa, *Functionalization of Fe₃O₄ NPs by Silanization: Use of Amine (APTES) and Thiol (MPTMS) Silanes and Their Physical Characterization*, *Materials*, 9 (2016)
- [88] Hojat Veisi, Seyed Behzad Moradi, Asma Saljooqi, Parisa Safarimehr, *Silver nanoparticle-decorated on tannic acid-modified magnetite nanoparticles (Fe₃O₄@TA/Ag) for highly active catalytic reduction of 4-nitrophenol, Rhodamine B and Methylene blue*, *Materials Science & Engineering C*, 100 (2019), 445-452
- [89] http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432011000200003
- [90] Olga B. Belskaya, Irina G. Danilova, Maxim O. Kabakov, Roman M. Mironenko, Alexander V. Lavrenov, Vladimir A. Likholobov, *FTIR Spectroscopy of Adsorbed Probe*
-

Molecules for Analyzing the Surface Properties of Supported Pt (Pd) Catalysts, Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology, (2012)