

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

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

Tesi di Laurea Magistrale

**Compositi con proprietà magnetiche ottenuti da
matrici zeolitiche per la “detection” di
biomolecole**



Relatrice
Barbara Bonelli

Correlatrice
Serena Esposito

Candidato
Giulia Di Francesco

Luglio 2018

Indice

Introduzione	1
1. L'estrazione di DNA: passato, presente e futuro	3
1.1 L'acido desossiribonucleico	3
1.2 La separazione del DNA.....	4
1.2.1 Metodi convenzionali.....	5
1.2.2 Metodi innovativi.....	6
1.3 Operazioni post-estrazione	10
1.4 L'uso di nanoparticelle magnetiche in applicazioni biomediche	12
1.5 La zeolite	13
1.5.1 Caratteristiche	13
1.5.2 Zeoliti naturali.....	15
1.5.3 Zeoliti sintetiche.....	15
1.5.4 Proprietà.....	17
2. Materiali	19
2.1 Il processo produttivo	19
2.1.1 Il processo di scambio ionico.....	20
2.1.1.1 Processo di scambio cationico dei campioni FeA8sc.750°C-2h, FeX5sc750°C-2h e FeX5sc750°C-2h_crogiolo	20
2.1.1.2 Processo di scambio cationico del campione (H,Fe)A18sc.600°C-1,5h.....	21
2.1.2 I trattamenti in atmosfera riducente dei campioni FeA8sc.750°C-2h, FeX5sc750°C-2h e FeX5sc750°C-2h_crogiolo.....	22
2.1.2.1 Trattamento termico FeA8sc	23
2.1.2.2 Trattamento termico FeX5sc	23
2.1.3 Il trattamento in atmosfera riducente del campione (H,Fe)A18sc.600°C-1,5h	23
2.1.4 Il campione FeA8sc.750°C-2h_macinato	24
3. Tecniche di caratterizzazione dei materiali	25
3.1 Spettroscopia di assorbimento atomico	25
3.1.1 Principi fisici.....	25
3.1.2 Apparato strumentale	25
3.1.3 Procedura sperimentale.....	26
3.2 Adsorbimento/desorbimento di N ₂ a -196 °C.....	27
3.2.1 Principi fisici.....	27
3.2.2 Apparato strumentale	28

3.2.3 Procedura sperimentale	29
3.3 Diffrazione di raggi X.....	30
3.3.1 Principi fisici.....	30
3.3.2 Apparato strumentale	31
3.3.3 Procedura sperimentale	33
3.4 Mobilità elettroforetica e determinazione del potenziale zeta (ζ)	34
3.4.1 Principi fisici.....	34
3.4.2 Apparato strumentale	36
3.4.3 Procedura sperimentale	36
3.5 Sedimentazione differenziale centrifuga	37
3.5.1 Principi fisici di base.....	37
3.5.2 Apparato strumentale	38
3.5.3 Procedura sperimentale	39
3.6 Proprietà magnetiche	40
3.6.1 Magnetometro a campione vibrante.....	40
3.7 PCR (polymerase chain reaction) e quantitative Real Time-PCR.....	41
3.7.1 PCR.....	41
3.7.2 Real Time-PCR.....	43
3.8 Estrazione DNA.....	45
4. Risultati Sperimentali.....	49
4.1 Spettroscopia di adsorbimento atomico.....	49
4.2 Adsorbimento/desorbimento di N ₂ a -196 °C.....	50
4.3 XRD.....	52
4.4 Mobilità elettroforetica e determinazione del potenziale zeta (ζ)	54
4.5 Sedimentazione differenziale centrifuga	56
4.6 Proprietà magnetiche	59
4.7 Estrazione DNA e Real-Time PCR	60
5. Conclusioni.....	71
Lista dei simboli	73
Bibliografia.....	75
Ringraziamenti	78

Introduzione

L'estrazione di biomolecole, in particolare di DNA (acido desossiribonucleico) e RNA (acido ribonucleico), è di estrema importanza in campo biochimico, in quanto senza questo passaggio preliminare sarebbe impossibile effettuare operazioni quali amplificazione di acidi nucleici, sequenziamento, clonaggio, etc.

Le metodologie di estrazione tradizionalmente usate comportano numerose serie di lavaggi, precipitazioni e centrifugazioni, che fanno sì che l'isolamento di acidi nucleici sia un'operazione lunga e difficoltosa, che dev'essere eseguita da un operatore esperto. Per questo motivo negli ultimi decenni sono stati proposti metodi di estrazione innovativi, tra cui separatori magnetici in fase solida che permettono di semplificare notevolmente la procedura di estrazione ed evitare qualsiasi tipo di danneggiamento delle catene.

Questo lavoro di tesi consiste nella realizzazione e nella caratterizzazione di compositi metallo-ceramici con proprietà magnetiche che hanno la funzione di estrarre DNA ed altre biomolecole da campioni di fluidi biologici. L'obiettivo è quello di creare un prodotto per la separazione di DNA economico e che dia risultati di estrazione comparabili ai separatori di DNA attualmente in commercio. Il lavoro è stato svolto in collaborazione con l'Università degli studi di Cassino.

Questi compositi sono stati creati a partire da due diversi tipi di zeolite commerciale, la zeolite X e la zeolite A, le quali sono state sottoposte ad un processo di scambio ionico con cationi di NH_4^+ e/o Fe^{2+} . Le due zeoliti sono state in seguito trattate termicamente a temperature relativamente basse in atmosfera riducente per ottenere la riduzione degli ioni fino al raggiungimento del numero di ossidazione 0.

Durante questo trattamento, la struttura cristallina della zeolite viene pressoché distrutta e il risultato finale è un composito formato da nanoparticelle di ferro disperse su una matrice amorfa di silice e allumina. L'unica caratteristica rimanente delle zeoliti, che è individuabile nel composito formato, è una certa percentuale di porosità residua, utile nell'adsorbimento di DNA [1].

I materiali in esame, dopo essere stati caratterizzati, sono stati testati ed è stata valutata la resa di DNA estratto confrontandola con i risultati ottenuti utilizzando particelle magnetiche Chemicell, costituite da un "core" di maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e un rivestimento di silice.

Poiché durante la procedura di estrazione si sono verificati problemi correlati alle dimensioni eccessive delle particelle del nanocomposito, è stata inoltre studiata una soluzione per ridurre la loro taglia.

Nel primo capitolo verranno introdotti brevemente l'acido desossiribonucleico e i più comuni metodi di estrazione di DNA che vengono attualmente utilizzati; inoltre, verranno illustrati i principali utilizzi delle particelle magnetiche in ambito biomedico e verranno approfondite le caratteristiche e le proprietà principali delle zeoliti che sono state utilizzate come precursore del composito.

Nel secondo capitolo verranno descritti i materiali utilizzati in questo lavoro di tesi e verranno spiegate le loro procedure di realizzazione.

Nel terzo capitolo verranno descritte le tecniche utilizzate per la caratterizzazione dei compositi metallo-ceramici: la spettroscopia di assorbimento atomico, l'adsorbimento/ desorbimento di N_2 a $-196\text{ }^\circ\text{C}$, la diffrazione di raggi X, la mobilità elettroforetica la determinazione del

potenziale zeta, le tecniche PCR e PCR real-time e la valutazione della magnetizzazione. Inoltre, verranno illustrate le procedure utilizzate per effettuare l'estrazione di DNA.

Nel quarto capitolo verranno illustrati i risultati sperimentali ottenuti dalle varie analisi eseguite sui campioni al fine di ricavare informazioni relative a quantità di cationi presenti nelle diverse matrici zeolitiche, area superficiale e volume dei pori, composizione, potenziale zeta, magnetizzazione. Verrà inoltre descritto il comportamento dei compositi nell'estrazione di DNA.

Nel quinto capitolo verranno espone le conclusioni.

1. L'estrazione di DNA: passato, presente e futuro

1.1 L'acido desossiribonucleico

L'acido desossiribonucleico (DNA) fu isolato per la prima volta nel 1869, da Friedrich Miescher, e fu caratterizzato nel 1953 da James Watson e Francis Crick, che ne rivelarono l'intera struttura secondo il modello a doppia elica.

Il DNA è un polimero a carattere acido con struttura a doppia elica costituito da due catene di monomeri, detti nucleotidi, legate tra di loro da legami covalenti, come mostrato in figura 1.1.

Ogni filamento di DNA è costituito da una sequenza di nucleotidi, ciascuno dei quali è formato da una base azotata legata ad uno zucchero pentoso, il desossiribosio, che a sua volta forma un legame con un gruppo fosfato.

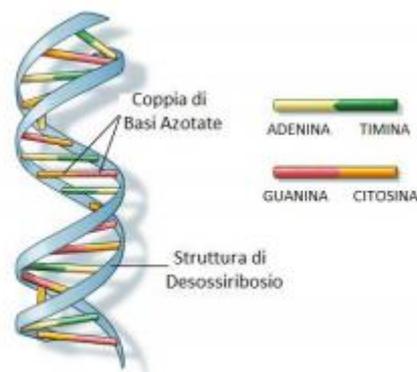


Figura 1.1: figura tratta da [2] con modifiche, illustrazione della struttura del DNA in cui viene evidenziata la doppia elica e la presenza di due catene legate tra di loro da coppie di basi azotate.

Le basi azotate permettono il legame tra le due catene e quelle presenti nel DNA sono quattro: due purine, adenina (A) e guanina (G), e due pirimidine, timina (T) e citosina (C), le quali si combinano tra di loro mediante legami a idrogeno ma solo con interazioni specifiche: la timina, infatti, si lega solo all'adenina con due legami a idrogeno e la guanina si lega solo alla citosina con tre legami a idrogeno, come evidenziato in figura 1.2.

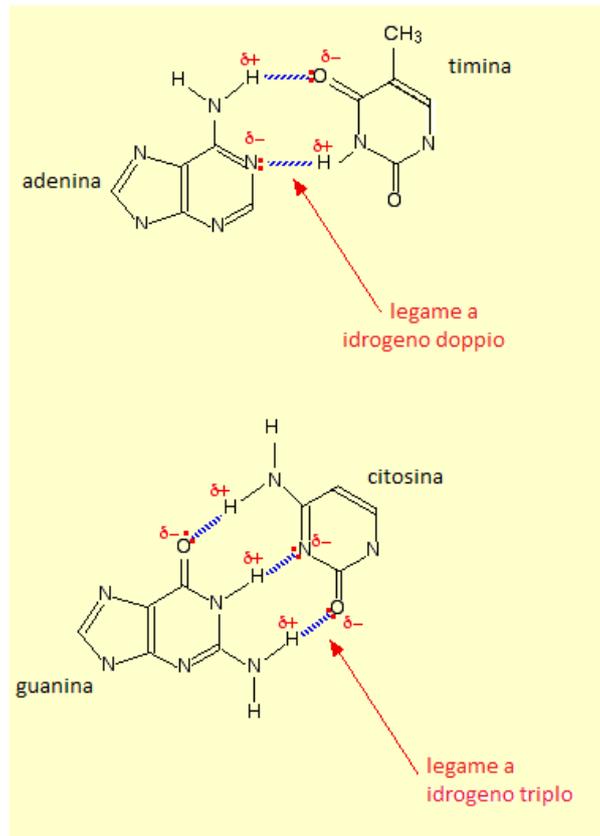


Figura 1.2: figura tratta da [2] con modifiche, rappresentazione delle 4 basi azotate del DNA e dei rispettivi legami a idrogeno che si instaurano tra le due coppie guanina-citosina e adenina-timina.

A causa della sua conformazione, il DNA risulta costituito da due parti con comportamenti opposti: la parte interna alla doppia elica, formata dalle basi azotate, ha un comportamento idrofobico, mentre la parte esterna, costituita dai gruppi fosfati che hanno carica negativa, è solubile in acqua.

Un'altra caratteristica del DNA dovuta alla sua struttura è la sua fragilità, dovuta ad un grande squilibrio dimensionale tra lunghezza e diametro, che lo rende soggetto a probabili rotture durante la sua manipolazione.

Il DNA umano ha una diversa organizzazione rispetto al DNA batterico: negli eucarioti, infatti, il DNA si dispone all'interno del nucleo della cellula e si organizza in particolari strutture dette cromosomi, esso è mantenuto in una conformazione ordinata da diverse proteine quali istoni, condensine e coesine; nei procarioti, invece, il DNA è generalmente arrotolato su stesso all'interno della cellula ed è disposto in modo tale da occupare il minor spazio possibile. [3] [4]

1.2 La separazione del DNA

L'isolamento di DNA o RNA (acido ribonucleico), che può essere effettuato a partire da qualsiasi materiale biologico come ad esempio tessuti, cellule eucariotiche o procariotiche e virus, è un procedimento che riveste un ruolo centrale in biologia molecolare, poiché è il punto di partenza di molte analisi diagnostiche e biochimiche.

Per la separazione del DNA e del RNA vengono utilizzati diversi metodi, che vengono scelti in base al tipo di campione di partenza, al tipo di acido nucleico che si desidera estrarre e alla concentrazione di DNA o RNA finale desiderata, e possono essere classificati come convenzionali o innovativi.

Alla fine di ogni tipo di estrazione effettuata i valori che vengono analizzati per valutare l'efficacia dell'operazione sono due: resa, ovvero la quantità di acido nucleico estratto, e purezza, ovvero la presenza quantitativa di contaminanti quali proteine, lipidi, etc.

1.2.1 Metodi convenzionali

Per quanto riguarda i metodi convenzionali, affinché l'estrazione di DNA o RNA abbia successo sono generalmente necessari 4 passaggi:

1. la lisi delle cellule da cui si intende estrarre l'acido nucleico, che può essere effettuata per via chimica, meccanica o enzimatica; questo è un passaggio molto delicato in quanto bisogna rompere la membrana cellulare senza alterare gli acidi nucleici da analizzare che sono molto fragili;
2. l'inattivazione delle nucleasi che possono danneggiare l'acido nucleico che si vuole estrarre, in particolare viene inattivata l'RNasi se si vuole estrarre RNA e la DNasi se si vuole estrarre DNA;
3. la separazione dell'acido nucleico da contaminanti quali proteine, lipidi, carboidrati o altri acidi nucleici, che può essere effettuata mediante diverse metodologie;
4. la precipitazione in forma solida dell'acido nucleico, generalmente effettuata in alcol etilico o propanolo in cui non è solubile.

Le metodologie più comunemente utilizzate per svolgere questa operazione sono basate su un'estrazione di tipo liquido-liquido e sono le seguenti:

- a) Estrazione con fenolo-cloroformio-alcol isoamilico: questa tecnica sfrutta la diversa solubilità di DNA e contaminanti tra due fasi immiscibili e prevede l'utilizzo di solventi organici che permettono la separazione dell'acido nucleico da macromolecole quali lipidi, proteine e carboidrati. A questo passaggio di separazione seguono una precipitazione del DNA in alcol etilico e una centrifugazione che permette di separare l'acido nucleico dalla soluzione acquosa, seguite a loro volta da un lavaggio in etanolo e da un'ulteriore centrifugazione.
Questo tipo di separazione permette di ottenere una resa elevata con costi molto bassi ma prevede l'utilizzo di sostanze dannose e implica numerosi passaggi.
- b) Estrazione alcalina: è uno dei primi e dei più semplici metodi scoperti per isolare il DNA. In questo tipo di separazione vengono utilizzate soluzioni acquose contenenti sostanze alcaline per far avvenire la lisi cellulare, che provoca, oltre alla rottura delle cellule, anche una denaturazione delle proteine da cui il DNA viene separato grazie ad operazioni di centrifugazione; gli svantaggi principali di questa tecnica consistono nell'elevata probabilità di degradazione del DNA stesso e nel fatto che la lisi alcalina non è efficace su ogni tipo di cellula.
- c) Separazione indotta da un'elevata concentrazione salina: è un metodo che sfrutta la bassa solubilità di proteine e altri contaminanti in alte concentrazioni di sali, quali ad esempio acetato di potassio o acetato di ammonio, che provocano la loro precipitazione e permettono, dunque, di effettuare la separazione dopo uno o più passaggi di centrifugazione; nonostante questo metodo permetta di eseguire operazioni di separazione in modo semplice e veloce esso genera DNA di scarsa purezza.

- d) Centrifugazione a gradiente di CsCl: è un metodo di separazione di tipo fisico che sfrutta differenze di densità, ma è molto complicato e laborioso se paragonato agli altri metodi esistenti. [5] [5.1]

Queste metodologie, pur essendo efficaci, hanno diversi svantaggi, primo fra tutti la necessità di effettuare una lunga serie di precipitazioni e lavaggi, come mostrato in figura 1.3, che sono laboriosi da eseguire ed incrementano il rischio di perdita di informazioni o di contaminazioni incrociate, specialmente nel caso in cui si lavori su più campioni contemporaneamente, e di degradazione del DNA o del RNA a causa delle forze di taglio esercitate dalle centrifugazioni. Inoltre, questi metodi non sono adattabili a processi di automazione.

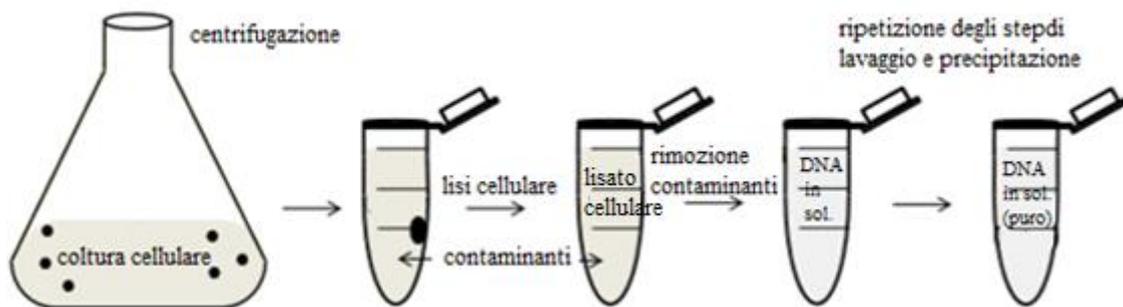


Figura 1.3: figura tratta da [5] con modifiche, illustrazione dei passaggi da eseguire durante una separazione effettuata con metodologie tradizionali

Per tutti i motivi precedentemente elencati, è nata la necessità di creare una nuova metodologia di separazione degli acidi nucleici.

1.2.2 Metodi innovativi

- Separatori in fase solida

Questi separatori sono stati utilizzati per la prima volta negli anni '80 e vengono generalmente utilizzati nei kit adibiti all'estrazione di DNA, sono utilizzabili su vasta scala e non solo in laboratorio poiché consentono di effettuare questo passaggio in modo semplice e veloce.

In questo caso la separazione viene effettuata in una colonna di rotazione e si basa sull'adsorbimento reversibile degli acidi nucleici su di un supporto solido a determinati valori di pH e di concentrazioni dei sali contenuti nei buffer.

I principi su cui si basa l'adsorbimento sono differenti e variano in base alla metodologia che si sceglie di utilizzare, ma possono essere sintetizzati in tre tipologie: legami ad idrogeno su matrici idrofiliche in condizioni caotropiche, scambio ionico in soluzione acquosa per mezzo di uno scambiatore anionico e meccanismi di esclusione dimensionale.

I passaggi che vengono eseguiti sono i seguenti: lisi delle cellule, che avviene prima dell'inserimento del materiale in analisi nella colonna, miscelazione della soluzione contenente l'acido da estrarre con il supporto solido e conseguente adsorbimento degli acidi nucleici su di esso dopo un tempo adeguato, lavaggio, eseguito con particolari buffer con lo scopo di eliminare eventuali sostanze indesiderate adsorbite sul supporto

solido, ed eluizione, che permette il rilascio dell'acido nucleico dal sito di adsorbimento, come mostrato in figura 1.4. Generalmente, durante i passaggi di lavaggio ed eluizione, sono comunque richiesti veloci passaggi di centrifugazione, filtrazione o separazione in colonna.

Prima di effettuare questi passaggi è comunque opportuno inserire un buffer nella colonna a determinati pH in modo da ottenere una trasformazione dei gruppi funzionali presenti sul supporto solido che sia favorevole all'interazione con l'analita da estrarre.

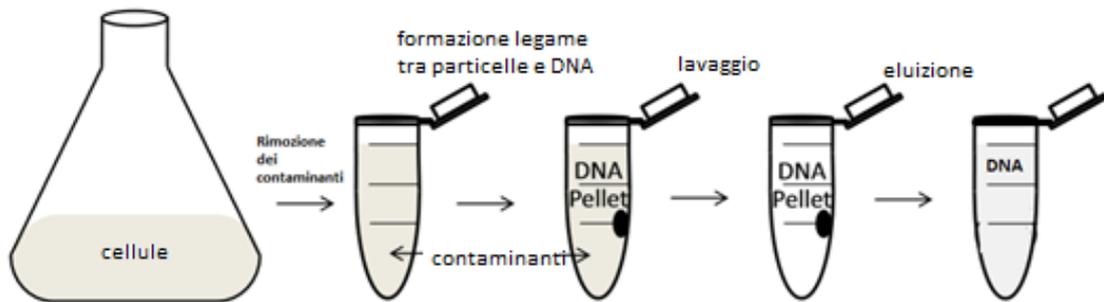


Figura 1.4: figura tratta da [5] con modifiche illustrazione dei passaggi da eseguire durante una separazione effettuata con separatori in fase solida

I materiali utilizzati come supporto solido, per essere considerati efficaci, devono possedere determinate caratteristiche come un'elevata area superficiale, una buona biocompatibilità e, inoltre, devono essere facilmente funzionalizzabili e manipolabili. Anche questa tipologia di separatori presenta diversi esempi:

- a) Adsorbenti a base di silice, la quale ha proprietà uniche per quando riguarda il legame selettivo con il DNA. Questa classe di materiali include particelle di vetro, polveri di vetro, particelle di silice, fibre di vetro e diatomite, ovvero una roccia silicea sedimentaria che ha un contenuto di silice pari a circa il 94%. Il legame che si forma tra silice e DNA viene reso possibile grazie all'utilizzo di un sale caotropico che, in opportune condizioni di pH e concentrazione di sale, denatura la superficie della silice rendendola carica positivamente. Il legame che si forma tra superficie delle particelle e DNA è dovuto principalmente a tre fattori: l'elevata attrazione tra la carica negativa del DNA e la carica positiva superficiale delle particelle di silice, la deidratazione della superficie della silice e la formazione di legami a idrogeno tra lo strato di contatto della silice con il DNA e il DNA stesso. In particolare, i cationi di del sale caotropico svolgono un ruolo fondamentale attraendo gli ioni ossigeno caricati negativamente dei gruppi fosfati contenuti nel DNA e rompendo i legami presenti tra gli atomi di ossigeno caricati negativamente della silice e gli atomi di idrogeno dell'acqua. Un ruolo importante nella formazione del legame è svolto anche da fattori esterni quali temperatura, pH e forza ionica. Questa serie di interazioni crea un legame molto forte tra silice e DNA, che non viene rotto nelle operazioni di lavaggio seguenti eseguite per allontanare le sostanze indesiderate. [5] [5.1] [6] [12]

b) Resine che fungono da scambiatori anionici, le quali sfruttano le interazioni elettrostatiche tra i gruppi carichi positivamente presenti sulla superficie della resina, generalmente gruppi di dietilamminoetilcellulosa (DEAE) e la carica negativa dei gruppi fosfati contenuti nel DNA. La resina su cui aderiscono gli acidi nucleici è generalmente costituita da un polimero con superficie funzionalizzata ed elevata porosità o un gel polimerico e gli elementi indesiderati vengono eliminati mediante lavaggi successivi. Nonostante l'efficacia di questo metodo, esso richiede passaggi simili alle metodologie di estrazione liquido-liquido per il recupero del DNA, tra cui operazioni di centrifugazione e precipitazioni in alcol.

- “Chip” microfluidico

Questa separazione viene effettuata mediante un dispositivo complesso che offre, però, importanti vantaggi, primo tra tutti la possibilità di effettuare una separazione automatizzata e rapida a partire da campioni grezzi [4].

- Separatori magnetici

Questa tipologia di separazione, effettuata mediante particelle magnetiche, è una delle tecniche più recenti e viene utilizzata sempre più frequentemente a causa dei notevoli vantaggi che mostra rispetto alle metodologie tradizionali prima trattate: grazie all'abolizione del passaggio di centrifugazione permette una separazione che non distrugge gli altri analiti presenti in soluzione, anche quelli più labili come ad esempio i complessi di proteine, e non c'è il rischio di degradare gli acidi nucleici; essa può essere inoltre applicata anche a campioni biologici grezzi, come ad esempio sangue o acqua e, infine, le particelle con gli acidi nucleici depositati in superficie vengono rimosse facilmente e selettivamente dal campione consentendo una separazione semplice, efficace e veloce (figura 1.5).

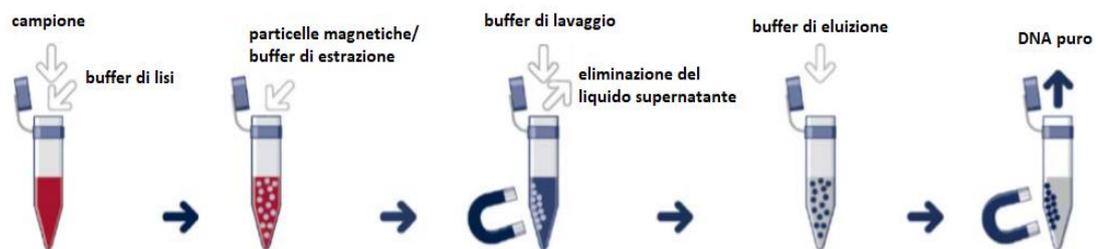


Figura 1.5: figura tratta da [10] con modifiche, rappresentazione schematica dei passaggi da effettuare durante un'estrazione di DNA o RNA utilizzando particelle magnetiche

Le particelle magnetiche svolgono l'azione di estrazione sia di DNA che di RNA, per ottenere uno solo dei due acidi nucleici è sufficiente introdurre in soluzione o RNasi se si vuole ottenere come prodotto finale il DNA o DNasi se si vuole ottenere come prodotto finale l'RNA.

Una tipologia molto studiata di materiali utilizzabili per le separazioni di tipo magnetico sono le particelle magnetiche che hanno dimensioni abbastanza piccole, dipendenti dalla tipologia di materiale utilizzato, ma generalmente comprese tra i 10 e 20 nm, che

rendono ognuna delle particelle composta da un singolo dominio magnetico e ciò fa sì che esse mostrino un comportamento superparamagnetico: ciò significa che esse non interagiscono tra di loro in assenza di campo magnetico esterno, evitando quindi la formazione di agglomerati, poiché mostrano comportamento magnetico solo sotto l'influenza di un forte campo magnetico esterno, ma, in assenza di questo, perdono la loro magnetizzazione. Il grande svantaggio di queste particelle è però legato proprio alle loro ridotte dimensioni, che fa sì che tendano ad aggregarsi per diminuire l'elevata energia superficiale [7].

Esistono due modi principali per effettuare una separazione magnetica: il primo modo possibile, che è di tipo diretto, è quello di inserire direttamente nel campione in analisi particelle magnetiche con opportuni leganti in superficie, il secondo modo, di tipo indiretto, consiste nell'inserire all'interno della soluzione contenente il campione leganti opportuni tali da promuovere la creazione di legami tra DNA e particella magnetica, come mostrato in figura 1.6. Un'altra opzione possibile è quella di utilizzare un letto fluidizzato magneticamente stabilizzato, adatto per operazioni di purificazione su larga scala [8].

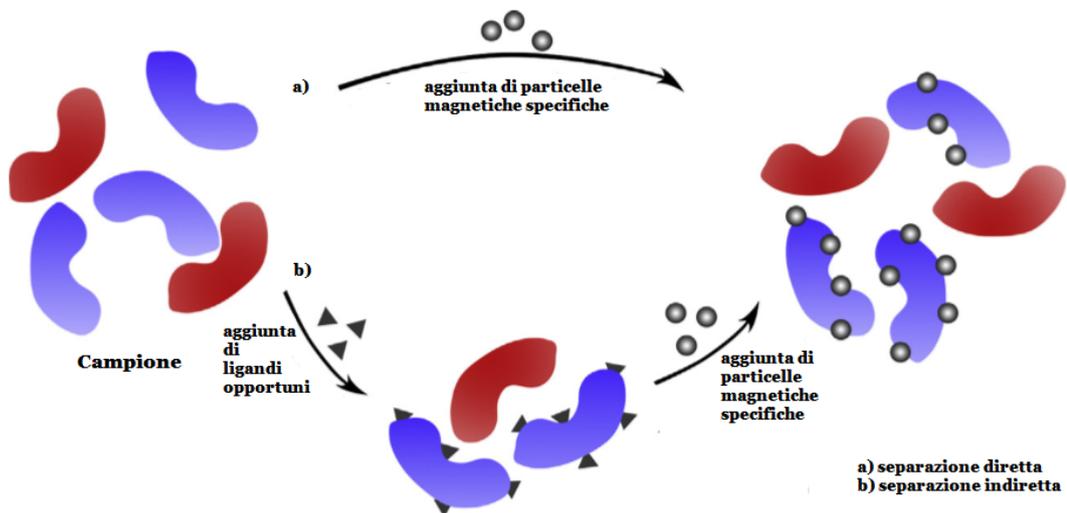


Figura 1.6: figura tratta da [8] con modifiche, illustrazione del metodo diretto (a) e di quello indiretto (b) utilizzati per l'estrazione di DNA con particelle magnetiche

Come anticipato prima, queste microsfero diventano magnetiche sotto l'influenza di campi magnetici esterni e permettono l'estrazione di molecole o sostanze che si erano precedentemente depositate sulla superficie in seguito a specifiche interazioni (ad esempio scambio ionico) mediante l'applicazione di un magnete.

I carriers magnetici solidi possono essere classificati in tre categorie:

- c) Un singolo componente magnetico metallico che interagisce, formando legami, con gli acidi nucleici: queste particelle hanno però il grande svantaggio di essere molto reattive chimicamente e di avere un'elevata tendenza all'ossidazione, diminuendo così la loro dispersione e la loro magnetizzazione;
- d) Un componente magnetico che forma il nocciolo interno della particella, incapsulato dopo la sintesi in un guscio di materiale inorganico (silice, carbonio, metalli nobili, etc.) o organico (polimeri, tensioattivi, etc.) su cui si lega l'acido nucleico o che può servire come basi per successive funzionalizzazioni;

- e) Un composito costituito da un componente magnetico disperso su di una matrice polimerica o di silice a cui si lega l'acido nucleico.

Le ultime due tipologie di carrier magnetico sono state create per proteggere le particelle e prevenire l'aggregazione e la precipitazione in soluzione, in modo da ottenere un materiale stabile e durevole nel tempo [8] [9].

In alcuni casi le particelle magnetiche possono essere funzionalizzate in modo da aumentare l'affinità con un determinato analita, ad esempio i gruppi funzionali quali $-NH_2$ e $-COOH$ sono utili per favorire l'adesione sulla superficie di proteine ed enzimi, mentre per promuovere l'attaccamento di DNA o RNA vengono usati oligonucleotidi, ovvero catene corte di nucleotidi contenenti meno di 20 gruppi di basi.

Esistono diversi elementi metallici che mostrano comportamento ferromagnetico, come ad esempio il Fe, il Co e il Ni, così come vari ossidi metallici e leghe metalliche, ma i materiali più utilizzati fino ad ora per la realizzazione di dispositivi utilizzabili in ambito biomedico sono formati da un "core" magnetico di particelle nanometriche di Fe_3O_4 o $\gamma-Fe_2O_3$ e da una "shell" di silice porosa, che provvede alla stabilità termica e chimica del composito fornendo al contempo una superficie estesa compatibile con diverse sostanze chimiche e molecole. Il "core" viene generalmente realizzato in Fe_3O_4 o $\gamma-Fe_2O_3$ in quanto questi ossidi possiedono bassa tossicità, proprietà superparamagnetiche ed è possibile controllare la magnetizzazione in modo semplice; inoltre, la magnetite è il minerale presente in natura con proprietà magnetiche migliori [9] [10] [11].

L'utilizzo di questi dispositivi presenta però degli inconvenienti correlati alla loro produzione che risulta essere laboriosa e complicata, proprio per la necessità di realizzare un guscio protettivo intorno al "core" metallico. Questo fattore, unito all'elevato costo dei reagenti, implica un elevato costo del dispositivo finale. Inoltre, questa tecnica dà buoni risultati nei test in laboratorio, ma non è utilizzabile su scala più ampia.

Nasce quindi la richiesta di creare nuove procedure semplici e a basso costo per la creazione di carrier solidi magnetici.

1.3 Operazioni post-estrazione

Una volta concluse le operazioni di estrazione del DNA, per valutare l'efficacia della metodologia che si è deciso di utilizzare, è necessario quantificare il DNA, analizzando quindi la resa, e valutare la sua purezza, ovvero l'assenza di contaminanti.

Per quanto riguarda la quantificazione e la valutazione della purezza esistono diverse tecniche che permettono questo passaggio:

- Spettrofotometria: E' una delle tecniche di valutazione più semplice e più utilizzata nei laboratori per la valutazione dei procedimenti di estrazione. Viene utilizzato uno spettrofotometro per misurare la quantità di luce UV assorbita dall'acido nucleico estratto e, essendo questa quantità proporzionale alla concentrazione, è possibile ricavare in modo preciso la quantità di DNA presente in un campione. Questa tecnica si basa sulla legge di Lambert-Beer (1.1), che stabilisce una proporzionalità diretta tra assorbanza (A) e il prodotto tra coefficiente di assorbimento molare (ϵ , [$mol^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$]), caratteristico per ogni sostanza ad una data lunghezza

d'onda, il cammino ottico (l , [cm]) e concentrazione della soluzione o specie chimica in esame (c , [mol/L]):

$$A = l c \epsilon \quad (1.1)$$

dove l'assorbanza A (1.2) corrisponde al logaritmo del rapporto tra l'intensità incidente sul campione (I_0) e l'intensità uscente (I):

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (1.2).$$

Per analisi spettrofotometriche su campioni di DNA si utilizza una radiazione incidente con lunghezza d'onda pari a 260 nm, corrispondente ad un picco di assorbimento del DNA dovuto alla presenza delle basi azotate.

Analizzando lo spettro di assorbimento è possibile anche stabilire se il campione in esame contiene impurezze o contaminanti, in quanto sostanze come proteine, lipidi, etc., presentano picchi in corrispondenza di diverse lunghezze d'onda, e si generano dunque nuovi picchi oltre a quello a 260 nm.

- Elettroforesi su gel: questo metodo permette di calcolare la concentrazione di DNA solo in modo approssimativo, ma fornisce anche informazioni riguardanti le dimensioni delle catene e la loro integrità. Per effettuare quest'analisi il DNA, posto in soluzione acquosa, viene inserito in un contenitore contenente un gel, colorato mediante un colorante fluorescente, e viene sottoposto ad un campo elettrico. Essendo il DNA carico negativamente in acqua, esso si sposterà verso il polo positivo attraversando il gel, che viene qui utilizzato come setaccio, poiché frammenti più lunghi migreranno più lentamente di frammenti brevi.

Durante il passaggio del DNA tra gli spazi vuoti del gel, il colorante fluorescente si lega in modo proporzionale al DNA stesso e questo permette, una volta terminata la prova, di individuare la quantità di DNA presente grazie ad illuminatori UV.

Come anticipato sopra, è anche possibile valutare le dimensioni delle catene del DNA analizzato, infatti, una volta terminata la misura, se è presente solo una linea vicino al punto di partenza allora significa che i filamenti hanno dimensioni simili tra di loro e sono lunghi, mentre se sono presenti molte linee significa che le catene hanno dimensioni molto diverse tra di loro.

- “Polymerase chain reaction”: la PCR è una tecnica che si basa su reazioni di amplificazione di frammenti di DNA. Poiché questa reazione segue un andamento inizialmente esponenziale, è possibile, in via teorica, misurare la quantità di DNA ottenuta al termine della prova e ricavare quella iniziale. Il problema più grande risiede nel fatto che alla fase iniziale esponenziale segue una fase di plateau, quindi, per effettuare un'analisi quantitativa, è necessario essere sicuri di trovarsi nella fase esponenziale, oppure utilizzare la PCR real-time, che permette di monitorare istante per istante l'andamento dell'amplificazione con una sensibilità estremamente elevata. La PCR real-time permette inoltre di stabilire se nel campione sono presenti inibitori.

Queste due tecniche verranno descritte più approfonditamente nel capitolo 4 “Tecniche di caratterizzazione”, in quanto la PCR real-time è stata qui utilizzata per effettuare un paragone tra le particelle magnetiche Chemicell e i nanocompositi metallo ceramici oggetto di questa tesi, per verificare quale dei due materiali permetta di estrarre un quantitativo maggiore di DNA a partire da due campioni biologici identici.

1.4 L'uso di nanoparticelle magnetiche in applicazioni biomediche

Le nanoparticelle magnetiche, oltre ad essere usate come separatori di DNA, vengono impiegate in molti ambiti relativi al campo biomedico sia *in vitro* sia *in vivo*.

Vengono definite nanoparticelle tutte le strutture, amorfe o semicristalline, che hanno almeno una delle dimensioni compresa tra 1 nm e 100 nm. Alcune loro caratteristiche, come l'uniformità dimensionale, la funzionalizzazione superficiale creata per favorire determinate interazioni, il comportamento superparamagnetico e il momento magnetico, possono essere finemente definite durante la loro produzione al fine di ottenere un materiale il più idoneo possibile al compito che andrà a svolgere. Il comportamento magnetico è una caratteristica importantissima in quanto permette di controllare a distanza la posizione delle particelle [7].

Per quanto riguarda la scelta del materiale magnetico da utilizzare per applicazioni in campo biomedico, è noto che alcuni elementi come cobalto e nichel siano tossici e molto sensibili all'ossidazione, mentre la magnetite e la maghemite sono utilizzabili anche per applicazioni in vivo. Infatti, le particelle a base ferro sono altamente biocompatibili come riportato in diversi studi [7][11]. Per implementare la biocompatibilità è inoltre possibile l'utilizzo di coating, organici o inorganici, i quali hanno anche il vantaggio di migliorare la dispersibilità delle particelle.

Ecco alcuni utilizzi delle nanoparticelle magnetiche:

1. Applicazioni *in vitro*:
 - a. Purificazione di acidi nucleici, già descritta precedentemente.
 - b. Purificazione di proteine: come per la purificazione degli acidi nucleici, l'utilizzo di nanoparticelle magnetiche permette di eliminare i passaggi di centrifugazione e filtrazione e permette di effettuare una separazione veloce e semplice.
 - c. "Cell sorting": le nano particelle magnetiche, funzionalizzate con particolari anticorpi, possono essere utilizzate sia per isolare specifici tipi di cellule da campioni complessi, sia per liberare i campioni da cellule indesiderate, o per entrambe le funzioni.
 - d. Rilevamento di patogeni: l'immuno-separazione effettuata con particelle magnetiche spesso supera i limiti dei metodi analitici tradizionali, permettendo di effettuare diagnosi più precise e veloci. [7][9]
2. Applicazioni *in vivo*:
 - a. Trasferimento di acidi nucleici e terapia genica: per effettuare il trasporto di DNA o RNA è possibile utilizzare particelle magnetiche, a cui sono legati gli acidi nucleici, le quali vengono mosse mediante un magnete.
 - b. Rilascio controllato di farmaci: molti agenti terapeutici, se assunti per via orale o iniettati, non vengono distribuiti con efficacia oppure non vengono assorbiti efficacemente. Per ovviare a questi problemi si può ricorrere all'utilizzo di nanoparticelle magnetiche per il loro trasporto, permettendo così di scegliere la destinazione finale del farmaco, che può aggregarsi in un punto preciso, permettendo così di limitare gli effetti nocivi della sostanza e di implementare la sua efficacia.
 - c. Ipertermia locale: questo processo viene utilizzato per provocare la morte di cellule tumorali, che avviene ad una temperatura maggiore di 43 °C, a cui le cellule normali sopravvivono tranquillamente. Le particelle magnetiche vengono, quindi, trasportate in corrispondenza delle cellule cancerose e in seguito vengono riscaldate grazie

all'esposizione ad un campo magnetico alternato che induce perdite di isteresi o rilassamenti di Néel e di Brown [13][14].

- d. Ingegneria dei tessuti: l'ingegneria dei tessuti si occupa dello sviluppo di possibili sostituti per tessuti persi o danneggiati. Generalmente le cellule autologhe pluripotenti, ovvero capaci di generare diversi tipi cellulari, vengono coltivate *in vitro*, dopodiché vengono inserite in "scaffolds" che hanno la funzione di dargli una struttura e una differenziazione simile al tessuto che viene imitato, e, infine, vengono inserite nel donatore. Una nuova tecnologia prevede l'utilizzo di particelle magnetiche con il compito di "etichettare" le cellule tissutali in modo da permettere una facile organizzazione di queste cellule attraverso un magnete. In questo modo le cellule possono essere trasportate selettivamente per creare strutture 2D o 3D. [7][11]

1.5 La zeolite

Come accennato nell'introduzione, il materiale di partenza utilizzato per la produzione dei nanocompositi in esame è la zeolite. Di seguito sono illustrate le caratteristiche principali, le proprietà e gli utilizzi più frequenti.

1.5.1 Caratteristiche

Le zeoliti sono dei minerali allumino-silicati microporosi appartenenti alla classe dei tectosilicati. Esse sono caratterizzate da una struttura primaria costituita dal tetraedro di legame $[TO_4]^{4-}$, il quale si lega ad altri tetraedri mediante gli atomi di ossigeno per formare delle impalcature tridimensionali [17].

La lettera T può indicare un atomo di Si o un atomo di Al. Nelle zeoliti, infatti, un atomo di Al può sostituire in modo isomorfo un atomo di Si e questo produce degli scompensi di carica: in particolare, si ha un eccesso di carica negativa che viene bilanciato mediante cariche positive appartenenti a cationi di metalli alcalini o alcalino-terrosi che si dispongono in corrispondenza della struttura anionica formata dal tetraedro $[TO_4]^{4-}$ in posizione extra framework per mantenere l'elettroneutralità. La struttura tridimensionale formata da questi tetraedri è aperta e ricca di cavità occupate dai cationi metallici, generalmente Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc., e da molecole d'acqua, entrambi dotati di elevata mobilità. La presenza di questi cationi extra framework è evidenziata nella formula bruta della zeolite (1.3):



dove la lettera M indica un catione metallico estraneo alla struttura di valenza, z è generalmente un numero non intero che varia nelle diverse zeoliti; y e x sono numeri relativi al rapporto Si/Al.

La presenza d'acqua all'interno dei micropori della zeolite è un elemento caratteristico di questo materiale: il termine "zeolite", infatti, venne introdotto nel 1756 dal mineralogista svedese Cronstedt per descrivere dei minerali naturali che, se scaldati in un letto di borace, espellono acqua tanto da sembrar bollire (dal greco zein = bollire, lithos = roccia).

Uno dei parametri caratteristici di una zeolite è il rapporto Si/Al, che non può mai scendere sotto un valore pari ad 1, come stabilito dalla regola di Loewenstein: non è quindi contemplata la formazione di legami tra atomi di alluminio-ossigeno-alluminio e, se essi sono presenti, sono

da considerarsi come dei difetti, poiché non sono appartenenti al reticolo ideale. All'interno della struttura si possono trovare quindi legami silicio-ossigeno-silicio e legami silicio-ossigeno-silicio e il rapporto Si/Al varia da 1 a infinito. La presenza di Al è spiegabile in base alla capacità dei tectosilicati di sostituire lo ione coordinante il tetraedro senza provocare variazioni di proprietà nel reticolo cristallino. Questa proprietà viene denominata "sostituzione isomorfa" o "vicarianza".

Le zeoliti, in base al contenuto di alluminio, vengono suddivise in: zeoliti a basso rapporto Si/Al (Si/Al=1-3), zeoliti a medio rapporto Si/Al (Si/Al=3-15) e zeoliti ad alto rapporto Si/Al (Si/Al>15, di solito create dall'uomo). Più cresce il numero di atomi di silicio rispetto a quelli di alluminio e minore sarà la capacità della zeolite di ospitare cationi extra-framework, in quanto saranno poche le cariche negative da bilanciare; questo determina una decrescente capacità di scambio ionico.

Le zeoliti possono essere classificate utilizzando un codice che descrive il reticolo tridimensionale e il rapporto Si/Al: è necessario utilizzare entrambe le informazioni per distinguere le zeoliti perché un reticolo può appartenere a zeoliti con diverso tenore di alluminio.

Un altro modo di classificare le zeoliti è in base alle strutture secondarie formate, denominate S.B.U. (secondary building units).

Ogni tetraedro formato da Si e Al viene comunemente denominato P.B.U. (primary building units). Quando due o più tetraedri si uniscono danno vita a semplici forme geometriche, denominate S.B.U.; alcune di queste strutture secondarie sono riportate nell'immagine 1.7, dove i tetraedri sono rappresentati da piccoli cerchi e i legami tra gli atomi di ossigeno sono raffigurati con una linea. Le strutture secondarie si organizzano poi tridimensionalmente per dare origine a poliedri dalla cui connessione deriva il reticolo tridimensionale. Ogni impalcatura tridimensionale può essere descritta servendosi di una sola di queste S.B.U. che può ripetersi più volte.

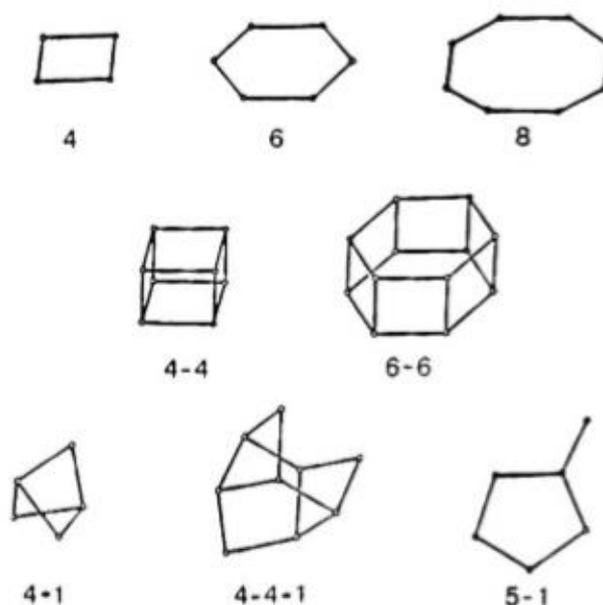


Figura 1.7: figura tratta da [17] con modifiche, alcune S.B.U. di zeoliti.

Altre unità strutturali di cui ci si può servire per descrivere l'impalcatura zeolitica sono le C.B.U. (composite building units), che sono strutture più complesse rispetto alle S.B.U., come ad esempio la gabbia α o la gabbia β , che appaiono sovente in differenti framework e possono essere utili nel riconoscimento di una determinata zeolite. [15] [16] [19]

1.5.2 Zeoliti naturali

Le zeoliti naturali di cui siamo a conoscenza sono circa 60 e sono generalmente a basso rapporto silicio-alluminio. Queste zeoliti sono abbondantemente presenti in natura e sono quindi caratterizzate da un basso costo. Esse hanno, però, lo svantaggio di avere un basso grado di purezza e di essere disponibili in un limitato numero di tipi strutturali.

Nei giacimenti italiani, nonostante ve ne siano numerosi e presenti in diverse zone geografiche, sono presenti solo due tipi di zeolite: la cabasite e la phillipsite, generalmente contenuti entrambi nella roccia madre.

1.5.3 Zeoliti sintetiche

Le zeoliti sintetiche hanno un costo più elevato rispetto a quelle naturali, ma hanno il vantaggio di essere disponibili in un gran numero di tipi, adatti a i più diversi scopi, e di possedere un elevato grado di uniformità e purezza per quanto concerne la loro struttura cristallina, la dimensione dei pori e la disposizione delle gabbie.

La sintesi di zeoliti è stata ampiamente studiata [31] e i materiali di partenza per la sintesi di questi materiali sono generalmente sostanze che contengono elevate quantità di SiO_2 e Al_2O_3 , minerali disponibili in natura o sottoprodotti industriali [30], come ad esempio le ceneri volatili, che sono abbondantemente disponibili ed economiche oltre ad essere ricche di minerali contenenti SiO_2 e Al_2O_3 [19][32].

Una delle prime zeoliti sintetizzate industrialmente che è ancora largamente utilizzata è la **Linde Type A (LTA)**.

La sua formula chimica è $\text{Na}_{12}\text{Al}_{12}\text{Si}_{12}\text{O}_{48} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$.

(1.4)

La cella di questa zeolite è di tipo cubico e una delle sue C.B.U. caratteristiche è la gabbia sodalitica, come raffigurato nell'immagine 1.8: tale struttura è costituita da strutture bidimensionali di forma esagonale o quadrata disposte in modo da formare un'impalcatura tridimensionale, avente forma di un ottaedro tronco, ovvero solido costituito da facce esagonali e quadrate.

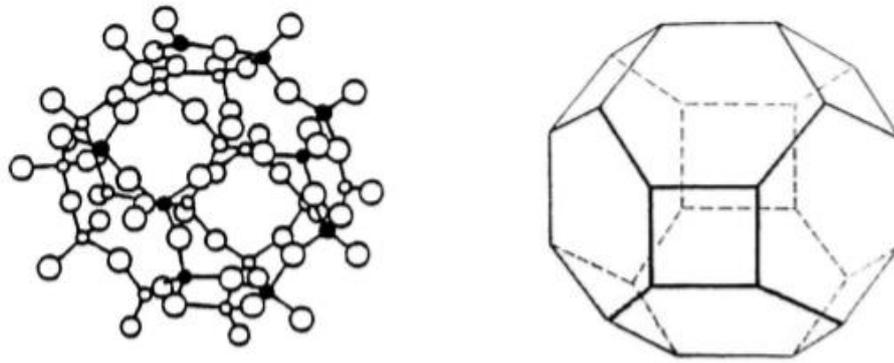


Figura 1.8: figura tratta da [17] con modifiche, gabbia sodalitica o gabbia β

Le gabbie sodalitiche sono a loro volta interconnesse tramite C.B.U. cubiche e l'interconnessione di otto gabbie β determina la formazione di una cavità più larga, detta gabbia α , che è la terza ed ultima C.B.U. utile per descrivere questa zeolite.

La struttura completa sarà quindi formata da 8 gabbie β e una gabbia α , raffigurate in figura 1.9.

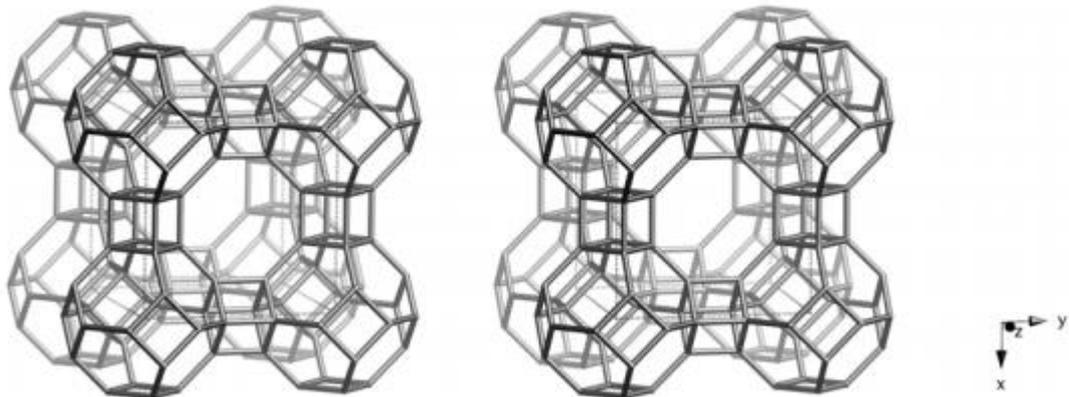


Figura 1.9: figura tratta da [15] con modifiche, struttura della zeolite 4A

Il rapporto Si/Al della zeolite 4A è pari ad 1 e gli atomi di Al e di Si si dispongono in modo alternato seguendo una sequenza regolare. [15][16][17][21]

Un'altra zeolite sintetizzata che viene impiegata per un vasto campo di applicazioni è la **Linde X (FAU)**. La sua formula chimica è $Na_{86}Al_{86}Si_{106}O_{384} \cdot 264H_2O$

(1.5).

Anche la cella della zeolite Linde X è cubica ed anche in questo tipo di zeolite una delle C.B.U. caratteristiche è la gabbia β . Le gabbie sodalitiche, però, sono collegate tra loro mediante C.B.U. che hanno forma di prismi a base esagonale e si genera, quindi, una cavità centrale più ampia rispetto alla zeolite 4A, osservabile in figura 1.10.

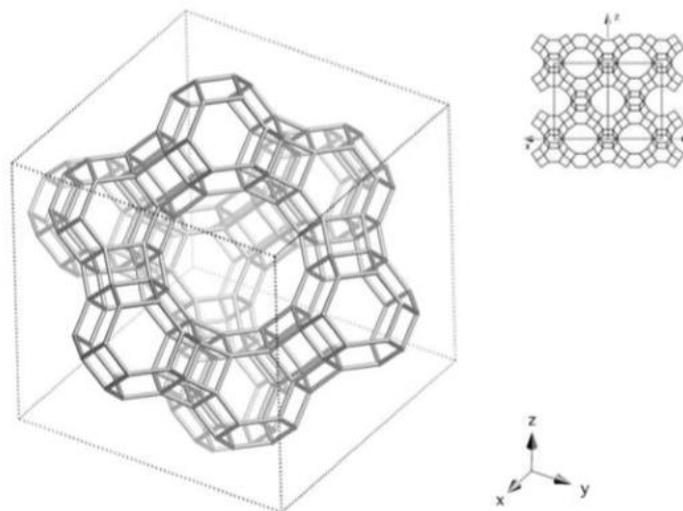


Figura 1.10: figura tratta da [15] con modifiche, struttura della zeolite 13X

Il rapporto Si/Al della zeolite 13X è pari ad 1,3. [15][17][21]

1.5.4 Proprietà

Come accennato in precedenza, le zeoliti sono tectosilicati caratterizzati da una struttura molto particolare: essa, infatti, è formata da cavità regolari, di dimensioni pari a pochi Å, che contengono al loro interno acqua e cationi metallici alcalino-alcalino terrosi, i quali hanno la funzione di ristabilire la neutralità della carica totale persa a causa della presenza degli atomi di alluminio. La presenza di micropori fa sì che il materiale in questione abbia un'area superficiale interna molto elevata. Inoltre, le molecole d'acqua e i cationi metallici “extra-framework” sono molto mobili.

Queste specifiche proprietà rendono le zeoliti adatte a svariati utilizzi, tra cui:

- setacci molecolari: grazie alla presenza di cavità di dimensioni ridotte;
- catalizzatori: a causa dell'elevata area superficiale e alla presenza di micropori;
- adsorbimento;
- scambiatori ionici: se le zeoliti vengono immerse in soluzioni elettrolitiche esse hanno la capacità di scambiare i cationi extra framework con quelli presenti nella fase acquosa. Questo comportamento è possibile poiché i cationi contenuti nelle cavità delle zeoliti non hanno legami forti e stabili con il suo reticolo. Infatti, i legami ionici che sussistono tra la zeolite ed i cationi risultano fortemente indeboliti dalla presenza di molecole d'acqua che sono altamente polari.

La quantità massima di cationi che possono essere scambiati è denominata *capacità di scambio cationico (CEC)* ed è generalmente espressa in meq/g. Questa grandezza, in teoria, dipende solo dal rapporto Si/Al: maggiore sarà il numero di atomi di Si sostituiti da atomi di Al e maggiore sarà la carica negativa da bilanciare. In realtà, il numero di cationi che può essere scambiato dipende anche dalla dimensione dei canali, che dev'essere compatibile con il diametro dei cationi, e dall'affinità della zeolite con i cationi presenti nella soluzione in cui si trova.

L'affinità della zeolite verso un determinato catione non è una proprietà definibile in modo assoluto, ma vengono determinate delle sequenze di selettività paragonando l'affinità della zeolite per cationi differenti.

La selettività può essere espressa mediante un fattore di separazione α_{BA} , ricavabile dall'equazione 1.6:

$$\alpha_{BA} = \frac{[A_Z \cdot B_S]}{[B_Z \cdot A_S]} \quad (1.6)$$

i termini A_S e B_S indicano le concentrazioni dei cationi A e B presenti in soluzione, i termini A_Z (equazione 1.7) e B_Z (equazione 1.8), invece, rappresentano le concentrazioni dei cationi A e B nella zeolite:

$$A_Z = \frac{\text{equivalenti di } A^{n+} \text{ nella zeolite}}{\text{g di atomi di Al nella zeolite}} \quad (1.7)$$

$$B_Z = \frac{\text{equivalenti di } B^{n+} \text{ nella zeolite}}{\text{g di atomi di Al nella zeolite}} \quad (1.8).$$

Se α_B^A è minore di 1 la zeolite avrà una maggiore affinità per il catione A, se α_B^A è maggiore di 1 la zeolite avrà una maggiore affinità per il catione B e se α_B^A è uguale a 1 la zeolite avrà la stessa affinità per i due cationi [34].

Le zeoliti sono degli scambiatori ionici molto importanti: esse, infatti, mostrano una buona compatibilità ambientale, una buona resistenza termica e alle radiazioni ionizzanti. Inoltre, grazie alle proprietà sopra descritte, è possibile utilizzarle per scambiare ioni in modo selettivo [20] [33].

2. Materiali

In questo lavoro sono state utilizzate due tipologie di zeoliti sintetiche come precursori di nanocompositi magnetici metallo-ceramico: la zeolite 4A (LTA) e la zeolite 13X (FAU), che sono due delle zeoliti più utilizzate in ambito tecnologico e vengono prodotte su larga scala, avendo quindi il vantaggio, oltre al basso costo, di essere già state caratterizzate ampiamente sia dal punto di vista strutturale sia per quanto riguarda le loro proprietà [22] [29].

Un campione di zeolite 4A e uno di zeolite 13X hanno subito un processo di scambio ionico in soluzione acquosa, effettuato per introdurre ioni Fe^{2+} , e, in seguito, sono stati sottoposti ad un trattamento termico in atmosfera riducente, composta da una miscela di Ar e H_2 al 3% di H_2 , a temperature relativamente basse ($T_{\text{max}}=750\text{ }^\circ\text{C}$). Si sono così ottenuti due nanocompositi formati da una matrice amorfa di silice e allumina contenente delle nanoparticelle di ferro metallico.

Un campione di zeolite 4A, invece, è stato sottoposto ad un processo di scambio ionico con NH_4^+ e Fe^{2+} ed è stato in seguito sottoposto ad un trattamento termico in atmosfera riducente di composizione uguale a quella utilizzata per i campioni che hanno subito uno scambio cationico con Fe^{2+} ad una temperatura pari a $600\text{ }^\circ\text{C}$, al fine di ottenere un nanocomposito con fase amorfa analoga ai due materiali precedenti ma contenente nanoparticelle di Fe, FeO e Fe_3O_4 [28].

2.1 Il processo produttivo

I campioni che sono stati preparati ed in seguito analizzati sono i seguenti e sono stati schematizzati in tabella 2.1:

- un campione di zeolite 4A scambiato con ioni Fe^{2+} e trattato termicamente in atmosfera riducente ad una temperatura di $750\text{ }^\circ\text{C}$;
- due campioni di zeolite 13X scambiati con ioni Fe^{2+} ; i campioni sono stati sottoposti allo stesso processo di scambio ionico ma sono stati inseriti in due tipologie diverse di supporto durante il trattamento termico in atmosfera riducente ad una temperatura di $750\text{ }^\circ\text{C}$, in particolare un campione è stato ridotto in un crogiolo e l'altro su di una navicella;
- un campione di zeolite 4A scambiato con ioni NH_4^+ e con ioni Fe^{2+} ridotto ad una temperatura di $600\text{ }^\circ\text{C}$.
- un campione di zeolite 4A scambiato con ioni Fe^{2+} che è stato sottoposto a macinazione per un tempo di 5h in un mulino a palle ed è stato, in seguito, trattato termicamente in atmosfera riducente ad una temperatura di $750\text{ }^\circ\text{C}$

Tabella 2.1: tabella dei campioni utilizzati nel lavoro di tesi.

Nome campione	Scambio ionico	Macinazione	Trattamento termico
FeA8sc.750°C-2h	8 scambi ionici con ioni Fe^{2+}	-	temperatura: $750\text{ }^\circ\text{C}$

			tempo: 2h
FeX5sc750°C- 2h_crogiolo	5 scambi ionici con ioni Fe ²⁺	-	temperatura: 750 °C tempo: 2h (effettuato in crogiolo)
FeX5sc750°C-2h	5 scambi ionici con ioni Fe ²⁺	-	temperatura: 750 °C tempo: 2h
(H,Fe)A18sc.600°C- 1,5h	10 scambi ionici con NH ₄ ⁺ 8 scambi ionici con Fe ²⁺	-	temperatura: 600 °C tempo: 1,5h
FeA8sc.750°C- 2h_macinato	8 scambi ionici con ioni Fe ²⁺	tempo: 5h mulino a palle	temperatura: 750 °C tempo: 2h

2.1.1 Il processo di scambio ionico

Prima di effettuare la procedura di scambio ionico è stata misurata la capacità di scambiare ioni delle due zeoliti utilizzando il metodo “batch exchange method”, che ha mostrato valori di CEC (“Cation Exchange Capacity”) sostanzialmente uguali a quelli riportati in letteratura [1][24]:

$$CEC_{ZA} = 5,48 \text{ meq/g [1]}$$

$$CEC_{ZX} = 4,73 \text{ meq/g [24].}$$

In letteratura vengono riportate diverse metodologie attraverso cui è possibile ottenere zeoliti scambiate con ioni di ferro: scambio ionico in ambiente acquoso utilizzando un sale ferrico o ferroso, scambio ionico allo stato solido, CVD (chemical vapor decomposition) di FeCl₃, oppure mediante una sostituzione isomorfa seguita da un'estrazione ad elevate temperature [25].

Lo scambio ionico in ambiente acquoso è il metodo più utilizzato a livello industriale, in quanto coinvolge un numero basso di passaggi e le condizioni necessarie per la sua riuscita sono facilmente ottenibili e controllabili [25].

2.1.1.1 Processo di scambio cationico dei campioni FeA8sc.750°C-2h, FeX5sc750°C-2h e FeX5sc750°C-2h_crogiolo

Durante il processo di scambio ionico due cationi di sodio monovalenti extra-framework delle zeoliti A e X vengono sostituiti da un catione di ferro di-valente. Si è scelto di utilizzare questo metallo di transizione a causa di alcune sue importanti proprietà poiché la presenza di ferro all'interno del composito induce un comportamento ferromagnetico nel materiale che viene sfruttato nelle operazioni di estrazione del DNA.

Il processo è analogo per la zeolite 4A e per la zeolite 13X.

Ciascuna delle due zeoliti è stata immersa in una soluzione acquosa 0,1M $[\text{Fe}^{2+}]$, ottenuta sciogliendo solfato ferroso eptaidrato ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in acqua. Il rapporto $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -acqua era pari a 1/50 g/ml.

Mediante miscelazione meccanica si è ottenuta una sospensione che è stata mantenuta ad una temperatura di circa 7 °C per tutta la durata del processo ed è stato insufflato gas Argon con continuità mediante un gorgogliatore. Queste operazioni sono state necessarie per evitare che i cationi Fe^{2+} si ossidassero a Fe^{3+} , evenienza da evitare in quanto il Fe^{3+} si scambia con un numero maggiore di cationi monovalenti rispetto al Fe^{2+} , con conseguente diminuzione della quantità di cationi di Fe scambiata.

Il pH della soluzione acquosa di $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ era pari a 3,8, il pH della sospensione di $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -zeolite A era pari a 6,0 e il pH della sospensione di $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -zeolite X era pari a 6,3-6,5.

Le zeoliti sono rimaste immerse in soluzione per un tempo di 40 minuti, dopodiché sono state separate dal liquido mediante filtrazione ed inserite in una nuova soluzione acquosa 0,1M $[\text{Fe}^{2+}]$, ottenuta in modo analogo alla precedente.

Il processo è stato ripetuto otto volte per il campione di zeolite A e cinque volte per la zeolite X.

Infine, le zeoliti sono state accuratamente sciacquate con acqua bidistillata, fatte asciugare in aria per circa un giorno ad una temperatura di 80 °C e, in seguito, poste in un ambiente ad umidità controllata con il 50% di umidità relativa per permettere il raggiungimento della saturazione acquosa da parte delle zeoliti. Durante la permanenza dei campioni scambiati in un ambiente al 50% di umidità relativa si verifica una parziale ossidazione del Fe^{2+} a Fe^{3+} , ma, essendo ormai terminato il processo di scambio ionico, questa variazione non va ad influire sulla quantità di ferro presente nelle zeoliti.

La zeolite A scambiata al ferro è stata denominata FeA8sc, la zeolite X, invece, FeX5sc.

2.1.1.2 Processo di scambio cationico del campione (H,Fe)A18sc.600°C-1,5h

La zeolite A è stata posta in contatto con una soluzione 0,1M $[\text{NH}_4^+]$, ottenuta sciogliendo NH_4Cl in acqua bidistillata e ottenendo un rapporto solido/liquido pari a 1/50 g/ml, ed è stata mantenuta in soluzione per 1 ora a temperatura ambiente.

Dopodiché, la parte solida è stata separata da quella liquida mediante filtrazione ed è stata messa a contatto con una nuova soluzione 0,1M $[\text{NH}_4^+]$, ottenuta in modo analogo alla precedente.

Questo passaggio è stato ripetuto per dieci volte per fare in modo di mantenere nella struttura zeolitica una quantità di cationi Na^+ minima.

Al termine di questa serie di scambi, quindi, la zeolite conteneva principalmente ioni NH_4^+ , che permettono scambi ionici più semplici, ed è stato quindi possibile introdurre un'elevata quantità di ioni Fe^{2+} .

In seguito, il campione di zeolite 4A scambiata con NH_4^+ è stato immerso in una soluzione 0,1M $[\text{Fe}^{2+}]$, ottenuta sciogliendo solfato ferroso eptaidrato ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) in acqua, con un rapporto solido/liquido pari a 1/50 g/ml. La zeolite è stata mantenuta nella soluzione per un tempo di un'ora, ad una temperatura di 7 °C e sotto insufflazione di gas Argon per i motivi precedentemente descritti.

Quest'operazione è stata iterata otto volte.

Dopo questi passaggi, il campione è stato lavato con acqua bidistillata, è stato fatto asciugare per circa un giorno in aria a 80 °C e, dopodiché, è stato posto per tre giorni in un ambiente al 50% di umidità per permettere alle zeoliti di reidratarsi. Questo passaggio, come anticipato nel paragrafo precedente, causa l'ossidazione di una parte di cationi di Fe²⁺ a Fe³⁺ e ciò giustifica la presenza, nel composito finale, di particelle di magnetite, che si sono create proprio a partire dagli ioni Fe³⁺.

Al termine di queste operazioni si ottiene una zeolite A contenente ioni Fe²⁺ e NH₄⁺, che verrà denominata (H,Fe)A18sc.

2.1.2 I trattamenti in atmosfera riducente dei campioni FeA8sc.750°C-2h, FeX5sc750°C-2h e FeX5sc750°C-2h_crogiolo

Terminato il processo di scambio ionico, i campioni FeA8sc e FeX5sc sono stati sottoposti ad un trattamento termico in atmosfera riducente, costituita da una miscela di Ar e H₂ al 3% di H₂ che veniva erogata con continuità in un forno tubolare che conteneva i campioni.

Il campione FeX5sc è stato suddiviso in due aliquote: una parte ha subito il trattamento termico in un crogiolo e l'altra, invece, su una navicella, per valutare eventuali differenze nell'efficacia della riduzione.

Si è osservato che durante il trattamento termico in atmosfera riducente nelle zeoliti scambiate prese in esame avvengono i seguenti fenomeni:

- riduzione dei cationi dei metallici, secondo la reazione $Me^{2+} \cdot O_{zeo} + 2H_{2(g)} \rightarrow Me_{(s)} + H_2O_{(v)}$. Come viene evidenziato dalla reazione, il processo di riduzione dei cationi metallici implica la perdita di atomi di ossigeno da parte della struttura zeolitica con possibili danni alla struttura stessa [1].
- Migrazione di alcuni atomi metallici appena formati all'interno delle cavità della zeolite, con conseguente formazione di "cluster" costituiti da poche unità di atomi [1].
- Migrazione di una parte di atomi metallici appena formati situati nelle cavità della zeolite verso la superficie esterna, con conseguente formazione di particelle metalliche di dimensioni leggermente superiori rispetto a quelle dei "cluster" formati all'interno delle cavità. Le particelle hanno comunque dimensioni nanometriche [1].
- Collasso della struttura microporosa delle zeoliti, causato dalla perdita di atomi di ossigeno durante la reazione di riduzione dei cationi Fe²⁺ [1] [26] [27].
- Possibile formazione di fasi ceramiche cristalline, di composizione e tipologia dipendenti dalle modalità di trattamento termico, dal precursore zeolitico selezionato e dalle modalità di scambio ionico [1] [26] [27].

Al termine del processo di riduzione si origina una polvere costituita da granelli di dimensioni micrometriche contenenti particelle metalliche di Fe di dimensioni nanometriche.

Poiché i cationi metallici erano omogeneamente distribuiti nella struttura zeolitica [1], anche le particelle nanometriche formatesi in seguito al trattamento termico avranno una distribuzione uniforme.

La temperatura minima di trattamento termico che permette di osservare una riduzione dei cationi contenuti nelle zeoliti è di circa 350 °C. Per ridurre questi due campioni si è scelto di effettuare però un trattamento termico in atmosfera riducente a temperature più elevate, pari a 750 °C, per far sì che la maggior parte degli ioni Fe²⁺ fosse ridotta.

Poiché la temperatura, i tempi di riduzione e la matrice zeolitica scelta come precursore influenzano il grado del collasso della struttura zeolitica e la percentuale di porosità residua, è possibile ottenere un prodotto finale con una matrice amorfa o amorfa con fasi cristalline, mantenendo una percentuale di porosità residua più o meno ampia, utile nella separazione del DNA.

Inoltre, le temperature non sono così elevate da determinare una coalescenza eccessiva delle nanoparticelle di ferro che farebbe perdere le loro dimensioni nanometriche, poiché è noto che la dimensione delle particelle metalliche cresce all'aumentare della temperatura e del tempo del trattamento termico [1].

2.1.2.1 Trattamento termico FeA8sc

Il campione è stato riscaldato in un forno tubolare programmabile da temperatura ambiente a 750 °C (velocità di riscaldamento pari a 10 °C/min) e, successivamente, si è svolto il trattamento termico in atmosfera riducente composta da Ar-H₂ con il 3% di H₂ per un tempo di 120 minuti. Dopodiché si è spento il forno tubolare e si è lasciato che il campione tornasse a temperatura ambiente senza controllare la velocità di raffreddamento.

Il campione che ha subito questo trattamento termico viene denominato FeA8sc750°C-2h.

2.1.2.2 Trattamento termico FeX5sc

Il campione in polvere è stato depositato in parte in un crogiolo di platino e in parte in una navicella di platino e, in seguito, ciascuno dei due campioni è stato inserito in un forno tubolare programmabile ed è stato riscaldato da temperatura ambiente fino ad una temperatura pari a 750 °C (velocità di riscaldamento pari a 15 °C/min) ed è stato mantenuto a questa temperatura per un tempo pari a 120 minuti. All'interno del forno il campione è stato sottoposto ad un'atmosfera riducente composta da Ar-H₂ con il 2% di H₂ per l'intera durata del trattamento termico. Passate due ore, l'erogazione del campione è stata interrotta per consentire al campione un raffreddamento libero.

Il campione che ha subito il trattamento termico all'interno del crogiolo è stato denominato FeX5sc750°C-2h_crogiolo, mentre il campione che ha subito il trattamento termico sulla navicella è stato denominato FeX5sc750°C-2h.

2.1.3 Il trattamento in atmosfera riducente del campione (H,Fe)A18sc.600°C-1,5h

Il trattamento termico del campione (H,Fe)A18sc in atmosfera riducente, composta da una miscela di Ar e H₂ con H₂ al 3%, porta alla riduzione dei cationi di ferro da Fe²⁺ a ferro metallico e ad una evoluzione dello ione ammonio che provoca la formazione di siti di idrogeno acidi e il rilascio di NH₃ gassosa.

Durante il trattamento termico la zeolite è stata riscaldata in un forno tubolare da temperatura ambiente fino ad una temperatura di 600 °C, aumentando la temperatura di 15 °C al minuto. Una volta raggiunta la temperatura desiderata, il campione è stato mantenuto a 600 °C per un tempo di 90 minuti.

Dopodiché si è spento il forno e il campione è stato fatto raffreddare fino a temperatura ambiente.

Il materiale così ottenuto è costituito da una matrice amorfa di silice-allumina con particelle di Fe metallico e Fe₃O₄ e siti di idrogeno acidi ed è stato denominato (H,Fe)A18sc.600°C-1,5h.

2.1.4 Il campione FeA8sc.750°C-2h_macinato

In seguito all'effettuazione delle prove di estrazione di DNA eseguite con metodi automatici sono state rilevate problematiche correlate alle dimensioni eccessive di una frazione di particelle del nanocomposito FeA8sc750°C-2h che hanno provocato problemi durante l'estrazione, in quanto hanno causato l'otturazione di una pipetta utilizzata per l'aspirazione delle particelle.

Per rimediare a questo inconveniente si è deciso di effettuare una macinazione del campione FeA8sc utilizzando un mulino a palle. Dopo questa operazione è seguito un trattamento termico in atmosfera riducente analogo a quello del campione FeA8sc non macinato.

Il campione che ha subito questa serie di operazioni è stato denominato FeA8sc.750°C-2h_macinato.

3. Tecniche di caratterizzazione dei materiali

3.1 Spettroscopia di assorbimento atomico

La spettroscopia di assorbimento atomico è una tecnica che permette la quantificazione di elementi metallici contenuti in un campione.

3.1.1 Principi fisici

Questa tecnica analitica si basa sulla capacità di un campione atomizzato di assorbire radiazioni elettromagnetiche a frequenze specifiche, scelte in funzione dell'elemento che si vuole rilevare.

Quando un atomo assorbe energia gli elettroni possono passare da uno stato energetico fondamentale ad uno stato eccitato. Una volta giunto nello stato energetico eccitato, l'atomo torna velocemente nello stato fondamentale, emettendo un'energia pari all'energia che aveva precedentemente assorbito. L'energia che il campione atomizzato assorbe è proporzionale al numero di atomi colpiti dalle radiazioni.

3.1.2 Apparato strumentale

Gli strumenti utilizzati per effettuare misure di spettroscopia di assorbimento atomico sono costituiti da: una sorgente luminosa, un chopper, un sistema di atomizzazione, un monocromatore e un detector, come mostrato in figura 3.1.

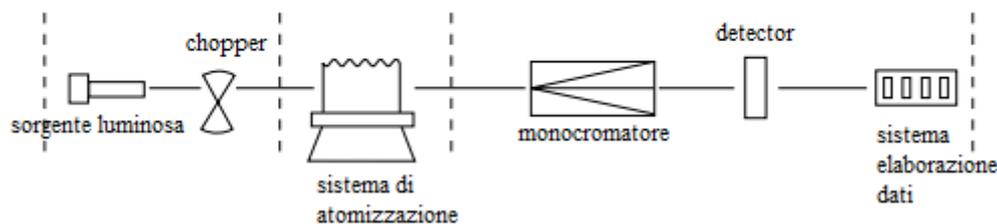


Figura 3.1: figura tratta da [41] con modifiche, rappresentazione schematica di uno spettrometro in cui vengono evidenziati gli elementi principali.

- Sorgente luminosa: generalmente costituita da una lampada a catodo cavo, formata da un anodo di tungsteno e un catodo cavo cilindrico costituito dall'elemento che si vuole rilevare. L'anodo e il catodo sono inseriti in un tubo di vetro riempito con un gas inerte, di solito argon o neon. Se si applica una differenza di potenziale di circa 300- 400 V alcuni atomi del gas inerte vengono ionizzati e colpiscono il catodo con energie sufficienti da provocare l'emissione di atomi metallici. Alcuni di questi atomi si trovano in uno stato eccitato ed emettono radiazioni caratteristiche. Queste radiazioni vengono

concentrate in un fascio, che fuoriesce attraverso una fessura in quarzo. Ogni strumento possiede diverse lampade, poichè esse sono specifiche per un preciso elemento.

- Chopper: dispositivo utilizzato per modulare l'intensità della radiazione emessa dalla sorgente luminosa in modo tale da renderla distinguibile dalle emissioni del sistema di atomizzazione.
- Sistema di atomizzazione: esistono due tipologie principali di atomizzatori utilizzati per le misure di spettroscopia ad assorbimento atomico:
 1. atomizzatori a fiamma: il campione in soluzione viene aspirato in un nebulizzatore, dove viene trasformato in aerosol e miscelato con ossidante e combustibile e poi viene immesso nella fiamma.
 2. Atomizzatori termoelettrici: il campione viene posizionato in un tubo di grafite riscaldato elettricamente e qui viene sottoposto a temperature crescenti che consentono di rimuovere il solvente, essiccare il campione, incenerirlo e, infine, atomizzarlo.
- Monocromatore: permette di selezionare la lunghezza d'onda d'interesse nell'analisi e rimuovere tutte quelle emesse dalla sorgente a catodo cavo.
- "Detector": è costituito da un fotomoltiplicatore che consente di convertire l'energia incidente in segnale elettrico.

3.1.3 Procedura sperimentale

L'analisi è stata svolta sui campioni che avevano subito lo scambio ionico ma non erano ancora stati sottoposti al trattamento termico in atmosfera riducente. Per effettuare la misura i campioni sono stati dissolti in una soluzione contenente acido fluoridrico e perclorico.

3.2 Adsorbimento/desorbimento di N_2 a $-196\text{ }^\circ\text{C}$

Le misure di adsorbimento e desorbimento permettono di ricavare informazioni relative all'area superficiale del campione, al volume dei pori presenti, alle loro dimensioni e, indicativamente, alla loro forma.

3.2.1 Principi fisici

Quando un solido, in un sistema chiuso, entra a contatto con un gas si verifica una cattura da parte della superficie di atomi o molecole gassose e questo fenomeno prende il nome di "adsorbimento".

In seguito a questo fenomeno si potrà osservare un aumento del peso del solido e una diminuzione della pressione del gas.

L'adsorbimento può essere di tipo chimico o fisico: nel primo caso si instaurano forti legami tra adsorbato e adsorbente, a volte dei veri e propri legami chimici, specifici per ogni sito e non sempre reversibili. Nell'adsorbimento di tipo fisico, invece, i legami sono deboli e aspecifici e il processo è sempre reversibile. Durante la prova di adsorbimento di N_2 si verifica un adsorbimento di tipo fisico. Si utilizza N_2 perché le sue molecole hanno scarsa interazione tra di loro e un'interazione non eccessiva con quasi tutti i materiali e ciò permette un fisisorbimento multistrato dell'azoto.

La quantità di gas adsorbita dipende da vari fattori, ovvero da: area superficiale esposta, temperatura a cui si trova il sistema e pressione del gas.

L'adsorbimento viene descritto tramite isoterme, che sono curve che riportano la quantità di molecole o atomi adsorbita in funzione della pressione.

In una condizione ideale, continuando ad aumentare la pressione, si arriva ad un punto in cui si ha un monostrato di particelle adsorbite sulla superficie ed un ulteriore aumento di pressione porta alla formazione di multistrati di particelle, come mostrato in figura 3.2.

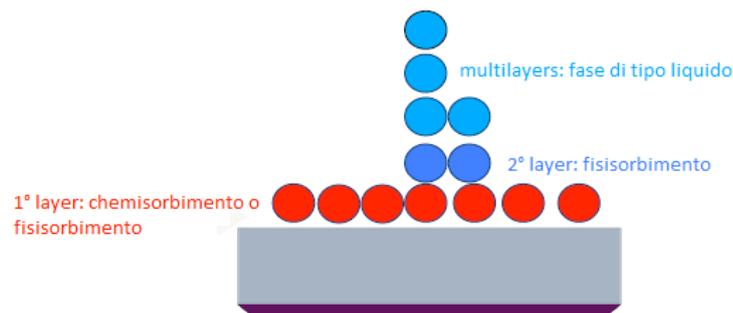


Figura 3.2: schema dei vari strati di adsorbimento.

Ad una determinata pressione, quindi, maggiore è l'area superficiale e maggiore è la quantità di molecole necessarie per la formazione del monostrato e degli strati successivi.

Nelle condizioni reali, però, non si analizzano superfici piane e lisce ma solidi con superfici rugose e irregolari e che possono contenere una certa percentuale di porosità. Analizzando

l'adsorbimento e il desorbimento del gas si possono quindi ricavare informazioni riguardanti la struttura dei pori e le dimensioni dell'area superficiale e dei pori.

Per valutare l'area superficiale si può utilizzare il modello BET (Brunauer, Emmet e Teller), che, a differenza di altri modelli, non trascura la possibile formazione di multistrati a qualsiasi pressione del gas, anche qualora non sia stato terminato il primo strato di molecole adsorbite.

In questo modello bisogna distinguere tra interazioni adsorbato-adsorbente, che avranno una loro costante di equilibrio K , e le interazioni adsorbato-adsorbato che avranno una costante di equilibrio K_n , dove la lettera n indica il numero di molecole che ricoprono il sito.

Esprimendo la relazione che si ottiene in funzione del volume si ottiene l'espressione 3.1:

$$V = \frac{V_{\text{monostrato}} \cdot C \cdot X}{(1 - X)(1 + (c - X)X)} \quad (3.1)$$

dove:

- V indica il volume di gas adsorbito ed è un termine che risulta proporzionale alla massa m adsorbita;
- $V_{\text{monolayer}}$ è il volume del monostrato adsorbito ed è proporzionale ad m_0 , ovvero alla quantità di fluido necessaria a ricoprire il monostrato;
- $X = P/P^0$ (P è la pressione del gas adsorbito e P^0 è la pressione di saturazione dell'adsorbato alla temperatura alla quale viene effettuata la prova);
- $C = K_1/K_m$ ed è un termine costante relativo all'entalpia di adsorbimento.

Una volta noto V è possibile risalire all'area superficiale: dal volume del monostrato si può ricavare il numero di molecole che lo ricoprono e, conoscendo l'area della molecola adsorbita (16.2 \AA^2 per l'azoto), si calcola l'area superficiale del solido in esame. Dopodiché si normalizza con la massa e viene così definita la superficie specifica del solido.

Dalle misure di adsorbimento e desorbimento è possibile ricavare, oltre alle informazioni relative all'area superficiale, anche informazioni riguardanti i pori: infatti, la formazione di liquido nei pori avviene a p sempre più basse man mano che diminuisce il raggio dei pori. A causa di queste differenze di comportamento tra adsorbimento e desorbimento si creano delle isteresi nelle isoterme che danno informazioni sui pori.

3.2.2 Apparato strumentale

Lo strumento utilizzato per effettuare le misure di adsorbimento e desorbimento di N_2 liquido a $-196 \text{ }^\circ\text{C}$, schematizzato in figura 3.3, è formato da:

1. un dewar di azoto liquido, in cui verrà inserito il campione durante la prova per mantenere la temperatura costante;
2. un recipiente contenente N_2 liquido che verrà utilizzato per effettuare l'adsorbimento;
3. un portacampione, che deve rimanere immerso nell'azoto liquido durante la misurazione;

4. un sistema di generazione e mantenimento del vuoto;
5. un sistema di controllo temperatura, che deve rimanere costante;
6. un sistema di controllo e acquisizione dati che legge e verifica che siano rispettate le impostazioni relative alla portata del gas e alla temperatura ed analizza i dati in uscita.

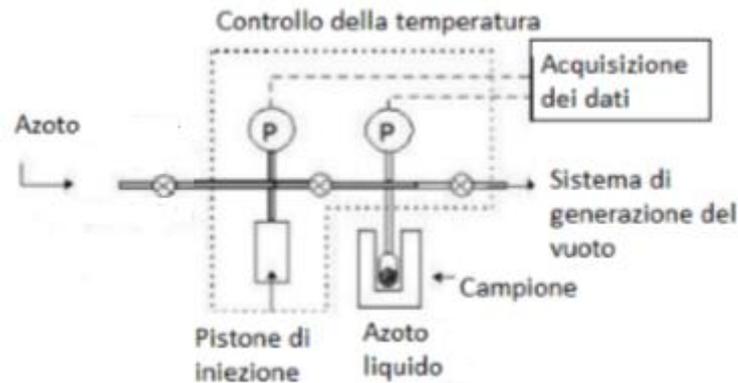


Figura 3.3: rappresentazione schematica dell'apparato strumentale utilizzato per effettuare le misure di adsorbimento/desorbimento.

3.2.3 Procedura sperimentale

L'analisi BET consiste essenzialmente nell'effettuare dei cicli di isoterme di adsorbimento e desorbimento variando la pressione parziale di azoto in una camera di volume noto collegata alla camera contenente il campione.

Per analizzare i risultati ottenuti con l'analisi BET vengono applicati dei modelli e delle simulazioni matematiche che consentono di ottenere informazioni riguardanti la distribuzione dei pori nel materiale.

Prima di effettuare la prova occorre misurare la massa del campione, dopodiché si effettua un degassaggio mediante riscaldamento, in modo da favorire il distacco di molecole adsorbite in precedenza sulle particelle, e dopo questa operazione, si pesa di nuovo il campione per conoscere la sua massa effettiva.

Dopo questa serie di operazioni si iniziano le misure di adsorbimento e desorbimento.

3.3 Diffrazione di raggi X

La diffrazione di raggi X (XRD) è una tecnica analitica non distruttiva che permette l'identificazione e l'analisi quantitativa delle fasi presenti in un materiale cristallino. Mediante questa tecnica è possibile ricavare anche informazioni riguardanti la struttura cristallografica delle fasi.

3.3.1 Principi fisici

I raggi X sono radiazioni elettromagnetiche prodotte dalla decelerazione di elettroni ad alta energia o da transizioni elettroniche che coinvolgono elettroni interni. I raggi X hanno lunghezze d'onda comprese in un intervallo tra 10^{-6} nm e 10 nm.

Ogni volta che una radiazione elettromagnetica viene in contatto con un atomo provoca l'oscillazione degli elettroni di "core" e ciascun atomo diventa sorgente di un'onda sferica che ha intensità proporzionale al numero degli elettroni coinvolti nel processo. Tali onde possono dare interferenze costruttive o distruttive. Queste interferenze tra radiazione ed atomi del campione sono possibili poiché la lunghezza d'onda dei raggi X utilizzata per questo tipo di analisi è confrontabile con le dimensioni della cella elementare (10^{-10} m).

Dall'interazione campione-raggi X vengono generate onde con interferenza costruttiva o distruttiva, determinate dalla legge di Bragg (3.2):

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (3.2)$$

Questa legge mette in relazione la lunghezza d'onda della radiazione incidente (λ) con il parametro reticolare del cristallo (d) e l'angolo di diffrazione (θ), che vengono illustrati in figura 3.4.

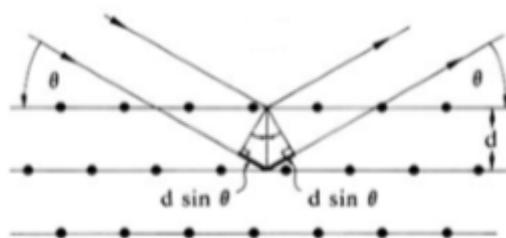


Figura 3.4: figura tratta da [40] con modifiche schema dei piani reticolari investiti da un fascio di raggi X

I piani cristallini in questa ipotesi vengono identificati come semiriflettenti, questo significa che solo una parte dell'onda incidente viene riflessa.

Affinché si possa avere interferenza costruttiva è necessario che la differenza di cammino esistente tra i raggi riflessi da piani vicini, espressa dal valore $2d \sin \theta$, sia corrispondente ad un multiplo intero di λ ; poiché nel caso in esame $n=1$, i requisiti per avere un'interferenza costruttiva sono soddisfatti.

Quindi, in conclusione, quando un fascio collimato di raggi X monocromatici viene riflesso da piani cristallini adiacenti e vengono verificate le ipotesi per cui si ha interferenza costruttiva, si genera un diffrattogramma costituito da una serie di picchi aventi diverse intensità e posizioni angolari. Ogni fase cristallina dà origine a una serie di picchi di diffrazione caratteristici, che sono raccolti in database appositi e che vengono confrontati con lo spettro ottenuto durante l'analisi per il riconoscimento della fase.

I dati analizzati durante un'analisi XRD vengono dunque raccolti in uno spettro di diffrazione, che contiene informazioni relative alle fasi presenti, individuabili in base alla posizione dei picchi, alla concentrazione di ogni fase, espressa dall'altezza dei picchi, al contenuto di fase amorfa e alla dimensione dei cristalliti, desumibile dall'ampiezza a metà altezza dei picchi attraverso la formula di Debye-Scherrer (3.3):

$$W_{FWHM} = \frac{K\lambda}{D_c \cos\theta} \cdot \frac{180}{\pi} \quad (3.3)$$

dove:

- W_{FWHM} è l'ampiezza a metà altezza del picco;
- K è una costante di proporzionalità;
- λ è la lunghezza d'onda del raggio incidente;
- D_c è la dimensione media dei cristalliti;
- θ è l'angolo d'incidenza del raggio.

3.3.2 Apparato strumentale

L'apparato strumentale utilizzato per effettuare le misurazioni di XRD è composto da una sorgente di raggi X, un filtro o un monocromatore, dei collimatori del fascio, un portacampioni e un detector, come illustrato in figura 3.5.

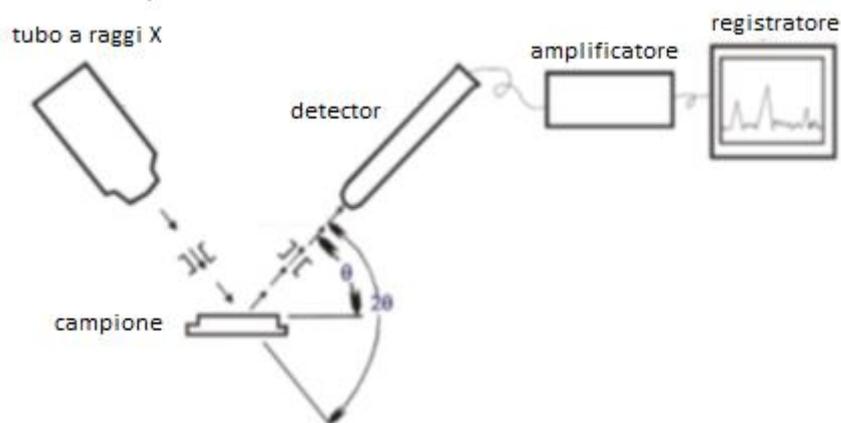


Figura 3.5: figura tratta da [40] con modifiche, apparato strumentale XRD

1. La sorgente di raggi X può essere di diverse tipologie, ma la più comune è il tubo a raggi X, ovvero un tubo in cui sono montati un target metallico, generalmente di rame, che costituisce l'anodo, e un catodo a filamento di tungsteno o di esaboruro di lantanio.

Il filamento di W o LaB_6 viene riscaldato mediante passaggio di corrente e rilascia elettroni per effetto termoionico. Se fra catodo e anodo viene mantenuta una differenza di potenziale, gli elettroni emessi dal filamento saranno accelerati in direzione dell'anodo. Il bombardamento elettronico del target metallico produce raggi X. In figura 3.6 viene rappresentata una schematizzazione di questa tipologia di sorgente.

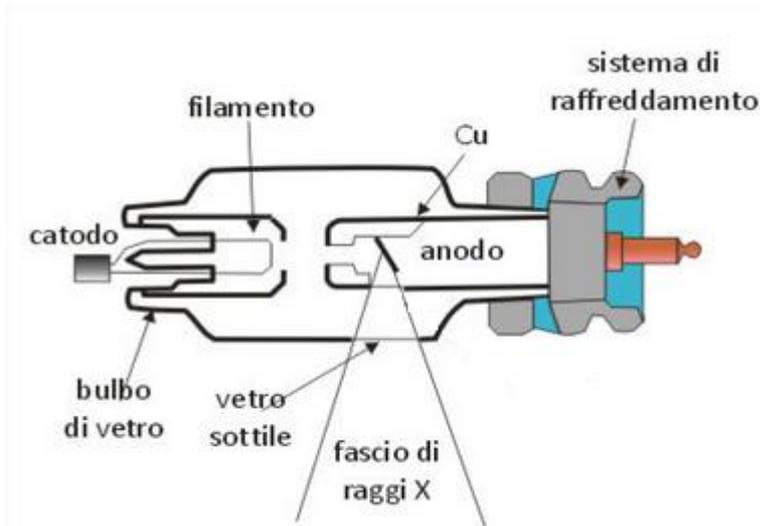


Figura 3.6: figura tratta da [35] con modifiche, schema di un tubo a raggi X che mette in evidenza il catodo, l'anodo, il sistema di raffreddamento e il fascio di raggi X generato.

L'intensità della radiazione emessa è controllata dalle modalità di riscaldamento del filamento, mentre la lunghezza d'onda e l'energia dei raggi X prodotti dipendono dall'accelerazione con cui gli elettroni liberi vengono diretti verso il bersaglio.

2. **Monocromatore e collimatore:** per gli esperimenti di diffrazione di raggi X a dispersione angolare, è importante disporre di radiazione monocromatica di elevata intensità, poiché l'interazione tra radiazione X e campione produce diversi fenomeni che vanno a costituire il "background". Il collimatore è generalmente costituito da cilindri cavi di piombo con un'apertura molto piccola, attraverso i quali viene fatto passare il fascio che viene collimato. Il monocromatore può essere posto sia fra la sorgente di raggi X e il campione, sia fra il campione e il rivelatore e permette di selezionare una e una sola lunghezza d'onda.
3. **Porta campione:** è generalmente costituito di plastica, alluminio o vetro e può essere utilizzato per un campione che può essere monocristallino o policristallino.
4. **Rivelatore:** in seguito all'analisi è necessario convertire i raggi X in una forma d'energia che possa essere misurata. I vari metodi per effettuare tale conversione si basano tutti sulla capacità della radiazione X di liberare uno o più elettroni dagli atomi colpiti (fenomeno di assorbimento) e sono i seguenti:
 - (a). film fotografico: veniva utilizzato in passato per rivelare i raggi X, ma ha una scarsa accuratezza per quanto riguarda l'intensità rivelata;
 - (b). scintillatore: è costituito da un materiale luminescente, generalmente ioduro di cesio o ioduro di sodio drogato con tallio, che quando viene colpito da una

radiazione X la assorbe ed emette luce a lunghezze d'onda superiori. Infatti, quando gli elettroni di valenza vengono eccitati dai raggi X incidenti, passano nella banda di conduzione determinando la formazione di coppie buca-elettrone. A seguito di tale eccitazione avviene un processo di decadimento con conseguente emissione di luce visibile nella regione dello spettro attorno ai 4000 Å. Le emissioni fluorescenti che vengono liberate dal cristallo investono un fotomoltiplicatore che le converte in impulsi elettrici, permettendone il conteggio.

Questo rivelatore ha un'accurata risposta in termini di posizione e intensità ma permette di analizzare un'intensità diffratta alla volta;

(c). rivelatori CCD (charged couple device): sono una delle classi di rivelatori più recente e sono formati da un diodo, generalmente di Si e Ge a trasporto di Li, costituito da tre strati: uno strato semiconduttore di tipo p, rivestito da uno strato d'oro su cui vengono agganciati i contatti elettrici, che viene rivolto verso la sorgente; uno strato centrale intrinseco e uno strato semiconduttore di tipo n, rivestito da uno strato di alluminio che permette di rilevare il segnale in uscita e inviarlo ad un amplificatore.

Grazie alla presenza dello strato intrinseco, quando un fotone delle radiazioni viene assorbito, si ha la formazione di un fotoelettrone con alta energia che genera una banda di conduzione di migliaia di elettroni di silicio.

Applicando al fotodiodo una differenza di potenziale, l'assorbimento di ogni fotone produrrà un impulso di corrente proporzionale all'energia dei fotoni assorbiti;

(d). rivelatori a gas: sono rivelatori proporzionali e sfruttano le interazioni che si hanno tra radiazione X e gas inerte, infatti, quando un raggio X vi passa attraverso questo viene ionizzato, con la conseguente formazione di numerosi ioni positivi gassosi ed elettroni.

3.3.3 Procedura sperimentale

Prima di iniziare la misura si sistema la polvere in un portacampione, compattandola e rendendo la superficie liscia e uniforme. Dopodiché si inserisce il portacampione nell'apposito supporto e si aziona la sorgente. La sorgente emetterà raggi X che verranno collimati e filtrati e infine andranno a colpire il campione interagendo con esso. In seguito, i raggi X emessi dal campione colpiranno il rivelatore e in uscita si otterrà uno spettro di diffrazione. L'angolo θ di incidenza del raggio sul campione è compreso tra 5° e 80° .

3.4 Mobilità elettroforetica e determinazione del potenziale zeta (ζ)

Le misure di potenziale zeta consentono di determinare la stabilità di una soluzione a vari pH.

3.4.1 Principi fisici

Quando una particella viene immersa nell'acqua viene generalmente ricoperta di cariche elettriche, le quali causano l'attrazione di ioni che formano uno strato intorno all'intera superficie esterna. La presenza di ioni sulla particella causa repulsione elettrostatica tra le varie particelle immerse nel liquido e, di conseguenza, la stabilità del sistema.

La formazione della carica è dovuta a diversi fenomeni, tra cui l'adsorbimento sulla superficie delle particelle di specie ioniche presenti in soluzione, la ionizzazione di gruppi chimici sulla superficie dei colloidi e la differenza della costante dielettrica tra il mezzo disperdente e la sostanza dispersa.

Lo strato di ioni che circondano la particella è suddivisibile in due parti: la parte più interna, costituita da ioni di segno opposto rispetto alla carica della particella, che ha legami stretti con la superficie e segue i suoi movimenti (strato di Stern) e la parte più esterna, costituita prevalentemente da ioni con lo stesso segno degli ioni dello strato di Stern, con legami labili, che vengono in parte persi durante i moti della particella e questo provoca la cattura di altri ioni in soluzione (strato mobile). Per quanto riguarda il secondo strato, la concentrazione di ioni di carica uguale a quelli dello strato di Stern va diminuendo a partire dall'inizio del secondo strato (denominato "slipping plane") fino al termine, che coincide infatti col punto in cui si arriva all'elettroneutralità.

Questa distribuzione di cariche, che inizia dalla superficie delle particelle e termina una volta che lo strato mobile giunge al punto di elettroneutralità, determina una differenza di potenziale tra superficie e soluzione.

Nel grafico in figura 3.7 viene mostrato l'andamento del potenziale zeta, ovvero il potenziale corrispondente allo "slipping plane", che è lo strato di separazione tra strato di Stern e strato mobile. Il potenziale zeta è indice della forza repulsiva esistente tra le varie particelle in soluzione e di conseguenza è una misura della stabilità del sistema la quale è determinata dal bilancio fra le forze attrattive e repulsive che agiscono quando le particelle si avvicinano.

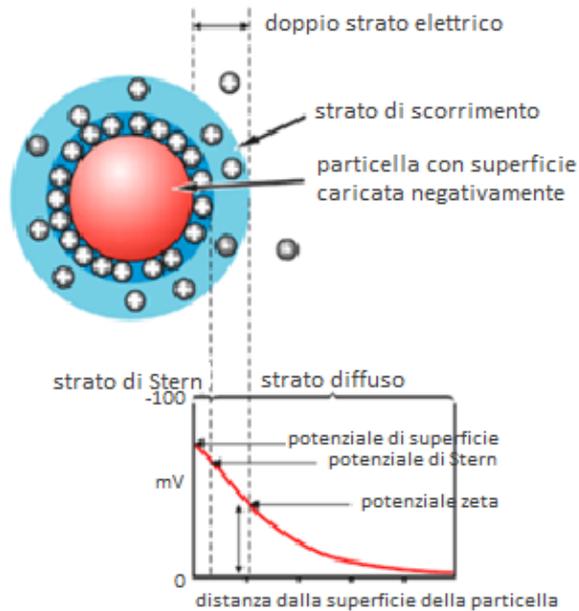


Figura 3.7 [37]: Formazione del doppio strato di ioni intorno alla particella e potenziale associato

L'elemento principale che influisce sul valore di potenziale zeta di una soluzione acquosa è il pH: alcune sostanze quando vengono inserite in una soluzione acquosa possono avere comportamento acido, rilasciando H^+ , o basico, assorbendo H^+ .

Come già detto in precedenza, il potenziale zeta dipende dalla densità di carica superficiale attorno alla particella e la densità di carica superficiale, a sua volta, dipende dalla concentrazione degli ioni in soluzione che hanno affinità con la superficie della particella. Se si considerano soluzioni contenenti acqua, dunque, il potenziale zeta dipende dal pH.

Quando due particelle con carica dello stesso segno si avvicinano, si respingono reciprocamente con una forza elettrostatica la cui intensità dipende dal potenziale zeta: se il potenziale assume valori bassi la forza repulsiva non sarà abbastanza forte da superare le forze di attrazione di Van der Waals fra le particelle e queste si aggrediranno determinando l'instabilità del sistema. Un alto valore di potenziale zeta, invece, impedisce l'agglomerazione delle particelle e mantiene la soluzione stabile.

Il potenziale zeta viene misurato mediante elettroforesi: una soluzione acquosa contenente particelle viene sottoposta ad un campo elettrico, questo causerà il movimento delle cariche in direzione del polo con carica opposta.

La loro velocità di migrazione dipende da: intensità del campo elettrico, costante dielettrica del mezzo, viscosità del mezzo e potenziale zeta. Utilizzando l'equazione di Henry (3.4), che esprime il valore di mobilità elettroforetica, ovvero la tendenza di una particella a muoversi all'interno di un campo elettrico esterno in funzione del potenziale zeta, è possibile risalire al valore di quest'ultimo:

$$U_e = \frac{2 \varepsilon_a \zeta f(ka)}{3\eta}$$

(3.4)

dove:

U_e = mobilità elettroforetica;

ζ = potenziale zeta;

ϵ_a = costante dielettrica dell'acqua;

η = viscosità del mezzo;

$f(ka)$ = funzione di Henry, rappresentata dal valore assunto dalla lunghezza di Debye, che è la distanza oltre la quale si ha la separazione di carica poiché il campo elettrico viene schermato dagli ioni in soluzione. Essa può assumere due valori tipici: $f(ka)=1,5$ nel caso in cui la lunghezza di Debye sia piccola rispetto al raggio della particella, oppure $f(ka)=1$ nel caso in cui il raggio della particella sia piccolo rispetto alla lunghezza di Debye.

Durante l'analisi, dunque, viene misurata la velocità delle particelle nell'acqua in seguito all'applicazione di un campo elettrico. Essa è ricavata dalla misura che un laser effettua delle lunghezze d'onda che colpiscono i corpuscoli in movimento. Misurando lo shift di frequenza è possibile misurare la mobilità elettroforetica attraverso la formula 3.5:

$$\Delta\nu = 2U_e \frac{\sin(\theta/2)}{\lambda}$$

(3.5)

dove $\Delta\nu$ è lo shift di frequenza, U_e è la mobilità elettroforetica, θ è l'angolo di scattering e λ la lunghezza d'onda della luce incidente.

3.4.2 Apparato strumentale

Lo strumento utilizzato per effettuare le misure di potenziale zeta è formato da un raggio laser, che attraversa il campione e serve per effettuare la misura di $\Delta\nu$, una cella di un materiale trasparente alla radiazione incidente in cui viene inserito il campione, un detector che analizza l'intensità del fascio laser in uscita dal campione e, infine, un sistema di acquisizione dati e analisi.

3.4.3 Procedura sperimentale

Si realizza una soluzione del campione da misurare e acqua, si inserisce all'interno della cella e l'interazione del campione con il laser dà come risultato il valore di potenziale zeta. Si effettua la misura a diversi pH.

3.5 Sedimentazione differenziale centrifuga

La sedimentazione differenziale centrifuga è un metodo di analisi largamente utilizzato che dà come risultato una distribuzione di taglia ad altissima risoluzione di particelle con dimensioni comprese tra 10 nm e 50 µm.

3.5.1 Principi fisici di base

La sedimentazione gravitazionale, descritta dalla legge di Stokes, è generalmente utilizzata per analizzare particelle che possiedono una taglia abbastanza grande, poichè la velocità di sedimentazione di particelle più piccole è troppo lenta per permettere un'analisi in tempi ragionevoli. Inoltre, quando la taglia delle particelle è molto piccola, il moto Browniano delle particelle stesse è più veloce ed ostacola in maniera importante la sedimentazione.

La legge di Stokes correla la velocità di sedimentazione delle molecole con le loro dimensioni:

$$D = \{9v\eta/(\rho_p - \rho_f)g\}^{0,5} \quad (3.6)$$

dove:

1. D = diametro particella;
2. v = velocità di sedimentazione;
3. η = viscosità della fase continua;
4. ρ_p = densità delle particelle;
5. ρ_f = densità del fluido;
6. g = accelerazione di gravità.

Particelle molto piccole, con diametro minore di 0,1 µm, invece non sedimentano mai per sola azione della gravità, quindi queste particelle non possono essere analizzate con metodi classici di sedimentazione gravitazionale.

La sedimentazione in una centrifuga estende il range di analisi di sedimentazione anche alle particelle con dimensioni piccole, poichè le forze coinvolte sono molto più alte della forza di gravità.

Quando viene utilizzata una centrifuga, la legge di Stokes viene modificata nel seguente modo:

$$D = \{(18\eta \ln \left(\frac{R_f}{R_0}\right))/((\rho_p - \rho_f)\omega^2 t)\}^{0,5} \quad (3.7)$$

dove:

1. D = diametro particella;
2. η = viscosità fluido;
3. R_f = raggio finale di rotazione;

4. R_0 = raggio iniziale di rotazione;
5. ρ_p = densità particelle;
6. ρ_f = densità fluido;
7. ω = velocità rotazionale;
8. t = tempo richiesto per la sedimentazione da R_0 a R_f .

Ci sono due metodi principali di analisi per la sedimentazione:

- Sedimentazione integrale: questo è il metodo più antico. Un fascio di luce monocromatica o di raggi X viene utilizzato come detector e viene fatto passare attraverso il fluido, ad una determinata distanza dalla superficie del liquido stesso, e misura la concentrazione delle particelle a quell'altezza. L'intensità iniziale del fascio che raggiunge il detector è corrispondente all'intensità minima ed è correlata ad un massimo nella concentrazione; l'intensità finale misurata è invece massima, poiché è correlata ad un minimo di concentrazione.

Per calcolare il diametro delle particelle sedimentate in funzione del tempo si usa la legge di Stokes, dopodiché viene generato un grafico plottando la concentrazione di particelle in funzione del diametro calcolato. Questo metodo non è utilizzabile per misure di sedimentazione in centrifuga.

- Sedimentazione differenziale: questo tipo di analisi fu descritta per la prima volta nel 1930. Un campione delle particelle che devono essere analizzate viene posto sulla superficie del liquido in una colonna e inizia la misura. All'inizio il detector registra un'intensità massima, dovuta al fatto che nessuna particella ha raggiunto l'altezza del liquido in cui il fascio passa; dopo un certo intervallo di tempo, l'intensità del segnale inizia a ridursi gradualmente poiché iniziano a giungere particelle che impediscono ad alcune zone del fascio di raggiungere il detector. Alla fine, quando tutte le particelle sono sedimentate, il segnale torna ad essere massimo. Il grafico della concentrazione di particelle in funzione del diametro mostra una distribuzione differenziale, perché in ogni istante il detector misura solo le particelle di una determinata taglia.

La concentrazione di particelle di ogni taglia è generata misurando istante per istante la torbidità del fluido al bordo esterno del disco rotante.

In realtà, quando un campione di particelle, che hanno una densità maggiore del liquido utilizzato per l'analisi, viene posto sulla superficie di quest'ultimo, la sospensione sedimenta rapidamente e questa sedimentazione di bulk viene denominata *streaming*. Per eliminare lo streaming e favorire una sedimentazione graduale è necessario formare un gradiente di densità nel liquido, che permette di aumentare gradualmente la sua densità dalla superficie verso il fondo: nei sistemi acquosi questo gradiente è generalmente formato utilizzando metanolo, etanolo, glicerina, saccarosio, etc.

3.5.2 Apparato strumentale

Lo strumento utilizzato per effettuare misure di sedimentazione in centrifuga è composto da un disco cavo trasparente, messo in rotazione da un motore, come mostrato in figura 3.8. Il diametro del disco è compreso tra i 125 mm e i 250 mm.

Il fascio utilizzato come detector può essere un fascio di luce monocromatica a bassa lunghezza d'onda, ovvero compresa tra i 400 nm e i 650 nm, oppure può essere costituito da raggi X. Quando le particelle hanno dimensioni minori di 100 nm vengono utilizzate lunghezze d'onda minori.



Figura 3.8: figura tratta da [36] con modifiche, sezione frontale e trasversale del disco cavo

Prima di iniziare la misura, il disco è messo in movimento ad una velocità costante e la cavità del disco viene riempita con un fluido con un leggero gradiente. I campioni di particelle sono diluiti in un liquido che deve avere la stessa densità del liquido con densità minore utilizzato per creare il gradiente. Quando il campione viene iniettato esso colpisce la parete posteriore del disco e forma un film sottile. Quando il disco viene accelerato, il film diffonde rapidamente verso la superficie. Una volta raggiunta la superficie iniziano le misure di sedimentazione. [36]

3.5.3 Procedura sperimentale

Il campione di polveri da analizzare viene diluito in acqua e la soluzione viene sonicata per cinque minuti. Dopo questi passaggi la soluzione viene iniettata nella centrifuga.

3.6 Proprietà magnetiche

Il momento magnetico di un materiale viene misurato da un magnetometro, secondo una tecnica di misura che differisce enormemente da strumento a strumento. Ogni dispositivo, comunque, è costituito da un trasduttore che converte il momento magnetico in un'altra grandezza, meccanica o elettromagnetica, facilmente misurabile.

3.6.1 Magnetometro a campione vibrante

Per effettuare questa misura, il materiale oggetto di studio viene montato rigidamente su una delle due estremità di un'asta diamagnetica che ne permette il posizionamento al centro del gap del magnete. L'altra estremità dell'asta è collegata ad un motore lineare che porta il campione in vibrazione al centro del magnete; l'ampiezza della vibrazione si attesta di norma attorno ai $\pm 1-3$ mm rispetto alla posizione di riposo, e la frequenza della vibrazione può essere tra i 60 e i 100 Hz.

Il campione è magnetizzato dal campo magnetico applicato, che è uniforme in tutta la regione in cui vibra il campione. Il flusso del campo generato dal campione magnetizzato si concatena con le bobine di pick-up poste nelle vicinanze. La vibrazione fa sì che tale flusso concatenato sia variabile nel tempo, inducendo in due bobine di pick-up una forza elettromotrice che può essere acquisita, filtrata ed amplificata da un amplificatore. La tensione indotta sulle bobine di pick-up è proporzionale a tre grandezze: frequenza di vibrazione, ampiezza di vibrazione e momento magnetico del campione.

La prima e la seconda sono mantenute costanti dall'hardware o dal software del magnetometro, la terza è determinata per confronto con un materiale usato come riferimento, dotato di momento magnetico noto ed usato per calibrare il magnetometro.

Il magnetometro a campione vibrante consente di effettuare misure di momento magnetico su materiali ferromagnetici dolci e duri e su materiali magnetici non convenzionali in funzione del campo applicato, del tempo e della temperatura.

3.7 PCR (polymerase chain reaction) e quantitative Real Time-PCR

3.7.1 PCR

La PCR è una tecnica teorizzata nel 1983 da Mullis, che consente la moltiplicazione, ovvero la creazione di copie multiple, di frammenti di acidi nucleici.

Questa tecnica si basa sul fenomeno della duplicazione cellulare, che consente la ricostruzione di un segmento di DNA a doppia elica a partire da un singolo filamento. Quest'operazione di ricostruzione viene svolta da enzimi denominati DNA-polimerasi, i quali formano il filamento mancante impilando una serie di nucleotidi che si dispongono in modo complementare ai nucleotidi del segmento di riferimento.

Grazie all'utilizzo della "polymerase chain reaction" è possibile ottenere in modo semplice e veloce la quantità di sequenze di DNA necessaria per svariate applicazioni, quali, ad esempio, genetic fingerprinting, test di paternità, identificazione di malattie ereditarie o virali, clonaggio di un gene ed analisi di DNA antico.

Per far sì che avvenga una reazione di polimerasi è necessario che siano presenti le seguenti componenti:

- DNA target, ovvero un filamento di DNA contenente il frammento da amplificare;
- DNA Polimerasi, un enzima che ha lo scopo di replicare la sequenza di DNA di interesse; poiché questa tecnica prevede l'utilizzo di temperature relativamente elevate, vengono impiegate le DNA polimerasi di batteri termofili e termostabili, che non risentono delle temperature a cui viene svolto il processo;
- Due primers, forward e reverse, che sono oligonucleotidi che, attaccandosi in punti specifici del filamento stampo di DNA, determinano l'inizio e la fine della regione da amplificare. Gli oligonucleotidi usati come primers devono essere composti da almeno 16 nucleotidi. La polimerasi incomincia a svolgere il suo compito quando gli oligonucleotidi forward si legano al filamento di DNA scelto come template a basse temperature (50-60 °C).
- Nucleotidi liberi che verranno impiegati nella sintesi del nuovo filamento di DNA;
- Buffer che crea un ambiente adatto per la duplicazione del DNA. Il buffer che viene generalmente utilizzato per la PCR contiene 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl.
- Ioni Mg^{2+}

Il processo della polymerase chains reaction è costituito da tre fasi principali, illustrati in figura 3.9:

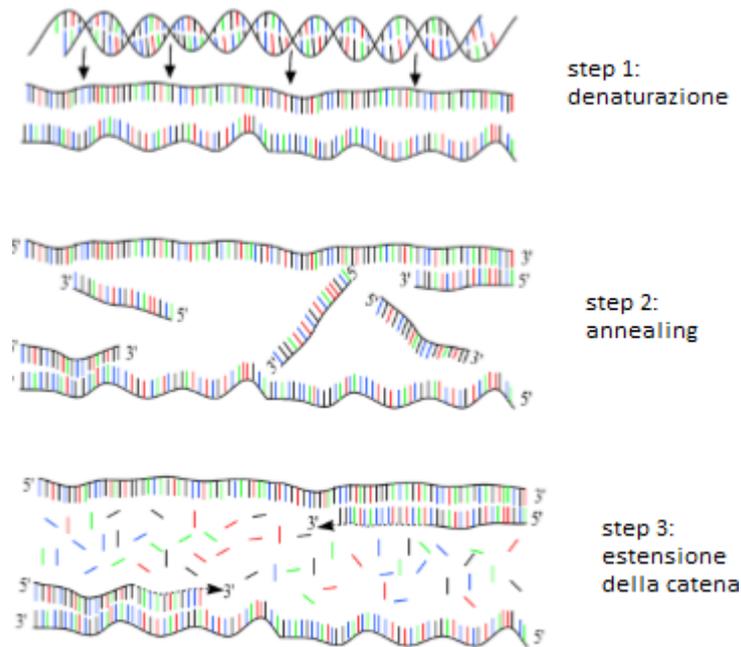


Figura 3.9: figura tratta da [39] con modifiche, “step” principali del processo della PCR

1. Fase di denaturazione del DNA: i due filamenti di DNA vengono separati per far avvenire la reazione di polimerasi. Questa fase avviene ad una temperatura elevata, tale da provocare la rottura dei legami che tengono uniti i due filamenti, ed è generalmente maggiore di 90 °C.
2. Fase di annealing: la temperatura viene abbassata in un intervallo compreso tra i 50 °C e i 60 °C per avere le condizioni favorevoli affinché i primers riescano a legarsi ai filamenti stampo del DNA in regioni ben definite e in queste zone si attacca la polimerasi che inizia la duplicazione della catena.
3. Estensione della catena: alzando la temperatura in un intervallo tra i 70-75 °C avviene l’elongazione, generata dalla polimerasi che attacca nucleotidi ai primers.

Il processo viene iterato per 30-40 volte e provoca una crescita esponenziale del DNA che termina quando i nucleotidi liberi non sono più sufficienti a creare nuovi filamenti e si raggiunge un plateau.

La tecnica presenta notevoli vantaggi, tra cui la velocità e la semplicità con cui è possibile effettuare l’amplificazione di milioni di copie della sequenza di DNA templato, la sensibilità che permette di replicare porzioni piccolissime di DNA e la possibilità di amplificare anche DNA danneggiato.

Uno degli svantaggi più grandi della PCR è che per analizzare il campione, valutando il numero di copie prodotte, bisogna aspettare la fine della reazione, che si verifica quando viene raggiunto il plateau e la quantità di DNA amplificato non è più proporzionale alla quantità di DNA stampo, quindi non è possibile risalire con sicurezza alla quantità iniziale di acido nucleico.

Per risolvere il problema legato all’effetto plateau si può ricorrere all’analisi Real Time-PCR, che permette di utilizzare i dati ottenuti durante la fase esponenziale in cui il DNA amplificato è proporzionale al template iniziale.

3.7.2 Real Time-PCR

Questa tecnica è un potenziamento della PCR che risolve il problema della quantificazione a termine amplificazione introducendo un sistema che permette di quantificare il DNA amplificato istante per istante. Il processo di amplificazione è lo stesso che viene utilizzato durante una classica PCR e, per quanto riguarda la quantificazione, essa viene eseguita introducendo in soluzione sostanze fluorescenti che si legano al DNA e che hanno emissioni luminose proporzionali alla quantità di DNA presente nell'istante di misurazione.

I componenti della reazione sono gli stessi della reazione PCR classica, con in più una sostanza fluorescente:

- DNA stampo;
- DNA Polimerasi;
- due primer;
- oligonucleotidi;
- componente fluorescente.

La Real Time-PCR permette, dunque, di quantificare il DNA amplificato durante ogni ciclo, quindi di effettuare un'analisi quantitativa durante la fase esponenziale, e ottenere così risultati più precisi.

Come si può vedere in figura 3.10, la curva di amplificazione che si ottiene mediante un'analisi PCR real-time è composta da tre parti: un primo tratto lineare, denominato "baseline", un tratto esponenziale, dove la quantità di DNA amplificato è proporzionale a 2^n volte la quantità iniziale, ed un plateau finale, che indica il termine della reazione.

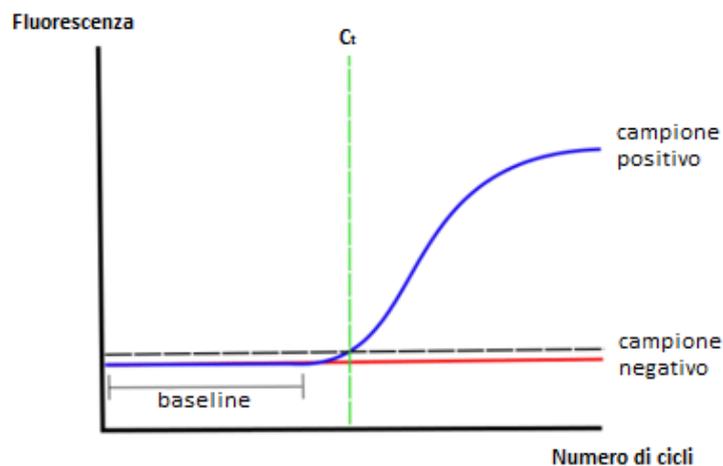


Figura 3.10: figura tratta da [39] con modifiche, curva ottenuta durante l'analisi PCR.

Un valore importante ricavabile dalla curva di amplificazione (figura 3.10) è il C_t (=Threshold Cycle), che è inversamente proporzionale alla quantità di template iniziale, infatti minore sarà la concentrazione di reagente e maggiore sarà il valore di soglia. Il C_t è il ciclo di reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza emesso dal DNA amplificato supera il segnale

di fluorescenza della threshold (linea tratteggiata in nero in figura 3.9), che è un valore minimo scelto volta per volta in base al quantitativo di DNA utilizzato per la prova.

La quantificazione può essere assoluta o relativa. Nella quantificazione assoluta si utilizza una “standard curve”, creata con standard di cui è nota la concentrazione iniziale e finale e si confronta il valore di C_t del campione a concentrazione note con quello del campione incognito per valutare la concentrazione di quest’ultimo. Nella quantificazione relativa, invece, i campioni vengono quantificati paragonando il loro ΔC_t .

Anche senza curve di calibrazione, questa tecnica ci permette di calcolare la concentrazione molare iniziale di DNA in base al valore C_t , secondo questa equazione:

$$M_{(0)} = M_{C_t} \cdot (1 + E)^{-C_t} \quad (3.8)$$

Dove $M_{(0)}$ rappresenta la concentrazione iniziale di DNA, M_{C_t} rappresenta la concentrazione di DNA al punto di soglia, E corrisponde all’efficienza del processo e C_t è il threshold cycle.

Da questa equazione si deduce che la concentrazione molare iniziale $M_{(0)}$ è inversamente proporzionale al termine C_t .

3.8 Estrazione DNA

Per valutare l'efficacia dei nanocompositi metallo-ceramici in analisi nella separazione del DNA da fluidi biologici, si è confrontata la resa di DNA ottenuta in seguito ad estrazione utilizzando questi materiali con la resa ottenuta mediante estrazione con particelle magnetiche Chemicell.

Oltre ai campioni di materiali nanocompositi analizzati in questo lavoro di tesi, sono state effettuate anche analisi su campioni analoghi precedentemente caratterizzati in un precedente lavoro [1], i quali sono stati però ritenuti non idonei al compito di estrazione del DNA.

Per effettuare il paragone sono state seguite diverse procedure:

1. Inizialmente è stato seguito il protocollo utilizzato per effettuare la separazione con le particelle Chemicell, illustrato in figura 3.11:
 - a. Il campione di partenza, ovvero 50 μL di sangue, è stato addizionato con 25 μL di soluzione costituita da particelle magnetiche e acqua e con guanidinio isotiocianato 8M, che è un sale caotropico il quale viene utilizzato per effettuare la lisi delle cellule e, contemporaneamente, favorisce il legame tra DNA e silice.
 - b. Il campione è stato mantenuto in incubazione con il sale caotropico e le particelle magnetiche per dieci minuti, mantenendo per tutto il tempo la soluzione sotto agitazione a temperatura ambiente.
 - c. In seguito a questo passaggio, il DNA si è legato alla superficie delle particelle, le quali sono state quindi rimosse dalla soluzione.
 - d. Successivamente, le particelle magnetiche sono state lavate due volte con una soluzione alcolica al 70% e disidratate con acetone. Le particelle sono state poi essiccate per dieci minuti a 60 °C. Con questi passaggi vengono eliminate le sostanze organiche indesiderate ed eventuali scarti.
 - e. Il DNA è stato eluito in acqua, mantenendo la soluzione in agitazione ad una temperatura di 60 °C per dieci minuti.
 - f. La resa del DNA eluito è stata valutata mediante la tecnica real-time PCR.

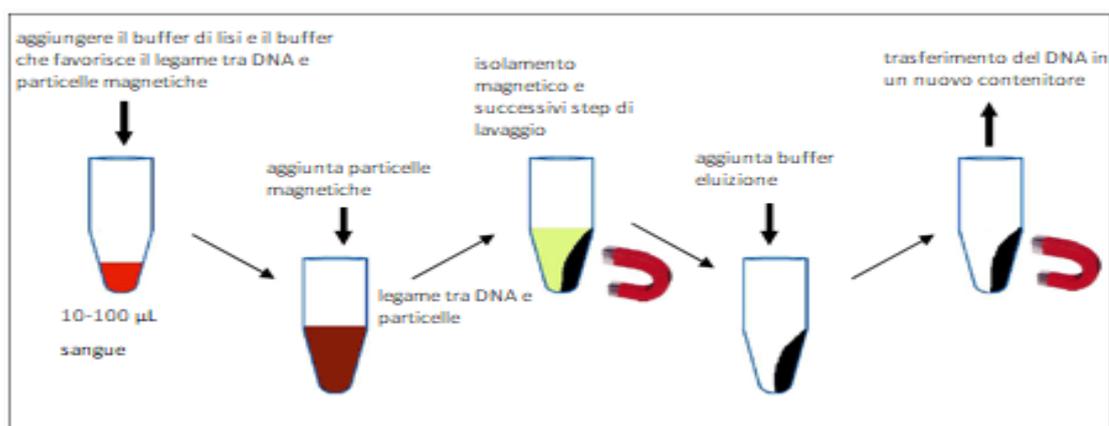


Figura 3.11: figura tratta da [38] con modifiche, protocollo utilizzato per la separazione di DNA da sangue con le particelle Chemicell

Poiché questa metodologia di estrazione non si è rivelata particolarmente adatta al nanocomposito metallo-ceramico studiato in questo lavoro, si è deciso di provare altre procedure:

2. Si è deciso di eliminare il passaggio di disidratazione con acetone e di essiccamento a 60 °C e di sostituirli con un lavaggio in H₂O.
3. E' stata eseguita una nuova preparazione della soluzione di acqua e particelle magnetiche iniziale:
 FeA8sc800°C-0min: 300 mg + 850 µl H₂O
 FeA8sc750°C-2h: 250 mg + 1 ml H₂O
 ed è stata modificata la temperatura di eluizione, che è stata aumentata a 70 °C, mantenendo sempre il tempo pari a 10 minuti.
4. E' stata aggiunta acqua alle particelle magnetiche in quanto si sono verificati problemi nella risospensione:
 FeA8sc800°C-0min: 300 mg + 850 µl H₂O + 850 µl H₂O, volume finale 1,7 ml
 FeA8sc750°C-2h: 250 mg + 1 ml H₂O + 1 ml H₂O, volume finale 2 ml
 Partendo da queste nuove soluzioni sono stati effettuati due diversi esperimenti: nel primo si è sostituito l'acetone con metanolo, le particelle sono state essiccate a 85 °C per dieci minuti e l'eluizione è stata effettuata ad una temperatura di 80 °C per dieci minuti; nel secondo il metanolo è stato sostituito con un lavaggio in acqua e il passaggio di essiccazione è stato eliminato, l'eluizione è stata effettuata sempre ad 80 °C per dieci minuti. Questi due esperimenti sono stati eseguiti ciascuno tre volte per campione. Le procedure sono state sintetizzate in tabella 3.1.

Tabella 3.1: schematizzazione delle procedure utilizzate per l'estrazione di DNA umano

Nome procedura	Descrizione
Procedura 1 (procedura utilizzata con le particelle magnetiche Chemicell)	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µl di sangue lisato + guanidinio isotiocianato + 25 µl di particelle magnetiche • 2 lavaggi con soluzione alcolica al 70% • disidratazione con acetone • essiccamento per dieci minuti a 60 °C • eluizione in acqua per dieci minuti a 60 °C
Procedura 2	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µl di sangue lisato + guanidinio isotiocianato + 25 µl di particelle magnetiche • 2 lavaggi con soluzione alcolica al 70% • disidratazione con acetone • eluizione in acqua per dieci minuti a 60 °C

Procedura 3	<ul style="list-style-type: none"> • FeA8sc800°C-0min: 300 mg + 850 µl H₂O • FeA8sc750°C-2h: 250 mg + 1 ml H₂O • 2 lavaggi con soluzione alcolica al 70% • disidratazione con acetone • essiccamento per dieci minuti a 60 °C • eluizione in acqua per dieci minuti a 70 °C 		
Procedura 4	<ul style="list-style-type: none"> • FeA8sc800°C-0min: 300 mg + 1,7 ml H₂O • FeA8sc750°C-2h: 250 mg + 2 ml H₂O <table border="1" data-bbox="635 584 1358 1025" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td data-bbox="635 584 1043 1025" style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Esperimento A</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 lavaggi con soluzione alcolica al 70% • disidratazione con metanolo • essiccamento per dieci minuti a 85 °C • eluizione in H₂O per dieci minuti a 80 °C </td> <td data-bbox="1043 584 1358 1025" style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p style="text-align: center;">Esperimento B</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 lavaggi con soluzione alcolica al 70% • Lavaggio in acqua • Eluizione in H₂O per dieci minuti a 80 °C </td> </tr> </table>	<p style="text-align: center;">Esperimento A</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 lavaggi con soluzione alcolica al 70% • disidratazione con metanolo • essiccamento per dieci minuti a 85 °C • eluizione in H₂O per dieci minuti a 80 °C 	<p style="text-align: center;">Esperimento B</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 lavaggi con soluzione alcolica al 70% • Lavaggio in acqua • Eluizione in H₂O per dieci minuti a 80 °C
<p style="text-align: center;">Esperimento A</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 lavaggi con soluzione alcolica al 70% • disidratazione con metanolo • essiccamento per dieci minuti a 85 °C • eluizione in H₂O per dieci minuti a 80 °C 	<p style="text-align: center;">Esperimento B</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 lavaggi con soluzione alcolica al 70% • Lavaggio in acqua • Eluizione in H₂O per dieci minuti a 80 °C 		

Queste diverse tipologie di protocollo sono state testate sull'estrazione di diversi geni target.

Per l'estrazione di DNA, effettuata sia in modo manuale, sia in modo automatico, è stata utilizzata la procedura 4-esperimento A.

Il nanocomposito metallo-ceramico è stato testato in manuale su diverse quantità di sangue: 100 µl, 10 µl, 1 µl, 0,1 µl.

E' stata anche provata un'estrazione in automatico di DNA batterico, con MAG24, che con le particelle magnetiche Chemicell dà uguali risultati all'estrazione manuale. Le quantità di sangue inserite nel pozzetto questa volta sono: 15 µl, 25 µl, 50 µl.

Dopo queste prove sono stati effettuati altri test in automatico per la ricerca di batteri nel sangue, in particolare Escherichia Coli e Staphylococcus aureus, seguendo la seguente procedura schematizzata in tabella 3.2:

5. sono stati utilizzati 948 mg di FeA8sc750°C-2h in 7,5 ml H₂O con lo 0,01% di azoturo di sodio, ottenendo così una concentrazione pari a 126 mg/ml, e per le analisi sono stati utilizzati 50 µl di questa soluzione; ogni campione di sangue analizzato conteneva o 10000 o 1000 o 100 o 10 batteri.

Tabella 3.2: schematizzazione della procedura utilizzata per l'estrazione di DNA batterico

Nome procedura	Descrizione
----------------	-------------

<p>Procedura 5</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 948 mg di FeA8sc750°C + 7,5 ml H₂O con lo 0,01% di azoturo di sodio • 2 lavaggi con soluzione alcolica al 70% • disidratazione con metanolo • essiccamento per dieci minuti a 85 °C • eluizione in H₂O per dieci minuti a 80 °C
--------------------	---

Inoltre, sono state effettuate diverse prove per determinare le condizioni migliori di estrazione utilizzando i nanocompositi metallo-ceramici: in primo luogo sono stati effettuati test sul quantitativo di particelle da utilizzare (concentrazione particelle: 15 µl, 25 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl in 50 µl di sangue), in secondo luogo si è provato a variare il tempo di incubazione delle particelle nel sangue lisato (tempo incubazione: 5 minuti, 10 minuti, 15 minuti) e, infine, sono state effettuate prove con diverse quantità di guanidinio isotiocianato (concentrazione: 2M, 4M, 8M).

4. Risultati Sperimentali

4.1 Spettroscopia di assorbimento atomico

L'analisi di spettroscopia di assorbimento atomico è stata effettuata sui campioni in seguito al processo di scambio ionico ma prima che fossero trattati termicamente. Si ricorda che il campione FeA8sc ha subito un processo di scambio ionico con Fe^{2+} iterato otto volte, il campione FeX5sc è stato sottoposto ad un processo di scambio ionico con Fe^{2+} iterato cinque volte, mentre il campione (H,Fe)A18sc ha subito un processo di scambio ionico con NH_4^+ iterato dieci volte e, in seguito, un processo di scambio ionico con Fe^{2+} iterato otto volte.

I campioni FeA8sc, FeX5sc e (H,Fe)A18sc sono stati, quindi, sottoposti a misure di spettroscopia di assorbimento atomico per conoscere le concentrazioni di cationi Fe^{2+} e NH_4^+ contenute nelle matrici zeolitiche in seguito al processo di scambio ionico. I risultati ottenuti sono i seguenti:

- FeA8sc: $\text{Fe}^{2+} = 4,51$ meq/g; Na^+ residuo = 0,58 meq/g. La percentuale in peso di cationi di Fe^{2+} è 16,9%.
- FeX5sc: $\text{Fe}^{2+} = 3,54$ meq/g; Na^+ residuo = 1,15 meq/g. La percentuale in peso di cationi di Fe^{2+} è 13,43%.
- (H,Fe)A18sc: $\text{Fe}^{2+} = 4,74$ meq/g; $\text{NH}_4^+ = 0,44$ meq/g; Na^+ residuo = 0,30 meq/g. La percentuale in peso di cationi di Fe^{2+} è 16,7%.

Si può notare che i campioni FeA8sc e FeX5sc hanno un contenuto di Fe^{2+} simile, anche se è leggermente maggiore nel campione FeA8sc.

Il campione (H,Fe)A18sc, invece, presenta una quantità di cationi Fe^{2+} nettamente maggiore rispetto ai cationi NH_4^+ .

4.2 Adsorbimento/desorbimento di N_2 a $-196\text{ }^\circ\text{C}$

Al fine di ottenere informazioni relative alle proprietà di superficie dei campioni FeX5sc750°C-2h, FeA8sc750°C-2h e (H,Fe)A18sc600°C-1,5h sono state misurate delle isoterme di assorbimento e desorbimento di N_2 a $-196\text{ }^\circ\text{C}$, le quali sono state in seguito utilizzate per determinare il valore della superficie specifica (S_{BET}), il volume totale dei pori (V_p) e il volume totale dei micropori (V_{mp}), riportati in tabella 4.1.

Le isoterme del campione FeX5sc750°C-2h (figura 4.1) del campione FeA8sc750°C-2h e del campione (H,Fe)A18sc600°C-1,5h sono tutte del tipo II, tipiche di superfici non porose o macroporose.

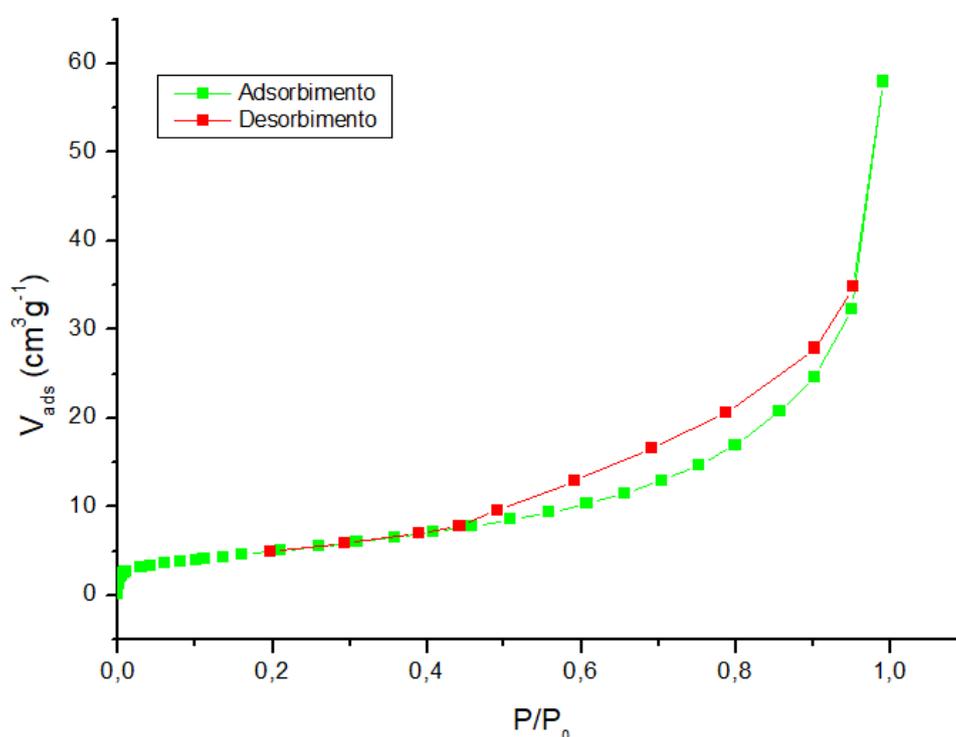


Figura 4.1: isoterma di adsorbimento e desorbimento del campione FeX5sc750°C-2h.

Tabella 4.1: tabella contenente le informazioni relative ai campioni FeA8sc750°C-2h, FeX750°C-2h, (H,Fe)A18sc600°C-1,5h e FeA8sc750°C-2h macinato per quanto riguarda i valori di area superficiale specifica (S_{BET}), volume dei pori (V_p) e volume dei micropori (V_{mp})

	S_{BET}	V_p	V_{mp}
FeA8sc750°C-2h	$9.5 \text{ m}^2/\text{g}$	$0.055 \text{ cm}^3/\text{g}$	$0.007 \text{ cm}^3/\text{g}$
FeX5sc750°C-2h	$19.03 \text{ m}^2/\text{g}$	$0.0666 \text{ cm}^3/\text{g}$	$0.0287 \text{ cm}^3/\text{g}$
(H,Fe)A18sc600°C-1,5h	$28 \text{ m}^2/\text{g}$	$0,15 \text{ cm}^3/\text{g}$	-

Come si può vedere dai risultati riportati nella tabella 4.1, il campione (H,Fe)A18sc600°C-1,5h mostra un valore di area superficiale specifica maggiore rispetto agli altri due ed un maggiore volume di pori. A differenza dei campioni FeX5sc750°C-2h e FeA8sc750°C-2h, però, il campione (H,Fe)A18sc600°C-1,5h non contiene micropori.

Per quanto riguarda il volume dei micropori, esso è maggiore nel campione FeX5sc750°C-2h.

Sui tre campioni è stata eseguita, inoltre, una distribuzione delle dimensioni dei pori, che ha mostrato che i campioni FeX5sc750°C-2h e FeA8sc750°C-2h presentano una larga varietà di dimensioni dei pori, che va dai 10 Å ai 1000 Å, ricoprendo così l'intervallo dimensionale di micro-, meso- e macro-pori.

Il campione (H,Fe)A18sc600°C-1,5h, invece, non mostra la presenza di micropori, ma contiene mesopori e macropori.

4.3 XRD

Inizialmente, sono stati misurati gli spettri XRD sui campioni FeA8sc750°C-2h, FeX5sc750°C-2h e FeX5sc750°C-2h_crogiolo per valutare se nei campioni fosse ancora presente zeolite in forma cristallina, per verificare la presenza di ferro metallico ed indagare l'esistenza di eventuali altre fasi cristalline formatesi durante il trattamento termico.

Lo spettro di diffrazione viene riportato in figura 4.2.

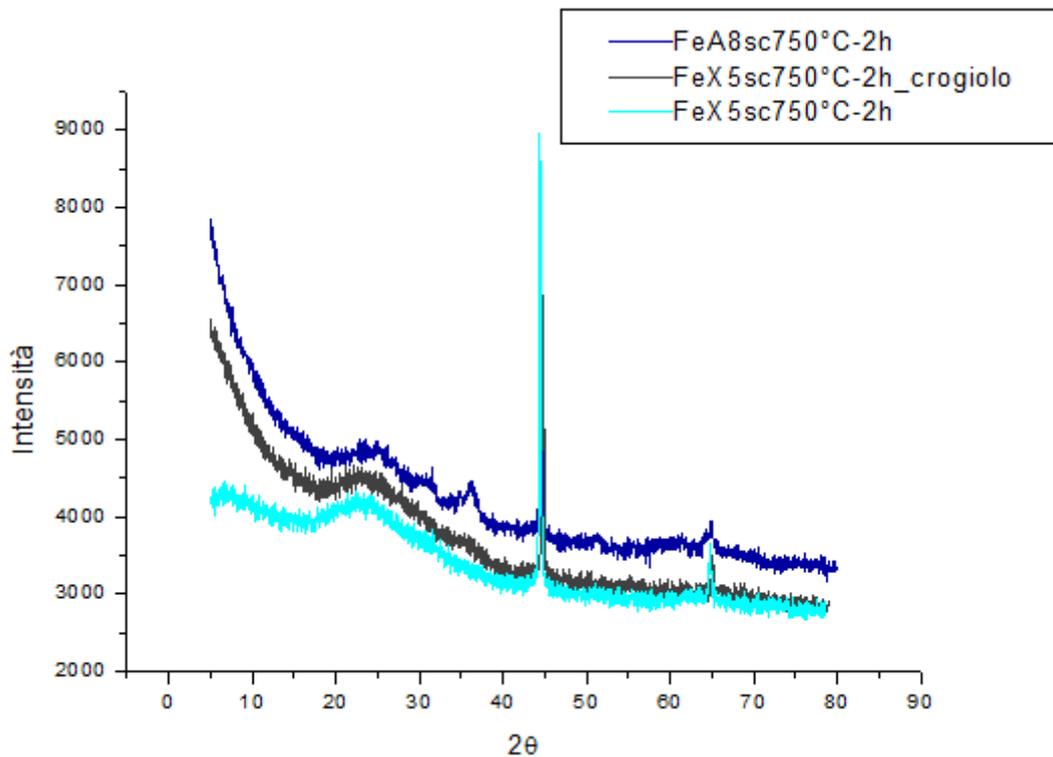


Figura 4.2: spettro di diffrazione dei campioni FeA8sc750°C-2h, FeX5sc750°C-2h e FeX5sc750°C-2h_crogiolo

Da quest'analisi è stato messo in evidenza che i campioni FeX5sc750°C-2h e FeX5sc750°C-2h_crogiolo presentano la scomparsa della struttura cristallina della zeolite e contengono ferro metallico. Il campione FeA8sc750°C-2h, invece, mostra una percentuale di zeolite cristallina residua elevata e presenta come altre fasi cristalline, oltre al ferro metallico, la fayalite (Fe_2SiO_4), un minerale composto da ferro, silicio e ossigeno.

Per valutare la quantità percentuale delle diverse fasi cristalline presenti nei campioni FeA8sc750°C-2h, FeX5sc750°C-2h, FeX5sc750°C-2h_crogiolo e (H,Fe)A18sc.600°C-1,5h è stata effettuata un'analisi Rietveld, con i seguenti risultati:

- FeA8sc750°C-2h: 6% Fe metallico, 15% zeolite cristallina, 11,7% fayalite, 67,3% fase amorfa;
- FeX5sc750°C-2h_crogiolo: 1,4% Fe metallico, 98,6% fase amorfa;
- FeX5sc750°C-2h: 4,1% Fe metallico, 95,9% fase amorfa;

- (H,Fe)A18sc.600°C-1,5h: 87,1% fase amorfa; 0,8% zeolite cristallina; 4,8% Fe; 7,1% Fe₃O₄; 0,2% FeO.

La percentuale di Fe contenuta nei campioni FeX5sc750°C-2h e FeX5sc750°C-2h_crogiolo mostra che la riduzione in crogiolo è meno efficace rispetto alla riduzione su navicella.

La presenza di ossidi nel campione (H,Fe)A18sc.600°C-1,5h potrebbe essere indice di una maggiore stabilità del materiale nelle condizioni di utilizzo.

4.4 Mobilità elettroforetica e determinazione del potenziale zeta (ζ)

Per ricavare informazioni relative al comportamento dei materiali in analisi in soluzioni a diversi pH sono state effettuate delle misure di potenziale zeta.

Innanzitutto, la misura è stata eseguita sui due campioni di zeolite A e X che avevano subito lo scambio ionico con il ferro ma non erano ancora stati trattati termicamente in atmosfera riducente. I risultati sono riportati in figura 4.3.

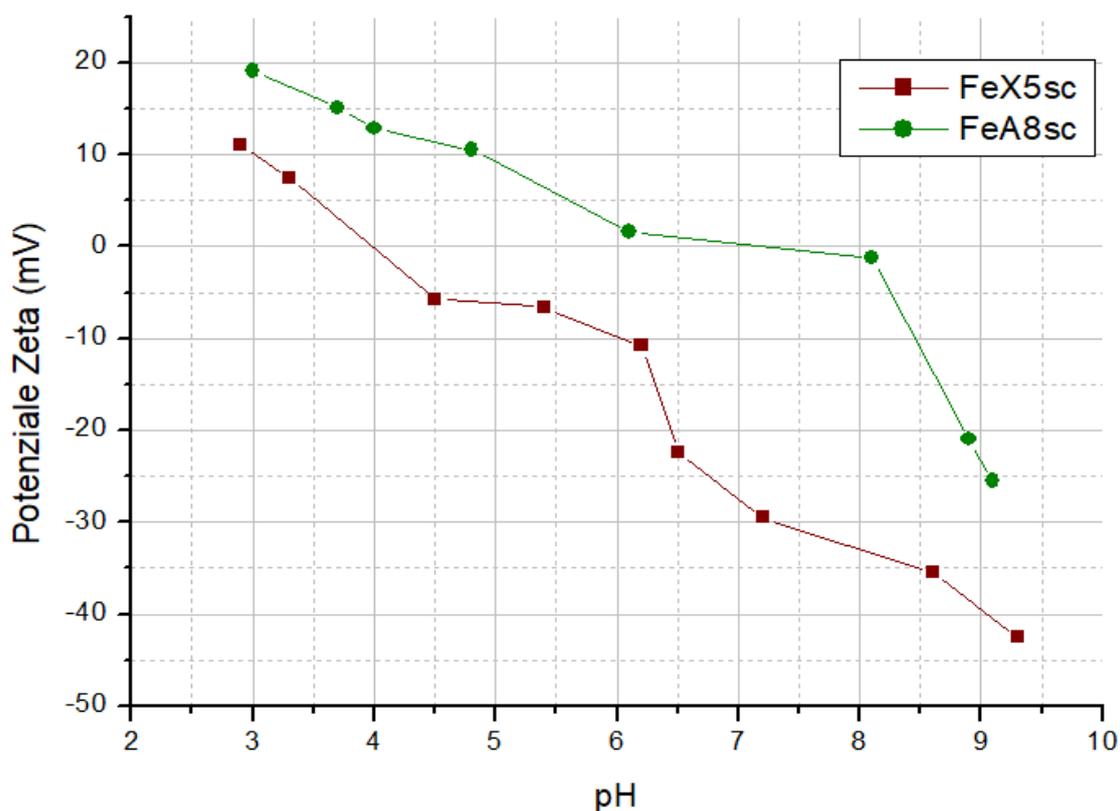


Figura 4.3: curve di potenziale zeta relative ai campioni FeA8sc e FeX5sc

Il grafico in figura 4.3 mostra che il campione FeX5sc ha il punto di carica zero in corrispondenza di un pH pari a 4. A pH inferiori la sua superficie si carica positivamente, mentre, a pH maggiori, la sua superficie si carica negativamente. Per quanto riguarda il campione FeA8sc, invece, il punto di carica zero è situato in corrispondenza di un pH della soluzione pari a 7. Per pH minori di 7 il campione ha un potenziale zeta positivo, mentre per pH maggiori il potenziale zeta diventa negativo.

Dopo le analisi preliminari eseguite sui campioni FeA8sc e FeX5sc, sono state eseguite le misure anche sui campioni FeA8sc750°C-2h, FeX5sc750°C-2h e (H,Fe)A18sc600°C-1,5h.

I risultati sono mostrati in figura 4.4.

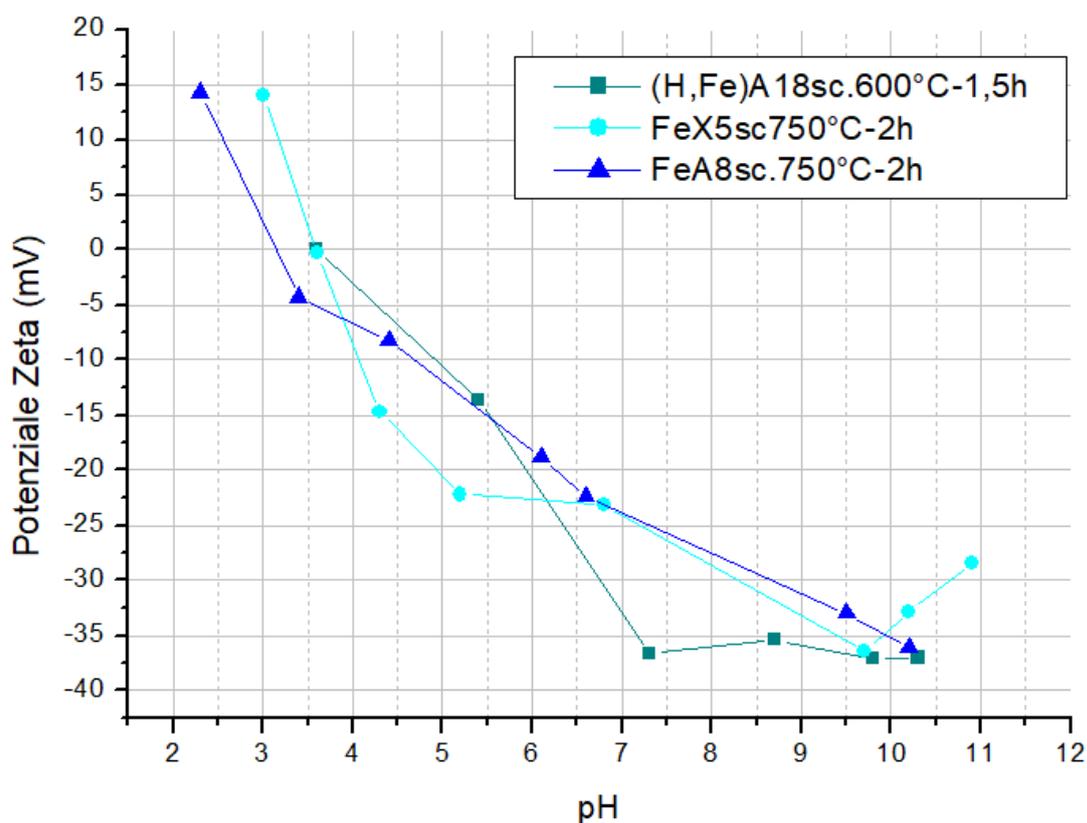


Figura 4.4: curve di potenziale zeta relative ai campioni FeA8sc750°C-2h, FeX5sc750°C-2h e (H,Fe)A18sc600°C-1,5h

Come viene messo in evidenza dal grafico in figura 4.4, tutti e tre i campioni hanno il punto di carica zero in corrispondenza di un pH compreso tra 3 e 4.

I campioni FeA8sc750°C-2h e FeX5sc750°C-2h, analogamente ai campioni FeA8sc e FeX5sc, hanno un potenziale zeta positivo per valori di pH più bassi rispetto al pH correlato al punto di carica zero e un potenziale zeta negativo per valori di pH più elevati.

4.5 Sedimentazione differenziale centrifuga

Per ottenere informazioni riguardanti le dimensioni delle particelle dei nanocompositi metallo-ceramici in esame, sono state eseguite delle misure di sedimentazione differenziale centrifuga, che hanno fornito come risultato un grafico che riporta il peso relativo in funzione del diametro delle particelle, espresso in μm . Nel grafico sono presenti due curve: una distribuzione differenziale, i cui picchi corrispondono al diametro più frequente nelle particelle in analisi, e una distribuzione integrale.

Le prime analisi di distribuzione dimensionale sono state eseguite sui campioni FeA8sc750°C-2h, FeA5sc750°C-2h e (H,Fe)A18sc.600°C-1,5h. I risultati sono riportati in figura 4.5.

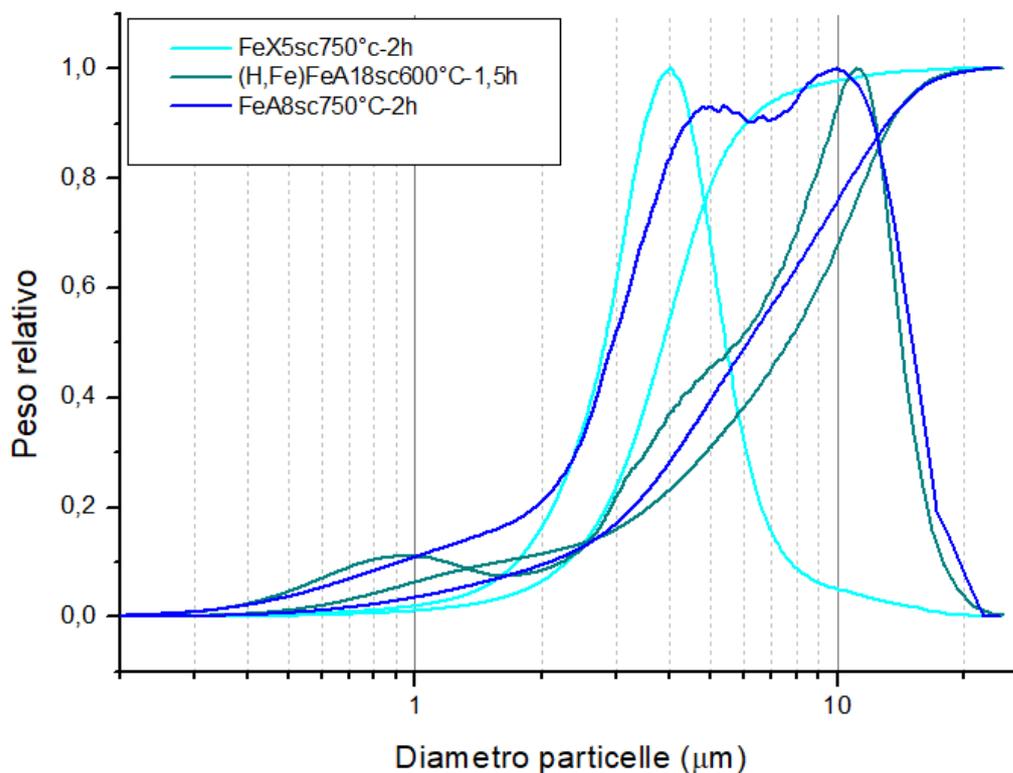


Figura 4.5: grafico che mostra la distribuzione in peso della dimensione delle particelle di FeX5sc750°C-2h_navicella, FeA8sc750°C-2h e (H,Fe)FeA18sc600°C-1,5h in funzione del loro diametro.

Il grafico in figura 4.5 mostra come le particelle del campione FeX5sc750°C-2h_navicella siano quelle con il diametro più piccolo, di dimensioni di circa 4 μm .

Il campione FeA8sc750°C-2h, invece, ha una distribuzione a doppio picco, probabilmente dovuta alla presenza di zeolite cristallina anche in seguito al trattamento termico in atmosfera riducente, e le dimensioni delle particelle sono centrate rispetto a due differenti grandezze: 5 μm e 10 μm .

Infine, il campione (H,Fe)FeA18sc600°C-1,5h, mostra una dimensione delle particelle leggermente maggiore di 10 μm .

Per ridurre la taglia delle particelle del campione FeA8sc750°C-2h si è deciso di macinare per cinque ore in un mulino a sfere il campione FeA8sc e di effettuare in un secondo momento il trattamento termico in atmosfera riducente.

Al fine di verificare la riuscita della macinazione, inizialmente sono state misurate e confrontate le distribuzioni dimensionali dei campioni FeA8sc e FeA8sc_macinato, come riportato in figura 4.6, per vedere se la macinazione eseguita sul campione FeA8sc_macinato avesse avuto buon esito.

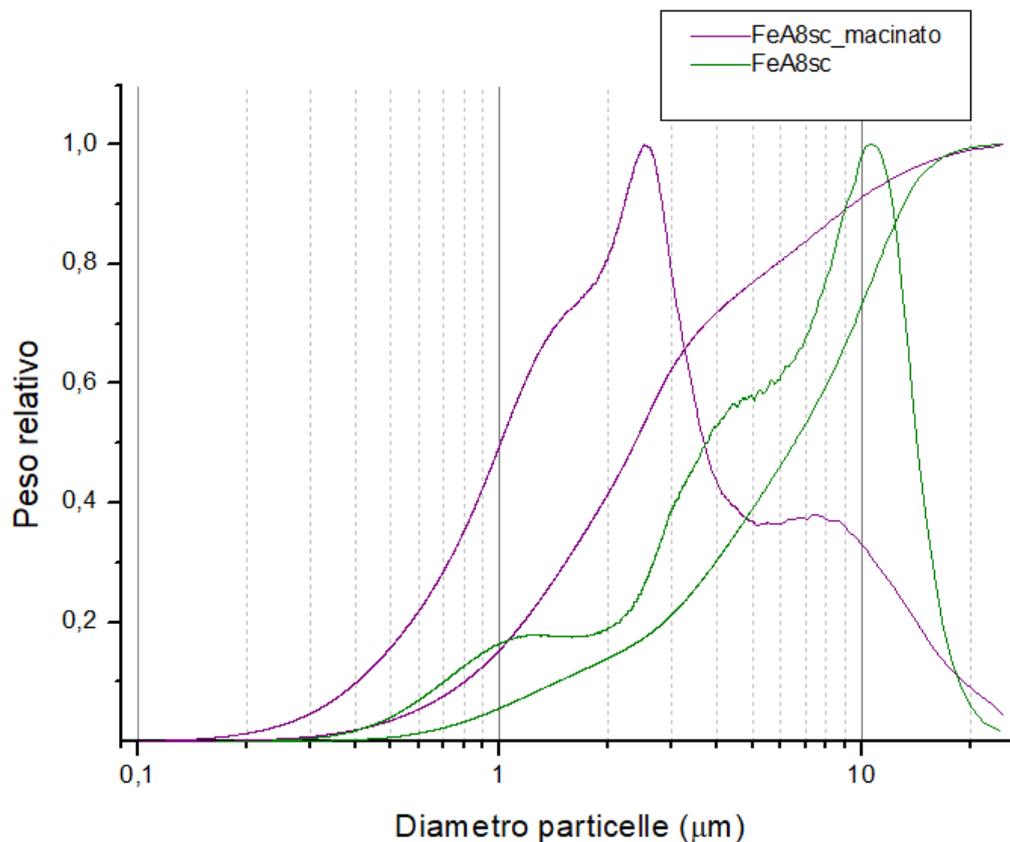


Figura 4.6: confronto tra le curve di distribuzione dimensionale del campione FeA8sc e del campione FeA8sc_macinato

Come si può vedere dal grafico in figura 4.6, il diametro delle particelle del campione FeA8sc si aggira intorno ai 10 µm, mentre il diametro del campione FeA8sc_macinato ha il picco principale compreso tra i 2 e i 3 µm, indice di una ottima riuscita del processo di macinazione.

A seguito dei risultati soddisfacenti ottenuti in seguito alla macinazione il campione FeA8sc_macinato è stato ridotto secondo le stesse modalità del campione FeA8sc e si è così ottenuto il campione FeA8sc750°C-2h_macinato.

Per confermare l'effettiva riduzione di taglia del composito è stata eseguita un'analisi di distribuzione dimensionale anche su quest'ultimo campione. Il grafico risultante è stato confrontato con quello del campione FeA8sc750°C-2h ed è riportato in figura 4.7.

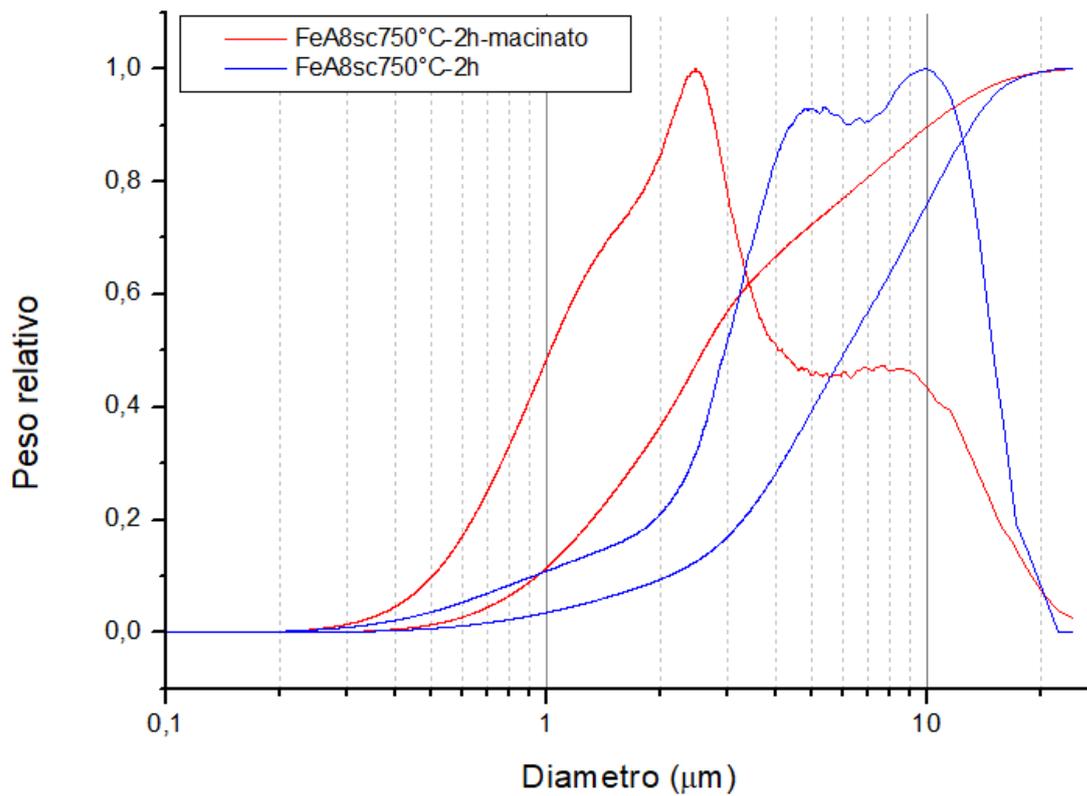


Figura 4.7: distribuzione dimensionale dei campioni FeA8sc750°C-2h e FeA8sc750°C-2h_macinato a confronto

Il grafico in figura 4.7 evidenzia come, anche dopo il trattamento termico, le dimensioni delle particelle del campione macinato rimangano minori rispetto a quello non macinato. In particolare, il campione FeA8sc750°C-2h_macinato ha il picco principale compreso tra i 2 e i 3 µm, mentre quello del campione FeA8sc750°C-2h ha il picco principale centrato sui 10 µm.

4.6 Proprietà magnetiche

In figura 4.8 vengono riportati i cicli di isteresi del campione FeA8sc750°C-2h (in nero) e del campione FeX5sc750°C-2h (in rosso).

Il campione FeA8sc750°C-2h mostra un massimo di magnetizzazione a 8,6 emu/g, mentre il campione FeX5sc750°C-2h ha un massimo di magnetizzazione più basso, corrispondente ad un valore di 6,5 emu/g; la differenza tra i massimi di magnetizzazione è conseguenza del diverso contenuto di Fe metallico nei due campioni in esame.

Il campione (H,Fe)A18sc600°C-1,5h presenta un massimo di magnetizzazione a 12,3 emu/g.

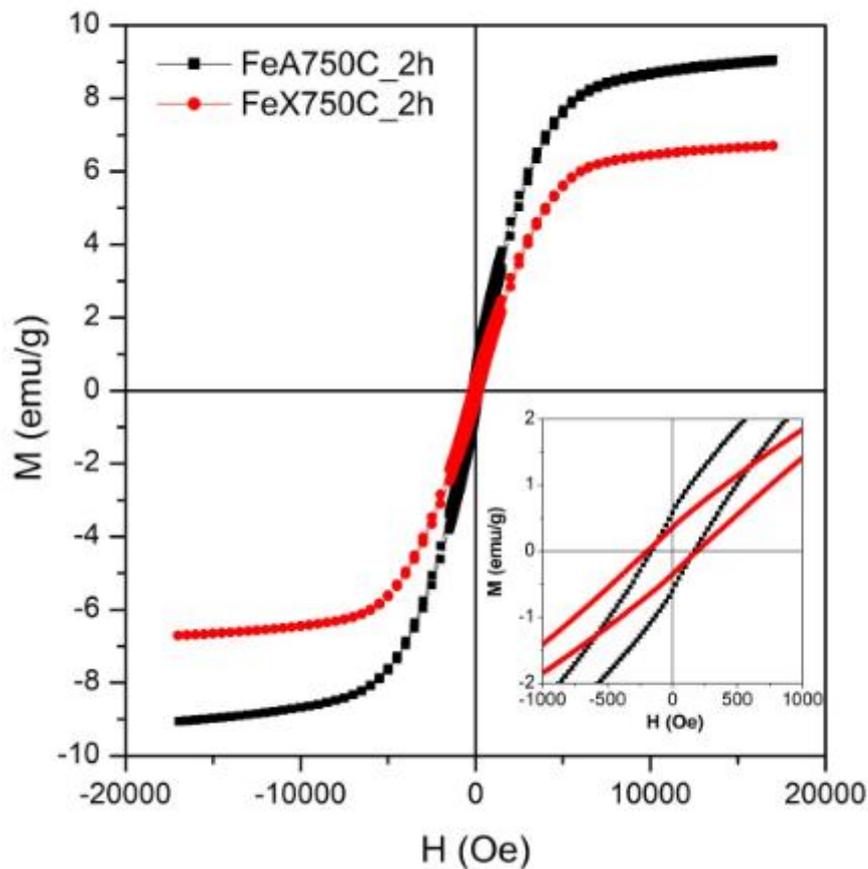


Figura 4.8: ciclo di isteresi dei campioni FeA8sc750°C-2h e FeX5sc750°C-2h

4.7 Estrazione DNA e Real-Time PCR

Come anticipato nel capitolo 3, per verificare l'efficacia del composito metallo-ceramico FeA8sc750°C-2h nell'estrazione del DNA sono state eseguite diverse prove in paragone con particelle magnetiche Chemicell e con il composito metallo-ceramico FeA8sc800°C-0min.

Il DNA eluito è stato quantificato mediante la tecnica Real-Time PCR e il confronto tra le varie particelle è stato effettuato valutando il valore C_t (threshold cycle), che è inversamente proporzionale alla quantità di DNA iniziale estratto. Di conseguenza, minore sarà il valore C_t e maggiore sarà la quantità di DNA estratto.

Di seguito sono riportati i risultati di tutte le prove eseguite con differenti procedure che sono state spiegate dettagliatamente nel capitolo 3:

- Procedura 1 (estrazione di geni da sangue intero, protocollo utilizzato con la resina Chemicell):

Inizialmente è stata eseguita una prova per paragonare i campioni FeA8sc800°C-0min e FeA8sc750°C-2h utilizzando come gene target il gene MTHFR 1298, i cui risultati sono riportati in tabella 4.2 e, in seguito, sono stati paragonati i due campioni con le particelle Chemicell, come riportato in tabella 4.3 e 4.4, utilizzando come geni target il gene RNASE e il fattore V.

Tabella 4.2: risultati delle prove di estrazione utilizzando come gene target MTHFR 1298, riguardanti il campione FeA8sc800°C-0min e il campione FeA8sc750°C-2h

Gene target: MTHFR 1298	
Particelle	C_t
FeA8sc800°C-0min	27
FeA8sc750°C-2h	30

Tabella 4.3: risultati delle prove di estrazione utilizzando come gene target RNASE, riguardanti il campione FeA8sc800°C-0min, il campione FeA8sc750°C-2h e le particelle Chemicell

Gene target: RNASE	
Particelle	C_t
FeA8sc800°C-0min	30
FeA8sc750°C-2h	32
Chemicell	25

Tabella 4.4: risultati delle prove di estrazione utilizzando come gene target fattore V, riguardanti il campione FeA8sc800°C-0min, il campione FeA8sc750°C-2h e le particelle Chemicell. La prova è stata ripetuta tre volte.

Gene target: fattore V

Particelle	C_t	C_t	C_t
FeA8sc800°C-0min	26	27	28
FeA8sc750°C-2h	33	27,8	31,5
Chemicell	26	26	27,4

Come evidenziato nella tabella 4.2, il confronto tra il campione FeA8sc800°C-0min e il campione FeA8sc750°C-2h ha portato in evidenza che, utilizzando questa procedura di estrazione, il campione migliore tra i due è il campione FeA8sc800°C-0min, come evidenziato anche in tabella 4.3 e 4.4. Confrontando, però, i valori di C_t ottenuti effettuando l'estrazione con i due compositi e quelli ottenuti con le particelle Chemicell, si è visto come i risultati di quest'ultima tipologia di particelle fossero migliori, come mostrato in tabella 4.3 e 4.4, o al limite uguali a quelli del campione FeA8sc800°C-0min, come evidenziato in tabella 4.4.

Si è quindi deciso di tentare l'utilizzo di procedure differenti e valutare come variasse il comportamento dei tre campioni utilizzando sempre come gene target il fattore V.

- Procedura 2:

Anche utilizzando questa procedura i risultati, riportati in tabella 4.5, rimangono migliori per le particelle Chemicell, con valori analoghi alla procedura 1.

Tabella 4.5: risultati delle prove di estrazione utilizzando come gene target fattore V, riguardanti il campione FeA8sc800°C-0min e le particelle Chemicell

Gene target: fattore V	
Particelle	C_t
FeA8sc800°C-0min	27,7
Chemicell	26,7

- Procedura 3:

Utilizzando la procedura 3, i cui risultati sono elencati in tabella 4.6, il C_t più basso viene ottenuto utilizzando le particelle Chemicell e il più alto sempre con il campione FeA8sc750°C-2h.

Tabella 4.6: risultati delle prove di estrazione utilizzando come gene target fattore V, riguardanti il campione FeA8sc800°C-0min, il campione FeA8sc750°C-2h e le particelle Chemicell

Gene target: fattore V	
Particelle	C_t
FeA8sc800°C-0min	27
FeA8sc750°C-2h	28
Chemicell	24,9

- Procedura 4:

Questa procedura è stata eseguita in due modalità differenti denominate esperimento 1 ed esperimento 2. Ogni esperimento è stato eseguito tre volte per ogni campione e si è calcolato un valore di C_t medio, riportato in tabella 4.7. I due esperimenti sono stati poi ripetuti una seconda volta e i risultati sono stati riportati in tabella 4.8.

Tabella 4.7: risultati della prima prova di estrazione utilizzando come gene target fattore V riguardanti il campione FeA8sc800°C-0min, il campione FeA8sc750°C-2h e le particelle Chemicell. Sono riportati i risultati sia dell'esperimento 1 sia dell'esperimento 2

Gene target: fattore V		
Particelle	C_t medio-esperimento 1	C_t medio-esperimento 2
FeA8sc800°C-0min	25,6	27,3
FeA8sc750°C-2h	25,4	28,5
Chemicell	26	25,6

Tabella 4.8: risultati della seconda prova di estrazione utilizzando come gene target fattore V, riguardanti il campione FeA8sc800°C-0min, il campione FeA8sc750°C-2h e le particelle Chemicell. Sono riportati i risultati sia dell'esperimento 1 sia dell'esperimento 2

Gene target: fattore V		
Particelle	C_t medio-esperimento 1	C_t medio-esperimento 2
FeA8sc800°C-0min	23,6	24,6
FeA8sc750°C-2h	24,7	23,3
Chemicell	24	24

Poiché questa procedura mostra valori di C_t più bassi per il campione FeA8sc800°C-0min che per le particelle Chemicell, per continuare le prove di estrazione di DNA da campioni di sangue si è deciso di utilizzare la procedura 4, in particolare si è scelto l'esperimento 1 poiché in questo caso, come mostrato in tabella 4.7, anche i valori di C_t relativi al campione Fe8sc750°C-2h risultano più bassi di quelli ottenuti con le particelle Chemicell.

Inizialmente, la prova è stata effettuata utilizzando lo stesso quantitativo di particelle in campioni contenenti diversi quantitativi di sangue, per valutare la sensibilità delle particelle, come mostrato in tabella 4.9.

Tabella 4.9: risultati delle prove di estrazione utilizzando come gene target fattore V, riguardanti il campione FeA8sc800°C-0min, il campione FeA8sc750°C-2h e le particelle Chemicell in diverse quantità di sangue.

Gene target: fattore V				
Particelle	C _t (100 µl sangue)	C _t (10 µl sangue)	C _t (1 µl sangue)	C _t (0,1 µl sangue)
FeA800°C-0min	25.7	28	30.8	34
FeA750°C-2h	26	26.3	30	35
Chemicell	24.1	28.4	32	35.7

Utilizzando questo tipo di procedura si è notato che i nanocompositi metallo-ceramici hanno un comportamento migliore rispetto alle particelle Chemicell nel caso in cui si utilizzi un quantitativo minore di sangue.

In particolare, si ottengono valori di C_t più bassi, quindi resa di estrazione migliore, quando la quantità di sangue è pari a 10, 1, 0,1 µl, quando dunque la concentrazione di particelle in soluzione è più alta.

Confrontando, invece, tra loro i campioni FeA800°C-0min e FeA750°C-2h si può osservare che il primo ha un comportamento migliore rispetto al secondo solo nel caso in cui la quantità di sangue sia pari a 0,1 µl.

In seguito, è stato eseguito un test in automatico utilizzando lo strumento MAG 24, che, se utilizzato con le particelle magnetiche Chemicell, fornisce gli stessi risultati di un' estrazione eseguita manualmente.

Si è deciso di testare l' estrazione automatizzata non più di DNA umano ma di DNA batterico; per farlo è stato usato sangue intero contaminato con Staphylococcus Aureus, utilizzando 100 batteri per pozzetto, quantitativo equivalente ad una concentrazione pari a 2000 batteri/ml, e l' esperimento è stato ripetuto in due giorni differenti.

Il test è stato eseguito con una quantità di particelle in soluzione pari a 15 µl per le particelle Chemicell e con una quantità pari a 25 e 50 µl di particelle in soluzione per i nanocompositi metallo-ceramici, sempre seguendo la procedura 4-esperimento 1.

I risultati sono riportati in tabella 4.10 e in tabella 4.11.

- Procedura 4-esperimento1:

Tabella 4.10: risultati delle prove di estrazione di Staph. Aureus utilizzando il campione FeA8sc800°C-0min, il campione FeA8sc750°C-2h e le particelle Chemicell. La prova è stata eseguita il giorno 1 tre volte differenti.

Staphylococcus Aureus – esperimento giorno 1			
Particelle	C _t media (15 µl di particelle in soluzione)	C _t media (25 µl di particelle in soluzione)	C _t media (50 µl di particelle in soluzione)
FeA800°C-0min	-	35	35
FeA750°C-2h	-	33,5	33,4
Chemicell	32,4	-	-

Il secondo giorno la prova è stata ripetuta utilizzando una quantità di soluzione con particelle magnetiche pari a 15 µl nel caso delle particelle Chemicell e una quantità pari a 50 e 100 µl per i compositi oggetto di studio.

Tabella 4.11: risultati delle prove di estrazione di Staph. Aureus utilizzando il campione FeA8sc800°C-0min, il campione FeA8sc750°C-2h e le particelle Chemicell. La prova è stata eseguita il giorno 2 tre volte differenti.

Staphylococcus Aureus – esperimento giorno 2			
Particelle	C _t media (15 µl di particelle in soluzione)	C _t media (50 µl di particelle in soluzione)	C _t media (100 µl di particelle in soluzione)
FeA800°C-0min	-	35,2	35,6
FeA750°C-2h	-	33,4	33,3
Chemicell	33,5	-	-

Da queste ultime prove eseguite in modo automatizzato è emerso che il campione FeA800°C-0min risulta poco magnetizzato rispetto agli altri due tipi di particelle magnetiche e viene dunque aspirato durante l'eluizione del surnatante.

Inoltre, è evidente che i risultati dati dal campione FeA750°C-2h siano confrontabili, come mostrato in tabella 4.10, se non addirittura migliori, come evidenziato in tabella 4.11, rispetto ai risultati ottenuti con le particelle Chemicell, anche se è necessario utilizzare quantitativi maggiori di particelle in soluzione.

In seguito ai risultati ottenuti sono state eseguite delle prove utilizzando esclusivamente il campione FeA8sc750°C-2h e seguendo la procedura 5.

- Procedura 5:

Inizialmente sono state eseguite delle prove che avevano il fine di testare la sensibilità del campione FeA8sc750°C-2h e sono stati fatti 4 test utilizzando diversi quantitativi di batteri nel pozzetto, in particolare sono stati utilizzati 10000, 1000, 100 e 10 batteri per pozzetto.

I test sono stati eseguiti sia su campioni di sangue contenenti Staph. Aureus, sia su campioni di sangue contenuti E. Coli.

I risultati sono riportati in tabella 4.12.

Tabella 4.12: risultati delle prove di estrazione di Staph. Aureus e E. Coli utilizzando il campione FeA8sc750°C-2h con diverse quantità di batteri.

	Staph. Aureus	E.Coli
Numero batteri	C_t	C_t
10000	28,6-28,8	24,5-22,6
1000	32,4- 30,5	27,7- 25,5
100	33,5 -33,3	28 -29,6
10	35,2 -36	30,5 -30,3

Utilizzando il campione FeA8sc750°C-2h e seguendo la procedura 5 sono stati ottenuti valori di C_t sovrapponibili a quelli riscontrati utilizzando la resina Chemicell. In particolare, questa prova ha messo in evidenza che il campione FeA8sc750°C-2h ha comportamento migliore nell'estrazione di E. Coli.

Dopo aver ottenuto questi risultati positivi si è deciso di effettuare delle prove riguardanti la stabilità nel tempo delle particelle FeA8sc750°C-2h, sempre paragonando i risultati ottenuti con quelli delle particelle Chemicell. Per effettuare questi test sono state usate particelle del campione FeA8sc750°C-2h diluite in acqua, che sono state conservate in frigo per 10 mesi e sono stati utilizzati 50 µl di sangue con 50 µl di particelle magnetiche. L' esperimento è stato eseguito 6 volte ed i risultati sono riportati in tabella 4.13.

Tabella 4.13: risultati delle prove di estrazione utilizzando il campione FeA8sc750°C-2h e le particelle Chemicell. La prova è stata eseguita sei volte e in tabella viene riportato il C_t medio.

Particelle	C_t media
FeA8sc750°C-2h	27
Chemicell	24,7

Questo test ha portato in evidenza che le particelle FeA8sc750°C-2h già sospese in acqua, dopo 10 mesi perdono efficacia nell'estrazione di DNA, cosa che non accade nel caso si utilizzino particelle Chemicell.

Inoltre, per una maggiore accuratezza dei risultati, il campione di FeA8sc750°C-2h conservato in frigorifero per dieci mesi è stato confrontato con un campione risospeso in acqua al principio della prova. I risultati sono riportati in tabella 4.14.

Tabella 4.14: risultati delle prove di estrazione di utilizzando il campione FeA8sc750°C-2h e il campione FeA8sc750°C-2h conservato in frigo per dieci mesi.

Particelle	C_t media (50 µl di resina in 50 µl di sangue)	C_t media (75 µl di resina in 50 µl di sangue)
FeA8sc750°C-2h (conservata in frigorifero dieci mesi)	27,7	31,8
FeA8sc750°C-2h	26	26,1

In tabella 4.14 è osservabile come le particelle mantenute in frigo abbiano perso efficacia rispetto ad un campione di particelle sospeso al momento.

Per determinare le migliori condizioni di utilizzo delle particelle FeA8sc750°C-2h, al fine di ottenere la resa più alta possibile, sono stati effettuati diversi test che hanno avuto come obiettivo quello di determinare alcuni parametri della procedura da utilizzare: in particolare si è rivolta l'attenzione alla quantità di resina da inserire nei campioni di sangue, ai tempi di incubazione della resina nel sangue lisato e alla concentrazione ideale di guanidinio isotiocinato (GTC).

Tutte le prove sono state eseguite in modo automatizzato e sono state ripetute tre volte.

I risultati relativi ai test effettuati per valutare la migliore concentrazione di particelle magnetiche da utilizzare in un campione di sangue sono riportati in tabella 4.15, quelli relativi al tempo di mantenimento delle particelle nel campione di sangue sono riportati in tabella 4.16, quelli relativi al quantitativo di GTC da utilizzare sono inseriti in tabella 4.17.

Tabella 4.15: risultati delle prove di estrazione utilizzando diversi quantitativi del campione FeA8sc750°C-2h in 50 µl di sangue intero

µl di particelle inseriti in 50 µl di sangue	C_t media
15 µl	29,9
25 µl	28,3
50 µl	27,2
75 µl	26,5
100 µl	27,5

I risultati migliori sono stati ottenuti inserendo 75 µl di particelle di FeA8sc750°C-2h (conc.= 126 mg/ml) in 50 µl di sangue intero.

Tabella 4.16: risultati delle prove di estrazione il campione FeA8sc750°C-2h mantenuto nel sangue per diversi intervalli di tempo

Tempo di incubazione	C_t medio
-----------------------------	----------------------------

5 minuti	24,6
10 minuti	24,7
15 minuti	24,4

Come mostrato in tabella 4.16 non ci sono sostanziali differenze tra 5, 10 o 15 minuti di incubazione delle particelle magnetiche nel sangue lisato.

Tabella 4.17: risultati delle prove di estrazione utilizzando il campione FeA8sc750°C-2h con diversi quantitativi di GTC

Concentrazione GTC	C _t medio
2M	35,2
4M	29,4
8M	28,3

La concentrazione migliore di GTC da utilizzare è 8M.

In seguito alle prove eseguite confrontando il campione FeA8sc800°C-0min, il campione FeA8sc750°C-2h e le particelle magnetiche Chemicell, sono stati effettuati dei test di estrazione manuale in cui è stato eseguito un confronto tra il campione FeA8sc750°C-2h, il campione FeX5sc750°C-2h e le particelle Chemicell, i cui risultati sono stati riportati in tabella 4.18 e in tabella 4.19. Per valutare il comportamento di questi campioni sono state utilizzate la procedura 4-esperimento 1 e la procedura 4-esperimento 2, mentre per la resina Chemicell è stata utilizzata la sua procedura standard, ovvero la procedura 1.

- Procedura 4-esperimento 1

Tabella 4.18: risultati delle prove di estrazione di DNA utilizzando i campioni FeA8sc750°C-2, FeX5sc750°C-2h e le particelle Chemicell eseguendo la procedura 4-esperimento 1.

Gene target: RNASE	
Particelle	C _t media
FeA8sc750°C-2h	24
FeX5sc750°C-2h	23.4
Chemicell	24.7

- Procedura 4-esperimento 2

Tabella 4.19: risultati delle prove di estrazione di DNA utilizzando i campioni FeA8sc750°C-2, FeX5sc750°C-2h e le particelle Chemicell eseguendo la procedura 4-esperimento 2.

Gene target: RNASE	
Particelle	C _t media
FeA8sc750°C-2h	23.5
FeX5sc750°C-2h	23
Chemicell	24.7

Da queste prove emerge come sia il campione FeA8sc750°C-2h, sia il campione FeX5sc750°C-2h diano risultati migliori rispetto alle particelle Chemicell.

E' inoltre evidente che il campione FeX5sc750°C-2h mostri valori di C_t più bassi del campione FeA8sc750°C-2h, risultato che implica quindi una resa di estrazione migliore.

Dopo questi test sono state eseguite delle prove di estrazione automatizzata sui campioni FeA8sc750°C-2h_macinato e (H,Fe)A18sc600°C-1,5h e FeA8sc750°C-2h in confronto con le particelle Chemicell (tabella 4.20).

Tabella 4.20: risultati delle prove di estrazione di DNA utilizzando i campioni FeA8sc750°C-2h, FeA8sc750°C-2h_macinato, FeX5sc750°C-2h, (H,Fe)A18sc600°C-1,5h e le particelle Chemicell eseguendo la procedura 4-esperimento 1.

Gene target: RNASE	
Particelle	C _t media
FeA8sc750°C-2h_macinato	27.3
(H,Fe)A18sc600°C-1,5h	36
FeX5sc750°C-2h	Problemi legati a precipitazione
Chemicell	25.6

I risultati del campione (H,Fe)A18sc600°C-1,5h non sono paragonabili ai restanti campioni utilizzati e alle particelle Chemicell.

Per quanto riguarda il campione FeA8sc750°C-2h e il campione FeA8sc750°C-2h_macinato i valori di C_t sono leggermente più alti ma paragonabili ai valori di C_t delle particelle Chemicell. Il campione FeX5sc750°C-2h, invece, ha riscontrato un problema relativo alla sua precipitazione durante il trattamento di estrazione e all'impossibilità di risospenderlo.

Sono dunque in corso ulteriori test sul campione FeA8sc750°C-2h e sul campione FeA8sc750°C-2h_macinato in quanto hanno fornito buoni risultati.

Per quanto riguarda, invece, l'estrazione di DNA batterico, i campioni FeA8sc750°C-2h, FeA8sc750°C-2h_macinato, FeX5sc750°C-2h e (H,Fe)A18sc600°C-1,5h hanno mostrato

risultati deludenti nel caso in cui si utilizzassero concentrazioni di batteri pari a 10 U/ml, riconducibili ad una scarsa sensibilità.

5. Conclusioni

In conclusione, utilizzando due diverse zeoliti come precursori (aventi struttura differente ma rapporto Si/Al confrontabile) e sottoponendole allo stesso trattamento termico, si sono ottenuti i seguenti risultati:

- la zeolite 13X contiene una percentuale leggermente inferiore di Fe^{2+} rispetto alla zeolite 4A.
- La percentuale di ferro ridotto nel campione preparato a partire dalla zeolite 4A è leggermente maggiore rispetto a quella presente nel campione preparato a partire dalla zeolite 13X, in accordo con le quantità di Fe^{2+} trovate nei due campioni scambiati e con le differenze di comportamento delle due zeoliti durante il trattamento termico. I diversi quantitativi di ferro metallico rispecchiano le differenze di magnetizzazione mostrate dai due campioni.
- Oltre al ferro metallico, i due compositi contengono fasi cristalline differenti e diverse percentuali di fase amorfa.
- L'uso di due tipologie di precursori influisce anche sul valore di area superficiale e sul volume di pori e micropori.
- Le dimensioni granulometriche dei due campioni sono diverse.

Utilizzando, invece, la stessa zeolite come precursore, ma introducendo diversi tipi di ioni e modificando i parametri di tempo e temperatura del trattamento termico in atmosfera riducente, si sono ottenuti i seguenti risultati:

- formazione di fasi cristalline contenenti ferro completamente diverse nei due compositi.
- Modifica del valore di area superficiale e della distribuzione dimensionale e del volume dei pori.

Il processo di riduzione è stato ottimizzato valutando l'utilizzo di due portacampioni differenti: un crogiolo e una navicella. Il diverso effetto del trattamento riducente osservato è probabilmente dovuto al diverso tipo di interazione tra il solido ed il flusso di gas.

Per quanto riguarda l'applicazione dei compositi con proprietà magnetiche, invece, sono state fatte le seguenti considerazioni:

- Per quanto riguarda l'estrazione manuale di DNA umano da campioni di sangue i compositi $\text{FeA8sc750}^\circ\text{C-2h}$ e $\text{FeX5sc750}^\circ\text{C-2h}$ hanno mostrato una resa analoga alle particelle Chemicell. I campioni in esame, però, necessitano di essere presenti in concentrazioni più alte nei campioni di sangue per avere risultati comparabili alle particelle Chemicell. Il campione $(\text{H,Fe})\text{A18sc600}^\circ\text{C-1,5h}$, invece, non è risultato idoneo all'estrazione di DNA, probabilmente a causa di un diverso meccanismo di adsorbimento degli acidi nucleici dovuto alla presenza della magnetite.
- Per quanto riguarda l'estrazione automatizzata di DNA, il campione $\text{FeA8sc750}^\circ\text{C-2h}_{\text{macinato}}$ mostra dimensioni granulometriche nettamente inferiori rispetto al

campione FeA8sc750°C-2h ed è stato verificato che le dimensioni delle particelle sono tali da non causare problemi durante il processo di estrazione di DNA automatizzato. Inoltre, i valori di resa di DNA estratto, sia batterico sia umano, sono comparabili con quelli delle particelle Chemicell.

Lista dei simboli

Simbolo	Grandezza	Unità di misura
A	assorbanza	
ϵ	coefficiente di assorbimento molare	
l	cammino ottico	$\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$
c	concentrazione della soluzione o specie chimica in esame	cm
C.E.C	cationic exchange capacity	meq/g
α_{BA}	fattore di separazione	
A_s, B_s	concentrazione cationi in soluzione	mol/cm^3
A_z, B_z	concentrazione cationi nella zeolite	mol/kg
V, V_m	volume, volume monostato	cm^3
λ	lunghezza d'onda	nm
d	parametro reticolare cristallino	nm
θ	angolo di diffrazione	deg
W_{FWHM}	ampiezza a metà altezza	
D_c	dimensione media cristalliti	nm
U_e	mobilità elettroforetica	$\text{cm}^2/(\text{s} \cdot \text{v})$
ζ	potenziale zeta	mV
ϵ_a	costante dielettrica dell'acqua	$\text{C}^2/(\text{N} \cdot \text{m}^2)$
η	viscosità	$\text{g}/(\text{cm} \cdot \text{s})$
D	diametro particella	cm
v	velocità di sedimentazione	m/s
ρ	densità	g/ml

g	accelerazione di gravità	m/s ²
R	raggio di rotazione	cm
t	tempo	s
ω	velocità rotazionale	rad/s
C _t	valore di soglia	
M ₀ , M _{Ct}	concentrazione di DNA	μg/ml
E	efficienza processo	
S _{BET}	area superficiale specifica	m ² /g
V _p	volume dei pori	cm ³ /g
V _{mp}	volume dei micropori	cm ³ /g
M	Magnetizzazione	emu/ cm ³

Bibliografia

- [1] M. Pansini, G. Dell'Agli, A. Marocco, 2017, Preparation and characterization of magnetic and porous metal-ceramic nanocomposites from a zeolite precursor and their application for DNA separation, *Journal of Biomedical Nanotechnology* **13**, pp.337-348
- [2] <https://www.chemguide.co.uk/organicprops/aminoacids/dna1.html>
- [3] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, 2000, *Essential Cell Biology. An Introduction to the Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing Inc, cap 6.
- [4] D. Sadava, H. C. Heller, G. H. Orians, W. K. Purves, D. M. Hillis, 2008, *Life: the science of biology*, Eight Edition, cap. 11
- [5] Adilah Ayoib, Uda Hashim, Subash C. B. Gopinath, M. K. Md Arshad, 2017, DNA extraction on bio-chip: history and preeminence over conventional and solid-phase extraction method, *Appl Microbiol Biotechnol* **101**, pp. 8077–8088
- [5.1] Siun CheeTan, Beow Chin Yiap, 2009, DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*
- [6] Ahmad Bitar, Nasir M. Ahmad, Hatem Fessi and Abdelhamid Elaissari, 2012, Silica-based nanoparticles for biomedical applications, *Drug Discovery Today* **17**, n° 19-20
- [7] José Luis Corchero and Antonio Villaverde, 2009, *Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles*, Elsevier
- [8] Jincan He, Meiyang Huang, Dongmei Wang, Zhuomin Zhang, Gongke Li, 2014, Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: a review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **101**, pp. 84-101
- [9] An-Hui Lu, E. L. Salabas and Ferdi Schüt, 2007, Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application, *Angewandte Chemie* **46**, pp. 1222-1244
- [10] Sonja Berensmeier, 2006, Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids, *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, pp, 495–504
- [11] D. Horák, M. Babic, H. Macková, M. J. Benés, 2007, Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations, *J.Sep.Sci.* **30**, pp.1751–1772
- [12] Kristina Smerkova, Simona Dostalova, Marketa Vaculovicova, Jindrich Kynicky, Libuse Trnokova, Miroslav Kralik, Vojtech Adam, Jaromir Hubalek, Ivo Provaznik, Rene Kizek, 2013, Investigation of interaction between magnetic silica particles and lambda phage DNA fragment, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **86**, pp. 65-72
- [13] C. Sunderland, M. Steirt, 2006, Targeted Nanoparticles for Detecting and Treating Cancer, pp 70-93
- [14] Dale L. Huber, 2005, Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles **5**, pp. 482 –501

- [15] Ch. Baerlocher, L.B. McCusker, D.H. Olson, sixth revised edition 2007, *Atlas of Zeolite framework types*, Elsevier, The Netherlands
- [16] R. Noroozia, T. J. Al-Musawib, H. Kazemianc, E. Mohammadi Kalhoria, M. Zarrab, 2018, *Removal of cyanide using surface-modified Linde Type-A zeolite nanoparticles as an efficient and eco-friendly material* **21**, pp. 44-51
- [17] Associazione Italiana Zeoliti, 1994, *Bollettino AIZ n° 3*, Napoli
- [18] Piotr Kunecki, Rafal Panek, Magdalena Wdowin, Wojciech Franus, 2017, Synthesis of faujasite (FAU) and tschernichite (LTA) type zeolites as a potential direction of the development of lime Class C fly ash, *Internation journal of mineral processing* **166**, pp. 69-78
- [19] Jha B., Singh D.N., 2016, *Fly ash zeolites*, Springer, chap. 2 [ISBN: 978-981-10-1402-4]
- [20] Rodney P. Townsend, 1986, Ion exchange in zeolites: some recent developments in theory and practice, *Pure & Applied Chemistry* **58**, pp. 1359-1366
- [21] P. J. Smeets, J. S. Woertink, B. F. Sels, E. I. Solomon, and R. A. Schoonheydt, 2010, Transition-Metal Ions in Zeolites: Coordination and Activation of Oxygen, *Inorg. Chem.* **49**, pp. 3573–3583
- [22] K. Kawakami, M. Ogura, 2015, Theoretical investigation of novel two-step decomposition of nitric oxide over Fe(II) ion- exchanged zeolites using DFT calculations, *Catalysis Today* **242**, pp. 343-350
- [23] G. Cerri, A. Langella, M. Pansini, and P. Cappelletti, 2002, Methods for determination of cation exchange capacity for clinoptilolite-rich rocks of the logoduro region in northern Sardinia, Italy, *Clays Clay Miner.* **50**, 127
- [24] M. Pansini, G. Dell’Agli, A. Marocco, B. Bonelli, P. Allia, P. Tiberto, G. Barrera, M. Manzoli, R. Arletti, S. Esposito, An innovative process for producing magnetic metal ceramic nanocomposites from a zeolite precursor
- [25] Landong Li, Qun Shen, Jinjun Li, Zhengping Hao, Zhi Ping Xu, G.Q. Max Lu, 2008, Iron-exchanged FAU zeolites: Preparation, characterization and catalytic properties for N₂O decomposition, *Applied catalysis A: general* **344**, pp. 131-141
- [26] S. Esposito, C. Ferone, M. Pansini, L. Bonaccorsi, E. Proverbio, 2004, *J. Eur. Cer. Soc.* **24**, 2689
- [27] N. Clayden, S. Esposito, C. Ferone, M. Pansini, 2006, *J. of Sol. St. Chem* **179**, 1957
- [28] M. Pansini, F. Sannino, A. Marocco, P. Allia, P. Tiberto, G. Barrera, M. Polisi, E. Battista, P. A. Netti, Serena Esposito, 2018, Novel process to prepare magnetic metal-ceramic nanocomposites from zeolite precursor and their use as adsorbent of agrochemicals from water, *Journal of Environmental Chemical Engineering* **6**, pp 527-538
- [29] Wei Fan, Satoshi Shirato, Feifei Gao, Masaru Ogura, Tatsuya Okubo, 2006, Phase selection of FAU and LTA zeolites by controlling synthesis parameters, *Microporous and mesoporous materials* **89**, pp. 227-234
- [30] Guo Lin, Qiang Zhuang, Qun Cui, Haiyan Wang, Huqing Yao, 2015, Synthesis and adsorption property of zeolite FAU/LTA from lithium slag with utilization of mother liquid, *Chinese journal of chemical engineering* **23**, pp. 1768-1773

- [31] R. Aiello, C. Colella, *La sintesi delle zeoliti*, pp. 555-583
- [32] Piotr Kunecki, Rafal Panek, Magdalena Wdowin, Wojciech Franus, 2017, Synthesis of faujasite (FAU) and tschernichite (LTA) type zeolites as a potential direction of the development of lime Class C fly ash, *International journal of mineral processing* **166**, pp. 69-78
- [33] Mohamed Nageeb Rashed and Pachagoundanpalayam Nachimuthugounder Palanisamy, 2018, *Introductory Chapter: Adsorption and Ion Exchange Properties of Zeolites for Treatment of Polluted Water*, DOI: 10.5772/intechopen.77190
- [34] Howard S. Sherry, 2003, *Ion exchange*, chap. 21, Marcel Dekker, Inc
- [35] <https://www.xrayconsult.it/nota-tr.html>
- [36] *CPS, Introduction to Differential Sedimentation*, CPS Instruments Europe, The Netherlands
- [37] <http://www.alfatest.it/pagina.php?p=67>
- [38] <http://www.chemicell.com/products/purification/docs/geneMAG-DNABlood.pdf>
- [39] http://host.uniroma3.it/docenti/cozzi/genmol_file/PCR1.pdf
- [40] http://www.enea.it/it/Ricerca_sviluppo/documenti/ricerca-di-sistema_elettrico/combustibili-fossili-ccs/2012/rds-2013-210.pdf
- [41] *Atomic absorption spectrometry*, leaflet produced in association with The Royal Society of Chemistry Fine Chemicals and Medicinals Group, <http://www.liskeard.cornwall.sch.uk/images/Liskeard-Sixth-Form/Atomic-Absorption-Spectrometry.pdf>.

Ringraziamenti

Si ringraziano Michele Pansini, Professore Ordinario presso il dipartimento di Ingegneria Civile e Meccanica dell'università degli studi di Cassino e del Lazio Meridionale e Antonello Marocco, Dottore di ricerca in Ingegneria Meccanica presso la stessa Università, per aver fornito i materiali oggetto di studio in questa ricerca.

Si ringrazia, inoltre, la Dottoressa Franca Mannu, rappresentante legale della società NUREX S.R.L., per la realizzazione delle prove di estrazione di DNA.