

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale

## **“Nanoparticelle magnetiche multifunzionali per il trattamento dei tumori”**



**Relatori**

prof.ssa Enrica Vernè

prof.ssa Marta Miola

**Candidato**

Marco La Porta

Marzo 2020

## Indice

<b>1.</b>	<b>Introduzione.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Ipertermia per il trattamento dei tumori.....</b>	<b>2</b>
2.1	Ipertermia e tumori .....	2
2.2	Tipologie di ipertermia .....	2
2.3	Ipertermia magnetofluida e tipi di nanoparticelle.....	4
<b>3.</b>	<b>Magnetismo nei materiali .....</b>	<b>7</b>
3.1	Classificazione del magnetismo .....	7
3.2	La suscettività magnetica dei magnetofluidi .....	8
3.3	I domini magnetici.....	10
3.4	Anisotropia magnetica e stato superparamagnetico .....	11
3.5	La temperatura di Curie .....	13
<b>4.</b>	<b>Sintesi nanoparticelle .....</b>	<b>15</b>
4.1	Decomposizione termica .....	15
4.2	Micro-emulsione.....	16
4.3	Sintesi idrotermale e sonochimica .....	16
4.4	Pirolisi Laser.....	16
4.5	Coprecipitazione .....	17
4.5.1	<i>Parametri di sintesi che influenzano le proprietà delle nanoparticelle.....</i>	<i>18</i>
4.6	Sintesi sperimentale delle nanoparticelle di magnetite per coprecipitazione .....	20
<b>5.</b>	<b>Metodi di caratterizzazione delle nanoparticelle.....</b>	<b>23</b>
5.1	Microscopia elettronica .....	23
5.1.1	Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM).....	23
5.1.2	Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) .....	25
5.1.3	Transmission electron microscopy (TEM).....	25
5.2	Dynamic light scattering (DLS) .....	27
5.2.1	La polidispersione .....	28
5.3	X-Ray Diffraction Spectroscopy (XRD) .....	28
5.4	Caratterizzazione magnetica-Suscettometro AC/magnetometro DC .....	30
<b>6.</b>	<b>Misure calorimetriche di magnetofluidi (prove forno a induzione) .....</b>	<b>33</b>
6.1	Meccanismi di generazione del calore (rilassamento di Neel e di Brown) .....	33
6.2	Dissipazione di potenza nelle nanoparticelle.....	35
6.3	Misura calorimetrica del tasso di assorbimento specifico .....	36
6.5	I parametri che influenzano la misura calorimetrica .....	39
6.6	Effetti concentrazione e grado di agglomerazione delle nanoparticelle.....	41
<b>7.</b>	<b>Risultati sperimentali.....</b>	<b>43</b>
7.1	Analisi FESEM delle nanoparticelle magnetiche .....	43
7.2	Analisi TEM delle nanoparticelle.....	46
7.3	Analisi DLS delle nanoparticelle magnetiche .....	53
7.4	Diffrattometria XRD.....	57
7.5	Analisi magnetica-Curve di magnetizzazione .....	62
7.6	Misure calorimetriche con generatore ad induzione e valutazione SAR.....	63
7.7	Confronto proprietà nanoparticelle con dati di letteratura.....	70
<b>8.</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>75</b>
	<b>Bibliografia .....</b>	<b>79</b>

## 1. Introduzione

Negli ultimi decenni lo sviluppo delle nanotecnologie per applicazioni in ambito biomedicale ha vissuto un crescente interesse soprattutto per quanto riguarda l'utilizzo di nanoparticelle magnetiche multifunzionali. La peculiarità di tali tipologie di materiali consiste nella poliedricità di impiego che permette di predisporre interventi mirati attraverso un approccio teranostico.

A seguito dell'applicazione di un campo magnetico esterno è possibile sfruttare la risposta delle nanoparticelle per individuare, stimolare e interagire con entità biologiche favorendo così l'utilizzo di tecniche come i trattamenti ipertermici per i tumori, *drug delivery e release* mirato e controllato, miglioramento dei mezzi di contrasto nelle tecniche di *imaging*, processi di *labelling* e separazione magnetica, approcci di *tissue engineering* che negli ultimi anni sono stati ampiamente indagati e descritti in articoli e ricerche da studiosi di tutto il mondo.

Lo scopo del presente lavoro di tesi consiste nell'ottimizzazione del processo produttivo e nella caratterizzazione di nanoparticelle a base di ossidi di ferro ottenute per coprecipitazione per il trattamento di ipertermia dei tumori. L'ipertermia rappresenta un approccio innovativo che porta alla necrosi dei tessuti tumorali mediante un innalzamento locale della temperatura sopra una soglia critica attraverso la risposta di un fluido magnetico sottoposto ad un campo magnetico alternato. È un approccio che può essere utilizzato in combinazione con le altre terapie tumorali tradizionali, migliorandone l'efficacia e riducendo i dosaggi.

I recenti studi hanno focalizzato l'attenzione nel circoscrivere gli effetti termici ai soli siti tumorali e a massimizzare la quantità di calore sviluppata per campi magnetici relativamente contenuti.

Il nostro scopo, dunque, è stato incentrato sull'analisi e documentazione sullo stato dell'arte riguardo alla produzione delle nanoparticelle per il trattamento di tumori -e sulla comprensione dei meccanismi chimico-fisici inerenti al magnetismo- da cui dipendono le proprietà e l'effettiva applicazione dei fluidi magnetici.

Dal punto di vista sperimentale, l'attività ha riguardato lo sviluppo e l'ottimizzazione del processo di produzione per coprecipitazione delle nanoparticelle magnetiche, analizzando l'influenza che i vari parametri di sintesi hanno sulle proprietà e sulla risposta complessiva dei campioni; attraverso i vari metodi e tecniche di caratterizzazione di natura chimico-strutturale, magnetica, morfologica e di riscaldamento è stato possibile determinare quali sono gli approcci produttivi che determinano un risultato migliore in termini di applicazione finale, valutando anche l'efficacia dei campioni prodotti attraverso il confronto con i dati riportati in letteratura e nanoparticelle commerciali già disponibili.

## 2. Ipertermia per il trattamento dei tumori

In questo primo capitolo verrà descritta brevemente l'ipertermia come trattamento terapeutico innovativo da affiancare ai più tradizionali trattamenti di radioterapia e chemioterapia per il trattamento dei tumori. Verranno dunque descritti i principi su i quali si basa tale tipologia di trattamento, le tipologie di ipertermia e i materiali che vengono utilizzati (nanoparticelle magnetiche).

### 2.1 Ipertermia e tumori

L'ipertermia rappresenta una procedura terapeutica innovativa per il trattamento dei tumori che può essere utilizzata in combinazione alle tecniche tradizionali, quali la chemioterapia e/o la radioterapia, allo scopo di migliorare l'efficienza della terapia antitumorale e ridurre gli effetti collaterali.

Tale terapia si basa sul riscaldamento localizzato dei tessuti tumorali al di sopra delle normali condizioni fisiologiche, in modo tale da indurre effetti di apoptosi nelle cellule maligne [1]. Generalmente tale risultato viene raggiunto riscaldando il tumore ad una temperatura compresa tra i 41°C e i 45°C cercando di non compromettere i tessuti sani circostanti. In tale modo è possibile uccidere selettivamente le cellule maligne che risultano maggiormente vulnerabili rispetto alle cellule sane a causa dell'assenza di efficaci metodi di raffreddamento, come la vasodilatazione. Infatti, il sistema vascolare che caratterizza i tessuti tumorali presenta delle differenze rispetto a quelli sani e risulta insufficiente ad assicurare il corretto apporto di ossigeno e sostanze nutrienti in tali condizioni. Inoltre, il calore favorisce una risposta immunitaria migliore grazie alla maggiore quantità di antigeni tumorali che risultano disponibili.

### 2.2 Tipologie di ipertermia

Esistono vari approcci mediante i quali ottenere l'innalzamento della temperatura corporea, una prima distinzione delle tipologie di ipertermia consiste in:

**Ipertermia esterna:** si applica calore dall'esterno attraverso microonde, radiofrequenze, ultrasuoni, bagni caldi e infrarossi;

**Ipertermia interna:** attraverso l'esposizione ai campi elettromagnetici si ha il riscaldamento di materiali impiantati all'interno del corpo.

Inoltre, il National Cancer Institute classifica i trattamenti ipertermici in tre categorie così descritte:

**Ipertermia locale:** come nel caso di un tumore, il calore viene somministrato limitatamente ad un'area ridotta.

**Ipertermia regionale:** si riscaldano ampie aree di tessuto tumorale, come cavità e organi;

**Ipertermia total body:** il calore viene fornito a tutto il corpo attraverso opportune apparecchiature come camere termiche o coperte ad acqua calda. Metodologia utilizzata in caso di tumore con metastasi.

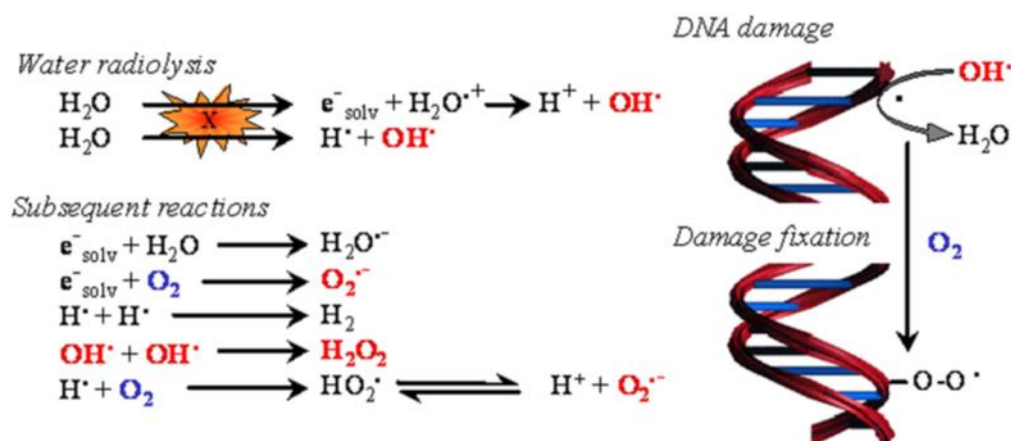
L'utilizzo di nanoparticelle magnetiche si è rivelato particolarmente incoraggiante dal punto di vista dei risultati per il trattamento locale: infatti è possibile far accumulare le nanoparticelle in corrispondenza del sito tumorale attraverso indirizzamento passivo grazie alle proprietà fisiche e chimiche con cui sono state progettate e - successivamente riscaldarle - mediante l'applicazione di un campo magnetico alternato, limitando gli effetti collaterali ai tessuti sani circostanti.

Un'ulteriore classificazione può essere fatta prendendo in considerazione la temperatura raggiunta in fase di trattamento distinguendo così:

**Trattamento ipertermico** (mild hyperthermia), in cui la temperatura raggiunta è nel range 41-45°C;

**Trattamento di termoablazione**, se si utilizza una temperatura superiore ai 50°C, in modo tale da indurre la necrosi dei tessuti tumorali per carbonizzazione.

Il trattamento ipertermico risulta particolarmente efficace se utilizzato in combinazione con le altre tecniche tradizionali, in particolare migliora la risposta dell'organismo sia alla radioterapia che alla chemioterapia [1]. L'ipertermia infatti favorisce un maggiore afflusso di sangue e quindi un maggiore apporto di ossigeno, specie fondamentale per gli effetti terapeutici della radioterapia; infatti tale approccio sfrutta le reazioni con tale elemento per sviluppare composti in grado di danneggiare le cellule tumorali. Come dimostrato da studiosi come Gray et al., (1953) [2] l'ipossia, ovvero un livello di ossigeno disponibile al di sotto della soglia fisiologica, limita l'efficacia della radioterapia in quanto, in mancanza di ossigeno, per ottenere la stessa risposta biologica è necessaria una radiazione con un'intensità tre volte maggiore rispetto alla condizione in cui si ha una pressione parziale di ossigeno normale. Per cui l'ossigeno favorisce il trattamento radioterapico favorendo la formazione di specie altamente reattive che permettono di limitare l'entità dei dosaggi. In Figura 2.1 vengono riportate le reazioni tipiche che coinvolgono l'ossigeno durante la radioterapia come descritto da Jordan e Sonveaux, (2012) [3].

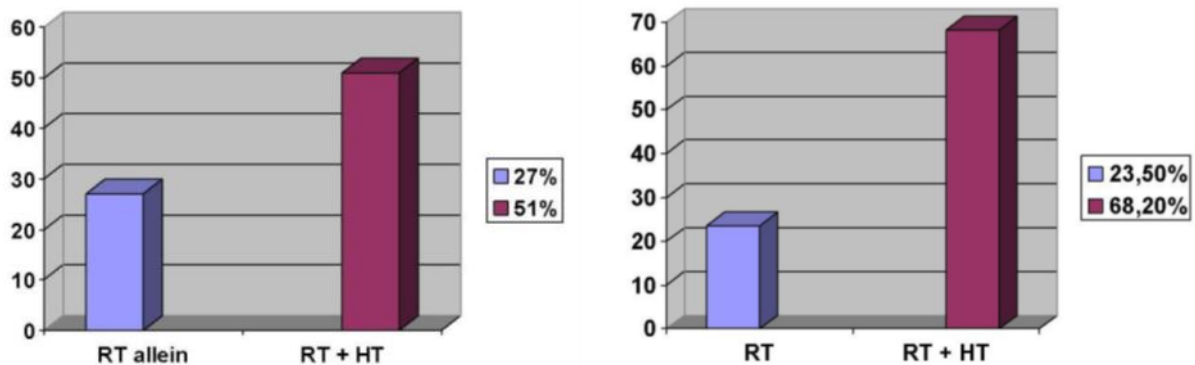


**Figura 2.1-** Reazioni tipiche che si sviluppano con l'ossigeno durante radioterapia [3]

Per quanto riguarda l'accoppiamento con la chemioterapia, una temperatura più elevata favorisce la profondità di penetrazione dei farmaci all'interno dei tessuti e influenza positivamente la cinetica di reazione.

Le immagini in Figura 2.2 evidenziano l'effetto sinergico delle terapie antitumorali, mentre

in Tabella 2.1 sono riportati i risultati di un approccio combinato di ipertermia con la radioterapia come riportato in Idrees e Jebakumar, (2014) [1].



**Figura 2.2-** Tasso di remissione completo per pazienti affetti da carcinoma alla cervice trattato con radioterapia e approccio combinato radioterapia più ipertermia.[1]

**Tabella 2.1-**Benefici dell'ipertermia combinata con radioterapia[1]

Tumour	Treatment	Patients (lesions)	End Point	Effect with HT	Effect without HT
Lymphnodes of head & neck tumors	RT	41 (44)	CR rate	83%	41%
			5 yr local control	69%	24%
			5 yr survival	53%	0%
Melanoma	RT	70 (138)	CR rate	62%	35%
			2 yr local control	46%	28%
Breast	RT	306	CR rate	59%	41%
Rectum	RT, surgery	115	5 yr survival	36%	7%
Cervix	RT	64	CR	55%	31%
Cervix	RT	40	CR	85%	50%
Rectum	RT	14	Response	100%	20%

### 2.3 Ipertermia magnetofluida e tipi di nanoparticelle

Quando si parla di ipertermia, più specificatamente si fa riferimento alla magnetofluido-ipertermia: l'effetto terapeutico viene raggiunto attraverso l'iniezione di nanoparticelle opportunamente disperse in un mezzo liquido, ad esempio acquoso, nella zona tumorale che viene riscaldata a seguito dell'applicazione di un campo magnetico tempo variante.

I magnetofluidi (o ferrofluidi) quindi, sono sospensioni colloidali stabili di nanoparticelle magnetiche, eventualmente funzionalizzate o rivestite con coating specifici, in un mezzo liquido. Generalmente la concentrazione di nanoparticelle è dell'ordine di  $10^{21} - 10^{23}$  particelle/ $m^3$  [4].

I ferrofluidi sono costituiti da 3 componenti:

- Nanoparticelle magnetiche;
- Tensioattivo o rivestimento delle particelle, per stabilizzare la sospensione;
- Fase liquida (ad esempio acqua o fluidi non acquosi);

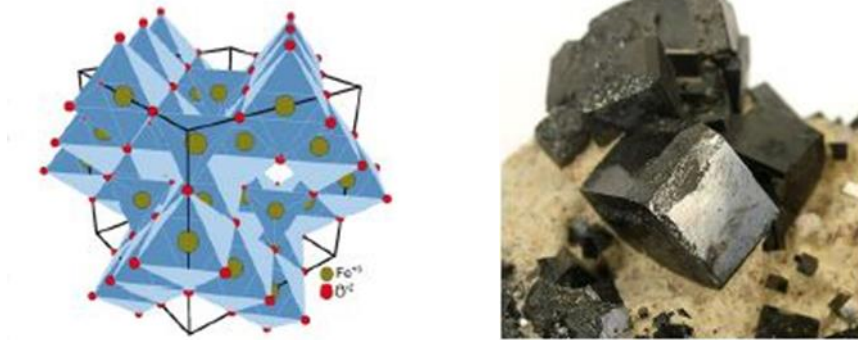
I materiali più ampiamente utilizzati per applicazioni biomedicali sono nanoparticelle a base di ossidi di ferro, principalmente magnetite ( $Fe_3O_4$ ) ma anche maghemite ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) o ferrite di cobalto ( $CoFe_2O_4$ ) poiché presentano comportamento superparamagnetico in

condizioni opportune. Tali ossidi possono presentare strutture cristalline differenti e proprietà magnetiche che variano a seconda della dimensione e delle condizioni fisiche in cui si trovano. Grazie alla loro scarsa tossicità e agli elevati valori di magnetizzazione di saturazione e suscettività magnetica le nanoparticelle a base di ossidi di ferro risultano le candidate ideali per applicazioni biomedicali. Le nanoparticelle sono inoltre classificate in base alla loro dimensione in SPIO (superparamagnetic iron oxide particle) se hanno diametro superiore ai 30 nm e USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxide particle) se sono caratterizzate da un diametro inferiore ai 30 nm.

Di seguito sono riportate e descritte le strutture più comuni che assumono gli ossidi di ferro di interesse biomedico.

( $Fe_2O_3$ ) è presente in natura sottoforma di tre fasi differenti a comportamento magnetico, ematite romboidale ( $\alpha-Fe_2O_3$ ), maghemite cubica ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) e la meno conosciuta fase  $\epsilon$ . La struttura del ( $\alpha-Fe_2O_3$ ) è caratterizzata dalla coordinazione ottaedrica di tutti gli ioni  $Fe^{3+}$ , mentre la maghemite ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) ha la struttura di una spinello cation-deficiente  $AB_2O_4$  in cui gli ioni metallici occupano sia i siti tetraedrici (A) che quelli ottaedrici (B). L'ematite è antiferromagnetica per temperature inferiori ai 950 K mentre al di sopra dei 260 K esibisce un ferromagnetismo debole. La maghemite viene generalmente ottenuta da un processo di ossidazione di magnetite e presenta comportamento ferromagnetico al di sotto dei 950 K.

La magnetite ( $Fe_3O_4$ ) mostra proprietà interessanti grazie alla presenza di entrambi gli stati di valenza degli ioni ferro. La magnetite è presente prevalentemente in forma cubica ed è ferromagnetica per temperature inferiori a 858 K. In alcuni casi, la decomposizione termica di composti contenenti ioni  $Fe^{3+}$  in assenza di ossigeno è accompagnata da una parziale riduzione di  $Fe^{3+}$  in  $Fe^{2+}$ . L'ostacolo principale al loro utilizzo è l'incompatibilità fisiologica dovuta alla scarsa solubilità in mezzo acquoso che ultimamente viene migliorata attraverso l'uso di differenti tipi di leganti e tensioattivi.



**Figura 2.3**-Struttura di un cristallo di maghemite (sinistra) e cristalli cubici di magnetite (destra)

Uno strato tensioattivo può essere utilizzato per evitare che le nanoparticelle creino degli agglomerati, in modo tale da garantire una sospensione stabile. Questa proprietà dipende da un opportuno bilancio tra le forze attrattive e repulsive tra le particelle e il liquido che le circonda. Inoltre, in ambito biomedicale un aspetto di fondamentale importanza è la biocompatibilità dei materiali da impiantare; per quanto gli ossidi di ferro siano generalmente compatibili per applicazioni *in vivo*, è comunque possibile migliorare la biocompatibilità attraverso dei rivestimenti con sostanze quali destrano, polietilenglicole (PEG), acido citrico/aspartico.

Date le considerazioni di cui sopra e la possibilità di ottenere diverse combinazioni di fattori geometrici, fisici e chimici dei vari componenti, ne deriva che la varietà di magnetofluidi esistenti è molto ampia e le proprietà magnetiche dipendono da vari fattori tra cui:

- Materiale, forma e dimensioni delle nanoparticelle;
- Tipo di materiale e spessore dell'eventuale coating;
- Tipo di fluido utilizzato per la sospensione;
- Concentrazione delle nanoparticelle.



### 3. Magnetismo nei materiali

In questa sezione, poiché si utilizzano nanoparticelle magnetiche per l'ipertermia, si descrivono i principi fisici che governano il magnetismo.

La risposta magnetica complessiva di un materiale sottoposto ad un campo magnetico di intensità  $H$  dipende dai singoli momenti atomici del materiale. Infatti, in assenza di un campo magnetico esterno, è possibile individuare zone che presentano momenti magnetici di diversa orientazione all'interno di un volume finito di un materiale magnetico.

L'induzione magnetica di un materiale immerso in un campo magnetico  $H$  risulta pari a:

$$B = \mu_0 (H + M) \quad (3.1)$$

Dove  $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ H/m}$  rappresenta la permeabilità magnetica del vuoto,  $M$  la magnetizzazione del materiale.

Per la maggior parte dei materiali si osserva che la magnetizzazione e il campo magnetico  $H$  sono proporzionali e paralleli:

$$M = \chi H \quad (3.2)$$

Dove  $\chi$  (adimensionale) è la suscettività magnetica del materiale e rappresenta il grado di magnetizzazione del materiale in seguito all'applicazione di un campo magnetico.

Combinando le due precedenti equazioni si ottiene l'espressione generale dell'induzione:

$$B = \mu_0 (1 + \chi) H = \mu_0 \mu_r H = \mu H \quad (3.3)$$

Dove  $\mu$  (H/m) rappresenta la permeabilità magnetica del mezzo.

#### 3.1 Classificazione del magnetismo

È possibile spiegare il differente comportamento dei materiali in presenza di un campo magnetico facendo riferimento alla loro struttura atomica. Infatti, le proprietà magnetiche di un materiale derivano principalmente dal movimento degli orbitali e dalla variazione degli spin degli elettroni; se gli spin sono appaiati i loro momenti magnetici si annullano, se gli spin non sono bilanciati l'atomo si comporta come un dipolo permanente [5].

In base alla loro risposta ad un campo magnetico esterno, i materiali magnetici possono essere classificati in cinque categorie:

- *Materiali diamagnetici*: possiedono suscettività magnetica  $\chi$  negativa molto bassa e respingono debolmente un campo magnetico. I materiali a comportamento diamagnetico vengono considerati comunemente non magnetici. Fanno parte di questo gruppo la maggior parte delle sostanze organiche, l'acqua e alcuni metalli come l'oro, l'argento, il rame e il mercurio.
- *Materiali paramagnetici*: sono materiali in cui gli elettroni spaiati presentano momenti allineati in maniera casuale per effetto dell'agitazione termica. Presentano magnetizzazione nulla in assenza di campo, ma i momenti tendono ad allinearsi lungo

la sua direzione originando una magnetizzazione di verso concorde e proporzionale al campo stesso se applicato.

- *Materiali ferromagnetici*: sono costituiti da dipoli magnetici orientati parallelamente in cui i momenti magnetici sono totalmente allineati in assenza di campo magnetico e la loro risultante è diversa da zero, dando luogo ad una magnetizzazione spontanea; sono ferromagnetici il ferro, cobalto e nickel e le loro leghe.
- *Materiali antiferromagnetici*: caso opposto al precedente, a causa di sotto reticoli i momenti mostrano un allineamento antiparallelo e la risultante totale è nulla. Sono antiferromagnetici il manganese e molti ossidi.
- *Materiali ferrimagnetici*: caso simile al precedente in cui i momenti magnetici sono orientati in modo antiparallelo ma la magnetizzazione è di ampiezza differente nelle due orientazioni. Il momento magnetico totale risulta non nullo e dà origine a una magnetizzazione spontanea. La magnetite e altre ferriti appartengono a questa categoria.

### 3.2 La suscettività magnetica dei magnetofluidi

La suscettività magnetica  $\chi$  è il parametro mediante cui è possibile classificare i materiali nelle precedenti categorie; infatti, come è possibile notare in Tabella 3.1, ai vari comportamenti magnetici corrisponde un range di valori di suscettività  $\chi$  differente:

**Tabella 3.1**-Valori tipici di suscettività per tipo di materiale

Comportamento	$\chi$ tipici
Diamagnetico	$-10^{-6} \div -10^{-1}$
Paramagnetico	$10^{-6} \div 10^{-1}$
Ferromagnetico	$\sim 10^3$
Antiferromagnetico	$0 - 10^{-2}$

La suscettività magnetica è una costante di proporzionalità adimensionale che quantifica il grado di polarizzazione magnetica di un materiale in seguito all'applicazione di un campo magnetico. Può essere definita come:

$$M = \chi_m H \quad (3.4)$$

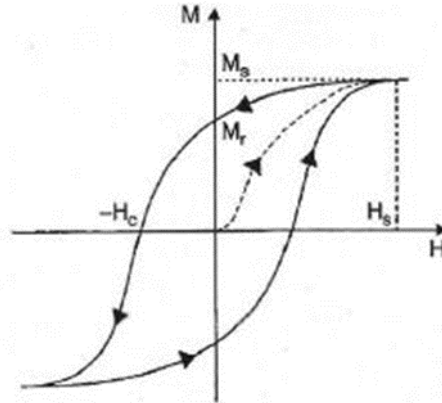
dove:

M rappresenta la magnetizzazione del campione di materiale;

H è il campo magnetico a cui il campione è sottoposto;

Dalla Tabella 3.1 è possibile notare che i materiali ferromagnetici presentano valori di suscettività molto elevati,  $\chi \gg 1$ , e quindi attraggono le linee di campo magnetico in maniera intensa. La caratteristica principale di questa categoria di materiali è che presentano una magnetizzazione residua  $M_r$ , ovvero una volta che il campo magnetico H è stato rimosso la magnetizzazione risultante è non nulla.

Tale concetto viene illustrato in Figura 3.1, dove si riporta il grafico tipico per la curva di isteresi a seguito di un ciclo di magnetizzazione, in cui si evidenzia il valore di magnetizzazione di saturazione  $M_s$  e il campo coercitivo  $H_c$ : tale parametro rappresenta l'intensità del campo di segno inverso che bisogna applicare per annullare la magnetizzazione di un materiale ferromagnetico.



**Figura 3.1**-Curva di isteresi per suscettività magnetica.[6]

Per i magnetofluidi la suscettività magnetica dipende dalla pulsazione del campo magnetico e pertanto assume una forma del tipo:

$$\chi(\omega) = \chi'(\omega) - j\chi''(\omega) \quad (3.5)$$

Dove  $\chi'$  e  $\chi''$  rappresentano la componente reale e la componente immaginaria della suscettività e possono essere esplicitate come:

$$\chi' = \frac{\chi_0}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (3.6)$$

E

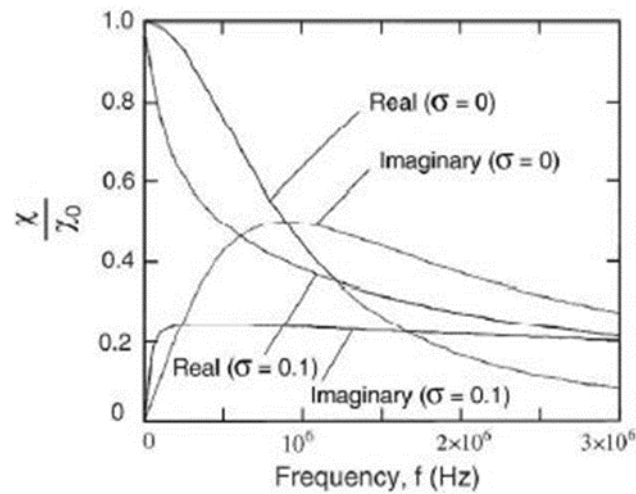
$$\chi'' = \frac{\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \chi_0 \quad (3.7)$$

In cui:

- $\chi_0$  è la suscettività di equilibrio (bassa frequenza);
- $\omega$  rappresenta la pulsazione del campo magnetico per cui vale la relazione  $\omega = 2\pi f$  in cui  $f$  è la frequenza del campo;
- $\tau$  è il tempo di rilassamento (trattato in sezioni successive);

Poiché è stato dimostrato attraverso vari studi sperimentali che la potenza generata dalle nanoparticelle risulta direttamente proporzionale al valore di suscettività, è importante capire come varia l'andamento della suscettività magnetica in funzione del campo magnetico applicato.

In Figura 3.2 è riportato l'andamento sia della componente reale che della componente immaginaria di  $\chi$  in funzione della frequenza del campo applicato.



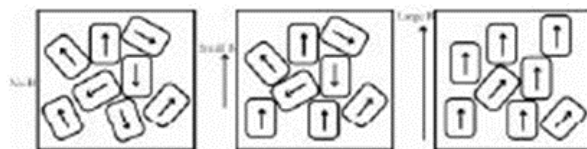
**Figura 3.2-**Relazione tra rapporto di suscettività e frequenza per particelle ferromagnetiche ferrodisperse [7].

### 3.3 I domini magnetici

Finora si è utilizzato un approccio semplificato nel descrivere gli effetti del campo magnetico sulla magnetizzazione e l'orientazione dei momenti magnetici di dipolo assumendo un comportamento omogeneo ed uniforme sul corpo in esame.

In realtà, i materiali ferromagnetici presentano una struttura a domini, ovvero delle regioni magnetiche che possono assumere anche diversa forma e dimensione in cui tutti gli spin presentano un'orientazione parallela e uguale. Tali regioni sono delimitate da confini di spessore finito, comunemente definiti come pareti di Bloch, che rappresentano delle vere e proprie zone di transizione all'interno delle quali avviene il graduale cambiamento di orientazione dei momenti magnetici in modo tale da minimizzare l'energia di scambio tra i dipoli.

I meccanismi con cui avviene la magnetizzazione del campione se sottoposto ad un campo magnetico sono due: si può verificare o la rotazione dei momenti magnetici dei domini o per la crescita di un dominio rispetto a quelli adiacenti. Per campi di elevata intensità si verifica la graduale rotazione dei dipoli e l'allineamento dei momenti magnetici creando così una magnetizzazione concorde al campo applicato. Tali meccanismi sono illustrati in Figura 3.3.



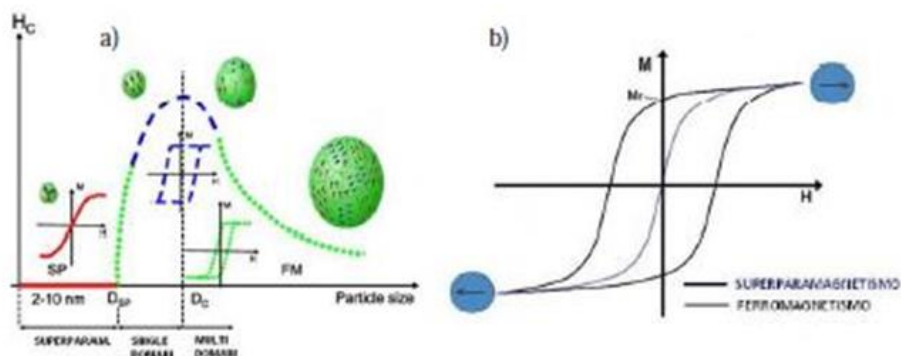
**Figura 3.3-** Rappresentazione schematica della magnetizzazione di una particella per rotazione dominio.

La formazione di una struttura multidominio avviene se tale condizione risulta favorevole energeticamente rispetto all'energia magnetostatica dello stato a singolo dominio. Poiché i contributi dei vari termini energetici dipendono fortemente dalle dimensioni delle

nanoparticelle, al di sotto di una determinata soglia definita diametro critico  $D_c$ , si può avere una magnetizzazione in stato di singolo dominio.

È possibile dunque che si verifichino tre situazioni differenti [8]:

1. Per particelle di grandi dimensioni tali da presentare una organizzazione multidominio la magnetizzazione avviene mediante il movimento delle pareti dei domini;
2. Al di sotto del diametro critico ( $D_c$ ) generalmente pari a 30 nm, prevale lo stato a singolo dominio. In questo caso non è più possibile modificare la magnetizzazione mediante il movimento delle pareti ma è necessaria la rotazione degli spin rispetto ad un asse cristallografico specifico, detto easy axis. È richiesta una quantità maggiore di energia magnetica, per cui un campo coercitivo maggiore.
3. Se le dimensioni delle nanoparticelle diminuiscono ulteriormente in modo tale da raggiungere il diametro di bloccaggio  $D_{sp}$ , le particelle si trovano nello stato superparamagnetico. In questo caso il momento delle particelle oscilla continuamente in maniera veloce a causa delle fluttuazioni termiche e sia il campo coercitivo che la magnetizzazione residua sono nulle.



**Figura 3.4**-Rappresentazione schematica della variazione del campo coercitivo in funzione delle dimensioni delle nanoparticelle. A)  $D_c$  dimensione critica della transizione tra MD e singolo dominio;  $D_{sp}$  dimensione critica della transizione tra FM e SP (sx). b) cicli di isteresi per particelle superparamagnetiche (SP) e ferromagnetiche (FM) [8].

### 3.4 Anisotropia magnetica e stato superparamagnetico

L'anisotropia magnetica riveste un ruolo di fondamentale importanza nel determinare le caratteristiche magnetiche dei materiali e quindi anche l'efficienza del trattamento di ipertermia. Quindi la descrizione del comportamento di particelle superparamagnetiche a dominio singolo presuppone considerazioni e premesse di carattere energetico.

Innanzitutto, è necessario considerare che l'anisotropia magnetica di uno specifico materiale assume una precisa direzione cristallografica, denominata easy axis, lungo la quale i momenti magnetici si allineano per minimizzare l'energia potenziale del sistema. A questo fenomeno è associata una energia di anisotropia magnetica della nanoparticella che viene comunemente considerata come la barriera energetica che si oppone e che bisogna vincere per variare la direzione di magnetizzazione. Tale energia viene descritta dalla seguente equazione:

$$E = KV(\sin \theta)^2 \quad (3.8)$$

In cui:

- $K$  rappresenta l'effettiva energia di anisotropia uniassiale per unità di volume;
- $\theta$  è l'angolo tra il momento magnetico e l'asse cristallografico (easy axis);
- $V$  è il volume della nanoparticella.

A seconda del tipo di materiale, è possibile individuare diverse tipologie di anisotropia che influenzano in maniera diversa e più o meno importante il comportamento della magnetizzazione. Le principali sono:

- Anisotropia magnetocristallina;
- Anisotropia di forma;
- Anisotropia di stress;
- Anisotropia indotta esternamente;
- Anisotropia di scambio;

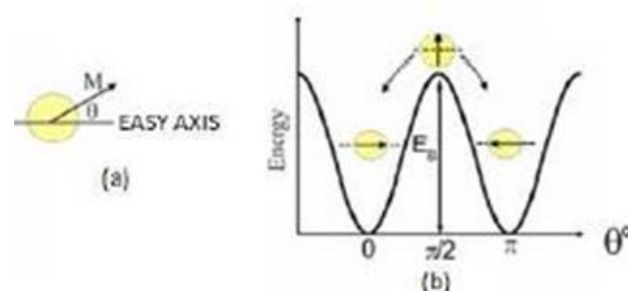
Nello specifico per le nanoparticelle i contributi più significativi sono dovuti all'anisotropia magnetocristallina e di forma.

L'anisotropia magnetocristallina è una caratteristica intrinseca del materiale ma non dipende dalla forma delle nanoparticelle. È dovuta all'accoppiamento spin-orbita e favorisce energeticamente l'allineamento della magnetizzazione lungo l'asse preferenziale easy axis.

L'anisotropia di forma è la tipologia che presenta l'effetto più elevato sull'aumento del campo coercitivo necessario ad annullare la magnetizzazione. È una peculiarità che si manifesta principalmente nei materiali ferromagnetici, in cui per lievi variazioni di aspect ratio si hanno elevati effetti sul campo coercitivo. Tale proprietà mostra una proporzionalità inversa tra dimensioni e forza coercitiva: risulta particolarmente evidente, dunque, al diminuire delle dimensioni delle nanoparticelle.

Dall'equazione (3.8) è chiaro che è possibile modificare l'energia di anisotropia o modificando l'angolo  $\theta$  o agendo sul volume delle nanoparticelle.

Per minimizzare l'energia del sistema il momento magnetico tende ad allinearsi all'asse facile per valori di  $\theta = 0^\circ$  o  $\theta = 180^\circ$ , mentre l'energia termica tende a disallinarlo mediante delle oscillazioni continue all'interno di un minimo o, se sufficientemente elevata, a farlo ruotare da un minimo all'altro.



**Figura 3.5-**Particella sferica a singolo dominio con momento magnetico non allineato con l'easy axis (a) ed energia potenziale d'anisotropia del momento magnetico vs  $\theta$  (b). I minimi corrispondono all'allineamento della magnetizzazione lungo l'asse principale di magnetizzazione rappresentato dalla linea tratteggiata.[9]

Per cui il comportamento magnetico macroscopico delle nanoparticelle dipende dall'effetto competitivo di questi due fenomeni. Ma intervenendo sul volume delle nanoparticelle è

possibile diminuire le dimensioni fino ad un valore soglia di bloccaggio  $D_{sp}$ , per il quale la barriera energetica assume valori paragonabili all'energia termica del reticolo  $E_t$ :

$$E_t = k_B T \quad (3.9)$$

In cui  $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23}$  è la costante di Boltzmann e T la temperatura.

Per cui, in questo caso, l'applicazione di un campo magnetico o un aumento di temperatura permettono di modificare facilmente la direzione della magnetizzazione rispetto all'asse facile.

Il momento magnetico rimarrà bloccato se l'energia termica risulta inferiore al salto energetico, altrimenti oscillerà con ampiezza differente in relazione alla temperatura rispetto alle posizioni di equilibrio. Inoltre, le fluttuazioni termiche continue inibiscono una magnetizzazione stabile per cui il campo coercitivo è nullo.

La temperatura per cui le nanoparticelle presentano comportamento superparamagnetico è nota come temperatura di bloccaggio ( $T_b$ ) e dipende dal loro volume e dal loro valore di anisotropia. Il valore massimo di  $T_b$  è pari alla temperatura di Curie, temperatura alla quale i momenti magnetici delle nanoparticelle si disaccoppiano.

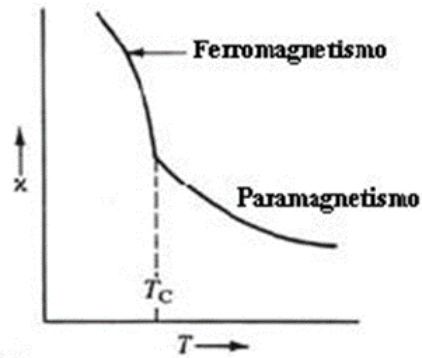
### 3.5 La temperatura di Curie

La temperatura di Curie è una peculiarità caratteristica di ciascun materiale e viene definita come la temperatura alla quale un materiale ferromagnetico cessa di avere proprietà magnetiche ferromagnetiche o ferrimagnetiche e diventa paramagnetico [10]. Tale andamento è descritto dalla seconda legge di Curie secondo cui:

$$\chi = \frac{C_c \rho}{T - T_c} \quad (3.10)$$

Dove:

- $C_c$  è la costante di Curie, caratteristica per ciascun materiale;
- $\rho$  è la densità del materiale;
- $T_c$  è la temperatura di Curie.



**Figura 3.6**-Andamento qualitativo della suscettività magnetica rispetto alla temperatura.

Se sottoposto al riscaldamento, un materiale ferromagnetico mantiene le sue proprietà magnetiche fino al raggiungimento della temperatura di Curie. Quindi può assorbire potenza magnetica da un campo esterno fin quando le dissipazioni di potenza al suo interno lo generano una temperatura pari a  $T_c$ , oltre questo limite diventa paramagnetico.

Analizzando tutte le precedenti considerazioni risulta evidente che le nanoparticelle superparamagnetiche risultano le candidate ideali per il trattamento ipertermico. Infatti, le dimensioni ridotte favoriscono l'assorbimento attraverso i vasi, non presentano ciclo di isteresi per cui sia il campo coercitivo che la magnetizzazione residua sono nulle e hanno un momento magnetico molto più elevato rispetto alle normali particelle paramagnetiche; è possibile dunque ottenere un aumento localizzato della temperatura molto più elevato a parità di condizione esterne rispetto ad altre sostanze.

Inoltre, riuscendo a progettare nanoparticelle che abbiano una temperatura di Curie compresa tra 43-45 °C si evitano locali surriscaldamenti raggiungendo un riscaldamento uniforme anche con un'esposizione al campo magnetico prolungata.



## 4. Sintesi nanoparticelle

Esistono svariati processi differenti per produrre MNPs, dalle tecniche di decomposizione termica ai processi in soluzione acquosa, o ancora dalla sintesi in fase gassosa fino alla tecnica per microemulsione, fino ai metodi con tecnologie al plasma, arco elettrico e simili.

In questo lavoro di tesi l'attenzione è stata focalizzata sullo sviluppo e sul miglioramento del processo di produzione per coprecipitazione, con lo scopo di valutare le proprietà e migliorare l'efficienza delle nanoparticelle ottenute secondo questo processo di sintesi.

Prima di trattare nel dettaglio questa procedura, vengono descritti brevemente gli altri processi di sintesi in modo tale da fornire una panoramica più completa dei metodi di produzione. A tale scopo si è fatto riferimento principalmente alla review (recent progress on magnetic

### 4.1 Decomposizione termica

Le tecniche di decomposizione termica ad alta temperatura hanno acquisito sempre maggior importanza grazie al miglior controllo in fase di sintesi sia sulle dimensioni che sulla distribuzione dimensionale delle nanoparticelle. Infatti, tramite i tradizionali processi di produzione, come la coprecipitazione, è difficile riuscire a controllare in maniera adeguata tali fondamentali proprietà, per cui la decomposizione termica è stata sviluppata come possibile alternativa per evitare tali limitazioni.

Tale metodo di produzione si basa sulle reazioni di decomposizione termica di precursori organometallici o composti coordinati di ferro trattati con opportuni solventi organici che risultano instabili in determinate condizioni di temperatura, luce e agitazione meccanica.

Generalmente i precursori organometallici più utilizzati appartengono alla famiglia dei metalli acetilacetoni  $[M(\text{acac})_n]$ , (dove  $M = \text{Fe, Co, Ni, Cr, Mn}$ ;  $n = 2$  o  $3$ ;  $\text{acac}$  = acetilacetone) oppure metalli carbonilici che vengono trattati mediante tensioattivi come acidi grassi, acido oleico o esadecilamina, in modo tale da ottenere una sospensione stabile di nanoparticelle monodisperse. Grazie all'elevata reattività dei precursori favorita dall'alta temperatura si verificano reazioni di dissociazione dei gruppi funzionali che permettono al centro metallico di nucleare e accrescersi in maniera controllata fino a formare nanoparticelle. Si ottengono quindi particelle con proprietà superiori e con un miglior controllo dimensionale poiché in questo modo la fase di nucleazione e di accrescimento sono separate e distinte, e inoltre si evitano complesse reazioni di idrolisi e deprotonazione, che avvengono invece nel processo di coprecipitazione. Il controllo delle caratteristiche morfologiche e dimensionali delle nanoparticelle avviene variando le tipologie e i rapporti tra le quantità di reagenti, tensioattivi e solvente oltre che alle condizioni operative come la temperatura e il tempo di reazione.

I principali vantaggi sono:

- Ottimo controllo della struttura;
- Dimensioni controllate tra 2-60 nm;
- Quantità di prodotto relativamente alta;
- Procedura semplice.

Gli svantaggi invece:

- Strumentazione relativamente complessa;
- Condizioni operative più critiche (elevate temperature 150-320°C);
- Tempistiche di produzione (durata da alcune ore a giorni);
- Particelle disperse in solventi non polari e tensioattivi con scarsa biocompatibilità;

#### 4.2 *Micro-emulsione*

La micro-emulsione sfrutta il meccanismo di micellizzazione che si verifica quando due liquidi non miscibili vengono dispersi isotropicamente in forma stabile mediante l'utilizzo di un tensioattivo.

Le micelle che si vengono a formare vengono utilizzate come "reattori" in cui i reagenti opportunamente dispersi tendono a collidere grazie all'azione delle micelle e a reagire formando le nanoparticelle di interesse. Grazie ai fenomeni di autoassemblaggio che si verificano nei sistemi acqua/tensioattivo o olio/tensioattivo e ai rapporti molarli tra i vari reagenti presenti, è possibile variare la dimensione delle micelle e quindi la micro-emulsione permette di ottenere strutture di vario tipo e una determinata distribuzione dimensionale più controllata.

Le caratteristiche generali di questo processo possono essere così schematizzate:

- Basse temperature
- Ottimo controllo strutturale, morfologico dimensionale;
- Nanoparticelle con dimensioni inferiori ai 10 nm;
- Processo relativamente rapido ma di complessa realizzazione;
- Bassa quantità di prodotto.

#### 4.3 *Sintesi idrotermale e sonochimica*

La sintesi idrotermale consiste nella produzione di cristalli di nanoparticelle in autoclave partendo da soluzioni acquose di precursori in condizione di elevata temperatura e pressione. Partendo da fonti di ioni Fe (II/III) dispersi in acqua, il controllo della temperatura e della pressione all'interno dell'autoclave permette un meccanismo di trasferimento di fase e separazione all'interfaccia tra i vari componenti, da cui si ottengono nanoparticelle con una migliore cristallizzazione e controllo sulla composizione chimica.

La sintesi sonochimica invece si basa sul fenomeno di cavitazione che si verifica in una fase liquida in seguito all'applicazione di ultrasuoni e che causa la formazione e il collasso di grosse bolle attraverso cui si favorisce la reazione di formazione delle nanoparticelle.

Entrambe le tipologie di sintesi presentano caratteristiche comuni:

- Processo di realizzazione relativamente semplice;
- Buon controllo della struttura e delle dimensioni;
- Quantità di prodotto non troppo elevata.

#### 4.4 *Pirolisi Laser*

Mediante questo processo si ottengono cristalli uniformi e puri di  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  in un unico step con l'utilizzo di un laser ad anidride carbonica. Il metodo prevede di utilizzare il laser come fonte di energia per riscaldare una miscela di precursori di ferro volatili, in modo tale da innescare la reazione di formazione di piccole nanoparticelle monodisperse che vengono spinte in un filtro da un flusso gassoso inerte. In questo modo si garantisce una precisione

irraggiungibile con altri metodi grazie all'opportuno ambiente di reazione privo di contaminazioni che si viene a creare per la nucleazione delle nanoparticelle.

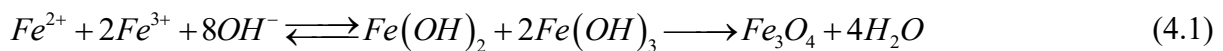
Riassumendo per la pirolisi laser si hanno:

- Temperature elevate (>300°C);
- Processo veloce ma di complessa realizzazione;
- Indicato per nanoparticelle di dimensioni ridottissime (3-5 nm);
- Accurato controllo sulla struttura;
- Elevata produzione.

#### 4.5 Coprecipitazione

Tale metodo fa parte dei processi umidi in soluzione acquosa, e consiste nella precipitazione di nanoparticelle a partire da una soluzione di sali di ferro (tipicamente cloruri) attraverso la graduale aggiunta di una base. Le particelle di magnetite vengono quindi purificate attraverso ripetuti lavaggi e infine funzionalizzate con una fase organica con lo scopo di stabilizzare la sospensione di nanoparticelle.

La reazione che avviene può essere descritta come segue:



Generalmente la fase di nucleazione è favorita per pH inferiori a 11, mentre l'accrescimento delle magnetiti avviene più facilmente per pH maggiori di 11. Questa via di sintesi risulta interessante soprattutto per la facilità di produzione sia in laboratorio che su scala industriale poiché non richiede apparecchiature e condizioni operative particolarmente complesse o critiche. Inoltre, la produzione per coprecipitazione risulta un metodo relativamente veloce e facilmente scalabile per grandi quantità (produzione industriale). Per contro i principali aspetti negativi sono uno scarso controllo della morfologia delle nanoparticelle (particelle pressoché sferiche), la difficoltà di ottenere particelle monodisperse e la tendenza a formare agglomerati.

Le caratteristiche di questo metodo di produzione possono essere così schematizzate:

- Facile realizzazione e velocità di produzione;
- Scarso controllo sulla struttura e dimensioni;
- Basse temperature (<90°C);
- Elevata produttività;
- Dimensione particelle 20-30 nm.

Però attraverso un attento controllo dei parametri e delle condizioni operative di reazione è possibile ottenere nanoparticelle con proprietà specifiche, in modo tale da ottenere una risposta ottimale al successivo trattamento ipertermico. Come già accennato, è questo l'obiettivo primario del presente lavoro di tesi. La seguente Tabella 4.1 riassume i tratti salienti dei principali metodi di sintesi.

**Tabella 4.1**-Caratteristiche dei principali metodi di sintesi delle nanoparticelle

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

#### 4.5.1 Parametri di sintesi che influenzano le proprietà delle nanoparticelle

Esistono vari parametri di sintesi che influenzano direttamente le proprietà delle nanoparticelle e che quindi hanno un effetto sulla risposta al trattamento di ipertermia. Grazie ad un opportuno controllo e selezione dei parametri ottimali è quindi possibile progettare le proprietà finali delle nanoparticelle magnetiche in modo tale da ottimizzare il loro effetto.

Quindi agendo sui vari parametri di sintesi quali pH, temperatura, concentrazione e tipologia dei reagenti, composizione chimica e tipologia di solvente è possibile mettere a punto delle nanoparticelle che presentano specifiche proprietà ottimali per determinate condizioni operative.

Infatti, la dimensione e la morfologia delle nanoparticelle dipendono da vari parametri:

- Tipo di sale utilizzato come reagente (come cloruri, solfati, nitrati, perclorati etc.);
- Il rapporto tra ioni Fe (II) e Fe (III);
- La temperatura di reazione;
- pH e forza ionica del mezzo di soluzione;
- altri parametri di reazione (agitazione meccanica, velocità di inserimento della base).

In particolare, le proprietà principali che influenzano l'ipertermia sono:

- Il campo coercitivo  $H_c$ , determina il comportamento magnetico delle particelle;
- la temperatura di bloccaggio  $T_b$ , alla quale si ha la transizione da un comportamento ferromagnetico a uno superparamagnetico;
- il rilassamento di Neel e di Brown,  $\tau_n$  e  $\tau_b$ , meccanismi fisici dominanti mediante cui avviene l'aumento di temperatura delle nanoparticelle a seguito dell'applicazione di un campo magnetico.

È possibile quindi selezionare opportunamente tali proprietà mediante il controllo durante il processo di sintesi della dimensione, morfologia e composizione delle nanoparticelle da produrre.

Infatti, per quanto riguarda la dimensione, alcuni studi [11] [12] hanno dimostrato che particelle con dimensioni inferiori ai 10 nm non sono in grado di sviluppare temperature utili per il trattamento ipertermico, mentre particelle nel range 15-30 nm presentano una risposta migliore. Inoltre, dalla dimensione dipende anche il meccanismo di rilassamento predominante mediante cui avviene il riscaldamento: il rilassamento di Neel generalmente è caratteristico per le particelle di minori dimensioni mentre quello di Brown diventa significativo a partire da i 20 nm, anche se è difficile stabilire sperimentalmente quale dei due contributi risulti effettivamente predominante considerando che i due meccanismi possono anche coesistere.

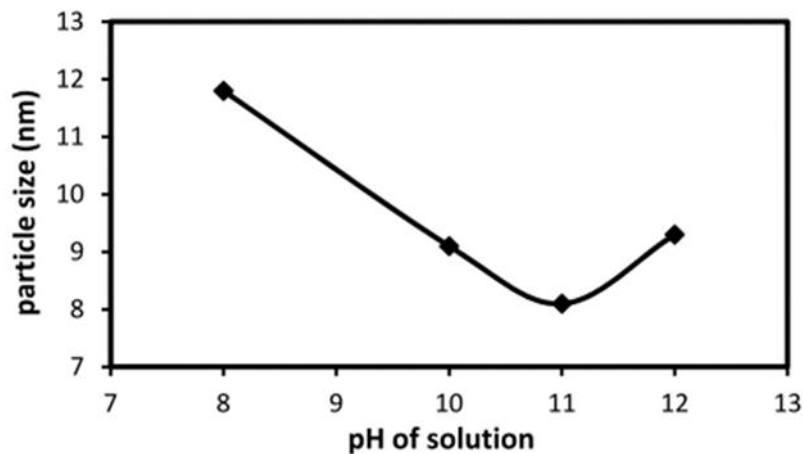
La morfologia influenza il valore di anisotropia magnetica, in particolare il contributo dovuto all'anisotropia di forma legato alla superficie specifica delle nanoparticelle e alla disposizione dei dipoli magnetici sulla superficie. L'anisotropia magnetica è un parametro di fondamentale importanza poiché la costante di rilassamento di Neel dipende esponenzialmente dall'anisotropia magnetica, quindi variazioni contenute del valore di anisotropia possono portare ad elevati effetti sul riscaldamento. Dagli studi consultati in letteratura [13][14][15] particelle che presentano aspect ratio maggiori come nanoparticelle cubiche, ellissoidali, nanorods e nanoflowers sono caratterizzati da valori di SAR più elevati.

Variando il rapporto molare  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ , la concentrazione o il tipo di solventi è possibile controllare la cinetica di accrescimento e ottenere delle nanoparticelle caratterizzate da una maggiore percentuale di magnetite, fase che presenta anisotropia maggiore rispetto alla maghemite. Inoltre, è possibile migliorare ulteriormente la risposta al campo magnetico attraverso il drogaggio con altre specie quali Co, Mn, Zn, Gd che mostrano anisotropia magnetica maggiore del Fe operando sostituzioni cationiche in posizioni ottaedriche e tetraedriche al fine di ottenere ossidi misti [9][16]. Infatti, anche la composizione chimica delle fasi costituenti le nanoparticelle riveste un ruolo fondamentale nel determinare la risposta completa al trattamento.

La temperatura di reazione riveste un ruolo di fondamentale importanza soprattutto nel determinare le cinetiche di nucleazione e accrescimento, controllando le quali è possibile modificare le dimensioni delle nanoparticelle. Generalmente le dimensioni dei cristalliti risultano inferiori per una temperatura di reazione compresa tra 25°C e 45°C e aumentano per temperature comprese tra i 45°C e 85 °C. Ciò favorisce un indice di polidispersità più elevato ad alte temperature.

Inoltre, aumentando la temperatura ma mantenendosi al di sotto dei 45°C si ostacola la formazione di aggregati di  $Fe_3O_4$  e si ottengono nanoparticelle di dimensioni inferiori. Sopra i 45 °C invece si favorisce la reazione di nucleazione delle nanoparticelle di  $Fe_3O_4$  che presenteranno così dimensioni maggiori.

Anche il valore di pH influenza notevolmente le proprietà delle nanoparticelle. Innanzitutto, bisogna considerare che si ha la necessità di operare con pH basico in modo tale da favorire la formazione della magnetite e la sua precipitazione. È possibile variare il valore di pH della soluzione durante la reazione in un range abbastanza esteso, ottenendo risultati differenti. Modificando la basicità della soluzione si ha una variazione del potenziale  $\zeta$  della soluzione da cui dipende quindi anche la stabilità delle particelle in sospensione. Inoltre, la variazione del pH determina un'evoluzione delle dimensioni delle nanoparticelle; infatti, come è possibile notare dal grafico in Figura 4.1, nel range di pH compreso tra 8 e 11 la dimensione delle nanoparticelle ottenute decresce all'aumentare del valore del pH, mentre al di sopra di 11 le nanoparticelle sono caratterizzate da un aumento delle dimensioni.



**Figura 4.1-** Evoluzione della dimensione delle nanoparticelle al variare del pH.

#### 4.6 Sintesi sperimentale delle nanoparticelle di magnetite per coprecipitazione

Come già accennato l'obiettivo di questo lavoro di tesi è incentrato sullo sviluppo e sull'ottimizzazione del processo di sintesi per coprecipitazione. Di seguito viene illustrata la procedura sperimentale adottata per la produzione delle MNPs.

Per la produzione delle nanoparticelle di magnetite si è preso spunto dalla procedura sperimentale descritta e utilizzata da Li et al., (2010) [17] per quanto riguarda la precipitazione delle magnetiti adattando successivamente la funzionalizzazione con acido citrico; tale prassi pratica è stata scelta quindi come sintesi base a cui fare riferimento e come punto di partenza per valutare l'influenza che diverse condizioni di reazione hanno sulle proprietà finali delle nanoparticelle. Infatti, conoscendo l'influenza dei vari parametri sulle specifiche proprietà delle MNPs, la sintesi base è stata modificata variando la temperatura, il pH, il rapporto  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  e i componenti della sospensione con l'obiettivo di comprendere il legame causa-effetto esistente tra le proprietà ottenute e ottimizzare l'efficacia delle nanoparticelle per l'ipertermia.

Di seguito vengono descritte le operazioni per la produzione delle nanoparticelle secondo la sintesi base.

Tutti i reagenti chimici utilizzati durante gli esperimenti hanno una purezza da laboratorio e non sono stati sottoposti ad un ulteriore processo di purificazione.

La sintesi prevede la preparazione di due soluzioni miscelando quantità adeguate di cloruri di ferro  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  e  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  in acqua deionizzata bidistillata in modo tale da ottenere due soluzioni con concentrazione 0.01 M. Successivamente si miscelano 37,5 ml di soluzione di cloruro di ferro(II) con 50 ml di soluzione di cloruro di ferro (III) per avere un rapporto stechiometrico molare  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  di circa 0.5, che rappresenta il rapporto minimo per avere la precipitazione di magnetite, utilizzando un miscelatore magnetico. Appena le due soluzioni risultano perfettamente miscelate si procede a tamponare la soluzione fino ad un pH di circa

10 aggiungendo  $NH_4OH$  goccia a goccia lentamente, in modo tale da avere la nucleazione e precipitazione delle magnetiti; in questa fase la soluzione assume una colorazione nera, a conferma dell'avvenuta formazione delle nanoparticelle magnetiche di interesse. Successivamente la soluzione viene posta in un bagno ad ultrasuoni per 20 minuti in modo tale da favorire l'accrescimento delle MNPs. Nel frattempo, si prepara una soluzione di acido citrico CA 0,05 M, con la quale successivamente si funzionalizzeranno le nanoparticelle in modo tale da avere una sospensione stabile. Dopo il bagno in ultrasuoni le nanoparticelle vengono separate magneticamente e sottoposte a due lavaggi con acqua bidistillata per rimuovere i cloruri, e successivamente disperse nuovamente in una soluzione 0.05 M di acido citrico. Si aggiusta il pH a 5.2 aggiungendo  $NH_4OH$  lentamente e si pone la sospensione in orbital shaker ad una temperatura di 80°C per 90 minuti in modo tale da favorire la deprotonazione dei due gruppi carbossilici COOH dell'acido citrico che si legano ai gruppi OH esposti dalla magnetite. Utilizzando un apposito sistema di ultrafiltrazione (Solvent Resistant Stirred Cells-Merck Millipore), si procede all'eliminazione dell'acido citrico superfluo e al successivo lavaggio delle magnetiti. In fine si recuperano le nanoparticelle, si sospendono nuovamente in acqua distillata e si tampona a pH 10.1 aggiungendo  $NH_4OH$ .

A partire da questo metodo di produzione base, sono state sintetizzati diversi campioni di nanoparticelle variando i parametri operativi con lo scopo di studiare sia l'influenza che ciascun parametro ha sulle proprietà globali, che progettare effettivamente MNPs che presentino una risposta specifica in seguito all'esposizione al campo magnetico.

Durante l'attività sperimentale, dunque, tenendo in considerazione le precedenti osservazioni sono state sintetizzate e caratterizzate le seguenti tipologie di nanoparticelle:

1. -M + AC, magnetiti in acido citrico secondo la sintesi per coprecipitazione sviluppata da Li et al.[28] (sintesi base)
2. -M + AC T=90°C, magnetiti sintetizzate in temperatura pari a 90°C
3. M + AC R= 0,6; magnetiti secondo sintesi base ma con  $Fe^{2+}/Fe^{3+} = 0,6$
4. M + AC pH = 8.2, magnetiti secondo sintesi base ma tamponate a pH = 8.2;
5. M + AC pH = 11.3 magnetiti secondo sintesi base ma tamponate a pH = 11.3;
6. M+AC T=80°C 24h, magnetiti secondo sintesi base ma mantenendo la temperatura a 80°C per 24h;
7. M + AC EtOH, magnetiti secondo sintesi base utilizzando però come solvente  $H_2O/EtOH = 1$

Tutte le sintesi sopra citate sono state condotte secondo la procedura descritta precedentemente, opportunamente variando i parametri indicati.

Nella seconda sintesi si è adottata una temperatura maggiore rispetto a quella ambiente, sia durante la fase di miscelazione dei cloruri preventivamente riscaldati, che durante il bagno ad ultrasuoni in modo tale da favorire la cinetica di reazione di accrescimento e ottenere nanoparticelle con diametro medio più elevato. Visti i buoni risultati ottenuti, si è pensato successivamente di valutare l'effetto di un mantenimento in temperatura per un tempo prolungato pari a 24 ore con la sintesi numero sette. Nel campione numero tre si è provato a variare la concentrazione dei cloruri, in modo tal da avere un rapporto molare  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  leggermente superiore rispetto a quello comunemente utilizzato poiché  $Fe^{2+}$  si ossida più

facilmente in  $Fe^{3+}$  in una soluzione acquosa permettendo così di controllare meglio le fasi presenti. Le sintesi numero 4-5 sono caratterizzate da diversi valori di pH a cui si tampona la miscela di cloruri in fase di precipitazione della magnetite; ciò si riflette sulla dimensione delle nanoparticelle che si ottengono, oltre che sulla tipologia di reazione che avviene e che può condurre alla formazione di altre fasi presenti. Ed infine, con l'ultima sintesi, seguendo quanto riportato da altri studiosi come Gonzalez-Fernandez et al., (2009) si è tentato di avere un controllo maggiore sulla morfologia delle nanoparticelle variando il mezzo di reazione aggiungendo etanolo allo scopo di ottenere NPs di forma cubica e quindi con anisotropia di forma maggiore [18].



## 5. Metodi di caratterizzazione delle nanoparticelle

Per avere informazioni specifiche riguardo alla morfologia, dimensione e composizione delle nanoparticelle magnetiche prodotte è necessario procedere attraverso la caratterizzazione dei materiali utilizzando strumentazioni e tecniche adatte allo scopo, in modo tale da avere un quadro completo delle caratteristiche ottenute e essere in grado di comprendere come i vari parametri influiscano sulle stesse.

Per studiare la forma e le dimensioni si è utilizzata la microscopia elettronica FESEM, i cui campioni sono stati preparati posizionando una goccia di sospensione su un opportuno retino in rame dotato di un film in carbonio; dopo aver fatto asciugare la goccia di sospensione, il retino viene posizionato su uno stub in alluminio. Le proprietà colloidali e la dimensione idrodinamica delle nanoparticelle sono state valutate mediante DLS (Dynamic Light Scattering), mentre la composizione delle nanoparticelle è stata stimata attraverso EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) analizzando il segnale proveniente dal FESEM; per avere, invece, informazioni riguardanti la struttura cristallina dei campioni prodotti è stata effettuata la diffrazione a raggi x. Le curve di magnetizzazione e le relative proprietà magnetiche sono state misurate attraverso un suscettometro AC/magnetometro DC. Per valutare la risposta ipertermica e quindi la capacità di riscaldamento dei campioni, sono state condotte prove di riscaldamento utilizzando il forno ad induzione; dalle curve di evoluzione della temperatura in seguito all' applicazione del campo magnetico è possibile calcolare il SAR e valutare dunque l'efficienza di riscaldamento.

Prima di riportare il lavoro sperimentale svolto e discutere i risultati ottenuti nei paragrafi seguenti, vengono descritti brevemente i meccanismi di funzionamento e i principi su cui si basano le strumentazioni utilizzate.

### 5.1 Microscopia elettronica

Tra tutte le possibili applicazioni la microscopia elettronica è ampiamente utilizzata per la caratterizzazione morfologica dei materiali, in particolar modo per quelli di dimensione nanometrica in quanto è una tecnica che permette di osservare i campioni con ingrandimenti e risoluzione molto più elevati rispetto alla microscopia ottica.

Il principio di funzionamento di un microscopio elettronico si basa su l'utilizzo di un fascio di elettroni focalizzato lungo un sistema di lenti, mediante cui si scansiona la superficie di un campione al fine di ottenere le immagini desiderate. I segnali ricevuti e analizzati dallo strumento possono essere dovuti ad interazioni di tipo elastico se gli elettroni mantengono la loro energia e vengono deviati solamente riguardo alla traiettoria (emissione di elettroni retrodiffusi), oppure ad urti anelastici se si ha trasferimento di energia al campione che a sua volta emette quindi raggi X e fotoni a diversa lunghezza d'onda.

Le tecniche di microscopia elettronica permette un'analisi superficiale dei materiali poiché gli elettroni sono caratterizzati da una bassa energia di penetrazione e per cui consentono di recepire informazioni che provengono dagli strati più superficiali, ovvero dai primi livelli atomici (da 2 a 50 nm).

#### 5.1.1 Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM)

La microscopia FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) permette di indagare la struttura topografica superficiale del campione con ingrandimenti che vanno da 10x fino a

300000x permettendo anche di raccogliere informazioni sugli elementi che compongono il materiale. A differenza della tecnologia SEM (Scanning Electron Microscopy), con il FESEM si riescono ad ottenere immagini di alta qualità grazie ad un segnale più pulito e preciso insieme a una risoluzione spaziale che risulta dalle tre alle sei volte maggiore. Inoltre, non è necessario trattare preventivamente i campioni per renderli conduttivi in caso di materiali isolanti. Per cui il FESEM si basa su una tecnologia che permette una diagnostica per immagini ad elevata risoluzione e con diversi mezzi di contrasto con lo scopo di ottenere una caratterizzazione completa dei materiali.

Il microscopio elettronico è sostanzialmente costituito dai seguenti elementi:

- Una sorgente di elettroni (in genere un filamento metallico che emette elettroni per effetto termoionico);
- Un sistema di lenti elettrostatiche;
- Una camera porta campioni;
- Un rivelatore di segnale.

Il funzionamento del microscopio FESEM si basa sull'emissione di elettroni da una sorgente generalmente costituita da un filamento di tungsteno o di esaboruro di lantanio riscaldato per induzione che vengono accelerati da un forte gradiente di tensione. Lo strumento lavora in condizioni di alto vuoto per evitare collisioni e distorsioni del fascio di elettroni a seguito degli urti con le particelle presenti nell'atmosfera. Attraverso questa colonna in condizioni di alto vuoto, il fascio elettronico emesso dalla sorgente viene concentrato e deviato attraverso un sistema di lenti in modo tale da avere un fascio focalizzato che bombarda specificatamente un'area ridotta dell'oggetto. A seguito dell'interazione tra il fascio incidente e il materiale, si ha l'emissione di elettroni secondari che possiedono un'energia e una traiettoria che dipende dalla struttura superficiale dell'oggetto. Un ricevitore è quindi in grado di raccogliere gli elettroni secondari emessi e di trasformarli in un segnale che successivamente viene amplificato e trasformato in immagini che possono essere visualizzate su un rivelatore.

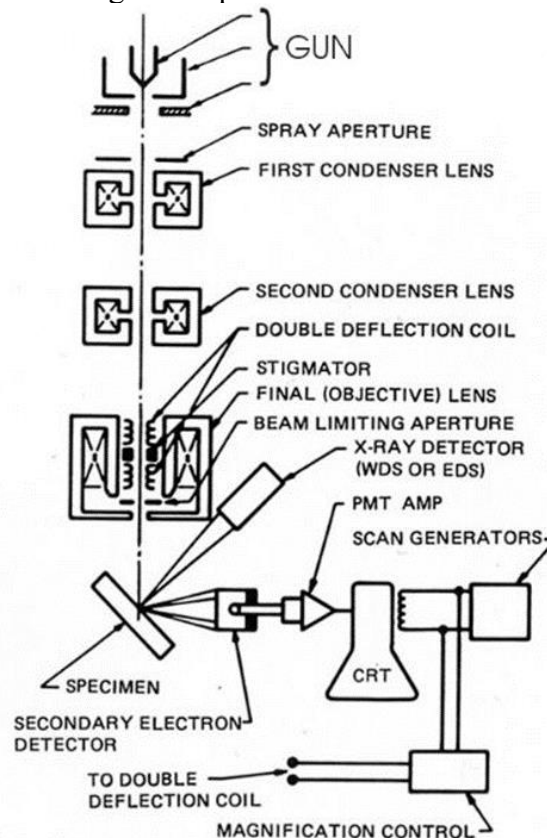


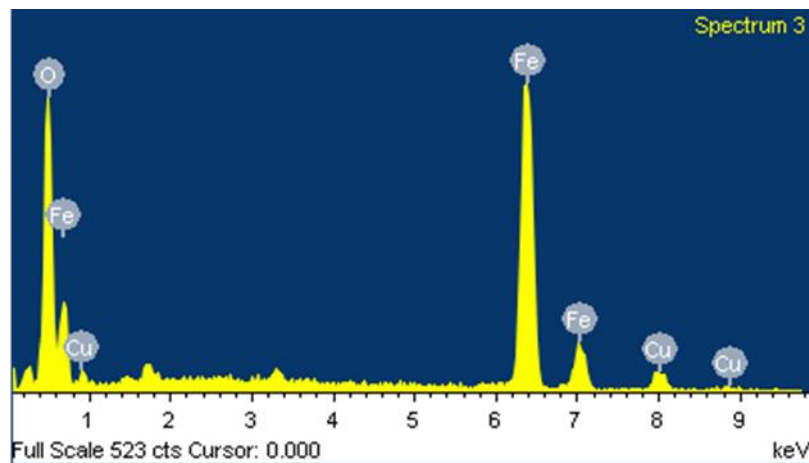
Figura 5.1- Rappresentazione schematica di un SEM.

### 5.1.2 Energy Dispersive Spectroscopy (EDS)

Generalmente la strumentazione FESEM è equipaggiata con spettrometri in grado di determinare qualitativamente e quantitativamente la composizione chimica del campione di analisi, valutando la presenza di elementi ben definiti.

Tale analisi avviene mediante lo spettrometro EDS che è in grado di ricevere e valutare i raggi X caratteristici emessi dal materiale in esame a seguito del bombardamento elettronico. Infatti, a seguito dell'interazione con il fascio di elettroni, all'interno del materiale si verifica un riarrangiamento della configurazione elettronica che può portare alla formazione di lacune negli orbitali con la conseguente promozione di un elettrone ad un livello energetico differente. Tale fenomeno è accompagnato dall'emissione di raggi X con un'energia pari al dislivello energetico del salto, che risulta caratteristica dell'elemento che la emette. Quindi misurando l'intensità di corrente prodotta dai fotoni dei raggi X si ricava la relativa energia mediante cui si identifica l'elemento originario.

Si valuta così la composizione elementare del campione anche per superfici abbastanza ridotte grazie allo spettro delle concentrazioni dei vari elementi che costituiscono il materiale.



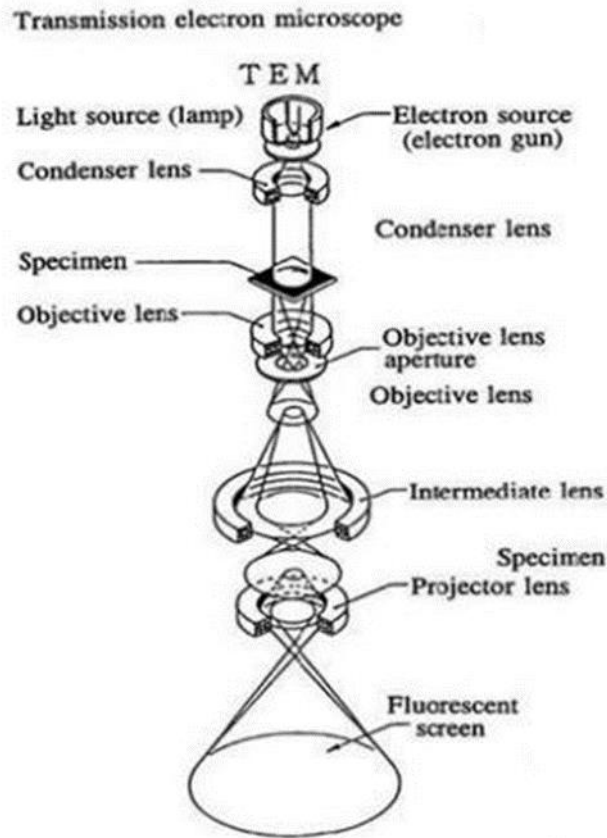
**Figura 5.2-**Tipico spettro output di un EDS.

### 5.1.3 Transmission electron microscopy (TEM)

Il microscopio elettronico a scansione è uno strumento di fondamentale importanza nell'ambito dello studio dei materiali in quanto a differenza del SEM, attraverso cui si ricavano informazioni sulla morfologia della superficie, permette di indagare sulla struttura interna del campione e ottenere informazioni sui più piccoli dettagli come la presenza di dislocazioni, bordi di grano e difetti.

Il TEM si basa sugli stessi principi di funzionamento del microscopio ottico ma presenta diverse caratteristiche operative affini al SEM, come il sistema di vuoto e il fascio di elettroni opportunamente focalizzato attraverso un sistema di lenti, che permettono di raggiungere per le immagini al TEM una risoluzione migliore rispetto a quelle del microscopio ottico di diversi ordini di grandezza.

In Figura 5.3 si riporta lo schema di un TEM.



**Figura 5.3-** Schema di un TEM.

Il fascio di elettroni viene generato da un cannone elettronico posto in sommità mediante il riscaldamento di un filamento di tungsteno o di esaboruro di lantanio e vengono accelerati attraverso l'anodo forato. Il fascio viene quindi focalizzato attraverso un sistema di lenti proiettato verso il campione che deve essere opportunamente dimensionato per quanto riguarda lo spessore per consentire il passaggio degli elettroni. A seguito dell'interazione degli elettroni con il campione una parte di essi viene diffratta deviando la direzione del fascio primario, mentre una parte viene trasmessa, passando indisturbata attraverso il provino a seconda del suo spessore e della trasparenza agli elettroni.

Il fascio trasmesso passa dunque attraverso un complesso sistema di lenti ottico-elettromagnetiche mediante cui viene allargato e diretto verso uno schermo fluorescente che elabora il segnale trasformato quindi in immagini. Grazie alla presenza di ulteriori obiettivi e lenti particolari è possibile migliorare gli effetti di contrasto schermando una parte del fascio e ottenere così informazioni dettagliate. Il principale punto di forza del TEM è quello di poter avere delle immagini dettagliatissime circa i componenti più piccoli che costituiscono il reticolo cristallino sfruttando l'elevatissima risoluzione spaziale (circa 0.2 nm) e la forte interazione degli elettroni con la materia. Gli svantaggi principali sono legati invece alla complessità della strumentazione che richiede perciò alti costi di investimento e di gestione, oltre alla difficoltà dovuta alla preparazione dei campioni e all'interpretazione delle immagini.

## 5.2 Dynamic light scattering (DLS)

La tecnologia DLS (Dynamic Light Scattering) rappresenta una tra le tecniche di caratterizzazione più diffuse per particelle che presentano dimensioni dell'ordine dei nanometri, poiché grazie all'analisi del pattern di diffrazione della luce che colpisce il campione, si ottengono informazioni riguardo alla distribuzione dimensionale e alla taglia delle particelle stesse.

Il principio alla base dell'analisi è semplice: mediante DLS si valuta il moto browniano sviluppato dalle nanoparticelle che si crea in seguito al bombardamento del solvente in cui sono disperse e che è correlato strettamente con le dimensioni delle nanoparticelle stesse. Il funzionamento dello strumento può essere così schematizzato: un fascio laser viene focalizzato attraverso un sistema di lenti e colpisce il campione opportunamente disperso in un solvente all'interno di una cuvetta adatta per lo strumento; dal punto di vista microscopico le particelle danno origine allo scattering del fascio luminoso verso tutte le direzioni, e i fasci diffratti sono raccolti ad un determinato angolo di scattering  $\theta$  da un detector di fotoni. Successivamente le informazioni ricevute vengono analizzate e trasformate in segnali di intensità di fluttuazione luminosa mediante una funzione di correlazione denominata  $g_2(t)$  mediante cui si determina il coefficiente di diffusione della sospensione di nanoparticelle. Le informazioni riguardo alla dimensione e distribuzione delle particelle deriva dall'analisi delle fluttuazioni di scattering della luce attraverso questa costante di diffusione  $D$  che risulta dipendente dal raggio delle nanoparticelle secondo quanto riportato nell'equazione di Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta R} \quad (5.1)$$

Dove  $k_b$  è la costante di Boltzmann,  $T$  la temperatura e  $\eta$  la viscosità.

Le dimensioni così ottenute attraverso il DLS sono riconducibili al raggio idrodinamico delle nanoparticelle, tiene conto quindi della sfera di idratazione e dell'interazione con il fluido circostante in cui sono disperse. Bisogna inoltre considerare che il coefficiente di diffusione dipende non soltanto dalle dimensioni delle nanoparticelle ma anche da altri fattori: la struttura superficiale, la concentrazione e la tipologia di ioni presenti sono tutti parametri che possono influenzare in maniera rilevante la velocità di diffusione delle nanoparticelle. In particolare, la quantità e la natura degli ioni può influenzare la lunghezza di Debye e ciò risulta nella formazione di un doppio strato adsorbito più esteso. Di conseguenza si avrà una costante di diffusione minore che porterà ad avere un raggio idrodinamico maggiore. Mentre qualsiasi modifica della morfologia superficiale delle particelle si ripercuote sulla dimensione apparente delle stesse; ad esempio di fondamentale importanza è la disposizione e l'ingombro sterico che derivano dalla presenza di eventuali gruppi funzionali o agenti stabilizzanti organici utilizzati per garantire la stabilità in sospensione. A seconda della disposizione che assumono si può determinare la velocità di diffusione dalla variazione delle dimensioni apparenti delle nanoparticelle.

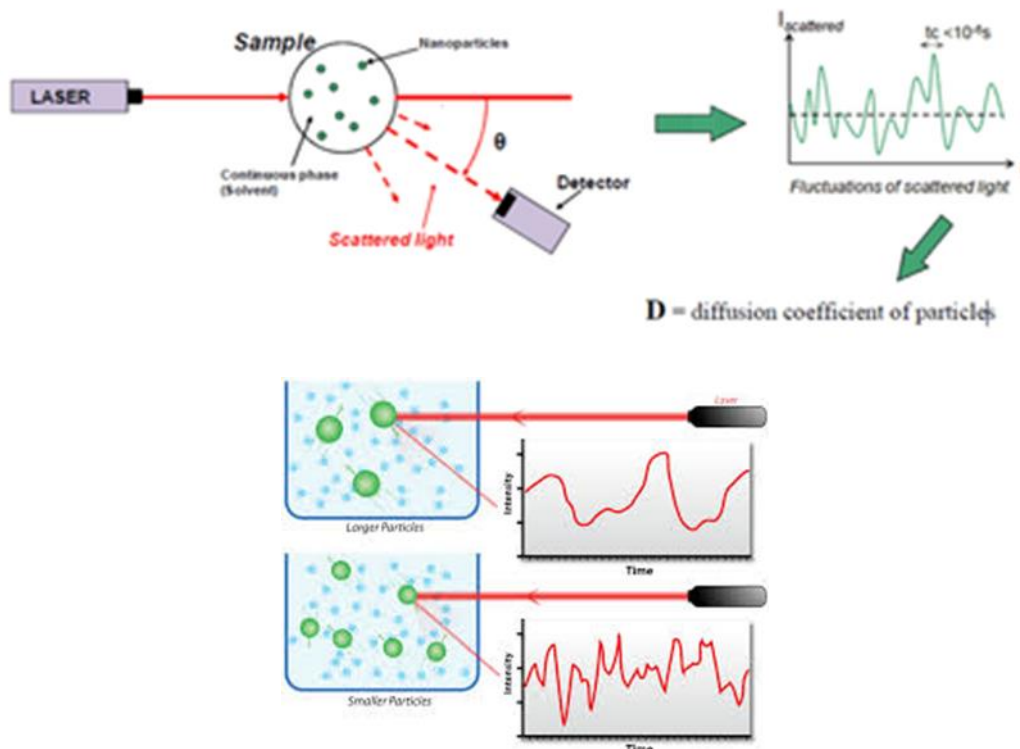


Figura 5.4-Rappresentazione schematica del funzionamento del DLS.

### 5.2.1 La polidispersione

Mediante il DLS è possibile ottenere anche l'indice di polidispersione di una sospensione colloidale di nanoparticelle. Tale parametro tiene conto dell'uniformità di distribuzione dimensionale di un insieme di corpi e riguarda il fatto che durante il processo di sintesi non è possibile ottenere nanoparticelle perfettamente identiche dal punto di vista dimensionale e morfologico.

Quindi una sospensione colloidale caratterizzata da nanoparticelle di dimensione variabile entro un certo range si dice polidispersa ed è caratterizzata da una distribuzione lognormale  $g(R)$ :

$$g(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma R} \exp\left[-\frac{\ln(R/R_0)^2}{2\sigma^2}\right] \quad (5.2)$$

Dove  $R$  rappresenta il raggio delle particelle,  $R_0$  è il raggio medio,  $\sigma$  è la deviazione standard della distribuzione lognormale.

### 5.3 X-Ray Diffraction Spectroscopy (XRD)

La spettroscopia XRD (X-Ray Diffraction spectroscopy) è una tecnica di caratterizzazione analitica che consente di individuare le fasi presenti in un materiale cristallino e ottenere informazioni riguardo alla struttura cristallina, forma e tipologia di cella unitaria.

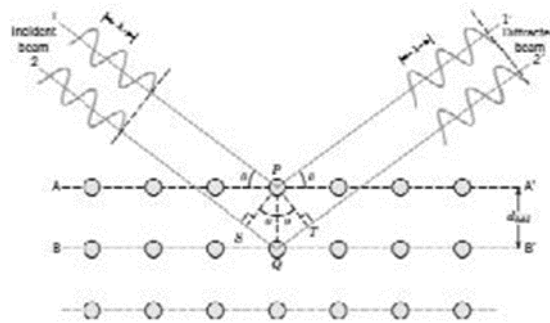
Il fenomeno su cui si basa tale tecnica di analisi dipende dall'interazione che si instaura tra il campione e i raggi x incidenti e fa riferimento alla legge di Bragg secondo cui si ha

interferenza costruttiva solo quando la differenza di cammino ottico tra raggio incidente e riflesso (SQ+QT) è un multiplo intero della lunghezza d'onda:

$$n\lambda = \overline{SQ} + \overline{QT} \quad (5.3)$$

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (5.4)$$

In cui n è un numero intero.



**Figura 5.5**-Diffrazione di raggi X di un cristallo.

Attraverso questa legge è possibile correlare la lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica con l'angolo  $\theta$  di diffrazione e il passo reticolare della struttura cristallina del campione analizzato.

Generalmente, i componenti che costituiscono un diffrattometro a raggi X possono essere raggruppati nei seguenti elementi:

- Una sorgente di raggi X
- Un supporto per campione
- Un contatore che riceve raggi X diffratti.

Il fascio di raggi X viene creato in un tubo catodico che funge da sorgente mediante il riscaldamento di un filamento metallico in modo tale da produrre gli elettroni che verranno successivamente filtrati in modo tale da ottenere una radiazione monocromatica e collimati per essere concentrati ed accelerati verso il campione. A seguito dell'interazione tra la radiazione incidente e il campione, se gli elettroni possiedono sufficiente energia da scalzare gli elettroni più interni si verifica la contemporanea emissione di uno spettro a raggi X che è caratteristico del materiale esaminato.

Durante l'analisi XRD il campione viene scansato mediante un detector con angolazione pari a  $2\theta$  in modo tale che gli angoli di incidenza e di diffrazione sia mantenuti sempre costanti tra di loro. In questo modo, i raggi X diffratti possono essere ricevuti, processati e elaborati lungo tutte le direzioni di diffrazione dipendenti dal reticolo cristallino del materiale permettendo così l'identificazione delle fasi presenti. Infatti, se la legge di Bragg è soddisfatta, a ciascun picco di diffrazione corrisponde una determinata distanza di cella che si riferisce ad una specie chimica univoca.

Come risultato a seguito dell'elaborazione del segnale si ottiene uno spettro di diffrazione caratterizzato da una serie di picchi di diversa intensità in corrispondenza di determinate

posizioni angolari che dipendono dalla tipologia di piani cristallografici che soddisfano la legge di Bragg.

In Figura 5.6 si riporta un esempio di spettro XRD.

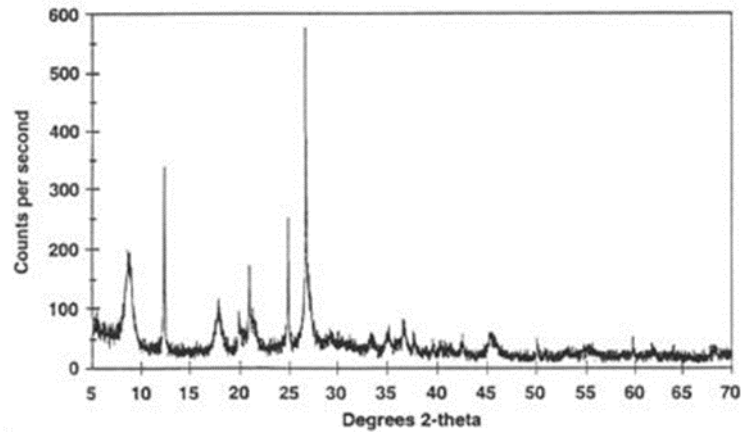


Figura 5.6- Tipico output che si ottiene da analisi XRD

#### 5.4 Caratterizzazione magnetica-Suscettometro AC/magnetometro DC

Per ottenere informazioni riguardo alla proprietà magnetiche di un materiale è possibile utilizzare una strumentazione che utilizza due approcci combinati attraverso un suscettometro AC e un magnetometro DC.

Tipicamente per determinare il valore del momento magnetico di un materiale si procede facendo delle misurazioni in corrente continua applicando un certo campo magnetico di ampiezza  $H_{DC}$ . In questo modo, si ottiene una misura del momento magnetico del campione che è una caratteristica intrinseca del materiale e rappresenta la capacità da parte del campione di generare un campo magnetico. Ciò che si ottiene è quindi una misura della magnetizzazione per unità di massa.

Generalmente un magnetometro in corrente continua funziona come spiegato di seguito. Il campione viene sottoposto ad un campo magnetico di ampiezza  $H_{DC}$  grazie all'azione di un magnete, mediante cui si genera la magnetizzazione del campione con un momento  $m$ . Il flusso magnetico generato dal campione viene ricevuto e analizzato mediante delle bobine di raccolta. Ma il flusso magnetico varia al variare della posizione del campione all'interno del campo magnetico, per cui si genera un segnale AC caratterizzato da una determinata frequenza che dipende dalla oscillazione del campione. Mediante quindi una "tecnica di estrazione" è possibile correlare proporzionalmente le variazioni del flusso al segnale AC rilevato e costruire dunque la curva di magnetizzazione per punti ripetendo la stessa procedura per diversi valori di campo crescenti.

In Figura 5.7 si riporta lo schema della strumentazione descritta.



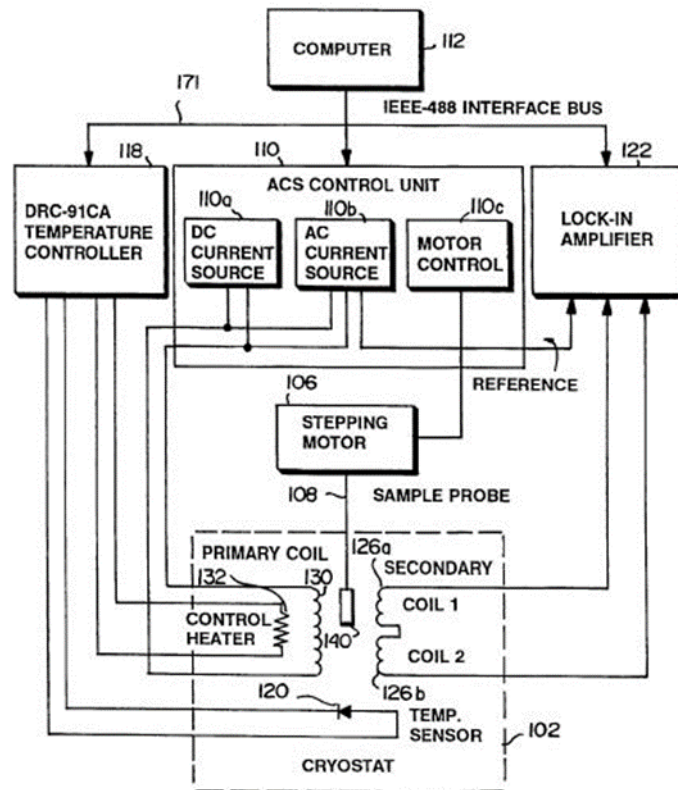


Figura 5.7- Schema della strumentazione utilizzata per ricavare le curve di magnetizzazione [19]



## 6. Misure calorimetriche di magnetofluidi (prove forno a induzione)

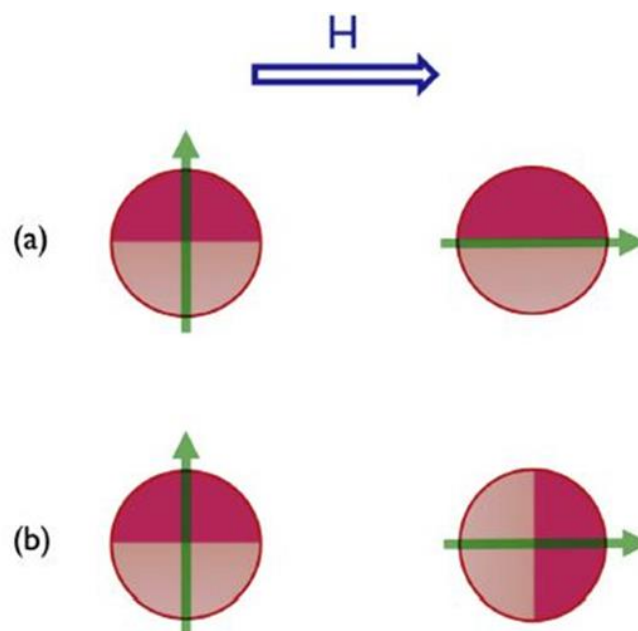
Il principale obiettivo di questa tipologia di prova di caratterizzazione è quella di valutare la SAR (Specific Absorption Rate) per ogni famiglia di nanoparticelle prodotte in modo tale da quantificare la capacità e l'efficienza di riscaldamento del magnetofluido se sottoposto ad un campo magnetico alternato.

### 6.1 Meccanismi di generazione del calore (rilassamento di Neel e di Brown)

Durante il trattamento ipertermico l'aumento localizzato di temperatura all'interno dei tessuti avviene in seguito ai meccanismi fisici che si sviluppano mediante l'applicazione di un campo magnetico alternato ad alta frequenza. Nelle nanoparticelle la generazione di calore dipende dalla dissipazione di energia che avviene durante la rotazione del momento magnetico rispetto all'asse principale di magnetizzazione superando l'energia magnetica di anisotropia.

Generalmente, la conversione dell'energia magnetica in calore avviene attraverso quattro meccanismi fisici differenti: correnti parassite, perdite per isteresi, rilassamento di Neel e Brown. Dato che le dimensioni delle MNPs in ambito biomedicale sono dell'ordine di alcune decine di nanometri e i primi due meccanismi hanno rilevanza per materiali di dimensioni sensibilmente maggiori (dalle centinaia di micron fino a materiali bulk), il contributo dominante deriva dai due meccanismi di rilassamento [20].

È possibile differenziare concettualmente le due tipologie di meccanismo in questo modo: se la particella rimane in posizione fissa durante la rotazione del momento magnetico si ha rilassamento di Neel e l'energia termica viene dissipata attraverso il riarrangiamento dei momenti del dipolo all'interno del cristallo. Se l'allineamento del momento magnetico avviene attraverso l'intera rotazione della particella, si verifica il rilassamento di Brown e l'energia dipende dagli sforzi di taglio che si generano con il fluido circostante. In Figura 6.1 viene illustrata chiaramente questa situazione.



**Figura 6.1-**a) secondo il meccanismo di Neel la particella rimane fissa mentre lo spin ruota allineandosi alla direzione del campo applicato. b) per il meccanismo di Brown lo spin rimane fisso e l'allineamento avviene mediante la rotazione di tutta la particella [21].

La costante di rilassamento di Neel venne descritta da Neel [22] e successivamente modificata da Brown [23] e può essere scritta nella seguente forma:

$$\tau_N = \frac{\tau_0}{2} \sqrt{\pi \frac{k_B T}{KV}} e^{KV/k_B T} \quad (6.1)$$

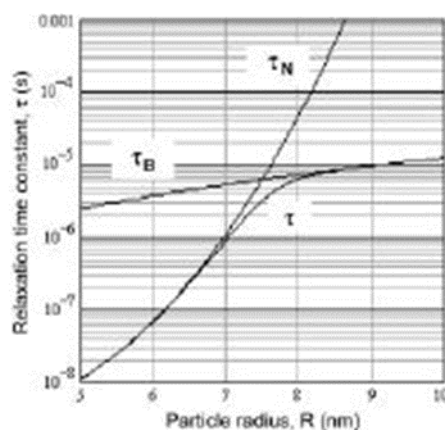
Dove K è la costante di anisotropia, che dipende sia da fattori cristallografici che di forma, e V rappresenta il volume della particella. Se si verifica un meccanismo browniano, il tempo di rilassamento dipende fortemente dalla viscosità del fluido  $\eta$  e dal volume idrodinamico della particella,  $V_h$  e assume la forma [23]:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_h}{k_b T} \quad (6.2)$$

Poiché il rilassamento di Neel e Brown si possono verificare contemporaneamente, il rilassamento totale è dato da:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (6.3)$$

Dall'equazione (6.3) è chiaro che il tempo di rilassamento totale dipende dalla costante di rilassamento minore. È possibile determinare una dimensione critica (che dipende fortemente dall'anisotropia magnetica della nanoparticella e dalla viscosità del fluido) per la quale entrambi i meccanismi contribuiscono al riscaldamento. Infatti, il processo di rilassamento di Brown presenta un andamento quasi lineare e si sviluppa in presenza di particelle più grandi, mentre quello di Neel è caratteristico delle particelle di minori dimensioni e assume un andamento esponenziale [20] [24]. In Figura 6.1 viene mostrato l'andamento del tempo di rilassamento totale in funzione del raggio delle nanoparticelle.



**Figura 6.2**-Costanti di tempo in funzione della dimensione delle particelle di magnetite [7].

## 6.2 Dissipazione di potenza nelle nanoparticelle

Quindi, i meccanismi di riscaldamento di un ferrofluido derivano dalla conversione in calore dell'energia magnetica assorbita mediante tali fenomeni di rilassamento. L'aumento di temperatura localizzato avviene mediante l'assorbimento della radiazione elettromagnetica e la sua conversione in calore attraverso i vari meccanismi di perdita.

Il raggiungimento della temperatura utile al trattamento di magnetofluido ipertermia non dipende soltanto dalle proprietà chimico-fisiche delle nanoparticelle ma anche dalle condizioni operative del trattamento, in particolare il riscaldamento è influenzato dalla frequenza  $f$  e dall'intensità  $H$  del campo magnetico alternato [20]. Per cui, risulta di fondamentale importanza considerare l'effetto sinergico di tutti i parametri al fine di perfezionare il comportamento delle nanoparticelle e l'efficacia del trattamento.

Il riscaldamento del magnetofluido se sottoposto ad un campo magnetico può essere valutato attraverso tre parametri equivalenti:

- Perdita di potenza specifica (SLP, specific loss power)
- Tasso di assorbimento specifico (SAR, specific absorption rate)
- Potenza specifica di riscaldamento (SHP, specific heating power)

In questo lavoro di tesi per valutare il riscaldamento si fa riferimento al tasso di assorbimento specifico SAR.

La SAR (specific absorption rate) rappresenta, dunque, il parametro mediante cui si valuta il riscaldamento di un ferrofluido sottoposto ad un campo magnetico; costituisce quindi una misura dell'efficienza con la quale avviene l'aumento di temperatura a seguito della conversione dell'energia assorbita dal campo magnetico in calore, in relazione al tempo di esposizione e alle proprietà del ferrofluido.

Secondo il modello LRT (Linear Response Theory) sviluppato da Rosensweig R.E., (2002) [7], la SAR rappresenta la potenza dissipata dalle nanoparticelle magnetiche per unità di massa (W/g) e può essere scritta come:

$$P = \frac{1}{2} \omega \mu_0 \chi_0 H^2 \frac{\omega \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \quad (6.4)$$

Dove  $\omega$  e  $H$  sono la frequenza angolare e l'ampiezza del campo magnetico applicato ( $\omega = 2\pi f$ ). Si ipotizza il materiale come un insieme di nanoparticelle con momento magnetico, ciascuno orientato in maniera casuale;  $\chi_0$  è la suscettività magnetica di questo insieme. Il termine frazionario nella precedente equazione determina che il massimo valore di SAR si ha per  $\omega \tau = 1$ , per cui tale equazione definisce il valore di frequenza critica. Per valori molto inferiori alla frequenza critica l'equazione precedente si riduce a:

$$P_{\omega\tau \ll 1} = \frac{1}{2} (\omega^2 \tau \mu_0 \chi_0 H^2) \quad (6.5)$$

per cui la potenza ha una dipendenza quadratica sia per la frequenza che per l'ampiezza del campo applicato. Per frequenze molto maggiori di quella critica l'equazione diventa:

$$P_{\omega r \gg 1} = \mu_0 \chi_0 H^2 / 2\tau \quad (6.6)$$

e SAR risulta indipendente dalla frequenza.

### 6.3 Misura calorimetrica del tasso di assorbimento specifico

La quantificazione della perdita di potenza specifica di un ferrofluido può essere ricavata attraverso misure calorimetriche grazie alla conoscenza dell'incremento di temperatura del campione se posto in un campo magnetico alternato.

Esistono vari setup sperimentali attraverso cui è possibile valutare la capacità di riscaldamento attraverso due metodi differenti:

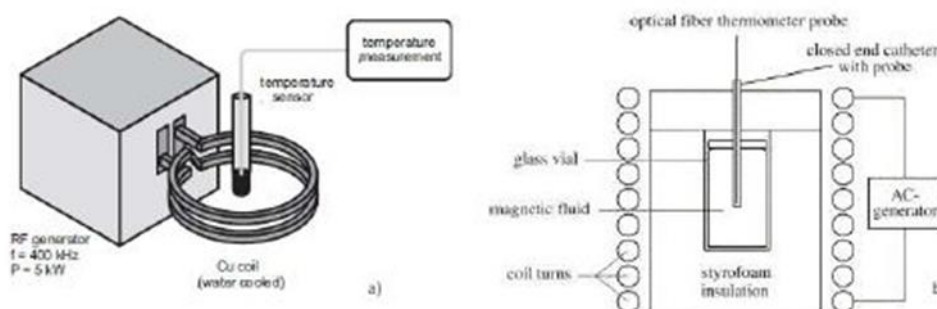
- magnetico: si misura la perdita dalla conoscenza delle proprietà magnetiche del materiale e dalle condizioni applicate;
- calorimetrico: attraverso la valutazione della variazione di temperatura in un ferro fluido;

Il secondo metodo è quello più utilizzato perché risulta più facilmente applicabile sperimentalmente e consiste nel valutare la perdita di potenza specifica del magnetofluido attraverso misure calorimetriche, grazie alla conoscenza dell'incremento di temperatura del campione se posto in un campo magnetico alternato.

La strumentazione utilizzata a tale scopo può essere schematizzata attraverso la presenza dei seguenti elementi [25] [26]:

- generatore di corrente alternata ad alta frequenza;
- induttore;
- sensore di temperatura (fibra ottica o termocoppia)
- provetta contenente magnetofluido da inserire al centro dell'induttore;
- isolante per evitare dispersione di calore (sistema ad acqua e/o aria, schiuma poliuretanicca posizionata tra provetta e induttore);

Nella Figura 6.3 sono riportati schemi che mostrano tipiche configurazioni di setup sperimentali.



**Figura 6.3**-Esempi di strumentazioni per la misura della SAR [25] [26].

Utilizzando il metodo calorimetrico secondo quanto riportato da Bekovic e Hamler, (2000) [27], la SAR viene calcolata come:

$$SAR = \frac{cm_{fluid}}{m_{particle}} \left( \frac{\Delta T}{\Delta t} \right)_{t=0} \quad (6.7)$$

Dove  $c$  [ $J \cdot Kg^{-1} \cdot K^{-1}$ ] è il calore specifico del fluido per unità di massa,  $m$  è la massa (di fluido e di nanoparticelle) e  $(\Delta T/\Delta t)_{t=0}$  è la variazione iniziale di temperatura. Considerando la capacità termica di un corpo  $C$  [J/Kg] è possibile riscrivere la (6.7) come segue:

$$SAR = \frac{C}{m_{particle}} \left( \frac{\Delta T}{\Delta t} \right)_{t=0} \quad (6.8)$$

La capacità termica di un ferrofluido può essere calcolata come la media pesata delle quantità effettive dei materiali che lo costituiscono:

$$C = c_{magn} m_{magn} + c_l m_l \quad (6.9)$$

Dove  $c_{magn}, m_{magn}, c_l, m_l$  indicano i calori specifici e le masse rispettivamente del materiale magnetico e del liquido.

La precedente definizione di SAR può essere utilizzata solo se l'intensità massima e la frequenza del campo magnetico rimangono costanti durante la misura.

Secondo quanto riportato negli studi di Bekovic e Hamler, (2000) [27], Il processo di variazione della temperatura nel tempo di un ferrofluido è descritto dalla legge:

$$T(t) = T_{initial} + \Delta T_{max} \left( 1 - e^{-t/\tau} \right) \quad (6.10)$$

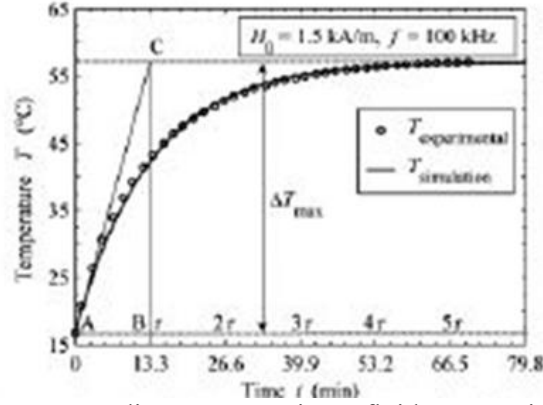
In cui  $\Delta T_{max}$  è la differenza di temperatura tra stato iniziale e stato stazionario e  $\tau$  è la costante di tempo di riscaldamento.

La pendenza iniziale utilizzata per la determinazione del SAR viene calcolata:

$$\left( \frac{\Delta T}{\Delta t} \right)_{t=0} = \frac{BC}{AC} = \frac{\Delta T_{max}}{\tau} \quad (6.11)$$

In cui AC viene determinato tracciando la tangente alla curva di temperatura in A che raggiunge l'ordinata in C. L'ascissa del punto C (AB) corrisponde alla costante di tempo  $\tau$ , l'ordinata invece (BC) all'incremento massimo di temperatura. La costante di tempo  $\tau$  rappresenta il tempo in cui la temperatura raggiunge il 63% del suo valore finale. Dopo circa  $5\tau$  si assume che il sistema abbia raggiunto lo stazionario.

In Figura 6.4 viene esemplificato il metodo grafico per calcolare il SAR come descritto precedentemente.



**Figura 6.4**-Incremento di temperatura in un fluido magnetico per misure con  $H_0 = 1.5 \text{ kA/m}$  e  $f = 100 \text{ kHz}$  [27]

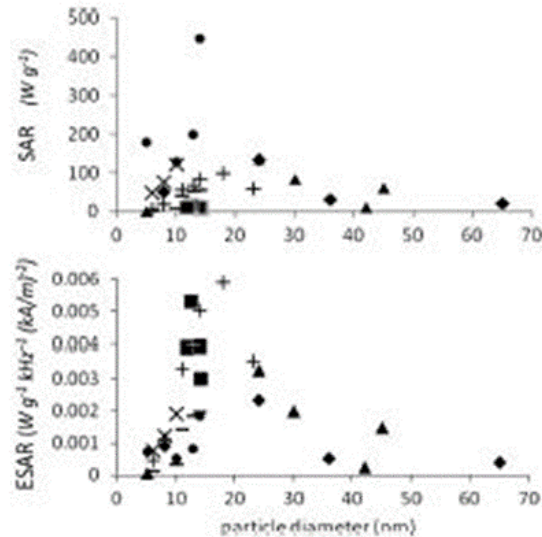
I diversi studi sperimentali spesso vengono condotti in condizione specifiche che implicano l'utilizzo delle più svariate caratteristiche e geometrie di campo magnetico e frequenze, che rendono complesso un confronto immediato tra i vari risultati ottenuti. A tal proposito, studiosi come Suto et al., (2009) e Kallumadil et al., (2009) hanno proposto di valutare la perdita di potenza attraverso il nuovo parametro ESAR (Effective Specific Absorption Rate) [28] e ILP (Intrinsic Loss Power) [29] rispettivamente, che viene ricavato normalizzando il SAR rispetto al quadrato dell'ampiezza del campo H, e alla frequenza f, come segue:

$$ESAR = \frac{\sum_i c_i m_i \Delta T}{m_{magn} \Delta t} \frac{1}{H_{appl}^2 f} \quad (6.12)$$

$$ILP = \frac{SAR}{H^2 f} \quad (6.13)$$

Dove c rappresenta il calore specifico, m la massa di ciascuna particella,  $m_{magn}$  la massa delle particelle di magnetite. Il grafico in Figura 6.5 mostra l'utilità del ESAR: nella parte superiore sono riportati i valori di SAR, mentre nella parte inferiore gli stessi dati vengono riportati in ESAR. In questo modo risulta più agevole la comprensione dei trend che derivano dai vari processi di ottimizzazione del parametro.





**Figura 6.5**-La parte superiore del diagramma riporta i valori sperimentali di SAR in funzione del diametro delle particelle. La parte inferiore mostra i valori in ESAR ottenuti normalizzando la SAR rispetto all'intensità del campo applicato e la frequenza.[20]

### 6.5 I parametri che influenzano la misura calorimetrica

L'efficienza del riscaldamento è influenzata direttamente sia da differenti parametri relativi alle condizioni operative in cui viene svolta la misura calorimetrica sia dalle proprietà chimico-fisiche delle nanoparticelle, che possono essere opportunamente controllate e modificate durante il processo di sintesi.

Tra i parametri più significativi vi sono:

- Intensità e frequenza del campo magnetico;
- Dimensioni e distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle;
- Grado di agglomerazione delle nanoparticelle;
- Rivestimento superficiale delle nanoparticelle;
- Concentrazione delle nanoparticelle;
- Viscosità del ferrofluido;

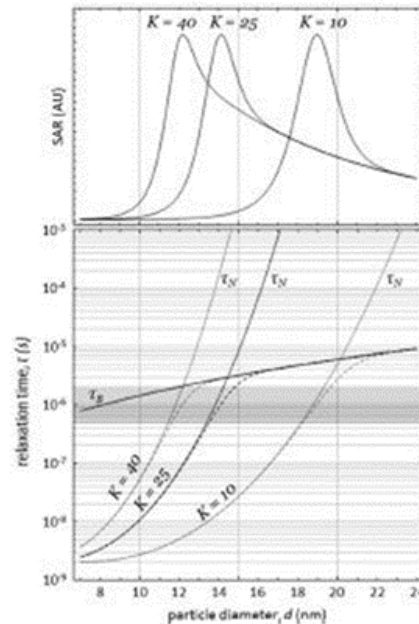
Generalmente, per nanoparticelle con comportamento superparamagnetico la SAR presenta una proporzionalità quadratica con l'intensità del campo applicato e proporzionalità diretta alla frequenza, per cui al crescere della forza del campo magnetico si osserva un aumento dei valori di SAR. In realtà, nei trattamenti per ipertermia, l'intensità del campo applicabile risulta limitata da considerazioni fisiologiche riguardo a possibili effetti collaterali dovuti allo sviluppo di correnti indotte nei tessuti circostanti.[20]

Secondo quanto riportato da Hergt e Dutz., (2007) [30], per applicazioni biomedicali quindi è stato fissato un valore di sicurezza limite pari a  $5 \cdot 10^9 \text{ Am}^{-1} \text{ s}^{-1}$  per il prodotto tra la frequenza ( $f$ ) e l'ampiezza del campo magnetico ( $H$ ) che è possibile applicare ai pazienti senza produrre un eccessivo riscaldamento.

Per valutare l'efficienza del riscaldamento l'influenza della frequenza risulta maggiormente complicata dall'accoppiamento con le dimensioni ottimali delle nanoparticelle. In particolare, il diametro ottimale dipende fortemente dal valore di anisotropia magnetica del sistema di

nanoparticelle. Infatti, le dimensioni ottimali variano al variare del valore di anisotropia all'interno di un range che comunque può essere individuato tra i 12 e 20 nm.

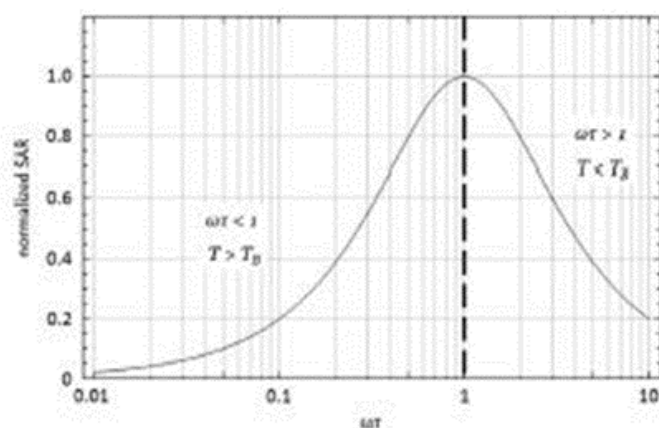
All'interno di questo range di dimensioni il rilassamento di Brown è predominante per le particelle di più grandi dimensioni mentre quello di Neel per le particelle più piccole. Il punto specifico in cui avviene la divisione tra questi due meccanismi dipende dal valore dell'anisotropia magnetica delle nanoparticelle come evidenziato in Figura 6.6.[20]



**Figura 6.6**-Effetti dell'anisotropia magnetica e dimensioni delle nanoparticelle sul tempo di rilassamento e SAR [20].

Le frequenze tipicamente utilizzate per i campi applicati durante il trattamento di ipertermia (100-300 kHz) determinano dei tempi di rilassamento dell'ordine di  $10^{-6}$  s che sono tipici del rilassamento di Neel, per cui dato che per avere tale tipo di meccanismo è necessario che l'energia di anisotropia sia maggiore dell'energia termica ( $KV > kT$ ) il rilassamento di Neel risulta predominante per particelle di dimensioni inferiori ai 15 nm, anche se particelle al di sotto di 7 nm non riescono a generare un riscaldamento sufficiente. Per cui il tempo di rilassamento di Neel dipende esponenzialmente dal volume delle nanoparticelle, oltre che dal valore di K, e il SAR è influenzato notevolmente dalle dimensioni.

Ma come riportato da Deatsch e Evans, (2014) [20], se un aumento dell'anisotropia magnetica porta ad un aumento della costante di rilassamento di Neel, ciò non necessariamente si traduce in un SAR più elevato. Questo perché bisogna porre maggiormente l'attenzione all'accoppiamento della costante di rilassamento con la frequenza del campo, in modo tale da soddisfare la relazione  $\omega\tau = 1$ , ovvero SAR massimo in corrispondenza della frequenza critica. Qualsiasi variazione da questa condizione porta ad un decremento di SAR [7].



**Figura 6.7**-Valore normalizzato di SAR in funzione del prodotto tra la frequenza e il tempo di rilassamento,  $\omega\tau$  per il riscaldamento di nanoparticelle magnetiche secondo il modello di Rosensweig. Il SAR massimo si ha per  $\omega\tau=1$ . [7]

### 6.6 Effetti concentrazione e grado di agglomerazione delle nanoparticelle

Il modello di Rosensweig, (2002) [7], risulta efficace per valutare l'influenza di alcuni parametri sul tasso di assorbimento specifico quali la dimensione e l'anisotropia delle nanoparticelle, l'intensità e la frequenza del campo magnetico applicato. Non considera però il comportamento collettivo del sistema di nanoparticelle, in quanto prende in considerazione nanoparticelle singole e non interagenti. Ma in realtà il comportamento complessivo del sistema è di fondamentale importanza per determinare l'efficienza nel riscaldamento, poiché le relativamente elevate concentrazioni utilizzate nei trattamenti di ipertermia possono determinare dei sistemi fortemente interagenti tra loro.

Aumentando la concentrazione si riduce la distanza tra le nanoparticelle e ciò può portare alla formazione di aggregati o di cluster a causa delle interazioni dipolari che si sviluppano tra di esse. Tali interazioni influenzano direttamente il tempo di rilassamento di Neel e possono avere un effetto importante sui valori di SAR. Sono stati condotti diversi studi sperimentali con l'intento di spiegare gli effetti dell'aumento di concentrazione delle nanoparticelle. Come mostrato nella Tabella 6.1 riportata nell'articolo di Deatsch e Evans, (2014) [20], per le nanoparticelle in cui il rilassamento di Neel risulta dominante generalmente si verifica un decremento di SAR all'aumentare della concentrazione, mentre per le particelle in cui il meccanismo browniano risulta fondamentale i valori di SAR aumentano all'aumentare della concentrazione.

**Tabella 6.1**-Influenza della concentrazione sul SAR in vari studi sperimentali [20].

Regime	Author	Year	Partide treatment	Partide diam. (nm)	Field freq. (kHz)	Concentration (mg/ml)	$\omega\tau$	As concentration increases, SAR
Néel-dominated	Urtizbera [59]	2010	Dispersed	$116 \pm 1$	109	2-8	0.003-0.46	Decreases
	Pineiro-Redondo [28]	2011	Coated	$10 \pm 2$	308	0.6-20	0.004-0.03	Decreases
	Wang [41]	2005	Dispersed	10	63	Agglomeration	0.001-0.02	Decreases
	Bakoglidis [39]	2012	Dispersed	$9.8 \pm 0.3$	765	0.15-1.2	0.013-0.26	Does not change
	Linh [60]	2009	Coated	15-17	184	3-15	$0.07-4.2^a$	Decreases
Brownian-dominated	Bakoglidis [39]	2012	Dispersed	$17.9 \pm 0.8$	765	0.15-1.2	2-22 <sup>b</sup>	Decreases
	Eggeman [37]	2007	Aggregated	$9.5 \pm 4^c$	140	5-30	212	Increases
	Dennis [51]	2008	Coated	$44 \pm 13$	150	Agglomeration	239	Increases
	Verges [61]	2008	Dispersed	$30 \pm 8$ cubic	249	3-10	24.6	Increases
	Pineiro-Redondo [28]	2011	Aggregated	$10 \pm 2$	308	0.6-20	-	Increases
	de la Presa [43]	2012	Aggregated	$8-13^d$	523	6-300	88-314	Does not change

<sup>a</sup> Relaxation times for linh become Brownian-dominated for  $K > 20 \text{ kJ/m}^3$  and  $\omega\tau$  becomes  $\geq 16$  for  $K \geq 16 \text{ kJ/m}^3$ .

<sup>b</sup> Relaxation times for Bakoglidis 18-nm particles is Néel-dominated for  $K < 14 \text{ kJ/m}^3$ .

<sup>c</sup> Aggregates were measured to be 84 nm. Relaxation time reported here is based on aggregate diameter.

<sup>d</sup> Relaxation times calculated here are based on aggregate diameters estimated by reported hydrodynamic diameters.

Come riportato dagli studi di Wang et al., (2005) valutando l'indice di agglomerazione, uguale al rapporto tra il diametro dell'agglomerato di particelle e il diametro medio delle stesse, si nota che il valore di SAR diminuisce sensibilmente all'aumentare della concentrazione a causa della diminuzione dei processi di rilassamento. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 6.2 [31].

**Tabella 6.2-**Influenza dell'agglomerazione sui valori di SAR [31].

<b>Agglomeration factor</b>	3	4.3	6.8	52	80	Particelle agglomerate
<b>SAR values (W/g)</b>	198	123	113	97	91	17

Inoltre, il rivestimento mediante agenti tensioattivi può portare ad un aumento del SAR grazie alle interazioni di superficie che modificano l'anisotropia di forma delle particelle. L'effetto globale dipende dallo strato più interno di rivestimento. In Tabella 6.3 si riporta l'effetto sul SAR di vari tensioattivi e mezzi di sospensione analizzati da Wang et al., (2005), [31].

**Tabella 6.3-**Influenza tensioattivo e rivestimento delle NPs sui valori di SAR [31].

<b>Surfactants</b>	None	Aminosilane	Oleic Acid	Oleic Acid +SDBS
<b>Carrier Liquids</b>	Water	Water	Oleic Acid	Water
<b>SAR Values (W/g)</b>	21	77	126	120

Infine, come si evince dalla Tabella 6.4, la viscosità del liquido di sospensione ha effetti trascurabili sulla capacità di riscaldamento di NPs di piccole dimensioni.

**Tabella 6.4-**Valori di SAR per NPs disperse in fluidi a diversa viscosità [31].

<b>Carrier liquids</b>	Octane	Toluene	Benzene	Styrene	Oleic Acid
<b>Viscosity of carrier liquids (mPa*s)</b>	0.545	0.586	0.601	0.696	32.8
<b>SAR Values (W/g)</b>	123	127	135	124	126

## 7. Risultati sperimentali

In questa sezione verranno descritte nel dettaglio tutte le attività sperimentali riguardo alla procedura di preparazione dei campioni e la loro caratterizzazione. Si procederà dunque con l'analisi e il commento di tutti i risultati ottenuti dalle suddette prove, confrontandoli con i risultati riportati in letteratura.

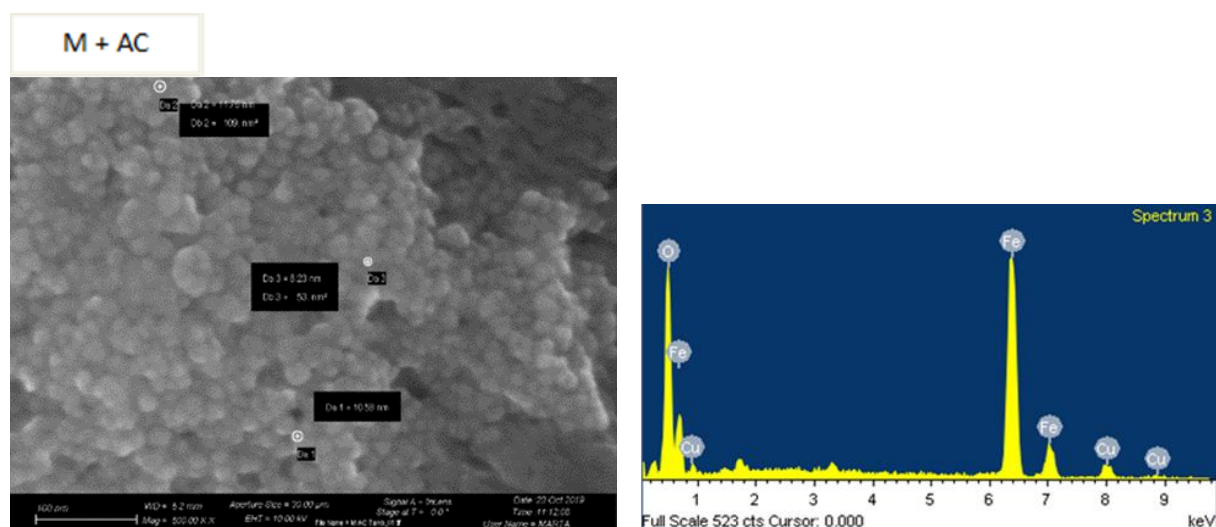
### 7.1 Analisi FESEM delle nanoparticelle magnetiche

Prima di procedere con l'analisi al microscopio elettronico è necessario preparare i campioni in modo appropriato. Si utilizzano specifici retini in rame all'interno dei quali è presente un film di carbonio sul quale si deposita una goccia di sospensione di nanoparticelle. In seguito, si pone il retino ad essiccare a temperatura controllata in modo tale da far evaporare il solvente e intrappolare così le nanoparticelle tra le maglie del film di carbonio.

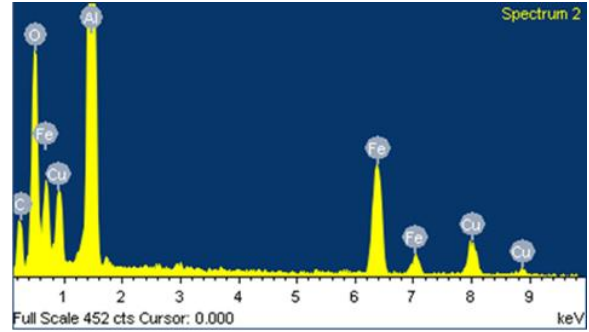
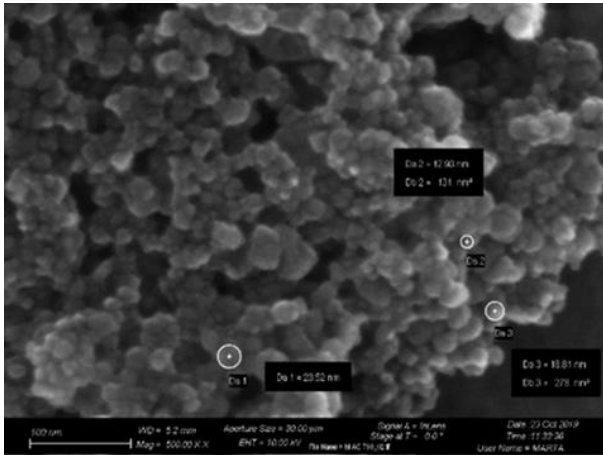
Dopo tali operazioni, si colloca il campione su un opportuno stub di supporto specifico e si inserisce il campione da analizzare nello strumento. Si attende che il sistema si riporti alle necessarie condizioni operative di vuoto, dopodiché è possibile iniziare l'analisi e ottenere le immagini.

Attraverso il FESEM è possibile ottenere informazioni riguardo alla morfologia delle nanoparticelle grazie anche la possibilità di impostare ingrandimenti successivi; si può ottenere una stima approssimativa delle dimensioni delle nanoparticelle anche se per avere dati decisamente più precisi e affidabili, è necessario ricorrere alla microscopia TEM, che permette anche di valutare la distribuzione dimensionale del campione in esame.

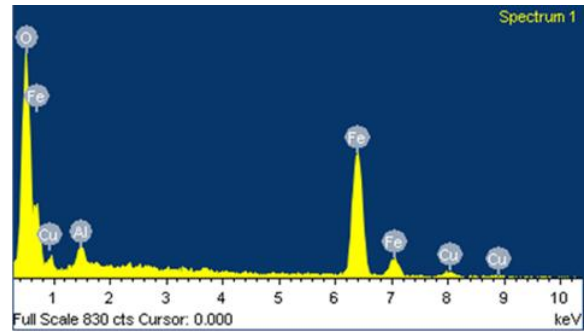
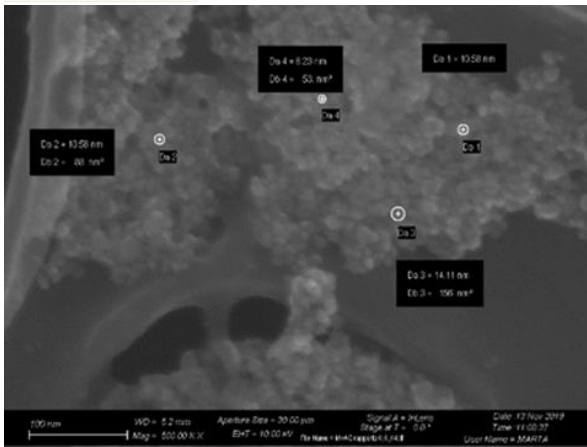
Nella Figura 7.1 vengono riportate tutte le immagini ottenute al SEM per i vari campioni di nanoparticelle sintetizzate; si riporta anche lo spettro ottenuto attraverso EDS integrato al FESEM che permette una prima indagine qualitativa sulla composizione chimica dei vari campioni



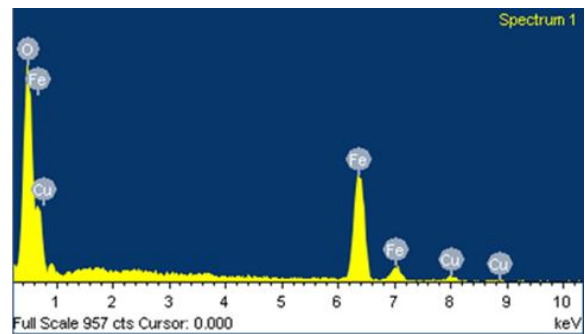
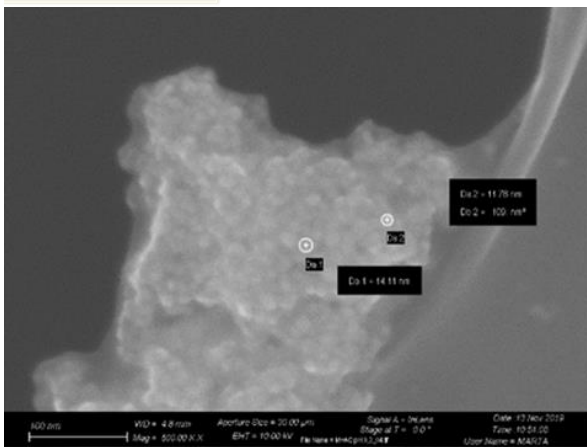
M+AC T=90°C



M+AC R=0,6

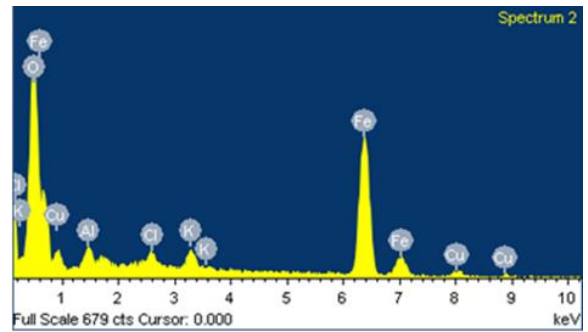
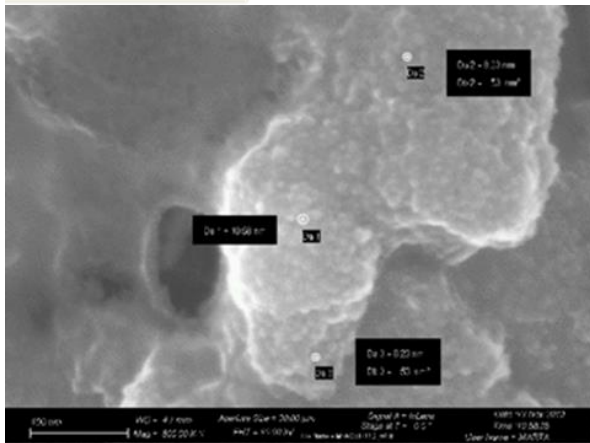


M+AC pH=8,2

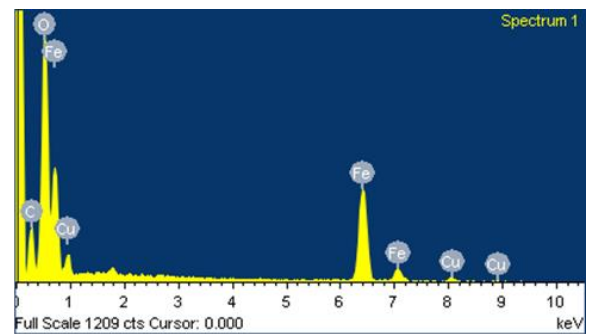
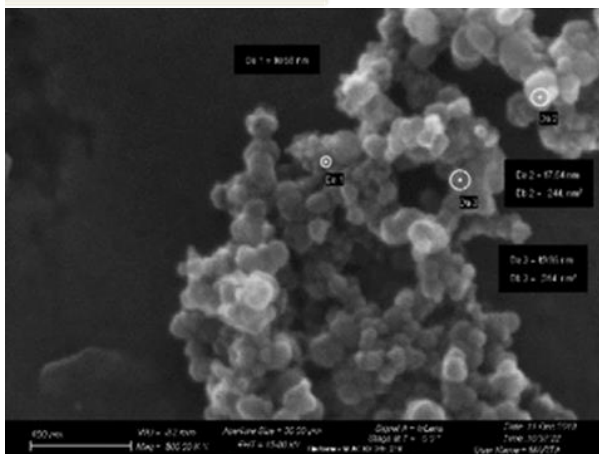




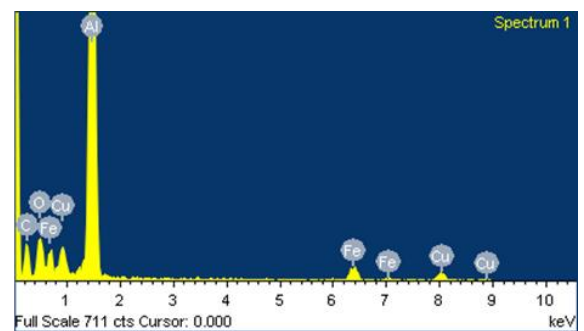
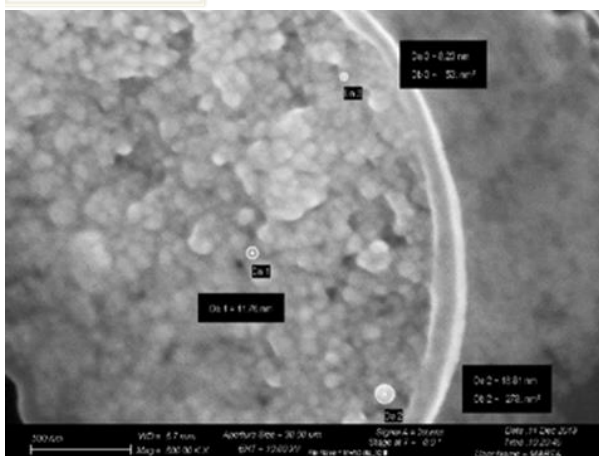
M+AC pH=11,3



M+AC T80 24H



M+AC+EtOH



**Figura 7.1**-Immagini FESEM e spettri EDS di tutti i campioni di nanoparticelle: è possibile notare forma, dimensione stimata e fasi presenti.

Le stime dimensionali estrapolate dalle immagini al FESEM sono indicative e approssimate, per avere delle valutazioni più accurate è necessario svolgere un'analisi al TEM. Come si può osservare, tutte le nanoparticelle mostrano una forma piuttosto regolare, ma presentano dimensioni non omogenee e la tendenza a formare aggregati. Si riscontra però come da previsione teorica che le particelle sintetizzate in temperatura hanno dimensioni maggiori; ciò è dovuto alla differente cinetica della fase di accrescimento che risulta agevolata a temperature più elevate. Si ottengono, così, particelle con diametro medio maggiore.

Dalle immagini ottenute si nota che tutte le particelle mostrano morfologia pressoché sferica, anche nel caso della sintesi in acqua/etanolo che avrebbe dovuto favorire invece la formazione di nanoparticelle cubiche. Tale incongruenza può derivare da una procedura incompleta o parzialmente corretta poiché per tale tipo di sintesi si è preso spunto dagli studi condotti da Gonzalez-Fernandez et al., (2009) [18], in cui si utilizza etanolo come solvente, ma adottando la procedura descritta alla nostra sintesi per quanto riguarda l'utilizzo di reagenti. Infatti, non sono stati utilizzati né solfati di ferro né  $NaOH$  e  $KNO_3$  come basi e agenti ossidanti. Dunque, è possibile che l'ottenimento della morfologia cubica si verifichi seguendo fedelmente il processo di sintesi descritto nell'articolo citato, mentre nel nostro caso si è provato solamente a modificare la composizione della fase liquida della sospensione aggiungendo etanolo.

Per quanto riguarda la composizione chimica, dagli spettri EDS si ricava che i picchi principali sono quelli del ferro e dell'ossigeno, costituenti della magnetite. I picchi relativi al carbonio, rame, ed alluminio che si notano in alcuni spettri sono da imputare alla zona in cui è stata condotta la misura, in quanto la presenza di carbonio fa riferimento film del porta campione di analisi, mentre il rame e l'alluminio sono imputabili ai materiali costituenti il retino e lo stub per il FESEM. Gli altri elementi possono considerarsi come impurezze dovute a contaminazioni casuali nell'ambiente di lavoro durante la sintesi e la preparazione dei campioni.

## 7.2 *Analisi TEM delle nanoparticelle*

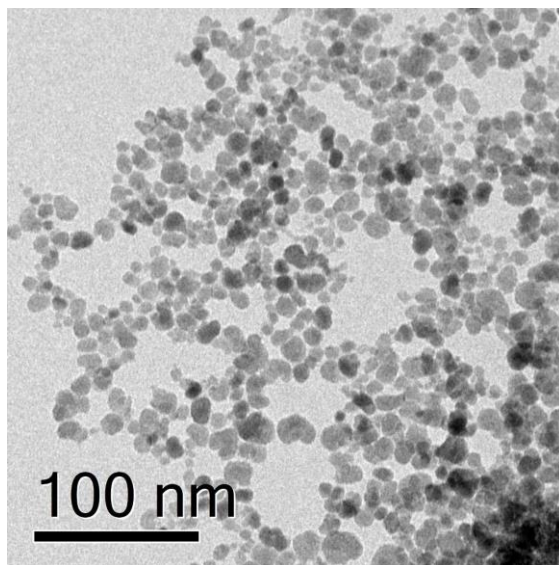
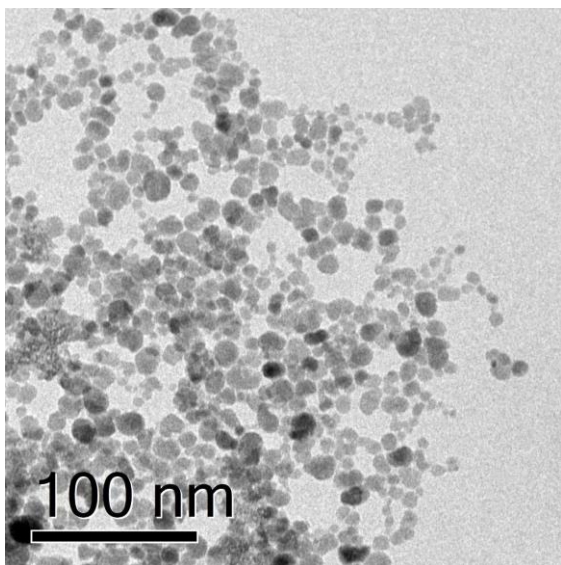
L'analisi al microscopio ottico a trasmissione (TEM) è stata condotta da Istituto Italiano di Tecnologia (IIT) di Genova. La strumentazione utilizzata è un microscopio JEM-1400Plus TEM dotato di una sorgente termoionica in esaboruro di lantanio e operante a 120 kV.

Prima di procedere con l'analisi i campioni sono stati preparati accuratamente sospendendo le nanoparticelle in acqua con una diluizione in mQ di acqua 1:20. Successivamente le sospensioni sono state sottoposte ad ultrasuoni per 2 minuti a potenza massima e una goccia di 2  $\mu$ l è stata depositata su un retino in carbonio (150 mesh) sostenuto da un supporto in rame. Infine, i campioni sono stati essiccati in condizioni di basso vuoto per un'ora a temperatura ambiente.

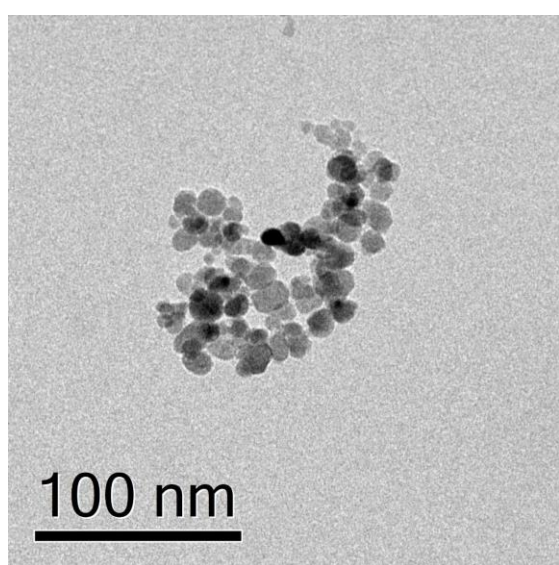
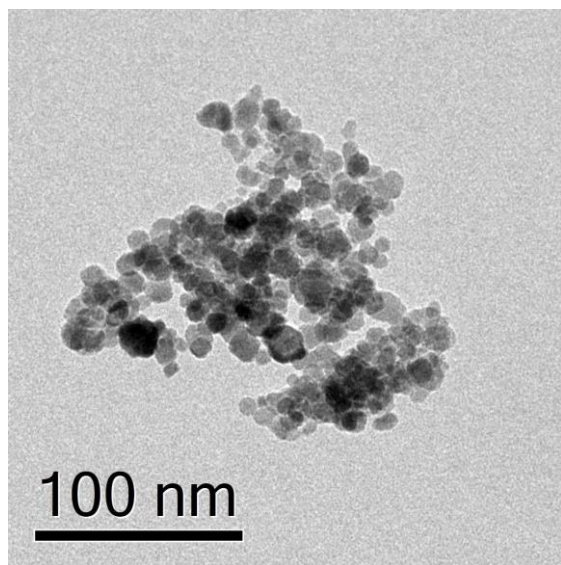
In Figura 7.2 vengono riportate le immagini ricavate dal TEM.



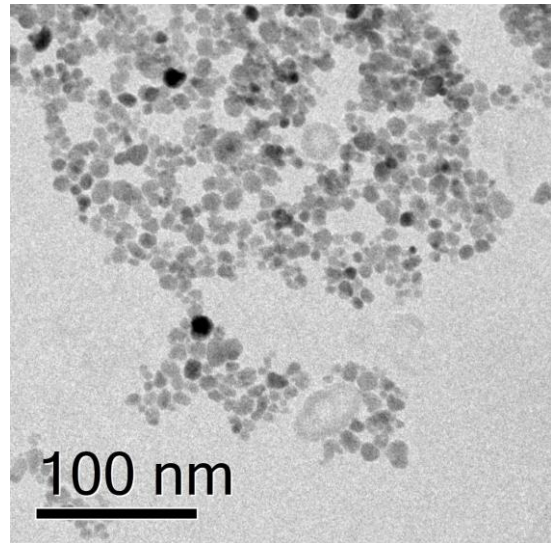
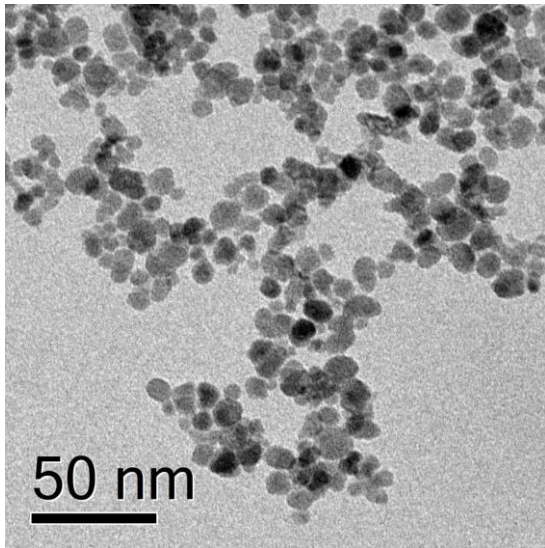
M+AC Tamb



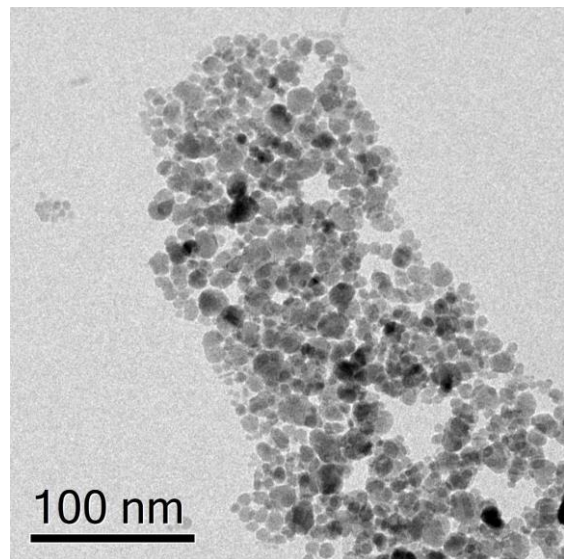
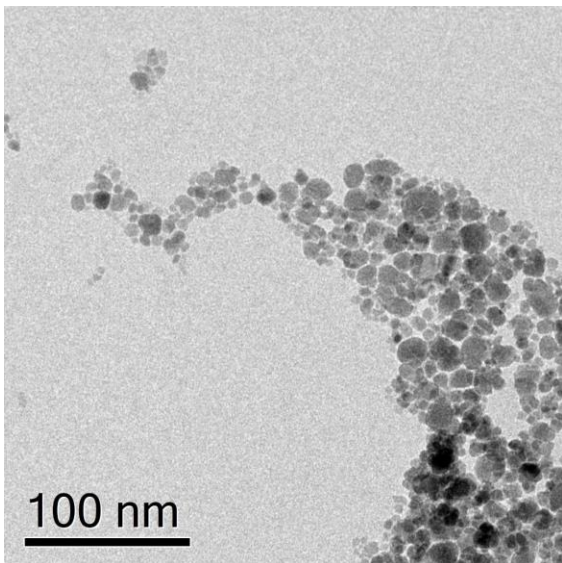
M+AC T=90° C



M+AC R=0,6

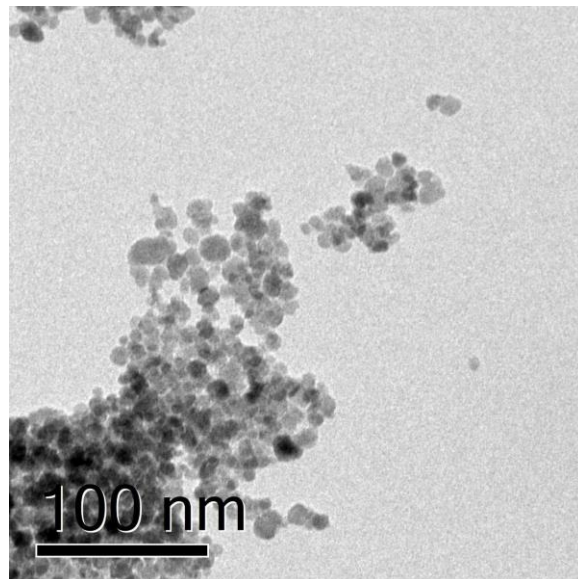
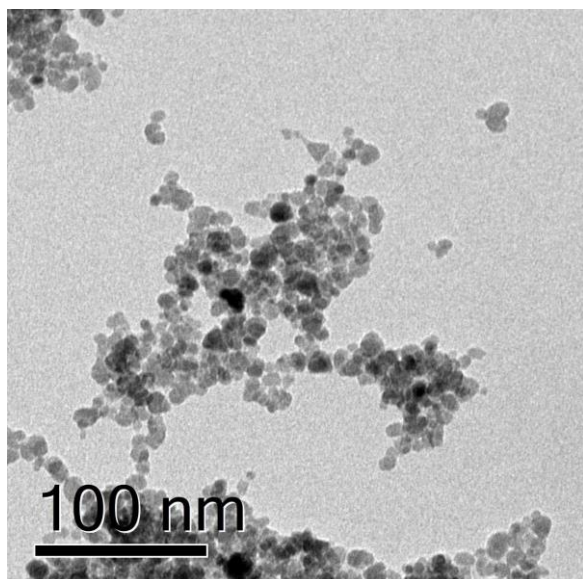


M+AC pH=8,2

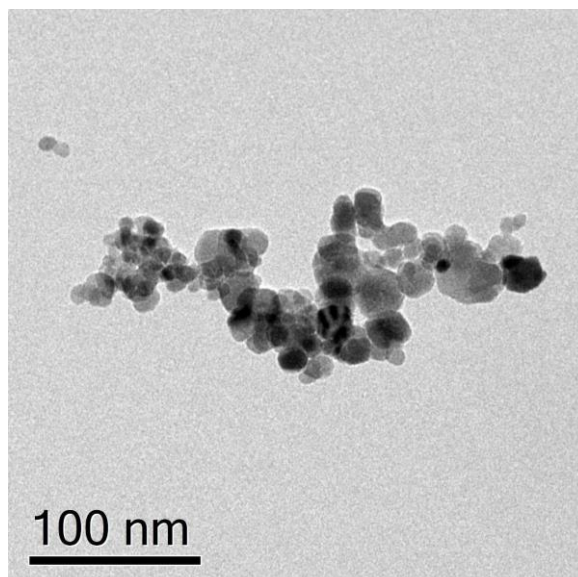
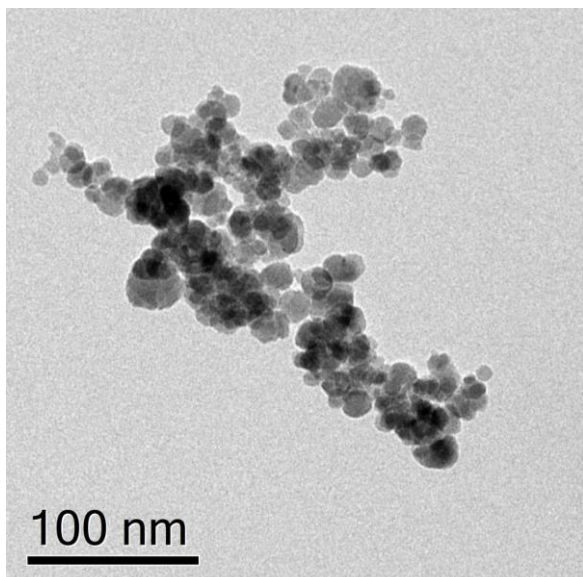




M+AC pH=11,3



M+AC T=80°C



M+AC+EtOH

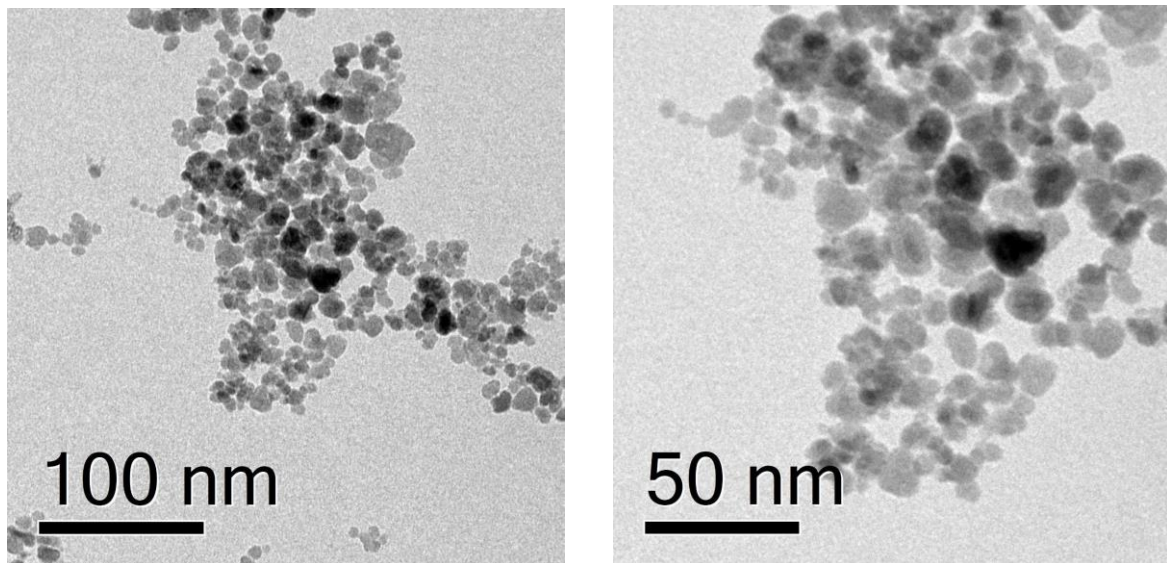
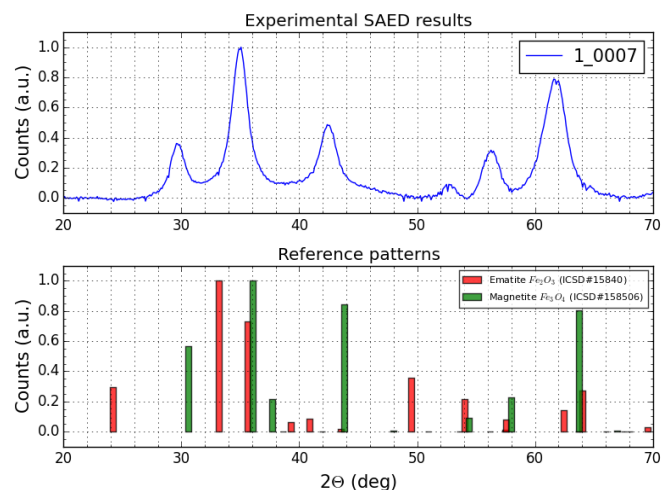
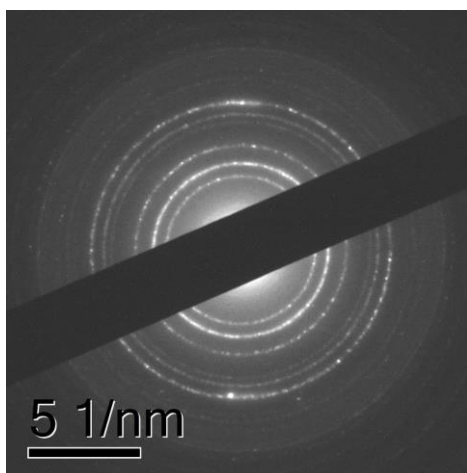


Figura 7.2 – Immagini delle nanoparticelle ottenute al TEM.

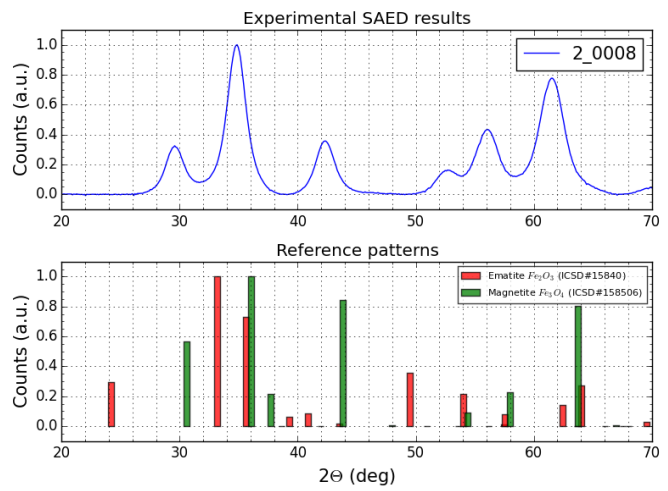
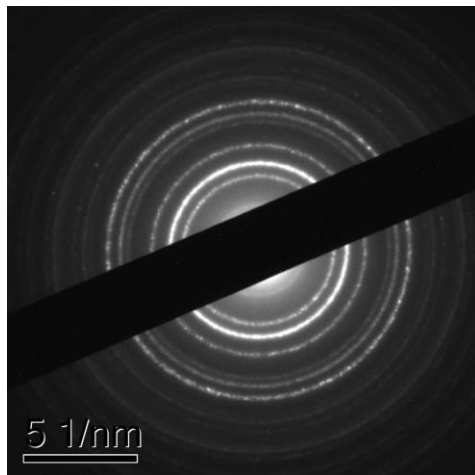
Attraverso l'analisi al microscopio elettronico è possibile ottenere informazioni riguardo al SAED (Selected area electron diffraction) che rappresenta una tecnica cristallografica mediante cui si ricavano i piani reticolari del campione analizzato nello spazio reciproco.

In particolare, è possibile correlare l'aspetto del pattern di diffrazione SAED a proprietà caratteristiche dei campioni utilizzati. Infatti se il reticolo reciproco si presenta come una serie di anelli caratterizzati da un'area di diffusione si è in presenza di un materiale amorfo; se il pattern è caratterizzato dalla presenza di spot luminosi disposti lungo circonferenze il campione è cristallino; infine se il pattern si manifesta come una serie di anelli costituiti da spot luminosi di piccole dimensioni che derivano dalla rifrazione di singoli cristalliti si può concludere che il materiale costituente il campione è polinancristallino. Inoltre, è possibile correlare il pattern alle specifiche fasi cristalline che costituiscono il campione. In Figura 7.3 vengono riportati i pattern SAED per tutti i campioni.

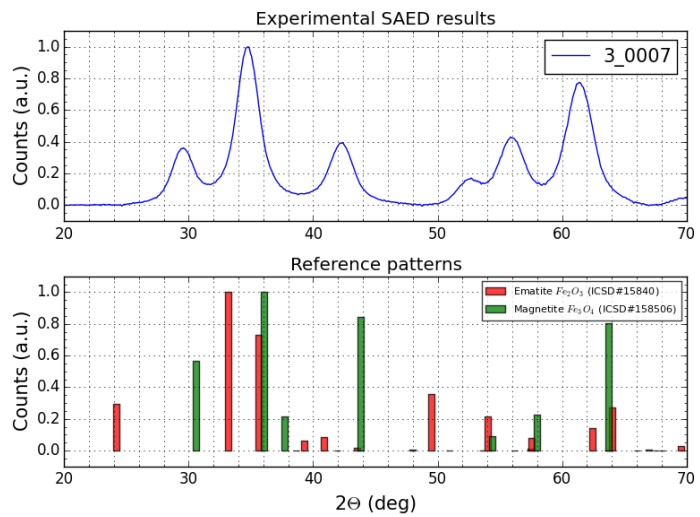
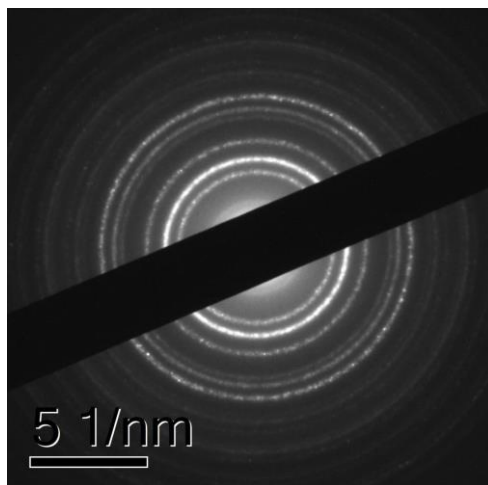
M+AC Tamb



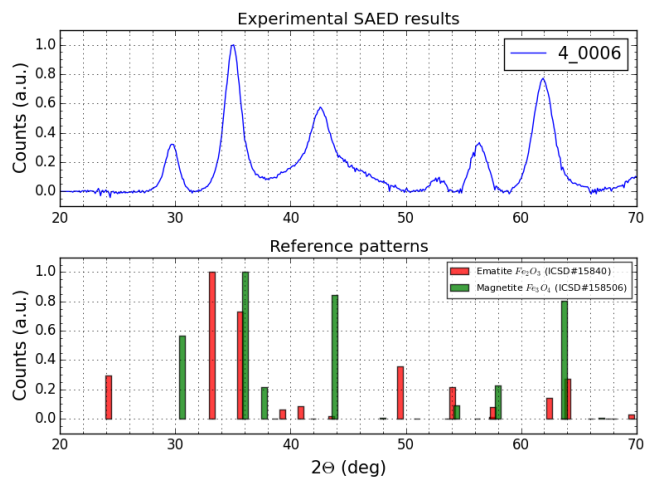
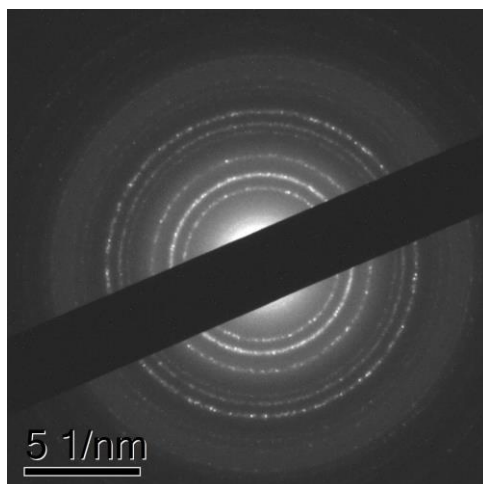
M+AC T=90°C



M+AC R=0,6

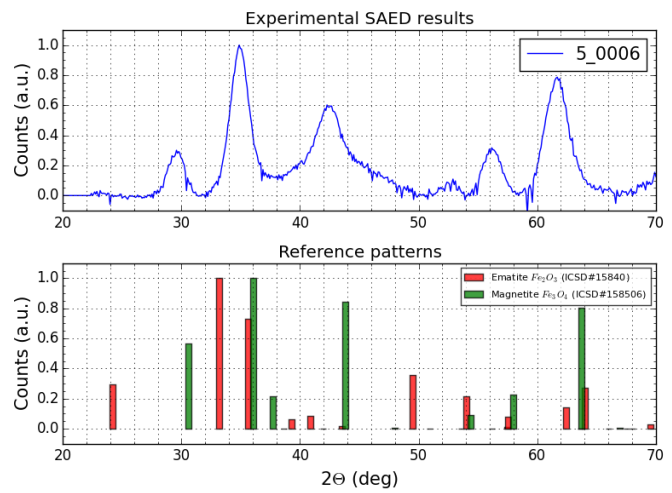
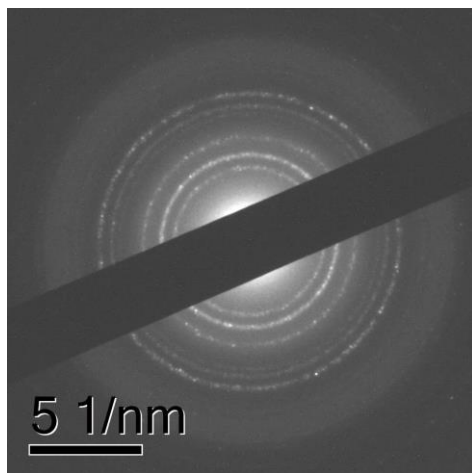


M+AC pH=8,2

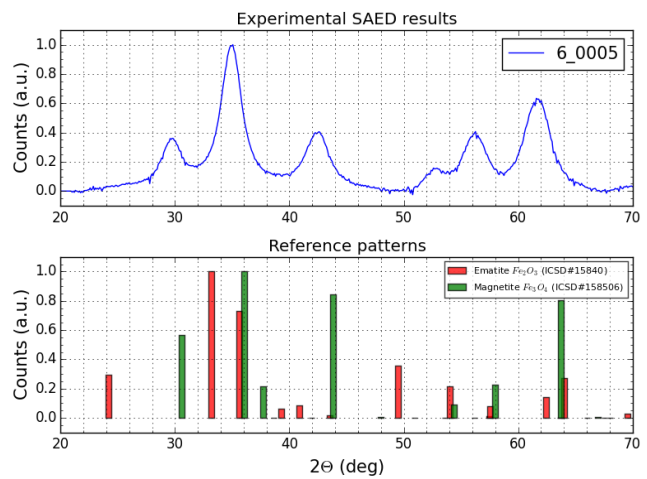
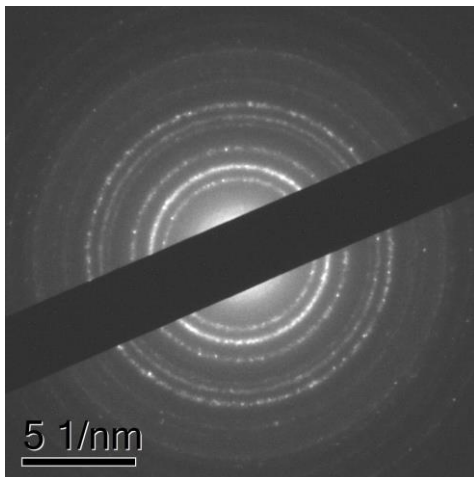




M+AC pH=11,3



M+AC T=80°C 24h



M+AC+EtOH

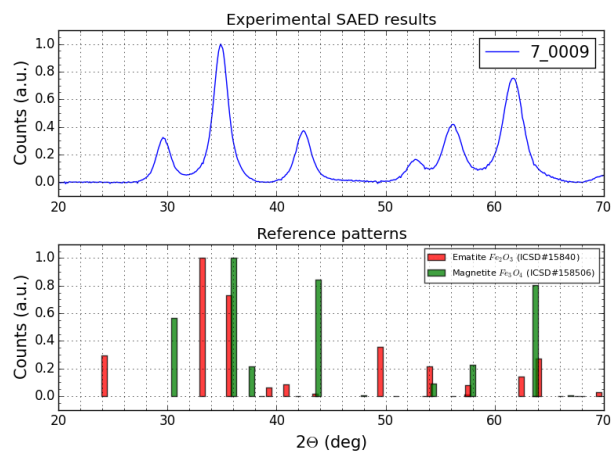
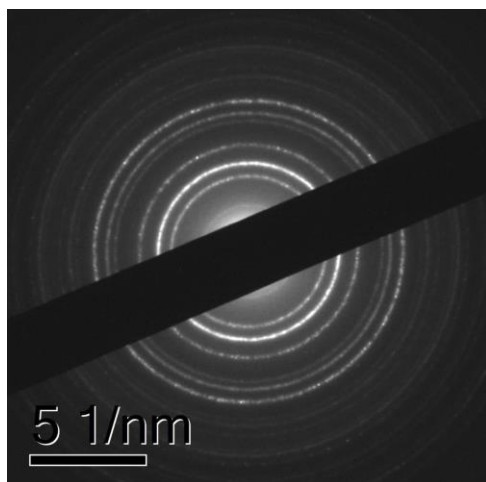


Figura 7.3- Pattern SAED di tutti i campioni di nanoparticelle.

Come possibile notare dalle immagini per tutti i campioni il pattern di diffrazione nello spazio reciproco si presenta come una serie di anelli costituiti da piccoli spot luminosi, e di conseguenza si ha la conferma che il materiale costituente i campioni è polinancristallino come da previsione teorica. Inoltre, confrontando lo spettro ottenuto dal SAED con il pattern di diffrazione presenti nel database, si nota che si ha una migliore corrispondenza con i picchi della magnetite rispetto a quelli dell'ematite.

### 7.3 Analisi DLS delle nanoparticelle magnetiche

Per la caratterizzazione mediante Dynamic Light Scattering si è utilizzato Litesizer 500 per ottenere informazioni sulle proprietà colloidali delle nanoparticelle e in particolare valutare il raggio idrodinamico e la distribuzione dimensionale.

Prima di procedere con la misura, è necessario preparare correttamente i campioni in modo tale da evitare contaminazioni ed errori per ottenere risultati quanto più accurati e coerenti. Innanzitutto, bisogna assicurarsi che la sospensione da caratterizzare presenti una concentrazione di nanoparticelle adeguata, poiché per concentrazioni troppo elevate si possono verificare distorsioni e incongruenze nei risultati dovuti alla soppressione dei moti browniani, che risultano ostacolati da un'eccessiva vicinanza tra le nanoparticelle.

Inoltre, le dimensioni delle nanoparticelle influiscono notevolmente sul range di concentrazione ideale per svolgere correttamente l'analisi; secondo quanto riportato nel manuale di utilizzo dello strumento per particelle che presentano una dimensione attesa nel range di 10-100 nm la concentrazione minima richiesta è pari a 0.1 mg/ml mentre più le particelle sono piccole maggiore sarà il valore di concentrazione massima ammissibile.

La preparazione e scelta del solvente è un passaggio chiave per l'ottenimento di risultati affidabili; infatti è necessario ridurre al minimo il rischio di contaminazioni ed evitare la presenza di elementi esterni che possono falsare la misura. Per questo motivo il solvente viene accuratamente distillato, filtrato e deionizzato per prevenire la presenza di particelle indesiderate. Nel nostro caso sperimentale si è utilizzata acqua bidistillata e deionizzata come solvente. Infine, dopo aver preparato la sospensione, si riempie la cuvetta specifica per la strumentazione assicurandosi che il volume sia compreso tra 0.85 e 3 mL e che non vi siano bolle d'aria all'interno del campione. Si posiziona dunque il campione all'interno del macchinario indossando guanti in lattice per prevenire il contatto diretto e quindi contaminazioni sia della cuvetta che del sistema di misura. Dopo l'elaborazione con il software come output si ottiene un report in cui sono riportati i valori di raggio idrodinamico, l'indice di polidispersità e la distribuzione dimensionale della popolazione di nanoparticelle.

Nella Tabella 7.1 vengono riportati oltre i parametri appena elencati ottenuti dal DLS anche la stima delle dimensioni delle nanoparticelle valutate al FESEM.

**Tabella 7.1**-Proprietà dimensionali stimate delle nanoparticelle

Formulazione	$d_{SEM}$ (nm)	$d_{DLS}$ (nm)	Indice polidispersione	$D_{10}$ (nm)	$D_{50}$ (nm)	$D_{90}$ (nm)
M+AC	10,19	96,82	22,8%	22,05	59,49	344,0
M+AC T=90°C	18,42	160,10	27,2%	66,39	141,70	294,3
M+AC R=0,6	10,88	67,83	26,3%	27,85	72,66	135,57
M+AC pH=8,2	12,93	91,53	26,8%	33,21	79,61	114,01
M+AC pH=11,3	9,02	64,47	25,8%	26,49	68,49	138,34
M+AC T=80°C 24h	16,07	348,7	29,1 %	141,22	301,8	869,6
M + AC +EtOH	10,01	99,65	25,9%	46,17	99,33	762,6

Bisogna considerare che attraverso il DLS si ha una stima del raggio idrodinamico, perciò il valore calcolato tiene conto della sfera di idratazione che avvolge le particelle e lo spessore del doppio strato adsorbito che può variare in correlazione del tipo di solvente utilizzato.

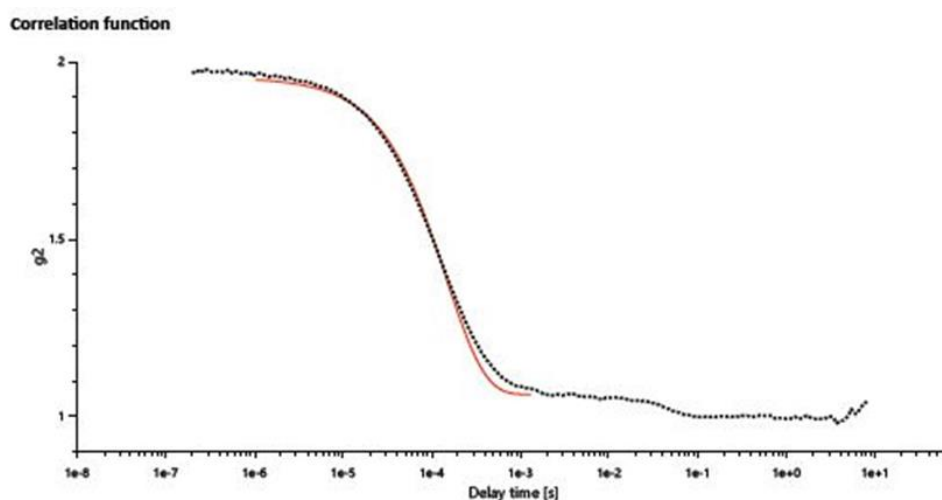
In ogni caso, dai dati in Tabella 7.1 è possibile notare come le particelle sintetizzate in temperatura sono caratterizzate da dimensioni maggiori, così come previsto a livello teorico poiché a temperature più elevate il meccanismo di accrescimento è favorito. In particolare, le nanoparticelle mantenute ad una temperatura di 80°C per 24 ore mostrano valori di raggio idrodinamico sensibilmente più elevati, che unitamente al più alto valore di indice di polidispersità permette ragionevolmente di ipotizzare la formazione di agglomerati di grandi dimensioni.

I valori inferiori appartengono ai campioni con diverso rapporto stechiometrico  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  e a pH=11,3 a sottolineare come la concentrazione, la natura degli ioni e le condizioni di reazione possono influire sulle proprietà delle fasi precipitate. Infine, sono stati misurati valori paragonabili in termini di dimensioni per le restanti tre sintesi.

Dai dati relativi alla distribuzione dimensionale si notano che le nanoparticelle non presentano dimensioni omogenee e che si ha una distribuzione piuttosto larga.

Tale risultato viene mostrata in Figura 7.4 viene riportata un esempio grafico in cui è possibile notare dalla funzione di correlazione come la curva calcolata si sovrappone bene alla curva di riferimento.

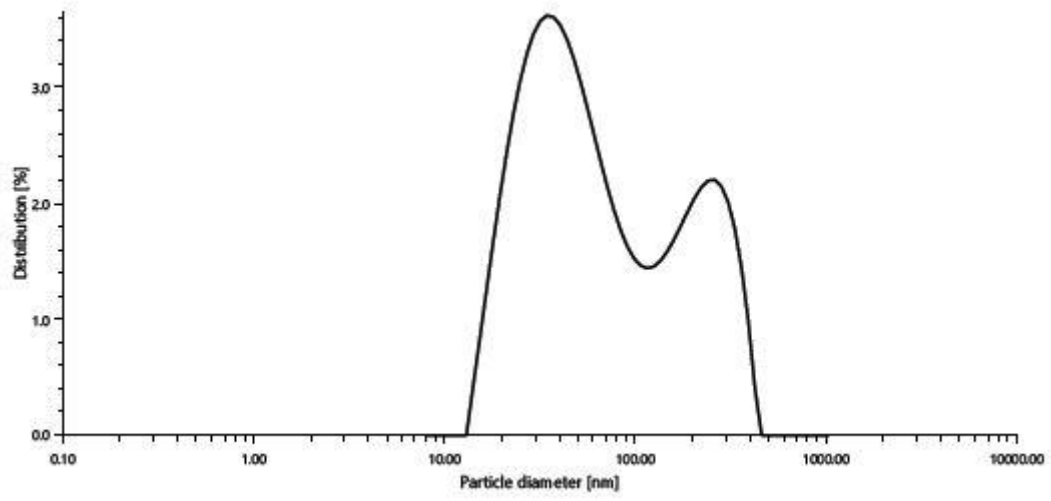
Nella seguente Figura7.5 vengono riportate invece le distribuzioni dimensionali di tutti i campioni di nanoparticelle.



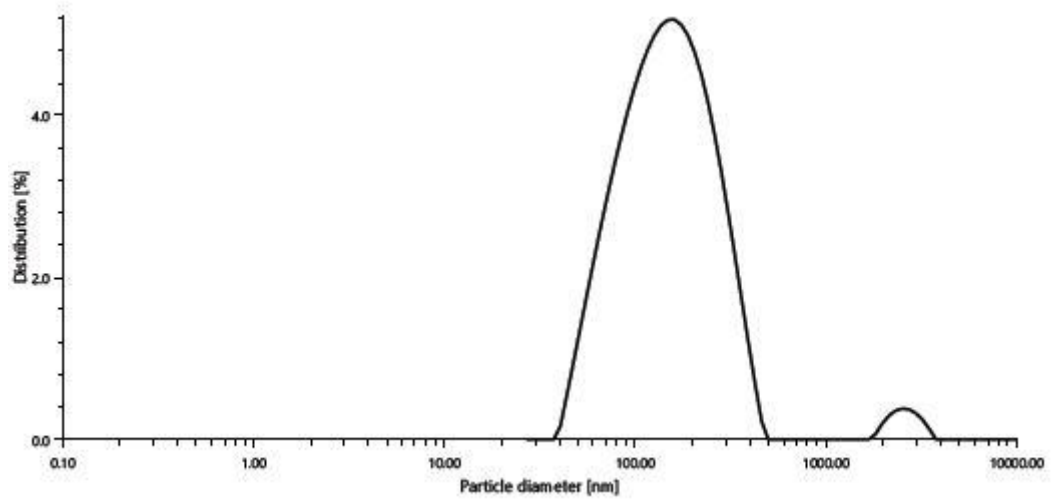
**Figura 7.4** -Esempio di funzione di correlazione per nanoparticelle di magnetite tamponate a pH= 8.2 estrapolate tramite analisi DLS.



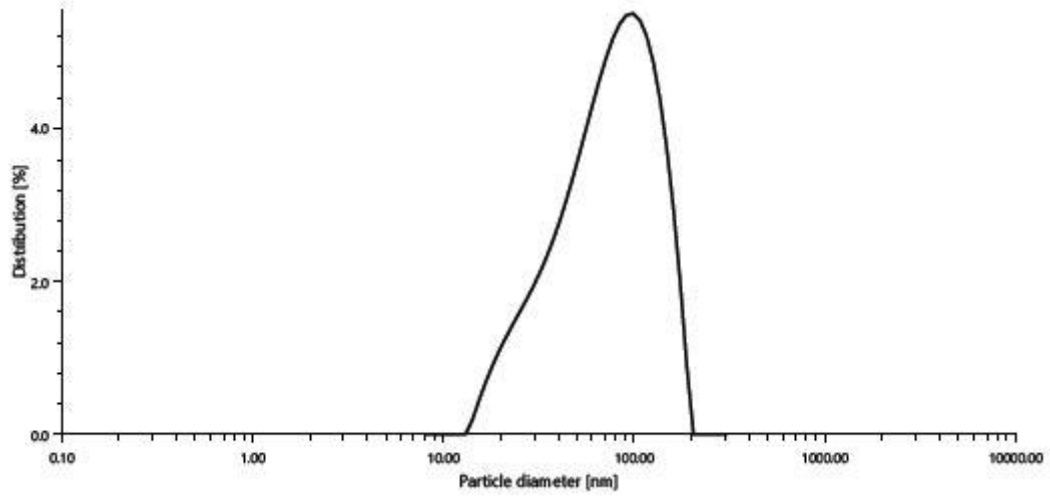
M+AC Tamb



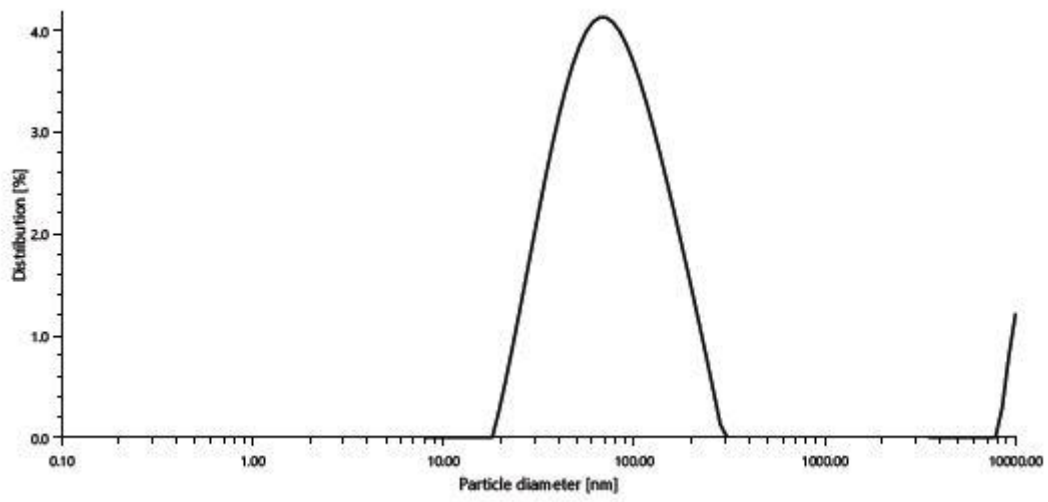
M+AC T=90°



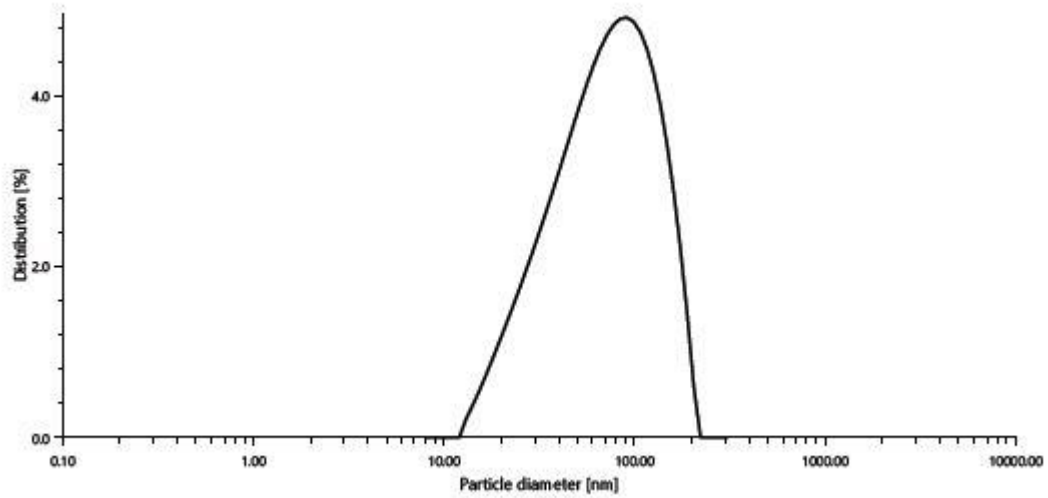
M+AC R=0,6



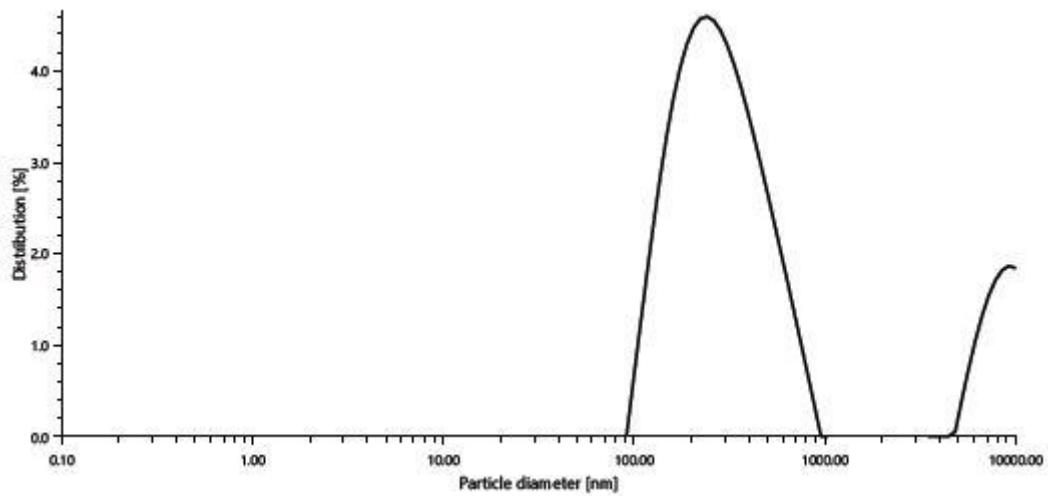
M+AC pH=8,2



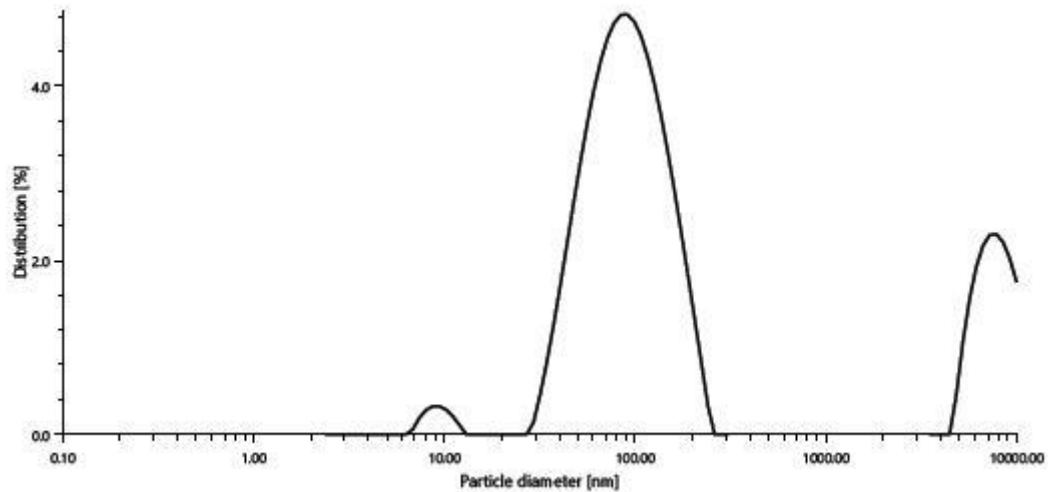
M+AC pH=11,3



M+AC T=80°C 24h



M+AC+EtOH



**Figura 7.5-** Distribuzione dimensionale di tutti i campioni di nanoparticelle estrapolati mediante DLS.

#### 7.4 *Diffrazione XRD*

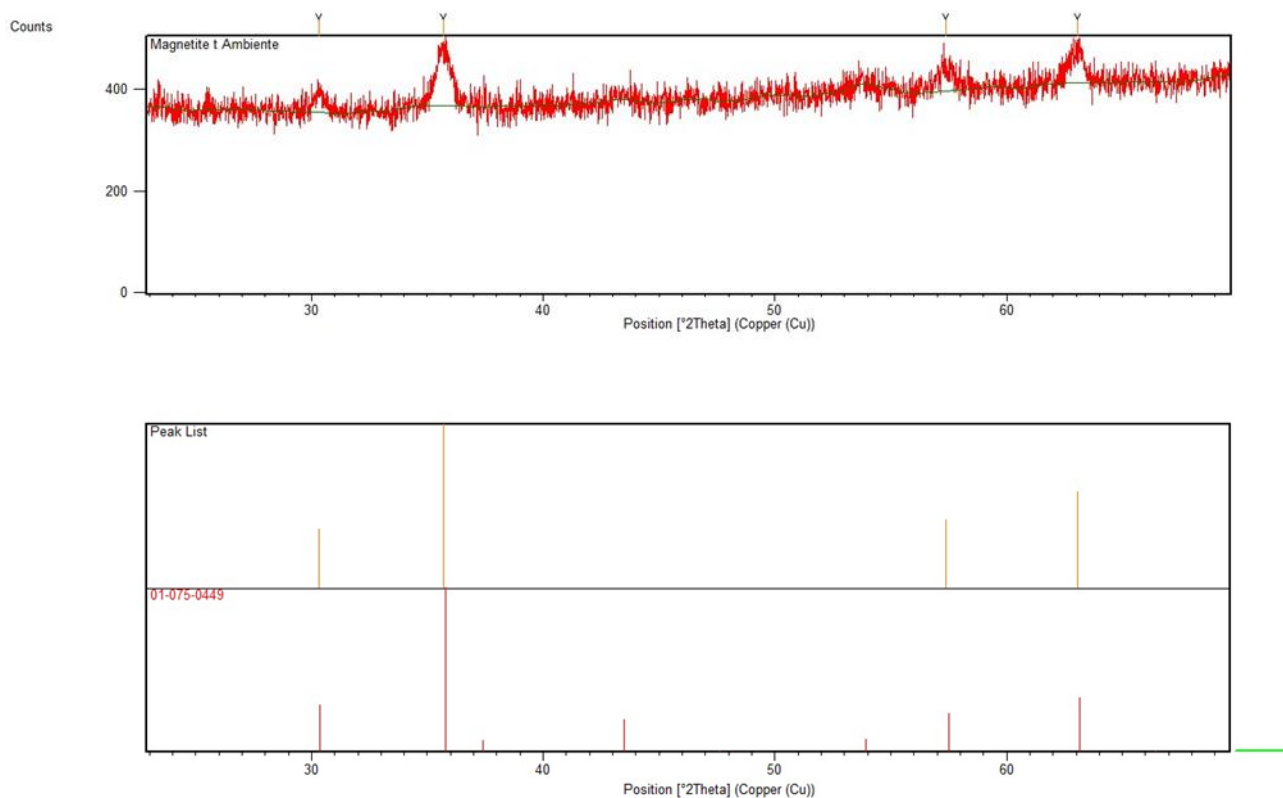
L'analisi XRD permette di individuare le fasi cristalline che costituiscono il campione di nanoparticelle, in particolare bisogna verificare se oltre alla magnetite si ha presenza di ematite e/o maghemite. Infatti, tali specie possono formarsi durante il processo di coprecipitazione in seguito alla variazione dei parametri di sintesi come il rapporto stechiometrico tra gli ioni Fe (II) e Fe (III) e il pH principalmente. Diventa dunque di fondamentale importanza valutare l'eventuale presenza di queste fasi cristalline all'interno dei campioni poiché generalmente portano ad un decremento della capacità di riscaldamento delle nanoparticelle.

Gli spettri XRD delle nanoparticelle sono ottenuti mediante un diffrattometro "X'Pert" utilizzando la radiazione  $K\alpha$  del rame con  $\lambda=1,541874 \text{ \AA}$  generata attraverso un voltaggio di 40 kV e una corrente di 40 mA, con intervallo di scansione  $2\theta$  tra 10 e 70° e velocità costante di 2°/min.

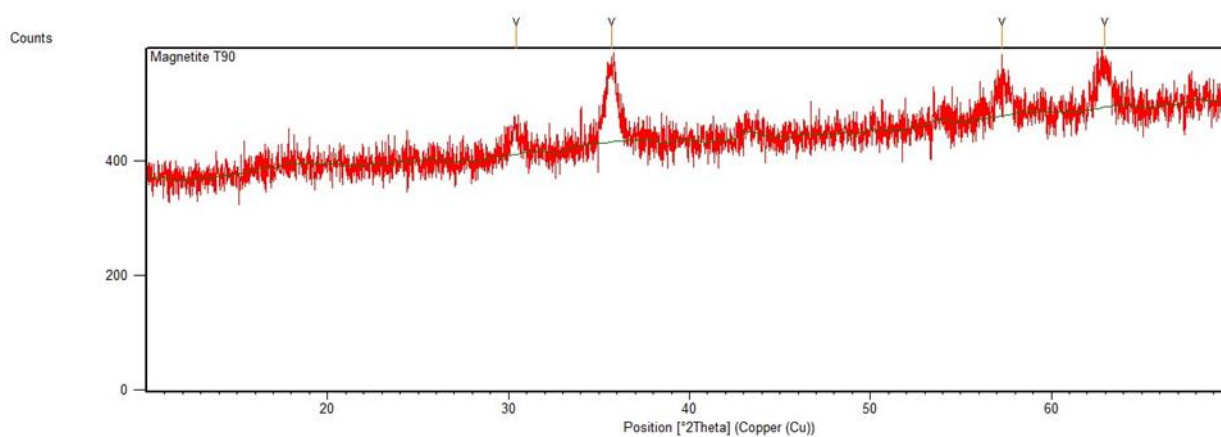
Gli spettri ottenuti sono stati analizzati con il software X'Pert HighScore Plus che permette di associare i picchi degli spettri XRD ai rispettivi materiali confrontandoli con un ampio database.

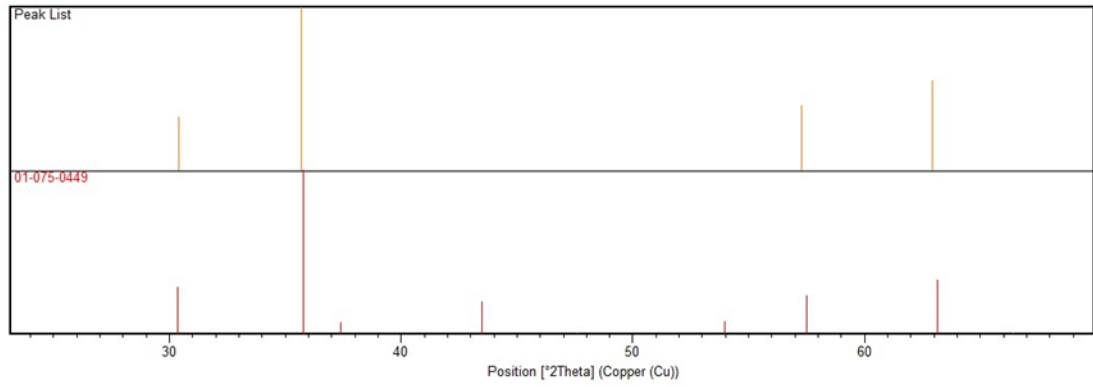
Nelle Figura 7.6 vengono riportati gli spettri e i pattern di tutti i campioni di nanoparticelle analizzati.

### M+AC Tamb

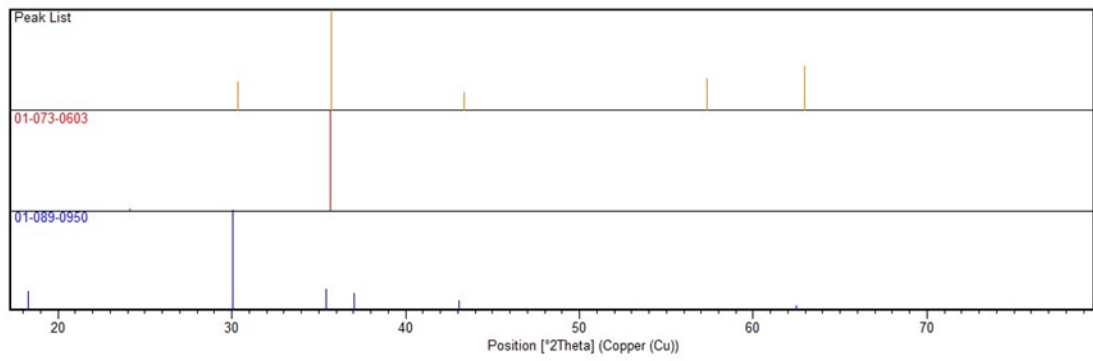
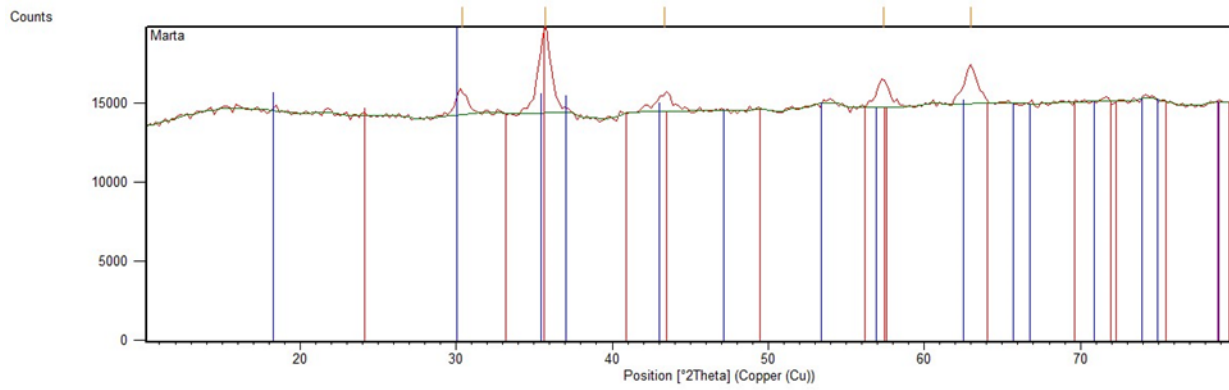


### M+AC T=90°C

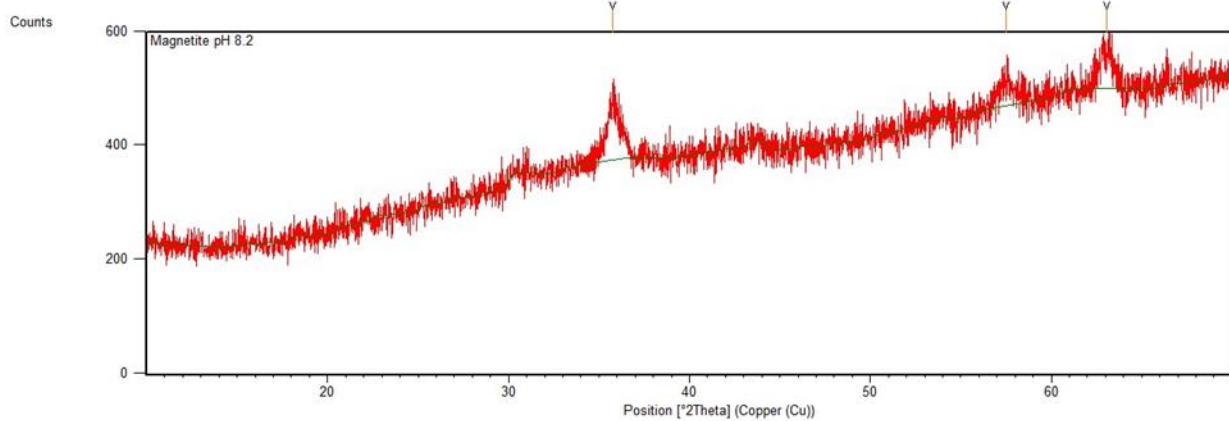


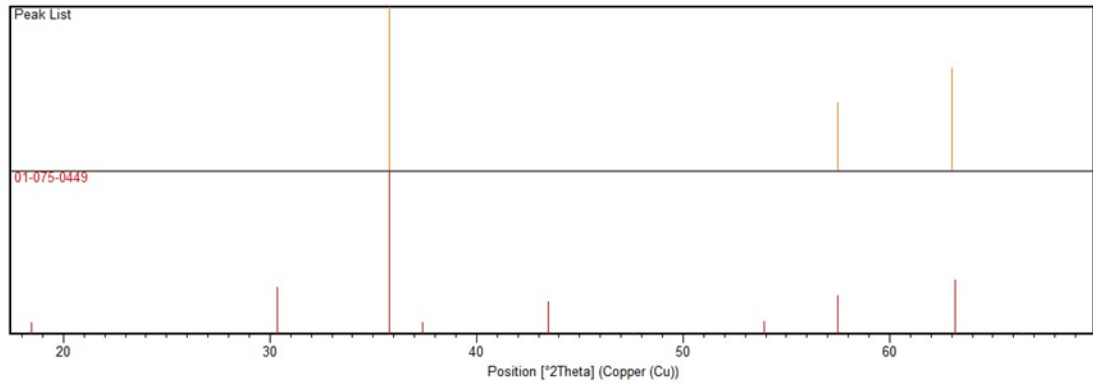


M+AC R=0,6

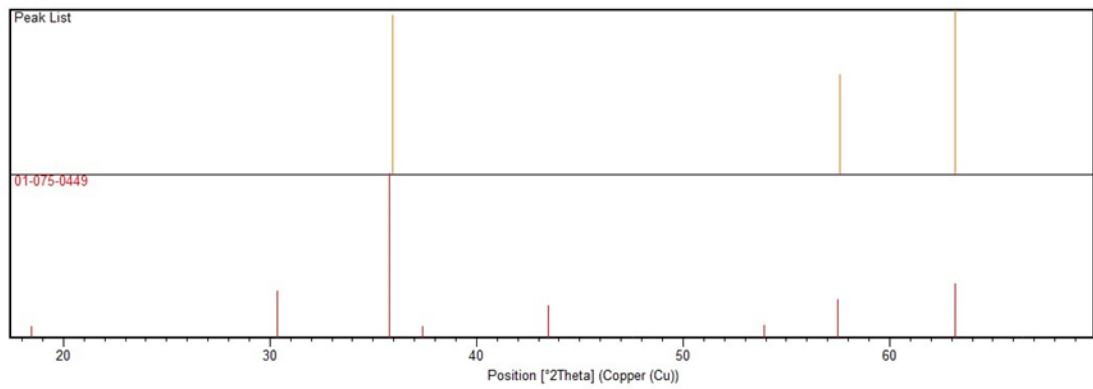
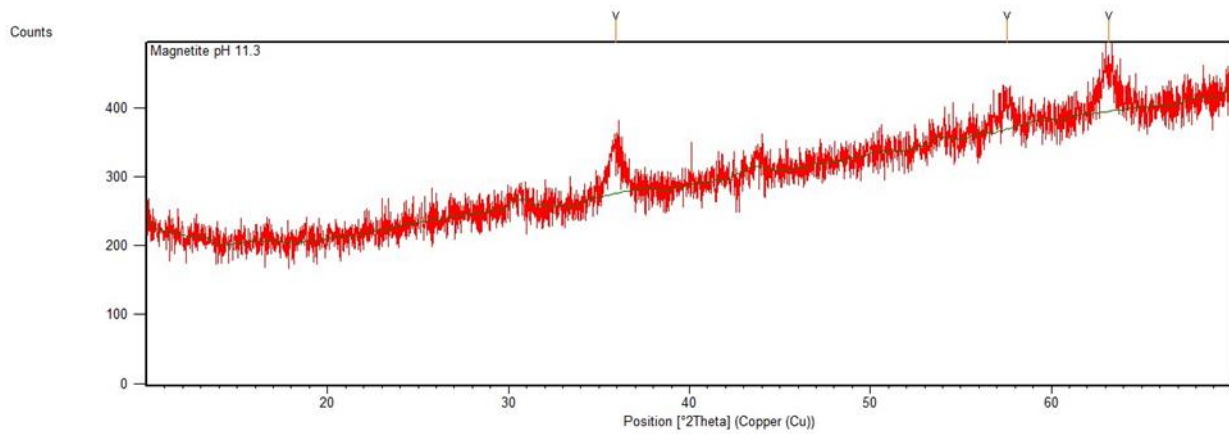


M+AC pH=8,2

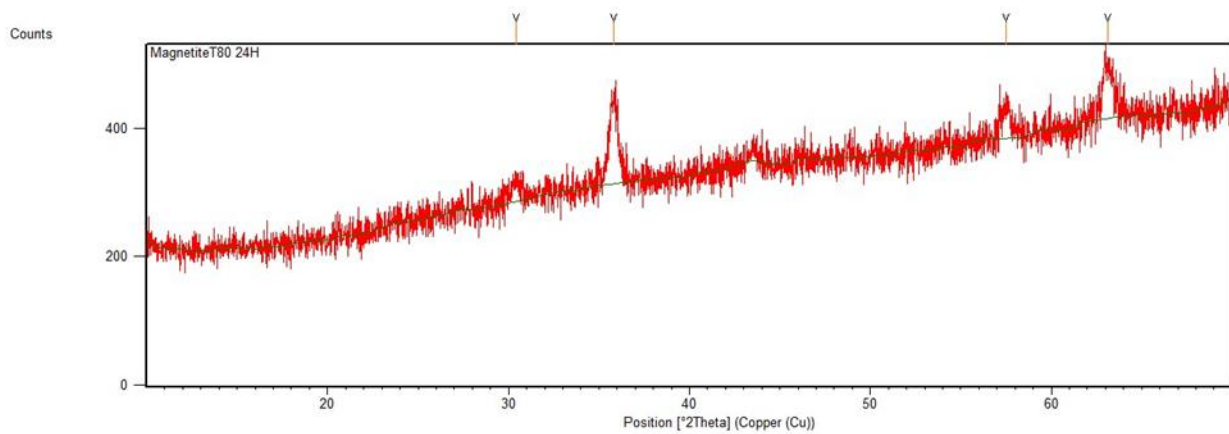


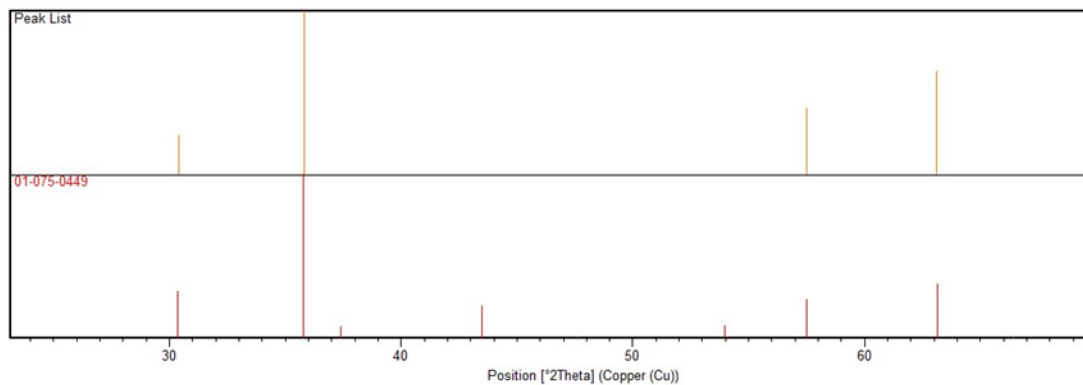


M+AC pH=11,3

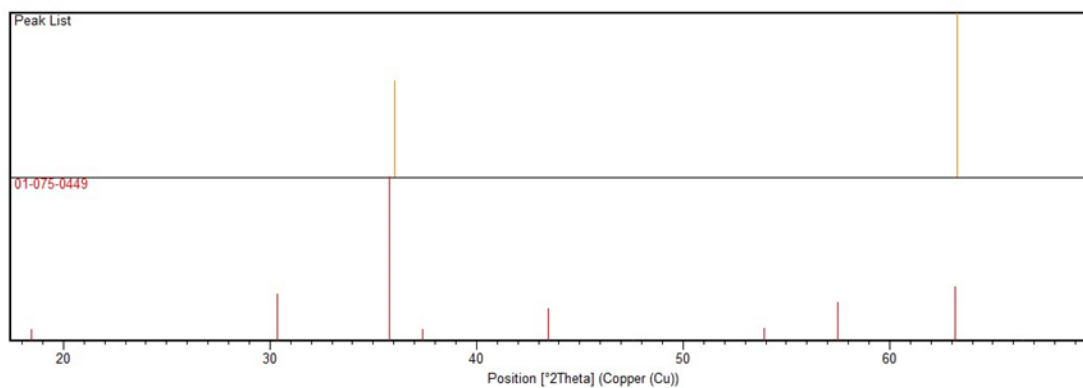
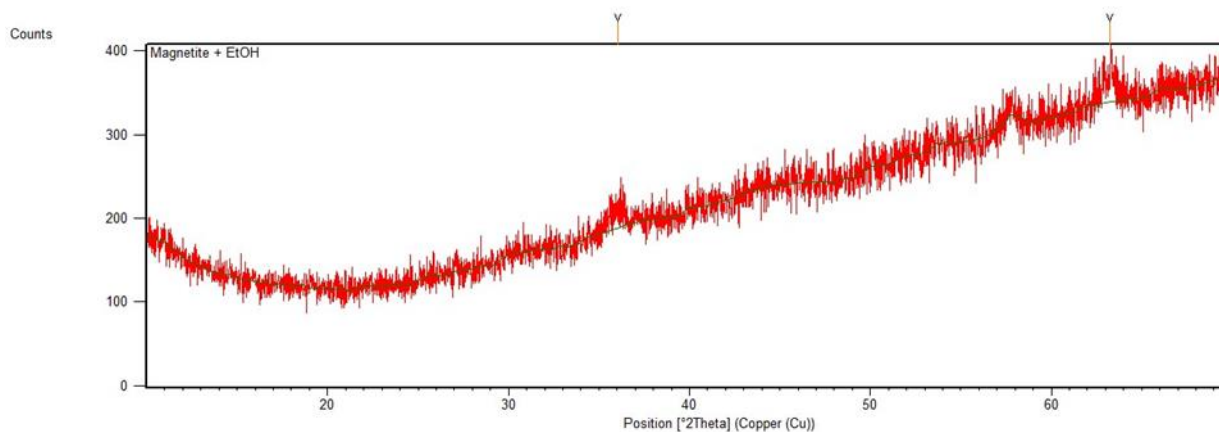


M+AC T=80°C 24h





M+AC+EtOH



**Figura 7.6-** Spettri e pattern XRD di tutti i campioni di NPs analizzati.

Come è possibile notare da tutti gli spettri riportati, i picchi sono presenti nelle medesime posizioni angolari per tutti i campioni, inoltre dall'analisi del pattern, tramite il software X'Pert HighScore risulta chiara la corrispondenza con i picchi della magnetite di sintesi identificata dal codice 01-075-0950 del database a cui fa riferimento il software. Quindi, vista l'assenza di altri picchi è ragionevole ipotizzare che i campioni siano costituiti prevalentemente da magnetite, poiché risulta quasi impossibile distinguere i picchi della maghemite da quelli della magnetite e inoltre attraverso la sintesi in aria, come nel nostro caso, spesso si ha la presenza di entrambi le fasi a causa dell'ossidazione del Fe.

### 7.5 Analisi magnetica-Curve di magnetizzazione

Per quanto riguarda la caratterizzazione delle proprietà magnetiche delle nanoparticelle si è utilizzato un magnetometro DC/ suscettometro AC Lakeshore 7225 dotato di Cryogen-Free Magnet Frumagnet a temperatura ambiente in condizioni quasi statiche.

Preventivamente ci si è occupati di preparare i campioni in maniera adeguata a condurre le prove, ottenendo dei pellet pressati bulk di polveri di magnetite ricavate dalle relative sospensioni. Dunque, dopo aver ottenuto le polveri mediante essiccazione, si procede con la formazione dei pellet, pressando le polveri mediante un apposito strumento. Per favorire una migliore compattazione e una maggiore resistenza meccanica dei campioni a ciascuna polvere è stata aggiunta una microgoccia di PVA. Una volta ottenuti, i pellet sono stati lasciati ad essiccare a temperatura ambiente.

Poiché i risultati di magnetizzazione vanno normalizzati rispetto alla massa nella Tabella 7.1 Vengono riportati i dati relativi a ciascun campione.

Tabella 7.1-Massa di ogni campione preparato per prove magnetiche.

Formulazione	Massa (mg)
M+AC Tamb	20,7
M+AC T=90°C	25,4
M+AC R=0,6	20,1
M+AC pH=8,2	22,7
M+AC pH=11,3	37,4
M+AC T=80°C	22,7
M+AC+EtOH	28,6

In Figura 7.7 si riporta il grafico delle curve di magnetizzazione ottenute per ogni campione analizzato

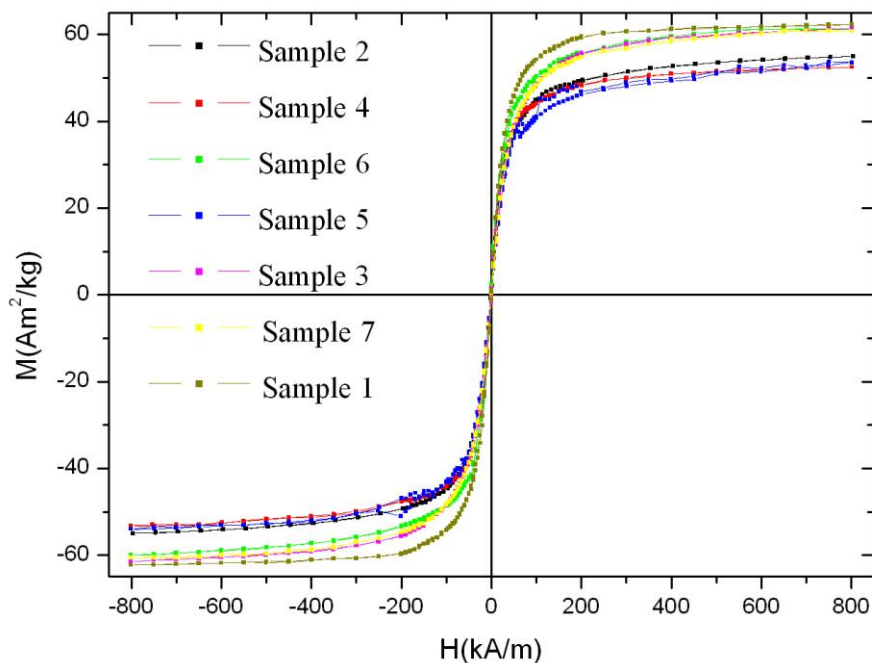


Figura 1- Curve di magnetizzazione di tutti i campioni analizzati.



Come possibile notare dai grafici in figura, è evidente che tutti i campioni di nanoparticelle sintetizzati mostrano comportamento superparamagnetico in accordo alle previsioni teoriche, infatti non è presente nessun ciclo di isteresi in quanto si hanno delle curve perfettamente sigmoidali passanti per l'origine; non è presente dunque alcuna magnetizzazione residua  $M_r$ , né campo coercitivo  $H_c$  inoltre alcuni campioni (campioni numero 1,3,7,6) mostrano valori di magnetizzazione di saturazione più elevati intorno a  $M_s = 60 Am^2/kg$  mentre i restanti campioni presentano valori dell'ordine di  $M_s = 50 Am^2/kg$ . Tali differenze possono essere riconducibili alle differenti condizioni di sintesi anche se è necessario sottolineare che in entrambi i casi si hanno dei valori di magnetizzazione di saturazione inferiori a quelli della magnetite bulk. Ma il valore di magnetizzazione di saturazione non influisce in maniera considerevole sulle proprietà ad ipertermia delle nanoparticelle, l'aspetto più importante è avere la certezza che le MNPs siano superparamagnetiche, in quanto questa condizione è imprescindibile per un avere una risposta magnetica ottimale ai fini dell'ipertermia.

### 7.6 Misure calorimetriche con generatore ad induzione e valutazione SAR

L'obiettivo principale del lavoro di tesi è quello di valutare la capacità di riscaldamento delle nanoparticelle se sottoposte ad un campo magnetico alternato. A tale scopo si sono effettuate delle prove di riscaldamento utilizzando un generatore a induzione Felmi serie EGMA6 operante alla frequenza di 219 kHz e ad un range di campo variabile selezionando la potenza del generatore fino a 6 kW. La provetta contenente la sospensione di nanoparticelle viene inserita al centro di una bobina costituita da due spire circolari di diametro  $d = 38,7$  mm,  $L = 243$  mm e la lunghezza complessiva del solenoide è  $l = 15$  mm.

In Figura 7.8 si riporta in foto l'attrezzatura utilizzata.



Figura 7.8 – Generatore Felmi serie EGMA6 utilizzato per le prove calorimetriche.

I parametri della strumentazione invece sono riportati in Tabella 7.2

**Tabella 7.2-Dati tecnici forno ad induzione EGMA 6**

Dati Tecnici generatore ad induzione	
Modello	EGMA 6
Serial number	EG 385
Tensione alimentazione	400 V
Tensione trifase	12 V
Potenza in entrata	12 kVA
Potenza in uscita	6 kW

Attraverso questa strumentazione sperimentale si valuta la SAR delle nanoparticelle magnetiche disperse in soluzione acquosa, in seguito all'esposizione al campo magnetico generato. Per valutare l'efficienza di riscaldamento si correla quindi la potenza magnetica assorbita dal campione al suo aumento di temperatura fino a raggiungere il range terapeutico. Generalmente, quindi, si ipotizza di operare in condizioni adiabatiche, assumendo che lo scambio di calore tra la strumentazione e l'ambiente circostante sia trascurabile. Tale considerazione risulta più accurata adottando alcuni accorgimenti durante la prova sperimentale come l'utilizzo di una schiuma poliuretanicca e un cilindro in materiale ceramico da inserire tra la provetta e la bobina e la riduzione del tempo impiegato a rilevare la temperatura una volta spento il campo. In questo modo si migliora l'isolamento termico, riducendo le perdite di calore verso l'esterno.

La SAR, quindi, si ricava secondo il metodo di Bekovic et Hamler, (2000) [27], dalla pendenza iniziale della curva di temperatura in relazione al tempo di misura secondo le equazioni (6.8) e (6.11).

Dal punto di vista sperimentale si sono preparati sette campioni di nanoparticelle, valutando innanzitutto la concentrazione di nanoparticelle che si ottiene da ciascun processo di sintesi. Nella Tabella 7.3 viene riportata la corrispondenza tra campioni d'analisi e tipologia di nanoparticelle.

Formulazione	
Camp1	M + AC
Camp2	M + AC T90
Camp3	M + AC R0,6
Camp4	M + AC pH 8,2
Camp5	M + AC pH11,3
Camp6	M+AC T80 24h
Camp7	M+AC +EtOH

Si è quindi prelevato un volume pari a 0,5 ml da ciascuna sospensione sintetizzata e successivamente si è trasferita la sospensione in provette eppendorf, poste ad essiccare in stufa. In tale modo si favorisce l'evaporazione totale del solvente acquoso ed è possibile determinare il peso di ciascun campione di nanoparticelle presenti in sospensione. Tale procedura è stata ripetuta due volte per ciascuna sintesi in modo tale da poter effettuare una media di valori e ottenere così il valore di concentrazione espresso in mg/ml.

Successivamente, si procede attraverso diluizione alla preparazione di 2 ml di sospensione di nanoparticelle con concentrazione pari a  $C = 2 \text{ mg/ml}$ . Si procede dunque alla misurazione dell'aumento di temperatura in seguito all'esposizione al campo magnetico.

Il generatore di corrente lavora ad una frequenza di 219 kHz e si è scelto di valutare il riscaldamento per due valori di campo impostando la potenza del generatore a  $P = 2 \text{ kW}$  e  $P = 6 \text{ kW}$ . Conoscendo dunque i parametri geometrici della bobina utilizzata è possibile determinare l'intensità del campo magnetico  $H$  che si sviluppa nel centro del solenoide secondo la seguente formula:

$$H = \frac{NI}{\sqrt{R^2 + l^2}} \quad (7.1)$$

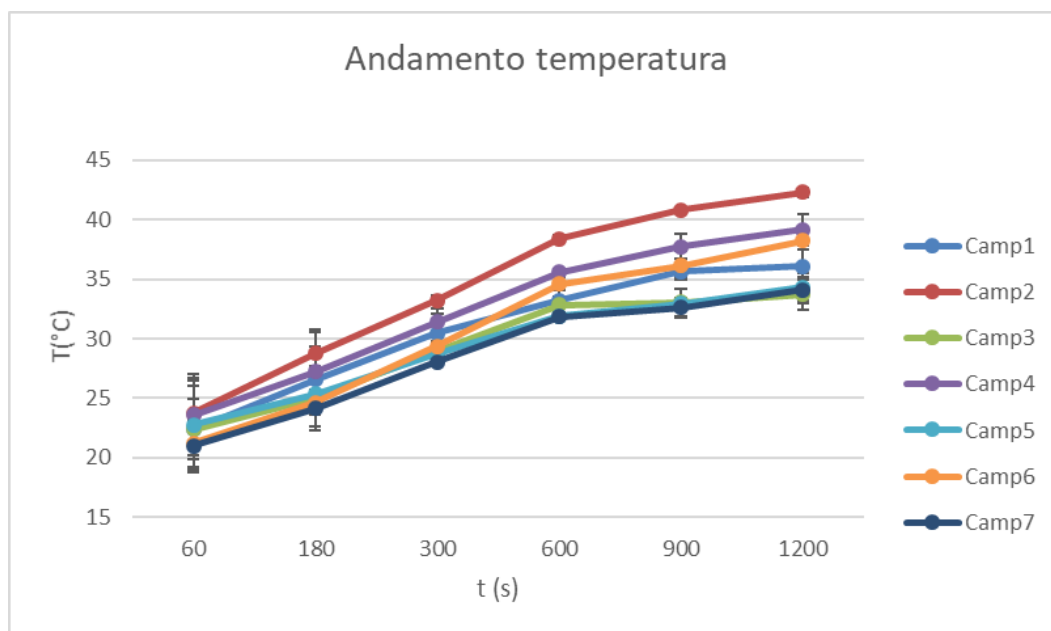
In cui  $N$  è il numero di spire,  $I$  è l'intensità di corrente che scorre all'interno del solenoide,  $R$  rappresenta il raggio delle spire ed  $l$  la lunghezza del solenoide. Bisogna notare che tale formula è una forma particolare della formula del campo magnetico per un solenoide in cui si è tenuto conto delle condizioni di non idealità poiché siamo in presenza di un solenoide finito ( $L/D \ll 10$ ).

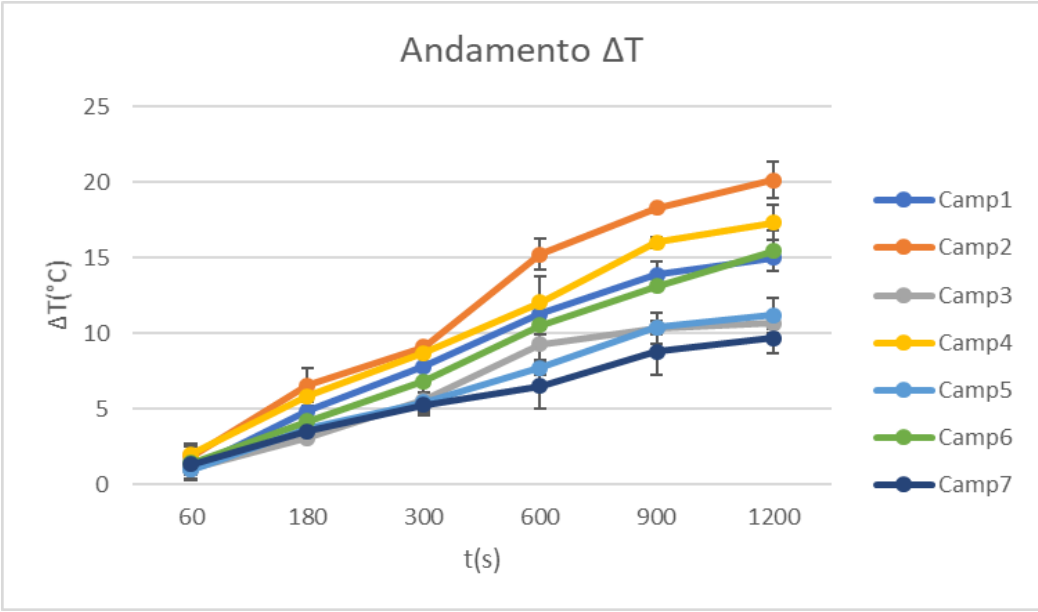
Dalla formula precedente si ricava quindi che il campo utilizzato è pari a  $H = 8 \text{ kA/m}$  per le misure condotte a  $P = 2 \text{ kW}$  e  $H = 24 \text{ kA/m}$  per le misure condotte a  $P = 6 \text{ kW}$ .

Le curve calorimetriche sono state costruite per punti valutando l'incremento di temperatura rispettivamente per  $t = 1, 3, 5, 10, 15$  e  $20$  minuti di esposizione per le prove a  $2 \text{ kW}$  e  $t = 1, 3, 5, 7, 10$  minuti per le prove a  $6 \text{ kW}$  fino al raggiungimento di un plateau per la temperatura.

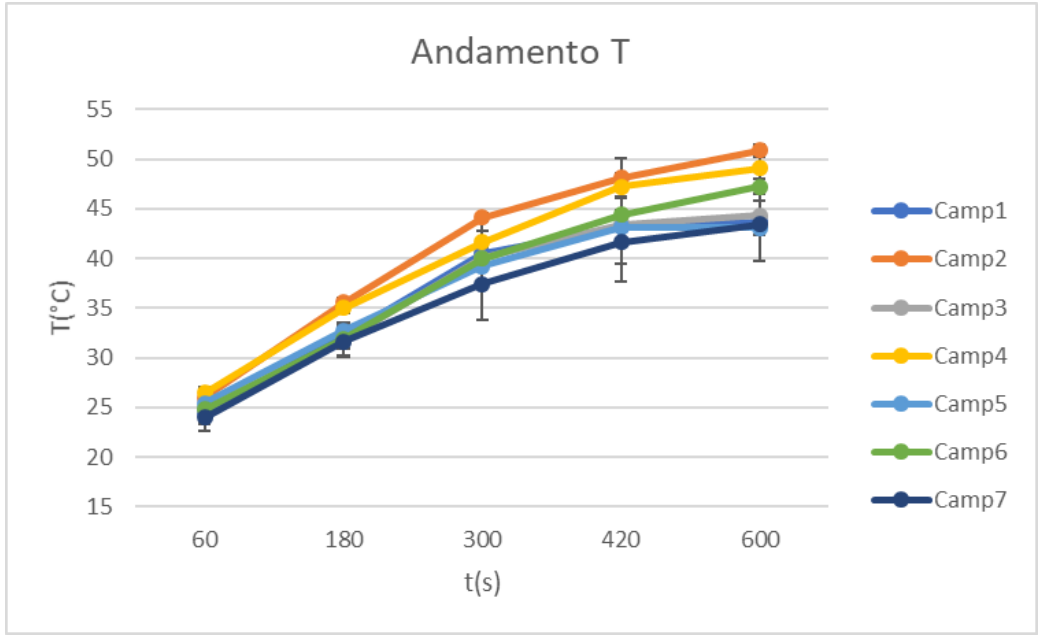
Nei grafici seguenti in Figura 7.9 si riportano l'andamento della temperatura e l'incremento  $\Delta T$  al variare del tempo di esposizione per le due condizioni operative.

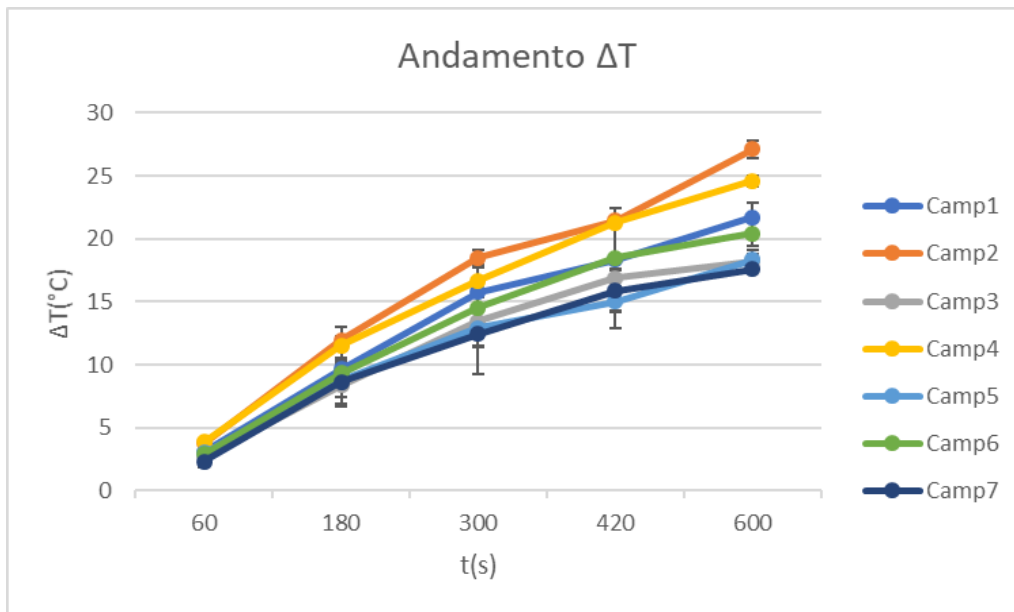
a)





b)



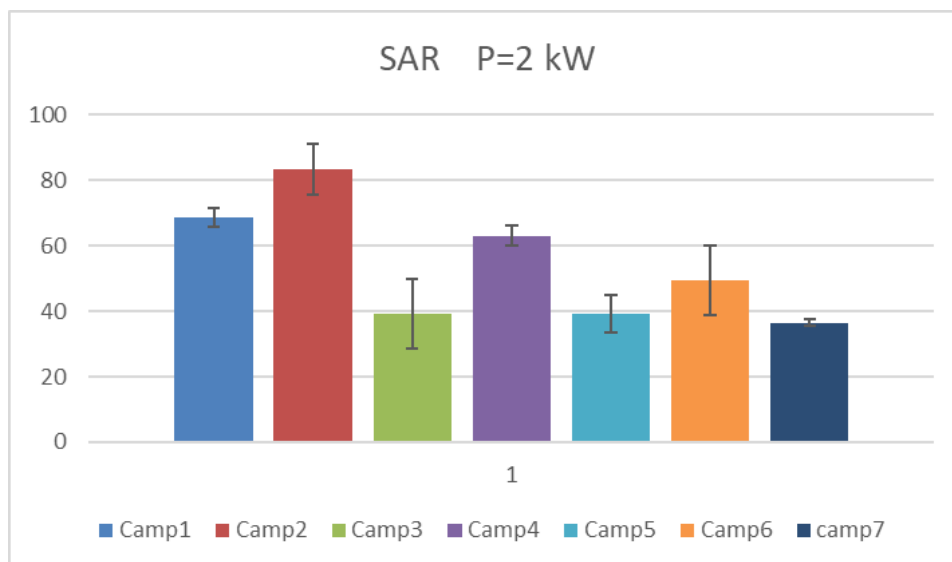


**Figura 7.9-a)** andamento temperatura e  $\Delta T$  per tutte le tipologie di nanoparticelle a  $f=219$  kHz e  $P=2$  kW; b) andamento temperatura e  $\Delta T$  per tutte le tipologie di nanoparticelle a  $f=219$  kHz e  $P = 6$  kW.

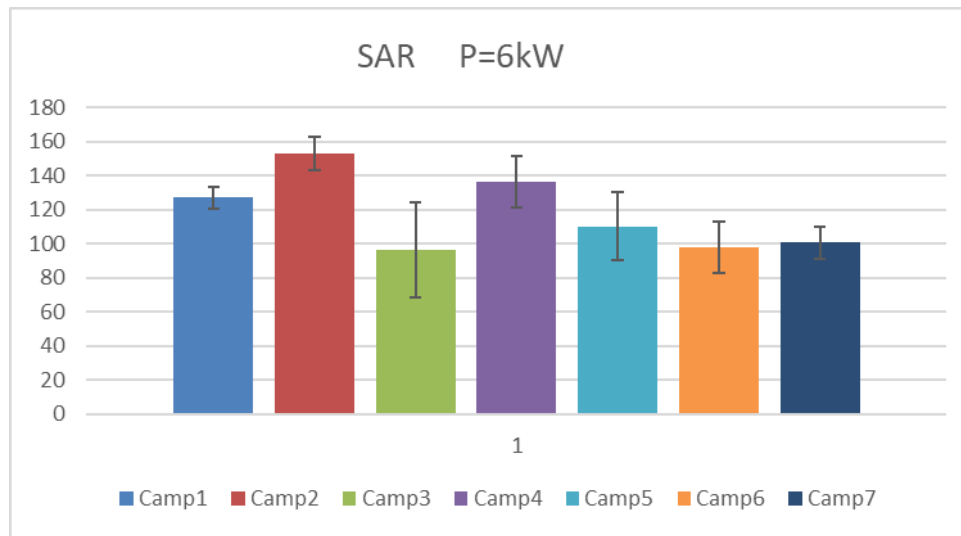
La SAR viene dunque calcolata secondo l'equazione (6.7):

$$SAR = \frac{cm_{fluid}}{m_{particle}} \left( \frac{\Delta T}{\Delta t} \right)_{t=0}$$

a)



b)



**Figura 7.10** -Valori medi di SAR calcolati tenendo conto della deviazione standard per P = 2 kW e P = 6 kW.

Come è facilmente intuibile dai grafici, il riscaldamento in seguito all'esposizione ad un campo magnetico risulta maggiormente efficiente per le nanoparticelle sintetizzate in temperatura. Tale comportamento può essere dovuto alla maggiore dimensione delle nanoparticelle che si ottengono attraverso questa procedura rispetto alla sintesi a temperatura ambiente, anche se le nanoparticelle prodotte seguendo la sintesi base presentano comunque dei buoni risultati in termini di SAR. Infatti, secondo quanto riportato da Deatsch e Evans, (2014) le dimensioni influenzano in maniera significativa il comportamento ad ipertermia delle nanoparticelle, in quanto particelle troppo piccole non sono in grado di raggiungere temperature sufficientemente elevate per lo scopo terapeutico. I migliori risultati, infatti, si ottengono in corrispondenza di una dimensione limite in cui sia il meccanismo di rilassamento di Brown che di Neel sono significativi e che per le magnetiti si aggira intorno ai 20-25 nm in diametro [20].

Ciò che permette di ottimizzare il comportamento magnetico è legato in particolar modo all'accoppiamento efficace tra dimensioni delle nanoparticelle e la frequenza del campo applicato, infatti il valor di SAR presenta un massimo per  $\omega\tau = 1$  e qualsiasi deviazione da tale condizione porta ad una diminuzione del valore di SAR [20] [21]. Quindi, è possibile ottenere nanoparticelle che presentano prestazioni massimizzate opportunamente selezionando la frequenza del campo applicato o controllando le dimensioni durante il processo di sintesi in modo tale che siano compatibili con le condizioni operative applicate.

In seguito ai buoni risultati ottenuti si è pensato di estendere il tempo di trattamento in temperatura per valutare l'effetto sul SAR. La sintesi è stata condotta seguendo la medesima procedura utilizzata per il secondo campione, ma dopo la miscelazione dei due cloruri riscaldati e il trattamento ad ultrasuoni la sospensione è stata mantenuta ad 80°C per 24 ore. Come riportato dai grafici, il valore di SAR pur essendo accettabile risulta significativamente ridotto rispetto alla sintesi base e alla sintesi in temperatura; grazie anche alle indicazioni ottenute dal DLS riguardo al raggio idrodinamico e alle immagini del FESEM si è ipotizzato dunque che il mantenimento ad alta temperatura possa portare alla formazione di particelle di maggiori dimensioni e soprattutto di aggregati di particelle che limitano l'efficacia del riscaldamento e quindi mostrano valori di SAR inferiori.

Per verificare la ripetibilità e confrontare i risultati ottenuti mediante le prove di riscaldamento utilizzando una diversa frequenza e campo applicato, i campioni di nanoparticelle sono stati analizzati anche dal Centro Ricerche Colorobbia (FI) e nella seguente Tabella 7.4 si riportano i risultati ottenuti.

**Tabella 7.4-** Valori di SAR e ILP ottenuti dal Centro Ricerche Colorobbia (FI) per H=22 kA/m e f=186 kHz

Campione	Formulazione	Parametri	
		SAR [W/g]	ILP
1	M+AC (sintesi standard)	107	1,19
2	M+AC 90°C	85	0,94
3	M+AC rapporto 0.6	112	1,24
4	M+AC pH 8.2	80	0,89
5	M+AC pH 11.3	68	0,76
6	M+AC 80°C 24h	164	1,82
7	M+AC sintesi in etanolo	43	0,48

Come è possibile notare dai risultati in tabella non si ha una corrispondenza qualitativa tra i risultati ottenuti per i vari campioni rispetto alle nostre prove. In particolare, in questo caso, le nanoparticelle più promettenti sono le magnetiti ottenute mediante il mantenimento della temperatura per 24 h, mentre il valore di SAR e quindi l'efficienza di riscaldamento per le altre nanoparticelle risulta notevolmente ridotta rispetto alle prove svolte da noi in laboratorio. I campioni numero 1 e 3 mostrano valori nella media, mentre i restanti campioni sono caratterizzati da valori poco promettenti.

Le differenze anche sostanziali tra i risultati ottenuti possono essere riconducibili alle differenti condizioni operative di campo e frequenza utilizzate; in particolare vista l'importanza dell'accoppiamento tra dimensioni e frequenza critica è possibile che il valore di frequenza applicato in queste prove risulta migliore per le dimensioni di altri campioni rispetto a quelle svolte precedentemente.

Successivamente si è tentato di modificare alcuni parametri durante il processo di sintesi, in particolare il rapporto molare e soprattutto il pH. Per quanto riguarda il rapporto molare  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ , seguendo quanto riportato in letteratura, il valore ottimale ricade intorno al range 0.5 -0.6 poiché per valori sensibilmente diversi si hanno dei problemi durante la sintesi che possono inficiare la corretta formazione delle magnetiti in fase di precipitazione, per cui è un parametro su cui si può agire in maniera abbastanza limitata. Infatti, tutte le sintesi sono state condotte in modo tale da avere un rapporto molare R=0,54, tranne per il campione numero 3 in cui il rapporto molare è stato incrementato a 0,6. e in questo caso si è registrato un decremento della SAR.

Più interessante risulta lo studio sul pH, in quanto si è valutato l'effetto di tre diversi valori sulla sintesi delle nanoparticelle. In particolare, si è ottenuto un elevato valore di SAR, paragonabile a quello ottenuto con la sintesi in temperatura, per le particelle tamponate a pH=8,2 mentre all'aumentare del pH i valori diminuiscono drasticamente. Ciò suggerisce che in condizioni di elevata basicità l'efficienza di riscaldamento risulta inferiore, anche perché a pH elevati come nel caso della sintesi tamponata a pH =11,3 le particelle ottenute presentano dimensioni molto ridotte.

Infine, si è cercato di ottenere nanoparticelle con un aspect ratio maggiore ed una morfologia differente da quella sferica, in modo tale da avere magnetiti che fossero caratterizzate da una maggiore anisotropia di forma e quindi una maggiore sensibilità al riscaldamento. Nella procedura operativa si è quindi utilizzato come solvente una soluzione 1:1 di acqua ed etanolo, in quanto tale sostanza favorisce un migliore controllo della cinetica di accrescimento delle nanoparticelle e il possibile ottenimento della morfologia cubica. Non si è ottenuto però tale risultato perché attraverso le immagini del FESEM si nota come le particelle abbiano una forma praticamente sferica e dimensioni relativamente ridotte e siano caratterizzate da valori di SAR poco incoraggianti.

### 7.7 Confronto proprietà nanoparticelle con dati di letteratura

Il SAR dipende dall'ampiezza e dalla frequenza del campo magnetico applicato, quindi al variare delle condizioni operative si ha una variazione del valore di SAR.

Poiché esistono vari setup sperimentali per condurre le prove calorimetriche e gli studiosi applicano le condizioni operative più disparate per valutare il riscaldamento, non si hanno dei dati omogenei riguardo il valore di SAR delle varie nanoparticelle. Inoltre, la mancanza di una procedura standardizzata e riconosciuta circa tale tipologia di caratterizzazione favorisce questa dispersione dei risultati ottenuti. Per ovviare a tale problema, dunque, e per facilitare il confronto tra i dati ottenuti dai vari esperimenti alcuni studiosi oltre al SAR hanno iniziato a utilizzare un nuovo parametro, ILP (Intrinsic Loss Power), ottenuto normalizzando il valore di SAR con il quadrato del campo applicato  $H$  e la frequenza  $f$ . [29]

Nella Tabella 7.5 vengono evidenziati i valori medi di SAR calcolati per tutte le nanoparticelle e i rispettivi valori di ILP.

**Tabella 7.5** -Valori di SAR e ILP calcolati per tutte le nanoparticelle nelle varie condizioni operative.

Formulazione	$SAR^1$ (W/g)	$ILP^1$ (nHm <sup>2</sup> /g)	$SAR^2$ (W/g)	$ILP^2$ (nHm <sup>2</sup> /g)
M + AC Tamb	69	4,87	127	1,01
M + AC T=90°C	83	5,95	153	1,21
M + AC R=0,6	39	2,80	97	0,77
M + AC pH=8,2	63	4,50	136	1,08
M + AC pH=11,3	39	2,80	110	0,87
M + AC T=80°C 24h	49	3,52	98	0,78
M + AC + EtOH	37	2,61	101	0,81

Dove  $SAR^1$  e  $SAR^2$  rappresentano i valori medi di SAR calcolati rispettivamente a  $H=8$  kA/m ( $P=2$ kW) e  $H=24$  kA/m ( $P=6$ kW) e  $f=219$  kHz.

$ILP^1$  e  $ILP^2$  sono i rispettivi valori normalizzati rispetto al campo e alla frequenza utilizzata.

Come riportato da Kallumadil et al., (2009) [29] il nuovo parametro ILP rappresenta una modalità di uniformare i dati ottenuti dalle prove di riscaldamento allo scopo di poter confrontare più agevolmente la capacità di riscaldamento. Le nanoparticelle, infatti, sono spesso testate in condizioni differenti per quanto riguarda sia i parametri relativi al campo magnetico, intensità e frequenza, che la tipologia di strumentazione utilizzata, come la tipologia di generatore e i parametri geometrici del solenoide.

Inoltre, bisogna considerare che l'ILP rappresenta comunque un'approssimazione che dipende dalle restrizioni imposte dalla teoria LRT proposta da Rosensweig, (2002) [7] per la quale il parametro risulta valido; inoltre si ipotizza di essere in condizioni di equilibrio termodinamico e in condizioni adiabatiche. Nonostante ciò attraverso l'intrinsic loss power si cerca di



sottolineare in maniera più specifica la capacità intrinseca delle nanoparticelle di essere impiegate efficacemente per l'ipertermia.

Grazie all'analisi condotta da Kallumadil et al., (2009) [29] è possibile confrontare le proprietà di diverse tipologie di nanoparticelle adatte al trattamento ipertermico. Infatti, tali studiosi hanno analizzato e caratterizzato sedici diverse tipologie di nanoparticelle magnetiche a base di ossidi di ferro già disponibili in commercio e prodotte da tre diverse aziende: Chemicell GmbH, Micromod GmbH e Bayer-Schering Pharma.

Le nanoparticelle, che differiscono per dimensioni, tipologia di architettura (core-shell) e fasi cristalline presenti, sono state analizzate mediante DLS, spettroscopia UV e ICP-AES allo scopo di determinare il raggio idrodinamico, il contenuto in ferro e la tipologia di rivestimenti eventualmente applicati. Sono state condotte anche prove calorimetriche per valutare il SAR e ILP per verificare l'attendibilità delle proprietà dichiarate dalle rispettive case produttrici.

Si riporta la Tabella 7.6 utilizzata da Kallumadil et al., (2009) per mostrare i risultati ottenuti dalla caratterizzazione delle nanoparticelle commerciali [29].

Reference number	Manufacturer	Particle type	Coating	Given hydrodynamic diameter (nm)	DLS hydrodynamic diameter (nm) (PDI)	MPMS crystallite diameter (nm) (PDI)	Given particle concentration (mg/mL)	Given Fe concentration (mg/mL)	ICP-AES measured total Fe concentration (mg/mL)	Intrinsic loss power ILP (nHm <sup>2</sup> /kg)
1	Chemicell	Fluidmag-D	Starch	50	42 (0.13)	9.8 (0.39)	100	50	27.8	1.31
2	Micromod	Nanomag-D-spio	Carboxyl	100	91 (0.13)	11.8 (0.56)	50	5.4	5.9	3.12
3	Micromod	BNF-01908	Carboxyl	60	108 (0.08)	7.7 (0.65)	20	11.4	8.9	0.35
4	Chemicell	Fluidmag-D	Starch	100	109 (0.10)	10 (0.45)	50	37.5	29.8	2.01
5	Chemicell	Fluidmag-D	Starch	200	160 (0.18)	9.6 (0.47)	50	37.5	33.7	1.41
6	Chemicell	Fluidmag-NC-D	Starch	200	177 (0.18)	9.5 (0.18)	80	–	48.2	1.31
7	Chemicell	Fluidmag-NY-D	Starch	200	212 (0.17)	9.6 (0.41)	80	–	37.0	1.53
8	Chemicell	Fluidmag-CMX	Carboxymethyl-dextran	200	220 (0.21)	9.9 (0.45)	200	–	125.4	1.71
9	Micromod	Nanomag-D-spio	Carboxyl	250	346 (0.21)	8.9 (0.43)	50	23.5	22.6	0.37
10	Micromod	BNF-02008	Carboxyl	400	512 (0.14)	7.6 (0.88)	50	11.8	8.1	0.16
11	Bayer-Schering	Resovist	Carboxy dextran	60	61 (0.19)	10.5 (0.67)	–	28	27.8	3.1
12	Micromod	BNF-01708	Carboxyl	80	130 (0.08)	7.1 (0.98)	50	29.7	29.5	0.15
13	Micromod	Nanomag-D-spio	Carboxyl	20	84 (0.15)	11.2 (0.59)	50	6	6.0	2.31
14	Micromod	Nanomag-D-spio	Carboxyl	130	165 (0.05)	8.3 (0.48)	50	25.3	25.1	0.23
15	Chemicell	Fluidmag-D	Starch	50	39 (0.08)	12.6 (0.5)	70	–	14.7	2.67
16	Micromod	BNF-01808	Carboxyl	90	129 (0.12)	8.2 (0.65)	50	32.1	28.0	0.17

**Tabella 7.6-Magnetofluidi commerciali analizzati [29]**

Da questo studio, le particelle migliori in termini di risposta al campo magnetico esterno sono le nanomag-D-100 nm della Micromod per le quali si è trovato un ILP= 3,12 nHm<sup>2</sup>/g, le Resovist della Bayer-Schering con ILP = 3,1 nHm<sup>2</sup>/g, e le fluidmag-D-50 nm che presentano un ILP = 2,67 della Chemicell.

Confrontando tali risultati con i valori di ILP calcolati per le nanoparticelle sintetizzate in laboratorio durante il presente lavoro di tesi, si nota come i valori di ILP ottenuti a P = 2 kW siano paragonabili a quelle delle migliori nanoparticelle commerciali, anzi le particelle sintetizzate a T=90°C risultano superiori in termini di riscaldamento grazie ad un ILP= 5,95, così come le magnetiti ottenute con pH=8,2 o attraverso sintesi base in cui in entrambi i

casi si ottengono valori di  $ILP > 4$ . Ciò a riprova del fatto che per campi magnetici e frequenze relativamente basse si ha una ottima capacità di riscaldamento.

Risultano diversi, invece, i risultati ottenuti per le prove condotte a  $P = 6$  kW. Infatti, i valori di SAR risultano più elevati all'aumentare dell'intensità del campo magnetico applicato come da previsione teorica, ma l'aumento di temperatura risulta più contenuto rispetto all'aumento dell'intensità del campo. Ciò si traduce quindi in una minore efficienza di riscaldamento, ovvero un indice ILP sensibilmente più basso e che si attesta intorno ad 1 per tutte le tipologie di nanoparticelle prodotte.

Inoltre, la conclusione che si può trarre analizzando lo studio condotto da Kallumadil et al., [29] è che nel caratterizzare le MNPs commerciali è necessario adottare un approccio di analisi globale di tutte le proprietà e valutarle indipendentemente per avere un quadro più chiaro dell'influenza di ciascun parametro sul SAR e ILP. È vero che la composizione chimica, il rapporto tra gli ioni ferro presenti e la struttura delle nanoparticelle possono avere degli effetti importanti sulla capacità di riscaldamento, ma il parametro che maggiormente influenza l'aumento di temperatura è la dimensione delle nanoparticelle.

Infatti, si nota come ci sia una dipendenza preponderante dei valori di ILP dal valore di raggio idrodinamico delle MNPs, in quanto i maggiori valori si hanno in corrispondenza dell'intervallo di raggio idrodinamico compreso tra i 70- 100 nm, a cui corrisponde un diametro dei cristalliti di circa 13-20 nm. Per dimensioni inferiori, infatti, non è possibile ottenere un riscaldamento sufficiente ai fine del trattamento ipertermico così come dimostrato in vari studi sperimentali [20] [32].

Inoltre, risulta interessante confrontare i valori di SAR delle nostre nanoparticelle con quelli ottenuti in laboratorio da altri ricercatori, per avere un'idea delle proprietà ottenute e dell'effettivo impiego in ambito terapeutico.

Si fa riferimento, quindi, a quanto riportato nella review da Kolhatkar et al., (2013) [13] in cui vengono riportati i risultati ottenuti da diversi studiosi. Anche in questo documento si afferma che per nanoparticelle magnetiche potenzialmente utilizzabili per ipertermia il parametro preponderante a cui bisogna fare riferimento è la dimensione delle nanoparticelle. Infatti, la generazione di calore presuppone il comportamento superparamagnetico delle nanoparticelle e la capacità di convertire l'energia magnetica assorbita in calore mediante meccanismi di rilassamento di Neel e di Brown.

In particolare, questi studi sono focalizzati a capire l'influenza delle dimensioni sulle costanti di rilassamento per definire il contributo dei due meccanismi, ma non è semplice distinguere dove avviene la divisione anche perché i due meccanismi possono coesistere. Generalmente, il rilassamento di Neel si ha per particelle con dimensioni inferiori ai 20 nm, mentre il rilassamento di Brown è preponderante per nanoparticelle che presentano diametro maggiore di 20 nm. Altri studiosi, come Jeun et al., (2012) [12] tramite diverse prove hanno stabilito che per nanoparticelle di dimensioni inferiori a circa 10 nm i valori di SAR risultano troppo bassi, per cui non è possibile utilizzare queste NPs per l'ipertermia, mentre altri studi hanno analizzato come il valore di SAR possa variare anche di un ordine di grandezza a seguito di limitate variazioni di diametro [11] [33].

In Figura 7.11 viene riportata la tabella in cui sono riassunti i risultati degli studi di vari ricercatori.

Reference	MNP	Size (nm)	SAR/SLP (W/g)	Frequency/amplitude				
Mornet <i>et al.</i> [71]	Single-domain Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> coated with dextran	10–12	210	At 880 kHz and 7.2 kA/m				
	Single-domain Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> coated with carboxymethyl dextran	6–12	90	At 880 kHz and 7.2 kA/m				
	Multi-domain Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	150–200	45	At 880 kHz and 7.2 kA/m				
	Single-domain Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	8	21	At 300 kHz and 6.5 kA/m				
	Single-domain γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5	524	At 500 kHz and 12.5 kA/m				
	Single-domain γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	7	626	At 500 kHz and 12.5 kA/m				
Jean <i>et al.</i> [76]	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	4.2	45	At 110 kHz and 140 Oe				
		5.8	30					
		7.9	28					
		9.8	28					
		11.8	150					
		14.0	201					
		16.5	249					
		20.0	309					
22.5	322							
Mueller <i>et al.</i> [30]	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	10.9	216	At 210 kHz and 30 kA/m				
		15.2	702					
		γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5.3		4			
		6.7	14					
		8.0	37					
		10.2	275					
		16.5	1650					
		Fortin <i>et al.</i> [75]	CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		3.9	40	At 700 kHz and 24.8 kA/m	
					9.1	360		
					γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in 95% water 5% glycerol	7.1		135
					γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in 40% water 60% glycerol	7.1		125
					γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in 0% water 100% glycerol	7.1		100
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> in 95% water 5% glycerol	9.7			420				
Lartigue <i>et al.</i> [77]	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> coated with rhamnose	CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> in 40% water 60% glycerol	9.7	145				
		CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> in 0% water 100% glycerol	9.7	90				
		4.1	0					
		6.7	0					
		10.0	30	At 168 kHz and 21 kA/m				
		16.2	61					
		35.2	76					

Figura 7.11 – Valori di SAR per MNPs di diversa dimensione.[13]

Le migliori nanoparticelle sintetiche per trattamenti di ipertermia studiate in letteratura sono quelle analizzate da Fortin *et al.*,(2007) [32] per le quali si ha un SAR di 1650 W/g a  $f=700$  kHz e  $H=24,8$  kA/m e quelle studiate da Hergt *et al.*,(2004) [34] per cui si è calcolato un SAR di 600 W/g a  $f=410$ kHz e  $H=11,2$  kA/m. I valori normalizzati secondo il parametro ILP sono 3,8 e 11,7  $nHm^2/g$  rispettivamente. I campioni di Fortin hanno una buona corrispondenza con le nanoparticelle commerciali analizzate precedentemente e anche con le nanoparticelle oggetto di indagine della presente tesi. Le MNps studiate da Hergt risultano decisamente migliori. Non è ben chiaro, il motivo di questa grande differenza, anche se bisogna ricordare che quest'ultime nanoparticelle sono caratterizzate da una distribuzione dimensionale molto stretta.

Dalla consultazione degli studi presenti in letteratura si nota che i valori di SAR per le differenti tipologie di nanoparticelle sono molto eterogenei e vari. Ciò dipende, come già affermato, dalla mancanza di una procedura univoca per la caratterizzazione del comportamento a ipertermia, per cui esistono diverse tipologie di strumentazioni sperimentali differenti che operano in diverse condizioni e le nanoparticelle testate vengono sottoposte alle

geometrie di campo più disparate. Si ha, dunque, una notevole dispersione dei dati relativi al SAR, da cui deriva la difficoltà a confrontare la reale efficacia delle MNPs.

Inoltre, bisogna considerare che esistono diversi approcci e metodologie di produzione delle nanoparticelle che differiscono in modo sostanziale tra loro e che conducono a risultati finali diversi.

Ad esempio, attraverso la sintesi per decomposizione termica o in condizioni idrotermali si ha un migliore controllo sulla struttura e sulle dimensioni, mentre per coprecipitazione si tende generalmente ad avere una distribuzione dimensionale piuttosto larga e ciò può influire sulla capacità di riscaldamento.

Alcuni metodi di sintesi sono più adatti ad ottenere nanoparticelle di dimensioni molto ridotte, altri invece permettono di sintetizzare campioni con dimensioni nell'ordine delle centinaia di nanometri; variando opportunamente i parametri operativi è possibile controllare la composizione chimica delle MNPs in modo tale da evitare contaminazioni e/o evitare la formazione di fasi che riducono la risposta al campo applicato; per contro è possibile intervenire sulla risposta magnetica drogando le nanoparticelle attraverso ioni di metalli che presentano un'anisotropia magnetica superiore a quella del Fe per ottenere riscaldamenti più elevati a parità di campo magnetico applicato.

In fine, è possibile funzionalizzare le nanoparticelle con diversi rivestimenti di tipo sia organico che inorganico per migliorare la biocompatibilità e la stabilità in sospensione, o ancora per favorire determinate reazioni biologiche.

In definitiva il confronto delle proprietà di varie nanoparticelle differenti non risulta particolarmente agevole perché, come dimostrato, il comportamento finale a ipertermia dipende da tantissimi parametri e condizioni che possono avere un'influenza più o meno importante, possono verificarsi simultaneamente e possono portare anche effetti contrastanti. È necessario, dunque, fare attenzione a ciascun effetto, e valutare l'influenza sul sistema nel suo complesso.

Ciò che risulta chiaro tuttavia è che il parametro principe per ottimizzare la SAR è la dimensione delle nanoparticelle. Questo perché il volume delle particelle influisce notevolmente nel determinare i meccanismi di rilassamento, i quali a loro volta sono responsabili dell'incremento di temperatura. In particolare, si ha il valore di SAR massimo quando il tempo di rilassamento risulta perfettamente compatibile con la frequenza applicata e la relazione  $\omega\tau = 1$  è soddisfatta.

Qualunque allontanamento da tale condizione porta ad una riduzione del massimo valore di SAR ottenibile.

Per cui diversi studiosi come Khandar et al., (2011) [35], hanno cercato di progettare su misura le dimensioni delle nanoparticelle da accoppiare ad una determinata frequenza applicata.

Dalle equazioni che determinano il tempo di rilassamento totale è quindi possibile determinare non solo quale sia la dimensione ottimale per le nanoparticelle, ma anche valutare l'influenza della viscosità del mezzo di sospensione, della temperatura e della costante di anisotropia magnetica sul riscaldamento finale.

## 8. Conclusioni

Attraverso lo studio e le analisi condotte nel presente lavoro di tesi si è dimostrato che mediante il processo di sintesi per coprecipitazione è possibile produrre nanoparticelle magnetiche che presentano una combinazione di proprietà che le rendono adatte per l'innovativo approccio terapeutico di ipertermia nel trattamento dei tumori. In particolare, dal confronto sia con altre nanoparticelle studiate in letteratura scientifica che dal confronto con prodotti commerciali già disponibili, emerge che le nanoparticelle sintetizzate hanno caratteristiche paragonabili e in alcuni casi migliori dei prodotti già disponibili. In particolare, le MNPs sintetizzate ad una temperatura maggiore rispetto alla temperatura ambiente sono quelle che mostrano i risultati più promettenti.

Infatti, tali campioni di nanoparticelle mostrano una buona risposta magnetica, favorendo così un adeguata capacità di riscaldamento utile allo scopo terapeutico per valori di campo magnetico applicato relativamente contenuti.

Ciò che è importante sottolineare è la possibilità di ottenere prodotti che presentano proprietà specifiche e differenti in base alla variazione dei parametri e della metodologia di sintesi delle nanoparticelle; dunque è possibile progettare *ad hoc* MNPs specifiche e adatte alle condizioni di applicazioni più disparate. Variando il pH, la concentrazione molare dei reagenti, la tipologia di solvente e la temperatura si influisce sul meccanismo di reazione e di precipitazione delle nanoparticelle che possono mostrare dunque proprietà differenti.

Attraverso la procedura sperimentale descritta si ottengono particelle superparamagnetiche, che quindi, grazie all'effetto quantico dimensionale, sono caratterizzate da valori di suscettività magnetica più elevata rispetto alla corrispondente magnetite bulk insieme al vantaggio di non presentare una magnetizzazione residua dopo la cessata esposizione al campo magnetico, cosa di fondamentale importanza per evitare effetti collaterali ai pazienti curati secondo questa terapia. Attraverso il controllo di tutti i parametri è possibile determinare una specifica composizione chimica, per evitare o quantomeno di ridurre al minimo la presenza di agenti inquinanti o impurezze e la formazione di fasi che riducono l'efficienza di riscaldamento, come ad esempio l'ematite.

Il parametro più importante è la dimensione delle nanoparticelle e in particolare la distribuzione dimensionale delle stesse. Secondo quanto riportato da Hergt et al., 2004 [34], i migliori valori di SAR si hanno per nanoparticelle che sono caratterizzate da una distribuzione dimensionale stretta. Da questo punto di vista, la sintesi per coprecipitazione risulta limitata poiché non si riesce ad avere un controllo molto accurato delle dimensioni e le nanoparticelle in fase di precipitazione tendono a formare aggregati, per cui le particelle ottenute tramite questa via di sintesi sono sempre caratterizzate da un certo indice di polidispersione. Questo parametro indica che durante il processo di sintesi non è possibile ottenere particelle perfettamente uguali in termini di dimensioni e che quindi ci sarà una certa dispersione di risultati ottenuti. Bisogna quindi cercare di mantenere un indice di polidispersione basso, in quanto all'aumentare di tale parametro corrisponde un decremento della SAR a dimostrazione del fatto che si hanno nanoparticelle con valori dimensionali troppo differenti e quindi una distribuzione dimensionale molto larga.

Le dimensioni delle nanoparticelle ottimali devono rientrare all'interno di un range di alcune decine di nanometri; sono varie le motivazioni che impongono tale tipologia di limitazione.

Innanzitutto, bisogna garantire che le nanoparticelle si trovino in stato superparamagnetico, e ciò avviene solamente se si raggiunge lo stato di magnetizzazione a singolo dominio che avviene al di sotto di una dimensione critica che generalmente per la magnetite si stima essere intorno ai 30 nm. Ai fini dell'applicazione in vivo, è necessario che le nanoparticelle possano

essere facilmente ed opportunamente somministrate ai pazienti mediante iniezione endovenosa e similari, per cui devono avere dimensioni tali da poter essere veicolate dal flusso sanguigno circolatorio senza costituire pericolo di embolizzazione o endocitosi da parte dei macrofagi. Inoltre, controllando le dimensioni, è possibile garantire un adeguato tempo di circolazione delle nanoparticelle all'interno dell'organismo ed evitare che si concentrino in organi quali fegato e reni. Infatti, tali organi possono essere considerati come "barriere di protezione" da agenti esterni in cui può verificarsi un accumulo di MNPs e successiva metabolizzazione delle magnetiti che in questo modo non possono svolgere alcun effetto terapeutico.

Dal punto di vista dell'ipertermia, l'incremento di temperatura dipende dalla conversione dell'energia magnetica in calore mediante i meccanismi di rilassamento di Neel and Brown che, come dimostrato ampiamente nella sezione 5, dipendono fortemente dal volume delle nanoparticelle e si ipotizza che valori di SAR massimi si ottengono per le dimensioni limite in cui entrambi i fenomeni si verificano e che per le nanoparticelle di magnetite si aggira intorno ai 20 nm in diametro. Inoltre, bisogna ricordare che per ottenere il SAR massimo bisogna principalmente fare riferimento all'accoppiamento tra frequenza del campo applicato e dimensioni delle nanoparticelle, per cui bisogna applicare correttamente le adeguate condizioni di trattamento perché MNPs perfettamente identiche possono dare origine a risultati molto differenti tra loro.

In ultima analisi, in questo lavoro di tesi l'attenzione è stata focalizzata sullo studio dei processi di sintesi per coprecipitazione poiché rappresenta il metodo più semplice ed immediato per la produzione di nanoparticelle che presentano una buona combinazione di proprietà, facilità e velocità di realizzazione e scalabilità anche per produzioni industriali, ma sono presenti dei limiti che possono essere superati adottando metodologie più sofisticate. Inoltre, lo scopo principale dell'attività sperimentale è stato incentrato sulla comprensione e lo studio dei meccanismi chimico-fisici che determinano la risposta magnetica delle nanoparticelle e sulla valutazione dell'influenza che i diversi parametri di sintesi esercitano sulle proprietà macroscopiche delle stesse. Infatti, lo scopo principale è l'ottimizzazione di un processo di produzione relativamente semplice variando le condizioni operative secondo un'attenta analisi e di correlare l'effetto macroscopico a tali modifiche attraverso una caratterizzazione adeguata.

Per contro, si è tralasciata la caratterizzazione della risposta delle MNPs prodotte durante l'effettiva applicazione *in vivo* in ambito terapeutico poiché, anche in letteratura scientifica, risulta un aspetto ancora poco studiato, e negli ultimi anni la ricerca sta proseguendo lungo questa strada visto anche le difficoltà presenti nel determinare effettivamente la corrispondenza tra i risultati ottenuti dai test sui materiali in laboratorio in condizioni ideali e quelli ottenuti durante la terapia. Di fatti, bisogna considerare che i valori di SAR e più in generale le proprietà delle nanoparticelle possono essere fortemente influenzati dalle condizioni fisiologiche presenti all'interno dell'organismo. La risposta al trattamento può cambiare in base alle interazioni biologiche e biochimiche che si sviluppano tra le MNPs e l'organismo, che dipendono anche dalle caratteristiche fisiologiche del tumore quali la tipologia di cancro, la sua estensione e gravità, la localizzazione all'interno dell'organismo, le difficoltà di accesso per introdurre le nanoparticelle o per sottoporre il paziente al campo magnetico adeguato per il trattamento. Sono tutte condizioni che portano ad avere risultati anche molto differenti rispetto a quelli ottenuti in laboratorio e che bisogna considerare, anche perché a parità di condizioni è possibile che i valori di SAR ottenibili *in vivo* siano inferiori a quelli teorici. Tutto ciò rappresenta motivo di ulteriore studio e approfondimento da parte della comunità scientifica, affinché si possa procedere all'effettiva applicazione su ampia

scala di tale metodologia di trattamento che, nonostante tutto è stata già individuata come un approccio molto promettente da affiancare alle altre terapie più diffuse per migliorare l'efficacia del trattamento tumorale e limitare gli effetti collaterali dei pazienti.





## Bibliografia

- [1] Idrees M. and Zechariah Jebakumar A., 2014, A review on potential benefits of hyperthermia in the treatment of cancer. *Acta Biomedica Scientia*, **1**(3),98-104.
- [2] Gray L.H., Conger A.D., Ebert M., Hornsey S. and Scott O.C., 1953, The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br.J. Radiol.* **26**,638 -648
- [3] Jordan B. F. and Sonveaux P., 2012, Targeting tumor perfusion and oxygenation to improve the outcome of anticancer therapy. *Front. Pharmacol.* **3**, 94
- [4] Goya G. F., Grazu V. and Ibarra M.R., 2008, Magnetic nanoparticles for cancer therapy. *Current Nanoscience*, **4**(1), 1-16.
- [5] Marchesi G.,1999, *Materiali per l'ingegneria elettrica*. Libreria Progetto, Padova.
- [6] Koksharov Y.A., 2009, Magnetism of nanoparticles: Effects of size, shape and interactions. In *Magnetic Nanoparticles*, 1<sup>st</sup> ed.; Gubin S.P., Wiley-VCH: Berlin, Germany, 228-229.
- [7] Rosensweig R.E, 2002, Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **252**, 370-374.
- [8] Trindade T., 2011, Biofunctional composites of polysaccharides containing inorganic nanoparticles. *Advances in Nanocomposites Technology*, **12**, 273-299.
- [9] Laurent S., Dutz S., Hafeli U.O. and Mahmoudi M., 2011, Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in colloid and interface Science*, **166**,8-23.
- [10] Colucci M.,2012, Proprietà delle particelle magnetiche per applicazione mediche. Tesi di laurea, Università degli studi di Padova.
- [11] Lartigue L., Innocenti C., Kalaivani T., Awwad A., Sanchez Duque M., Guari Y., Larionova J., Guerin C., Montero J.L.G., Barragan-Montero V., Arosio P., Lascialfari A., Gatteschi D. and Sangregorio C. Water-dispersible sugar coated iron oxide nanoparticles. An evaluation of their relaxometric and magnetic hyperthermia properties, *J.Am.Chem.Soc.*, **133**(27),10459-10472.
- [12] Jeun M., Lee S., Kang J., Tomitaka A., Kang K., Kim Y., Takemura Y., Chung K., Kwak J. and Bae S., 2012, Physical limits of pure superparamagnetic  $Fe_3O_4$  nanoparticles for a local Hyperthermia agent in nanomedicine. *Appl. Phys. Lett.*, **100**, 092406:1-092406:4.
- [13] Kolhatkar A.G., Jamison A.C, Litvinov D., Willson R.C. and Lee T.R.,2013, Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *Int.J.Mol.Sci.* **14**, 15977-16009.
- [14] Di Corato R., Espinosa a., Lartigue L., Tharaud M., Chat S., Pellegrino T., Menager C., Gazeau F. and Wilhelm C.,2014, Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials*, **35**,6400-6411.
- [15] Iacovita C., Florea A., Dudric R., Pall E., Moldovan A.I., Tetean R., Stiuftuc R. and Lucaci C.M.,2016, Small versus large iron oxide magnetic nanoparticles: hyperthermia and cell uptake properties. *Molecules*, **21**,1357-1368.
- [16] Khot V.M., Salunkhe A.B., Ruso J.M. and Pawar S.H., 2015, Improved magnetic induction Heating of nanoferrites for hyperthermia applications: Correlations with colloidal stability and magneto-structural properties. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **384**,315-343.
- [17] Li Z., Kawashita M., Araki N., Mitsumori M., Hiraoka M. and Doi M., 2010, Magnetite nanoparticles with high heating efficiencies for application in the hyperthermia of cancer. *Materials science and Engineering C*, **30**,990-996.

- [18] Gonzalez-Fernandez M.A., Torres T.E., Andrès-Vergès M., Costo R., de la Presa P., Serna C.J., Morales M.P., Marquina C., Ibarra M.R. and Goya G.F., 2009, Magnetic nanoparticles for power absorption: Optimizing size, shape and magnetic properties. *Journal of Solid State Chemistry*, **182**, 2779-2784.
- [19] Krause J.K., Wang V. and Dodrill B.C, 1996, *Magnetic property characterization system employing a single sensing coil arrangement to measure both AC susceptibility and DC magnetization*. U.S. Patent US 005506500A.
- [20] Deatsch A. and Evans B.A., 2014, Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **354**,163-172.
- [21] Shaterabadi Z., Nabiyouni G. and Soleymani M.,2018, Physics responsible for heating efficiency and self-controlled temperature rise of magnetic nanoparticles in magnetic hyperthermia therapy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **133**, 9-19.
- [22] Neel L.,1949, Theorie du trainage magnetique et des ferromagnetiques en grains fins avec applications aux terres cuites. *Ann.Geophys.*, 5, 99-136.
- [23] Brown W.F, 1963, Thermal fluctuations of a single domain particle. *Phys.Rev.*,**130**, 1677-1686.
- [24] del Pino P. and Pelaz B.,2012, Hyperthermia using inorganic nanoparticles.In: Jesus M.d.l.F., Grazu V., (Eds.), *Frontiers of Nanosciences*, Elsevier, 309-335.
- [25] Zeisberger M., Dutz S., Muller R., Hergt R., Matoussevitch N. and Bonnemann H.,2007, Metallic cobalt nanoparticles for heating applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **311**,224-227.
- [26] Skumiel A.,2007, Suitability of water based magnetic fluid with  $CoFe_2O_4$  particles in hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **307**,85-90.
- [27] Bekovic M. and Hamler A., 2010, Determination of the heating effect of magnetic fluid alternating magnetic field. *IEEE transactions on magnetics*,**46**,552-556.
- [28] Suto M., Hirota Y., Mamiya H., Fujita A., Kasuya R., Tohji K. and Jeyadevan B.,2009, Heat dissipation mechanism of magnetite nanoparticles in magnetic fluid hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **321**, 1493-1496.
- [29] Kallumadil M., Tada M., Nakagawa T., Abe M., Southern P. and Pankhurst Q.A.,2009, Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **321**, 1509-1513.
- [30] Hergt R. and Dutz S., 2007, Magnetic particle hyperthermia-Biophysical limitations of a visionary tumor therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **311**, 187-192.
- [31] Wang X., Gu H. and Yang Z., 2005, The heating effect of magnetic fluids in an alternating magnetic field. *Journal of Magnetism of Magnetic Materials*, **293**, 334-340.
- [32] Fortin J.P., Wilhelm C., Servais J., Menager C., Bacri J.C. and Gazeau F.,2007, Size -sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *Journal of Solid State Chemistry*,129,2628-2635 .
- [33] Gonzales-Weimuller M., Zeisberger M. and Krishnan K., 2009, Size-dependant heating rates of iron oxide nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **321**, 1947-1950.
- [34] Hergt R.,Hiergeist R., Hilger I., Kaiser W.A., Lapatrikov Y., Margel S. and Richter U., 2004, Maghemite nanoparticles with very high AC-losses for application in RF-magnetic hypethermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **270**(3), 345-357.
- [35] Khandar A.P., Ferguson M.R., Simon J.A. and Krishnan K. M.,2011, Tailored magnetic nanoparticles for optimizing magnetic fluid hyperthermia. *J.Biomedical. Mater.Res.A.*, **1007**, 728-737.