

ALMA MATER STUDIORUM . UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

---

---

**Scuola di Scienze  
Dipartimento di Fisica e Astronomia  
Corso di Laurea in Fisica**

**TERANOSTICA: DIAGNOSI E CURA  
ATTRAVERSO  
NANOPARTICELLE**

Relatore:

Prof. Paola Fantazzini

Presentata da:

Sara Satanassi

# Indice

<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>Capitolo 1 : Intoduzione</b> .....	<b>6</b>
1 Nanoscienze e nanotecnologie .....	6
2 Nanoparticelle magnetiche .....	8
3 Principali applicazioni mediche .....	10
<b>Capitolo 2 : Ipertermia magnetica</b> .....	<b>12</b>
2.1 Principi fisici alla base	
2.1.1 Ciclo di isteresi .....	12
2.1.2 Anisotropia .....	16
2.1.2.1 Anisotropia magneto-cristallina .....	17
2.1.2.2 Anisotropia di scambio .....	18
2.1.3 Particelle multidominio e a singolo dominio .....	18
2.1.4 Superparamagnetismo .....	20
2.1.5 Nanoparticelle core-shell .....	23
2.2 Ipertermia magnetica fluida .....	25
2.2.1 Materiali ferromagnetici .....	25
2.2.2 Materiali superparamagnetici .....	26
2.2.3 Specific Absorbation Rate (SAR) o Specific Loss Power (SLP) .....	27
2.2.4 Teoria di Debye .....	28
2.2.5 Rilassamento magnetico nei ferrofluidi .....	29
<b>Capitolo 3 : Nanoparticelle magnetiche</b> .....	<b>32</b>
3.1 SPIONs .....	32
3.1 Nanoparticelle d'oro .....	36
<b>Capitolo 4 : Teranostica. Diagnosi e cura</b> .....	<b>38</b>
4.1 Composizione delle nanoparticelle .....	38
4.2 Nanoparticelle come agente di contrasto .....	41
4.3 Drug delivery .....	44
4.4 Ipertermia .....	50

4.4.1 Risposta biologica al trattamento ipertermico .....	55
<b>Capitolo 5: Tossicità .....</b>	<b>57</b>
5.1 Nanoparticelle e cellule .....	61
5.2 Le nanoparticelle e l'uomo .....	64
<b>Capitolo 6: Conclusioni e prospettive future .....</b>	<b>68</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>70</b>

# ABSTRACT

La prospettiva della teranostica è quella di effettuare contemporaneamente diagnosi e cura, individuando le singole particelle tumorali. Questo è possibile grazie a nanoparticelle magnetiche, entità multifunzionali rivestite da un polimero, accompagnate nel luogo di interesse mediante un campo magnetico esterno.

Per quanto riguarda la diagnosi possono essere utilizzate come agenti nella risonanza magnetica nucleare per aumentare il contrasto dell'immagine e consentire una migliore rivelazione del tumore.

Per quanto riguarda la terapia esse sono utilizzate per l'ipertermia magnetica, tecnica basata sul riscaldamento mediante l'applicazione di un debole campo magnetico alternato dotato di un'opportuna frequenza. In questo modo le cellule tumorali, essendo più sensibili al calore rispetto a quelle sane, vengono distrutte, una volta raggiunta una temperatura locale tra i 41 e i 46°C.

Un'altra grande applicazione terapeutica è il rilascio controllato e mirato dei farmaci (drug target delivery). Infatti un opportuno rivestimento polimerico consente di coniugare alla particella dei medicinali chemioterapici che, una volta raggiunta la zona tumorale, possono essere rilasciati nel tempo, permettendo dunque la somministrazione di una minor dose e un'azione più mirata rispetto ai classici trattamenti.

Insomma queste nanoparticelle magnetiche individuano la posizione delle cellule tumorali attaccandosi selettivamente ad esse, monitorano la variazione di temperatura agendo da termometri locali e rilasciano localmente il farmaco in grado di debellare il tumore.

I materiali maggiormente utilizzati per la sintesi delle nanoparticelle sono gli ossidi di ferro (come la magnetite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e la maghemite  $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) e l'oro.

Tuttavia, nonostante i possibili vantaggi, questi trattamenti presentano degli effetti collaterali. Trattandosi infatti di particelle ultrafini, dell'ordine dei nanometri, possono migrare all'interno del corpo umano raggiungendo organi bersaglio e comprometterne il loro funzionamento.

La teranostica, però, è una disciplina molto studiata e in via di sviluppo; si spera che da qui a breve sia possibile un utilizzo concreto di questi nuovi metodi, riducendo al minimo la tossicità per il corpo umano.

# 1. Introduzione

## 1.1 Nanoscienze e nanotecnologie

Il termine nanoscienze si riferisce alle discipline che si dedicano allo studio delle proprietà dei nanomateriali, ossia di qualunque tipo di struttura con dimensioni dell'ordine di grandezza dei nanometri,  $10^{-9}$ m. Strutture dell'ordine dei nm esistono ovviamente in natura. Un singolo filamento di DNA è largo circa tre nanometri. Le ali di una farfalla Morpho contengono nanostrutture che cambiano il modo in cui le onde luminose interagiscono tra di loro, dando alle ali brillanti tonalità blu e verdi. Le piume di un pavone e le bolle di sapone ottengono la loro colorazione iridescente dalla luce che interagisce con piccoli complessi spessi solo decine di nanometri.

Avendo le nanostrutture dimensioni così ridotte, sono necessari metodi particolari per la produzione di oggetti in questo range di grandezza. La nanotecnologia è lo studio che si occupa sia della ricerca sia dello sviluppo di tecnologie a livello atomico, molecolare e macromolecolare, sia del controllo e della manipolazione dei materiali su scala atomica e dello sviluppo e dell'applicazione di strutture, dispositivi e sistemi caratterizzati da nuove proprietà e funzioni dovute alle loro piccole dimensioni. Grazie alle ridotte dimensioni di queste strutture, si possono infatti studiare e sfruttare nuove ed importanti proprietà dei materiali: le lunghezze su questa scala sono quelle che caratterizzano le molecole e le macromolecole e, dal momento che sono confrontabili con la lunghezza d'onda di de Broglie degli elettroni, gli effetti quantistici non sono più trascurabili. La spaziatura tra i livelli di energia dei cristalli, per esempio, aumenta col diminuire delle dimensioni dei cristalli stessi; quindi sintetizzando particelle di diversi diametri è possibile regolare ed impostare i loro livelli di energia e le loro proprietà. Se le dimensioni della particella diminuiscono, a parità di massa, il rapporto tra la superficie ed il volume della particella aumenta e questo significa che gli atomi che si trovano sulla superficie o in prossimità di essa sono in numero maggiore. Questa è una

caratteristica molto importante in quanto molte reazioni hanno luogo proprio sulla superficie dei materiali.

Gli scienziati usano fasci di elettroni o di ioni per incidere strutture, di circa 25 nm di grandezza, su metalli o su materiali a base di carbonio. Le nanostrutture possono essere create per reazione chimica in liquidi o in gas per generare nanofibre, nanocristalli e “quantum dot” (punti quantici), alcuni raggiungono anche la dimensione di un nanometro. Naturalmente si sta parlando di un settore in via di sviluppo e tutt’ora gli scienziati stanno studiando altri metodi per costruire strutture tridimensionali su questa scala di grandezza. I NEMS ovvero sistemi nano-elettromeccanici, potrebbero un giorno essere usati come robot microscopici per svolgere compiti che gli stessi uomini non riuscirebbero a compiere. Per esempio potrebbero effettuare interventi chirurgici su una singola cellula o potrebbero agire come attuatori meccanici per spostare le molecole.

Le nanoscienze hanno già influenzato le nostre vite con innovazioni come i tessuti antimacchia ispirati da caratteristiche dell’ordine dei nanometri presenti sulle piante di loto e come i dischi rigidi dei computer, che memorizzano le informazioni su bande magnetiche di spessore di circa 20nm.

Una delle peculiarità di questo ambito di ricerca è il coinvolgimento e l’incontro di molte discipline come la fisica, la chimica, la biologia, l’ingegneria e la medicina. Da questo incontro nasce la nanomedicina, che sfrutta le applicazioni biomediche delle nanoscienze e delle nanotecnologie sia per la diagnosi che per la terapia. La nanomedicina è finalizzata per lo più alla cura del cancro. I trattamenti tradizionali (chirurgia, radioterapia e chemioterapia) presentano, infatti, diversi problemi ed effetti collaterali (come l’accessibilità del tumore, il rischio di un’operazione su organi vitali, la poca selettività per le cellule cancerogene e lo spargimento di esse) che possono essere aggirati o ridotti mediante l’utilizzo di nanotecnologie. Le attività di ricerca comprendono lo sviluppo di:

- nuovi agenti di imaging e di nuove tecniche diagnostiche che permettono di individuare un tumore nel suo stato iniziale,

- tecniche che forniscono valutazioni in-loco degli effetti di una terapia,
- dispositivi di individuazione che possono superare le barriere biologiche e trasportare agenti terapeutici nel sito interessato,
- sistemi di sorveglianza che possano predire l'insorgere del male
- tecniche che permettano di identificare nuovi target per i trattamenti clinici, prevedendone gli effetti collaterali e la resistenza ai farmaci.

Per ottenere alcuni di questi risultati i ricercatori stanno studiando materiali multifunzionali che consentono contemporaneamente l'imaging del tumore ed il trasporto in-loco di farmaci, aumentando così l'efficacia del trattamento e diminuendo gli effetti collaterali. [1]

## **1.2 Nanoparticelle magnetiche**

Esistono diversi metodi che permettono di sintetizzare nanoparticelle: top-down, bottom-up e un metodo ibrido. L'approccio top-down consiste nell'incidere, dividere ed eliminare parti e strati di un blocco di partenza di materiale ed è un metodo ben sviluppato grazie ai grandi passi avanti dell'industria dei semiconduttori. L'approccio bottom-up, invece, consiste nel disporre atomi, molecole e macromolecole nel modo desiderato. Entrambi i metodi presentano però dei problemi:

- Metodo top-down: è facile che il materiale presenti delle imperfezioni superficiali come i danni cristallografici, difetti che influiscono molto sulle proprietà fisiche e chimiche del materiale. Inoltre non è possibile costruire particelle di dimensioni inferiori ai 10 nm.
- Metodo bottom-up: il numero di difetti è molto minore rispetto a quelli dell'altro approccio, in quanto la composizione chimica è più omogenea e si ha un migliore ordinamento; tuttavia è difficile che le dimensioni finali della particella siano sufficienti per le applicazioni pratiche desiderate.

Mediante l'approccio ibrido, nella gran parte dei casi, è possibile eliminare gli ostacoli che presentano questi due metodi.

È interessante studiare, oltre alle particolari proprietà meccaniche, termiche, elettriche ed ottiche dei materiali, le proprietà magnetiche, poiché presentano gli aspetti maggiormente promettenti: infatti i materiali aventi dimensione nella scala dei nanometri hanno un ruolo fondamentale, in quanto le loro dimensioni così ridotte sono confrontabili con le lunghezze critiche che governano i forti cambiamenti nel comportamento magnetico della materia. Le proprietà ferromagnetiche o superparamagnetiche delle nanoparticelle vengono sfruttate in applicazioni che vanno dall'imaging medico e dal trasporto di farmaci, ai sensori e all'elaborazione di dati.

I nanomateriali magnetici maggiormente utilizzati in medicina e biologia sono suddivisi in tre categorie:

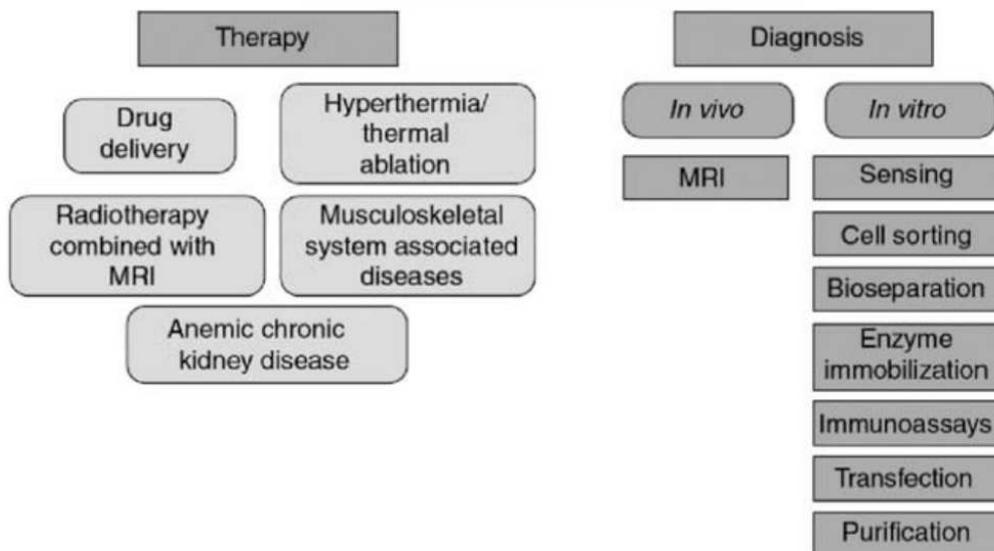
- Nanomateriali “zero dimensionali” come, per esempio, le nanosfere,
- Nanomateriali uni-dimensionali come nanofili o nanotubi
- Nanomateriali bi-dimensionali come pellicole sottili.

Per la costruzione di biosensori e biochips sono spesso utilizzate sottili pellicole magnetiche. Le nanosfere sono, invece, quelle maggiormente impiegate nelle applicazioni biomediche: solitamente le nanoparticelle magnetiche sono sospese in opportuni liquidi trasportatori e formano dei fluidi magnetici chiamati anche ferrofluidi. I materiali usati più frequentemente per la sintesi delle particelle magnetiche sono la magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e la maghemite ( $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$ ), mentre i liquidi possono essere acqua, cherosene oppure oli di diverso genere. La grande rivoluzione di questo tipo di strutture è che, grazie alle loro dimensioni molto ridotte, le particelle utilizzate in campo biomedico sono meno soggette alla sedimentazione dovuta al campo gravitazionale o magnetico e all'agglomerazione indotta dai loro momenti di dipolo. Per ottenere una sospensione stabile è possibile ricorrere a due metodi: il primo consiste nella stabilizzazione mediante una carica elettrica, mentre il secondo consiste nello stabilizzare le particelle rivestendole con molecole organiche. È possibile sfruttare una combinazione dei due metodi ricoprendo il nucleo di ossido di ferro con uno strato di oro o silicio e funzionalizzando la superficie del rivestimento. Un altro requisito fondamentale delle nanoparticelle è che

non siano tossiche per l'organismo e non interferiscano con le normali funzioni cellulari.

### 1.3 Principali applicazioni mediche

Grazie ai progressi nelle nanoscienze e nelle nanotecnologie è stato possibile sviluppare diverse applicazioni biomediche per nanomateriali magnetici: i campi magnetici utilizzati, infatti, hanno un'intensità tale da non recare danno ai tessuti biologici; inoltre l'ambiente biologico non interferisce con il magnetismo delle particelle. I materiali più frequentemente utilizzati per la sintesi delle particelle sono gli ossidi di ferro, poiché non risultano tossici per l'organismo. I nanomateriali magnetici sono impiegati in teranostica, ovvero sia per la diagnosi che per la cura. La *figura 1.1* mostra le principali applicazioni delle nanoparticelle:



*Figura 1.1:* Applicazioni mediche di nanoparticelle magnetiche [5].

Tra le applicazioni diagnostiche si trova l'imaging per risonanza magnetica (MRI), che riveste un ruolo importante: infatti è una tecnica non invasiva ampiamente utilizzata per diagnosi, verifiche pre-chirurgiche e monitoraggio degli effetti di una terapia. Per aumentare l'efficacia di questa tecnica spesso si ricorre ad agenti di contrasto costituiti da nanoparticelle magnetiche. Queste

particelle vengono iniettate nel sistema circolatorio e, a seconda delle loro dimensioni, possono raggiungere e accumularsi in organi diversi, permettendo così di studiarli ed analizzarli.

Tra le applicazioni terapeutiche più notevoli si trovano il target e drug delivery, ovvero la somministrazione mirata dei farmaci, e l'ipertermia magnetica. L'efficacia di un farmaco dipende dalla dose somministrata: fino ad una certa quantità essa è proporzionale alla dose stessa, mentre, oltre un certo limite, la relazione cambia e si giunge alla saturazione. Spesso il farmaco, prima di arrivare al limite della saturazione, presenta una certa tossicità; di conseguenza l'intervallo di azione utile è piuttosto ristretto. Grazie alla somministrazione mirata di un farmaco è però possibile ampliare tale intervallo. In questo processo si ricorre a nanoparticelle magnetiche funzionalizzate: esse possono contenere dei farmaci da rilasciare nelle cellule maligne e dei sensori che controllano e regolano il rilascio della sostanza.

Una volta concentrati i carrier nella zona malata, mediante la modulazione del campo magnetico (per esempio un impulso a radiofrequenza), vengono rilasciate le molecole del farmaco. Questo processo permette quindi di aumentarne la concentrazione nei tessuti o negli organi malati migliorando l'efficacia della terapia e di diminuirne la concentrazione nei tessuti sani, riducendo così il rischio di effetti collaterali. Per questo tipo di trattamento risulta fondamentale:

- 1 la scelta delle particelle magnetiche impiegate: più grande è la particella e maggiore è la forza magnetica che può essere esercitata su di essa. La particella, però, deve essere sufficientemente piccola in modo da non ostruire i capillari, che hanno diametro dell'ordine dei  $\mu\text{m}$ , e in modo da essere assorbita dal tessuto
- 2 tenere sempre in considerazione la biocompatibilità della particella: l'ossido di ferro risulta essere il materiale maggiormente utilizzato perché non è tossico e dopo il trattamento può essere riutilizzato dall'organismo per la produzione di emoglobina; il cobalto, invece, è più stabile del ferro e

quindi più semplice per la fabbricazione delle nanoparticelle, ma è tossico per l'organismo e necessita della presenza di un rivestimento particolare. È stato riscontrato che le cellule tumorali sono più sensibili alle alte temperature rispetto alle cellule sane, quindi possono essere trattate termicamente. Aumentando la temperatura del tessuto oltre i 41°C esse possono essere distrutte in maniera selettiva. Al di sopra di questa "temperatura soglia" le cellule tumorali risultano anche più sensibili all'azione di farmaci e di radiazioni; di conseguenza questo trattamento detto ipertemico può essere utilizzato efficacemente in combinazione con chemioterapie e radioterapie. [1,5]

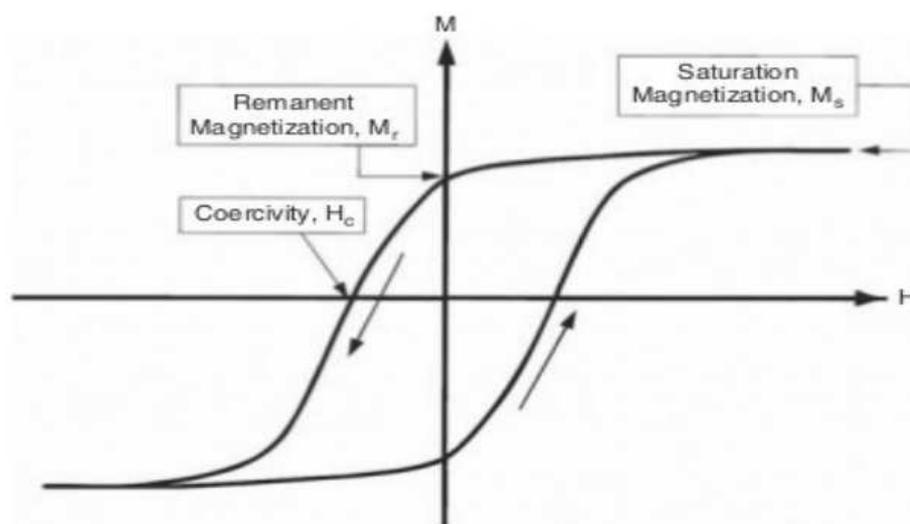
## 2. IPERTERMIA MAGNETICA

### 2.1 Principi fisici alla base:

#### 2.1.1 Ciclo di isteresi

La maggior parte delle proprietà magnetiche dei materiali può essere derivata dal ciclo di isteresi.

Tale ciclo è schematicamente illustrato in *figura 2.1*.



*figura 2.1*: Ciclo di isteresi della curva M-H di un materiale ferromagnetico [1]

Quando il campo magnetico esterno è sufficientemente grande, tutti gli spin all'interno di un materiale magnetico si orientano con il campo magnetico applicato. In questo stato, la magnetizzazione del materiale raggiunge il suo massimo valore detto magnetizzazione di saturazione,  $M_s$ . Quando il campo magnetico esterno si indebolisce la magnetizzazione totale del materiale diminuisce.

Un materiale ferromagnetico, quando il campo esterno diminuisce fino a raggiungere lo zero, ha ancora un momento magnetico residuo e il valore della magnetizzazione a campo 0 è detta magnetizzazione residua,  $M_r$ .

Si può definire rapporto residuo il rapporto tra la magnetizzazione residua e la magnetizzazione di saturazione,  $M_r/M_s$ , che varia tra 0 e 1. Per portare il materiale indietro a magnetizzazione 0, viene applicato un campo magnetico in direzione negativa e la grandezza del campo è detta campo coercitivo,  $H_c$ .

La riorientazione e la crescita dei domini magnetizzati spontaneamente di un materiale magnetico dipendono sia da caratteristiche microstrutturali quali posti vacanti, impurità o limiti strutturali dei cristalli, sia da caratteristiche intrinseche come l'anisotropia magnetocristallina, la forma e la dimensione della particella.

Non è possibile determinare a priori la forma del ciclo di isteresi, ma, nella maggior parte dei casi, può essere misurata sperimentalmente con Vibrating Sample Magnetometer (VSM) o con un Superconducting Quantum Interference Device (SQUID).

I materiali con differenti proprietà magnetiche hanno diverse forme di cicli. La *figura 2.2* mostra un diagramma schematico dei vasi sanguigni nei quali sono state iniettate alcune nanoparticelle magnetiche, le proprietà magnetiche delle particelle iniettate e l'ambiente biomolecolare nel flusso sanguigno.

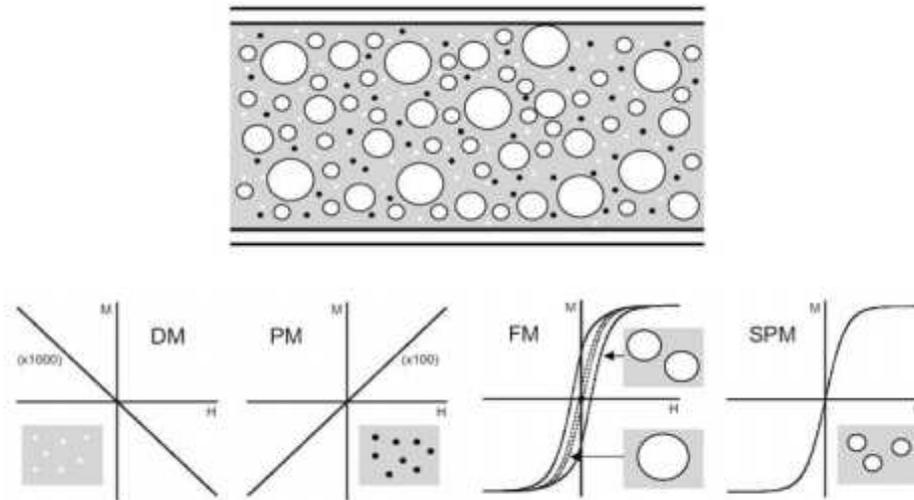


Figura 2.2: Curve M-H di un materiale diamagnetico (DM) la cui pendenza negativa indica che la magnetizzazione  $M$  si oppone al campo  $H$ , paramagnetico (PM) la cui pendenza positiva indica la concordanza tra  $M$  e  $H$ , ferromagnetico (FM) multidominio (linea tratteggiata) o a dominio singolo (linea continua) e superparamagnetico (SPM) [21].

In generale il vaso sanguigno e i biomateriali in esso introdotti sono entrambi diamagnetici o paramagnetici, mentre le nanoparticelle iniettate sono ferromagnetiche o superparamagnetiche. Quando un campo magnetico di valore  $H$  è applicato ad un materiale magnetico, il momento magnetico del materiale contribuisce complessivamente all'induzione magnetica  $B$  del materiale:

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

dove  $\mu_0$  è la permeabilità magnetica nel vuoto,  $M$  è il momento magnetico su un volume  $V$  di materiale. [1]

In generale, tutti i materiali possono essere considerati come materiali magnetici, in quanto tutti rispondono ad un campo magnetico di diversa grandezza. Sono di solito classificati in:

- paramagnetici (in cui la magnetizzazione si orienta concordemente al campo magnetico esterno, ma non è conservata una volta rimosso il campo),
- diamagnetici (in cui la debole magnetizzazione ha verso opposto a quello associato al campo magnetico esterno)
- ferromagnetici (che conservano la magnetizzazione orientata concordemente col campo)

basandosi sulla loro suscettività magnetica  $\chi$ , che descrive la relazione tra il campo magnetico  $H$  e la magnetizzazione  $M$  indotta in un materiale da un campo magnetico:

$$M = \chi H$$

Nel SI,  $\chi$  è adimensionale, mentre  $M$  e  $H$  sono espressi in  $\text{Am}^{-1}$ . [1]

La maggior parte dei materiali mostra un piccolo magnetismo, in questo caso essi sono classificati come paramagnetici o diamagnetici. Il valore di  $\chi$  per i paramagnetici è di solito positivo e compreso tra  $10^{-6}$  e  $10^{-1}$ , mentre il valore di  $\chi$  per i diamagnetici è compreso tra  $-10^{-6}$  e  $-10^{-3}$ . I valori negativi di  $\chi$  per i diamagnetici indicano che, in questo tipo di materiali, la magnetizzazione  $M$  e il campo magnetico  $H$  hanno verso opposto. Diversi materiali mostrano stati magnetici ordinati e di solito sono classificati come ferromagnetici, ferrimagnetici e antiferromagnetici. I prefissi in tale nomenclatura si riferiscono alla natura della forza di accoppiamento tra gli elettroni nel materiale. Accoppiamenti di questo genere potrebbero condurre ad un grande numero di magnetizzazioni spontanee e questa è la ragione per cui materiali magneticamente ordinati di solito hanno un valore di  $\chi$  più grande rispetto ai materiali paramagnetici o diamagnetici. Inoltre si può notare che la suscettività nei materiali ordinati dipende anche dal campo magnetico  $H$  applicato. Questo campo magnetico dà luogo a forme sigmoidali caratteristiche delle curve  $M$ - $H$ , con  $M$  vicino al valore di saturazione dell'alto campo magnetico.

Nei materiali ferri e ferro magnetici, il ciclo di isteresi può essere osservato come in *figura 2.2*. La forma del ciclo di isteresi è parzialmente determinata dalla dimensione della particella. Per particelle dell'ordine dei micron, che

solitamente hanno una struttura a multi dominio, il ciclo di isteresi risulta essere abbastanza stretto, in quanto è facile muovere le pareti dei domini. Per particelle più piccole (a singolo dominio), con dimensioni vicine al volume critico,  $V_c$ , il ciclo di isteresi risulta più ampio. Le particelle ancora più piccole, dell'ordine dei nm o meno, presentano un comportamento superparamagnetico: il loro momento magnetico è libero di ruotare in risposta all'energia termica, mentre i singoli momenti atomici mantengono il loro stato ordinato l'uno rispetto all'altro. [1,18]

### 2.1.2 Anisotropia

Nella maggior parte dei materiali il comportamento della magnetizzazione è influenzato da qualche tipo di anisotropia. L'anisotropia magnetica, in alcuni casi, può essere modellizzata come monoassiale e l'energia di anisotropia può essere espressa come:

$$E = KV\sin^2\theta$$

dove  $K$  è l'energia di anisotropia monoassiale per unità di volume,  $\theta$  è l'angolo tra il momento e l'asse preferenziale e  $V$  è il volume della particella (*figura 2.3*).

In assenza di campo magnetico esterno  $H$ , si ha quindi un asse favorito lungo il quale  $M$  può trovarsi in una qualunque delle due diverse orientazioni antiparallele e energeticamente equivalenti. L'energia di anisotropia massima ( $E=KV$ ) rappresenta il valore della barriera di energia che deve essere superata, affinché si verifichi l'inversione della magnetizzazione  $M$ . Questo valore è finito ed è, dunque, finita anche la probabilità che la magnetizzazione si inverta a temperature  $T>0K$ . Si ha di conseguenza un tempo di rilassamento caratteristico  $\tau$ , che è il tempo medio che intercorre tra due inversioni della magnetizzazione.

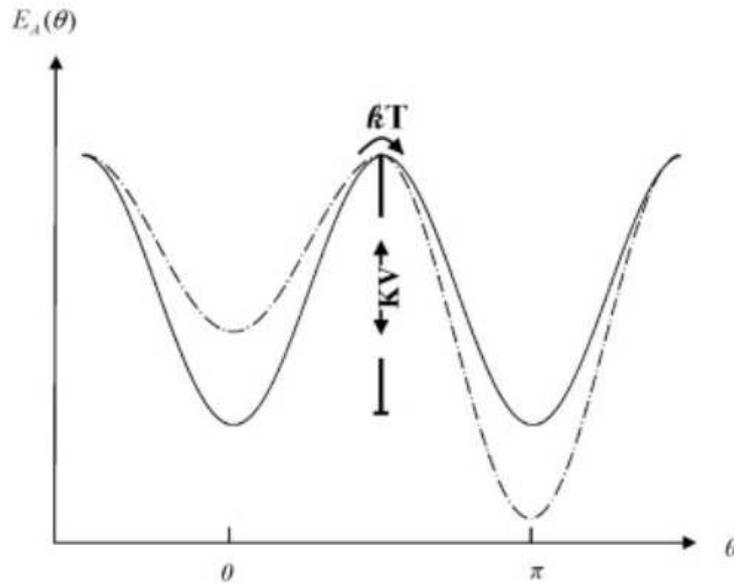


figura 2.3: L'energia di anisotropia in funzione dell'angolo  $\theta$  tra il momento e l'asse preferenziale della particella. In assenza di campo magnetico esterno (linea continua) le due orientazioni di M lungo l'asse sono equivalenti e separate da una barriera di energia pari a KV; in presenza di un campo magnetico esterno H (linea tratteggiata) una delle due orientazioni è favorita. [1,17]

### 2.1.2.1 Anisotropia magneto-cristallina

L'anisotropia magneto-cristallina è dovuta sostanzialmente all'accoppiamento spin-orbita. Nella maggior parte dei materiali ferromagnetici, l'interazione orbita-reticolo è molto forte, perciò le orbite elettroniche influenzano gli spin causando un allineamento di essi lungo assi cristallografici ben definiti. Quindi è lecito pensare all'anisotropia cristallina come ad una forza che tende ad orientare la magnetizzazione in determinate direzioni cristallografiche.

L'anisotropia magneto-cristallina è specifica del materiale indipendentemente dalla forma della particella e l'allineamento della magnetizzazione lungo un preciso asse cristallografico è favorita dal punto di vista energetico. La coercività è proporzionale alla costante di anisotropia e quindi i materiali con forte anisotropia magneto-cristallina sono molto indicati per applicazioni che richiedono un'alta coercività. Se si considera un campione policristallino senza

un'orientazione preferenziale non si ha un'anisotropia cristallina netta, ma se questo campione non è sferico si ha un'anisotropia di forma che determina una forte coercività.

I parametri che caratterizzano questo tipo di anisotropia dipendono fortemente dalla temperatura e sono definiti per ferromagneti che non si deformano al variare della direzione di  $M$ . In realtà esiste un'interazione di accoppiamento tra la magnetizzazione ed il reticolo tale da causare una deformazione del materiale. Questo fenomeno si chiama magnetostrizione ed altera l'anisotropia magnetocristallina efficace. Le correzioni che devono essere apportate ai parametri non sono comunque molto significative. [1]

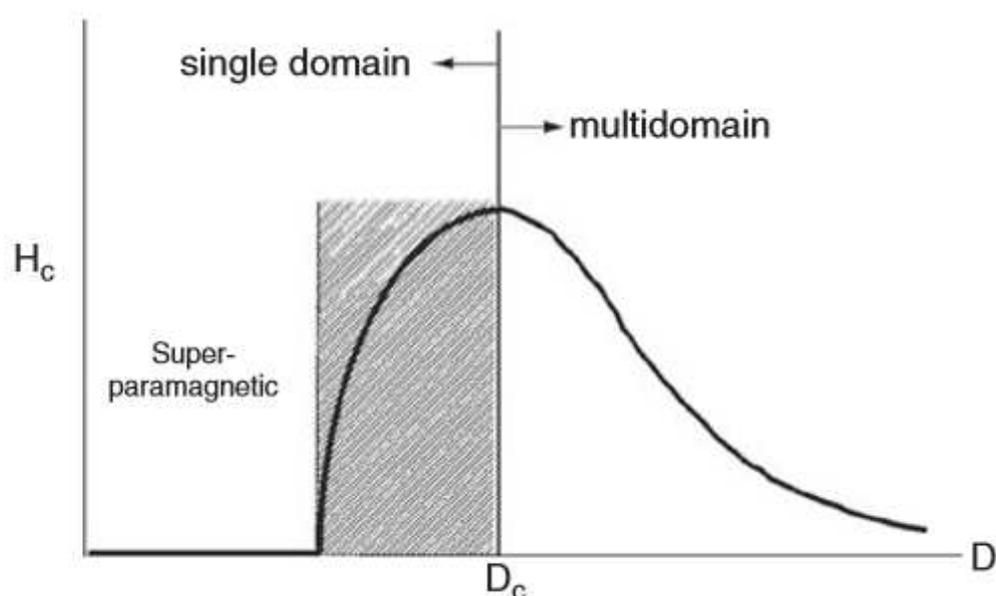
### **2.1.2.2 Anisotropia di scambio**

L'anisotropia di scambio si ha quando un materiale ferromagnetico è messo in prossimità o a contatto con un materiale antiferromagnetico. L'accoppiamento magnetico all'interfaccia tra i due materiali può creare una direzione preferenziale nella fase ferromagnetica che prende la forma di un'anisotropia unidirezionale. Un materiale antiferromagnetico possiede una magnetizzazione netta molto piccola o nulla e l'orientazione degli spin è debolmente influenzata dal campo  $H$ . Se il materiale ferromagnetico che si pone a contatto con esso è accoppiato fortemente mediante l'interazione di scambio, i suoi spin all'interfaccia saranno vincolati. L'inversione della magnetizzazione nel materiale ferromagnetico richiede, quindi, un costo aggiuntivo di energia che corrisponde all'energia necessaria per creare le pareti di dominio entro lo strato superficiale. Questo risulta uno spostamento del valore di  $H$ , in grado di invertire la magnetizzazione del materiale e quindi in una traslazione del ciclo di isteresi. [1]

### **2.1.3 Particelle multidominio e a singolo dominio**

Un dominio è un gruppo di spin i cui momenti magnetici hanno la stessa direzione e agiscono in cooperazione durante la magnetizzazione. In un materiale granulare ("bulk material"), i domini sono separati da pareti che

hanno uno spessore caratteristico e un'energia associata alla loro formazione ed esistenza. Il movimento di queste pareti è il mezzo principale per invertire la magnetizzazione e la più grande fonte di dissipazione di energia. La *figura 2.4* mostra in maniera schematica la relazione tra la coercività nei sistemi particellari e le dimensioni delle particelle (Leslie-Pelecky e Rieke 1996).



*Figura 2.4:* Relazione tra la coercività  $H_c$  e le dimensioni delle particelle di un sistema di particelle ultrafini [17].

La formazione di pareti di dominio è favorita, dal punto di vista energetico, in particelle di grandi dimensioni, le quali presentano quindi una struttura a multidominio.

La magnetizzazione di queste particelle avviene per nucleazione e per il movimento delle pareti di dominio. Come si può osservare nella figura sopra riportata, diminuendo le dimensioni delle particelle, la formazione delle pareti di dominio è sempre meno conveniente, fino a giungere al diametro critico  $D_c$  (dell'ordine delle decine o poche centinaia di nm) al di sotto del quale le particelle non hanno pareti di dominio e quindi sono particelle a singolo dominio.

Per una particella a singolo dominio, il processo di magnetizzazione avviene attraverso la rotazione coerente degli spin. Le particelle con dimensioni vicine al  $D_c$  di solito presentano grande coercività. Mentre gli spin delle particelle a singolo dominio con dimensioni molto minori di  $D_c$ , sono soggetti a fluttuazioni termiche. Particelle di questo genere solitamente sono dette particelle superparamagnetiche. Nel 1930 Frenkel e Dorfman teoricamente hanno predetto l'esistenza di particelle a singolo dominio. [15]

Se si considera un insieme di particelle bisogna tener conto delle eventuali interazioni che si possono instaurare tra di esse. Il modello di Stoner-Wohlfarth descrive il comportamento di un insieme di particelle ferromagnetiche a dominio singolo, con anisotropia assiale e non interagenti tra loro. Se si considerasse l'interazione tra dipoli, la legge di Neel-Arrhenius non sarebbe più valida. La teoria di Stoner-Wohlfarth tiene conto anche del campo magnetico (regime Zeeman) e calcola le correzioni all'energia interna delle particelle. [1,22]

### **2.1.4 Superparamagnetismo**

Nel 1949 Neel dimostrò, dal punto di vista teorico, che quando le dimensioni delle particelle si riducono molto, la coercività  $H_c$  del materiale tende a zero a causa delle fluttuazioni termiche che, in particelle così piccole, impediscono l'instaurarsi di una magnetizzazione stabile. Questo comportamento è detto superparamagnetismo. La curva di magnetizzazione dei materiali superparamagnetici non presenta un ciclo di isteresi e, in un grafico di  $M$  in funzione di  $H/T$ , le curve di magnetizzazione a diverse temperature devono sovrapporsi come è mostrato in *figura 2.5*.

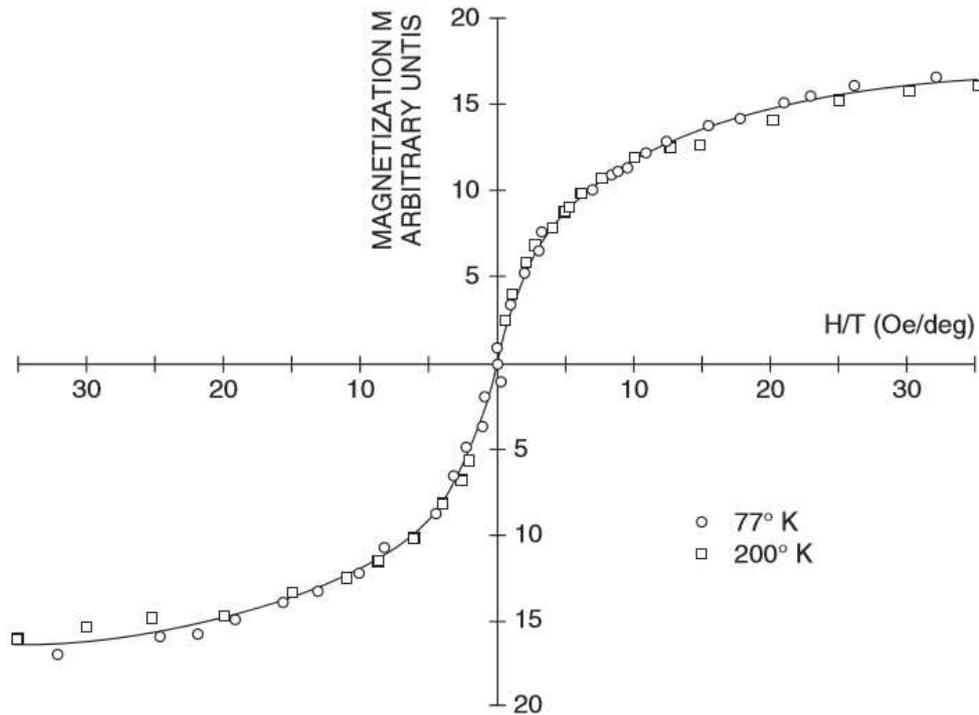


figura 2.5: Dimostrazione di superparamagnetismo di una miscela di ferro: sovrapposizione delle curve di M in funzione di H/T. [1]

Il meccanismo del superparamagnetismo si basa sul tempo di rilassamento  $\tau$  della magnetizzazione netta di una particella magnetica. La variazione della magnetizzazione nel tempo può essere descritta dalla legge:

$$\frac{dM(t)}{dt} = -\frac{M(t) - M(t = \infty)}{\tau}$$

dove  $M(t = \infty)$  è la magnetizzazione allo stato di equilibrio e  $\tau$  è il tempo di rilassamento caratteristico dato da [1]:

$$\tau = \tau_0 e^{\frac{\Delta E}{k_B T}}$$

dove  $\Delta E$  rappresenta la barriera di energia per l'inversione del momento e  $k_B T$  è l'energia termica. Per particelle non interagenti il fattore preesponenziale  $\tau_0$  è dell'ordine di  $10^{-10}$ - $10^{-12}$  s e dipende debolmente dalla temperatura. La barriera di energia ha diverse origini, è dovuta a effetti come l'anisotropia magnetocristallina e di forma. Nel caso più semplice di anisotropia monoassiale  $\Delta E =$

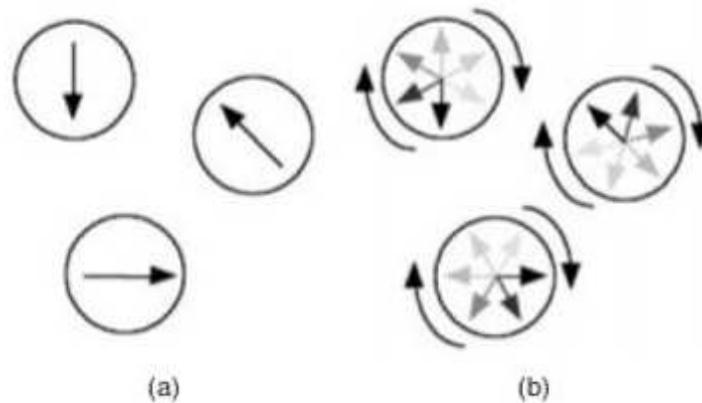
$KV$  dove  $K$  è la densità di energia di anisotropia e  $V$  è il volume della particella. Di conseguenza le dimensioni della particella influiscono fortemente sul tempo di rilassamento. Se tutti i componenti di un sistema possiedono lo stesso tempo di rilassamento, l'equazione differenziale scritta sopra presenta la soluzione più semplice. Tale assunzione non è soddisfatta nella pratica, perché nei sistemi reali la barriera di energia presenta sempre una distribuzione che può dipendere da molteplici cause e parametri. Se essa risulta costante allora la magnetizzazione decade in maniera logaritmica [1]:

$$M(t) = M(t = 0) - S \ln(t)$$

dove la viscosità magnetica  $S$  è legata alla distribuzione delle barriere di energia.

Il superparamagnetismo riveste un ruolo fondamentale nelle applicazioni biomediche perché le dimensioni molto ridotte delle particelle fanno sì che la barriera di energia  $\Delta E$  sia confrontabile con l'energia termica a temperatura ambiente e che, di conseguenza, si possa sfruttare facilmente questo fenomeno. L'osservazione del comportamento superparamagnetico per un dato materiale non dipende solo dalla temperatura, ma anche dal tempo di osservazione  $\tau_m$  della tecnica sperimentale usata. Si può definire la temperatura di bloccaggio  $T_B$  ponendo  $\tau = \tau_m$ .

Se il tempo di rilassamento è molto inferiore a  $\tau_m$  (cioè per  $T \gg T_B$ ) l'inversione dei momenti delle particelle è così rapida che, in assenza di campo magnetico esterno, il momento netto delle particelle mediato sul tempo è nullo e la particella appare paramagnetica. Se invece il tempo di rilassamento è molto superiore a  $\tau_m$  (cioè per  $T \ll T_B$ ) l'inversione è lenta, il momento netto è quasi statico e la particella è in uno stato definito stato bloccato. [21]



*Figura 2.6:* Osservazione di superparamagnetismo: i cerchi rappresentano le nanoparticelle magnetiche e le frecce al loro interno rappresentano la direzione della loro magnetizzazione. a) Per  $T \ll T_B$  (temperatura di bloccaggio) oppure  $\tau \gg \tau_m$  (tempo di misura) i momenti appaiono quasi statici; b) per  $T \gg T_B$  oppure  $\tau \ll \tau_m$  le inversioni della direzione del momento sono così frequenti che, in assenza di campo magnetico esterno, il momento netto delle particelle mediato sul tempo è nullo. [1]

Nei tipici esperimenti la misura  $\tau_m$  può avere un range da circa  $10^{-2}$ s per la magnetizzazione DC, fino  $10^{-7}$ - $10^{-9}$  - per la spettroscopia Mössbauer del  $^{57}\text{Fe}$ .

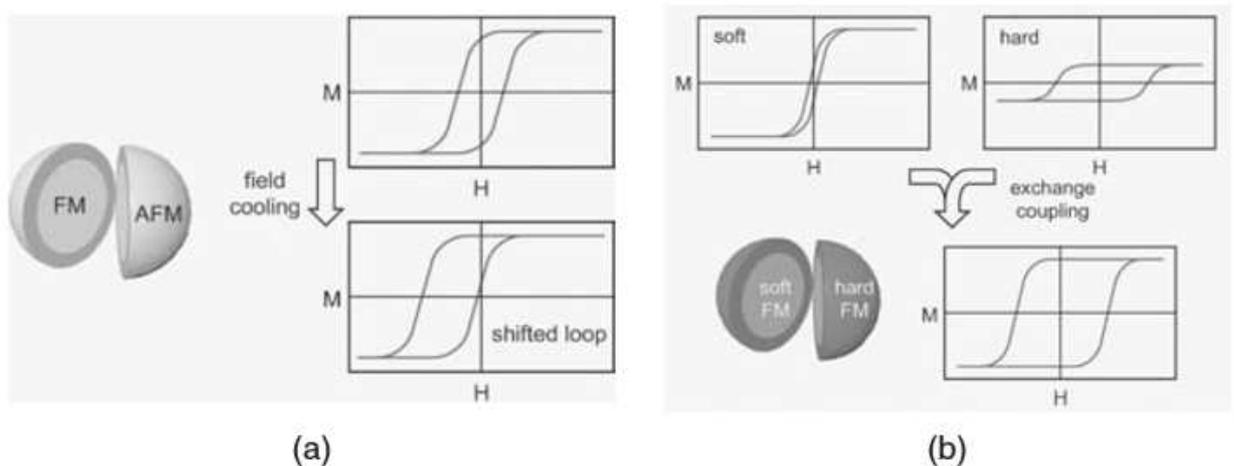
### 2.1.5 Nano particelle core-shell

Le particelle core-shell (nucleo-guscio), in genere sono costituite da un nucleo magnetico rivestito da uno strato protettivo di solito biocompatibile ed hanno le dimensioni dell'ordine della decina di nanometri. Tali particelle sono solitamente utilizzate nella composizione di ferrofluidi affinché sia garantita la stabilità del colloide mediante il rivestimento superficiale (che ha il compito di rendere le particelle invisibili al sistema reticolo-endoteliale del corpo, di evitare che le particelle formino un agglomerato che non potrebbe essere trasportato e di oltrepassare le barriere biologiche a causa delle loro grandi dimensioni) e mediante l'agitazione termica che previene l'agglomerazione fornendo energia alle nanoparticelle.

In generale si possono dividere le particelle core-shell in due categorie:

- particelle il cui nucleo è costituito da un materiale magnetico, mentre il rivestimento è costituito da un materiale non magnetico
- particelle in cui sia il nucleo che il rivestimento sono formati da materiali magnetici con proprietà diverse tra loro.

Le particelle core-shell, con rivestimento non magnetico, si possono creare circondando il nucleo con uno strato di ossido (che è il risultato naturale dell'esposizione all'ossigeno dell'ambiente). Nanoparticelle di questo tipo possono essere anche sintetizzate chimicamente regolando le dimensioni dei due strati e dell'interfaccia tra loro. In sistemi di questo genere il nucleo è costituito da un materiale ferromagnetico e il rivestimento da un materiale antiferromagnetico. Come si vede in *figura 2.7* il risultato di questa combinazione è un ciclo di isteresi traslato dovuto all'anisotropia di scambio causata a sua volta dall'accoppiamento all'interfaccia tra i due materiali.



*Figura 2.7:* Cicli di isteresi di nanoparticelle core-shell. a) Il ciclo di isteresi di una nanoparticella core-shell, ottenuta accoppiando un nucleo ferromagnetico ad un rivestimento antiferromagnetico, risulta traslato; b) il ciclo di isteresi di una nanoparticella core-shell, ottenuta accoppiando un nucleo di materiale ferromagnetico “soft” a un rivestimento di materiale ferromagnetico “hard”, è il risultato della combinazione della grande magnetizzazione del nucleo con la grande coercività del rivestimento. [1,23]

La maggior parte dei materiali utilizzati in applicazioni biomediche appartiene a questa categoria. Circondando il nucleo ferromagnetico con un altro materiale ferromagnetico si ottiene una particella core-shell della seconda categoria. Nella *figura 2.7 (b)* si vede il ciclo di isteresi risultante una volta applicato come rivestimento un materiale che presenta un ferromagnetismo più forte del nucleo. Accade che, a causa dell'accoppiamento di scambio magnetico, un tale sistema combina il grande campo coercitivo di un materiale con la grande magnetizzazione dell'altro. Regolando l'accoppiamento all'interfase tra i due materiali si possono ottenere dei magneti permanenti molto forti. [1,23,24]

## 2.2 Ipertermia magnetica fluida

### 2.2.1 Materiali ferromagnetici

Dalla curva M-H si deduce che è richiesta energia esterna per oltrepassare la barriera di energia che governa il movimento delle pareti dei domini in un materiale policristallino.

Questa energia è legata all'area racchiusa dal ciclo di isteresi e nella procedura di magnetizzazione essa è fornita dal campo magnetico esterno applicato. Se si applica ad un materiale ferromagnetico o ferrimagnetico un campo magnetico variabile nel tempo, vi è un trasferimento costante di energia nel materiale, che viene trasformata in energia termica. Ciò è alla base del trattamento di ipertermia.

La quantità di calore generata per unità di volume è determinata dall'area del ciclo di isteresi moltiplicata per la frequenza del campo [1]:

$$P_{FM} = \mu_0 f \oint H dM$$

Nel caso di particelle ferromagnetiche con dimensioni molto maggiori del limite per il passaggio al superparamagnetismo, questa espressione non ha dipendenze implicite dalla frequenza; quindi il valore dell'area del ciclo, e di

conseguenza il valore di  $P_{FM}$ , può essere misurato grazie a dispositivi come il VSM e lo SQUID. Questa espressione non tiene conto di altri meccanismi che possono generare calore con l'applicazione di un campo magnetico, come le correnti parassite e la risonanza ferromagnetica, in quanto questi effetti sono trascurabili alle frequenze di campo utilizzate solitamente per l'ipertermia magnetica. In linea di principio usando dei magneti fortemente anisotropi si dovrebbe ottenere un riscaldamento sufficiente, ma nella pratica dei trattamenti non è possibile arrivare alla completa saturazione della magnetizzazione del materiale a causa dei vincoli sull'ampiezza del campo magnetico. Questi cicli ridotti producono ovviamente meno calore. Il accordo con la formula scritta sopra, la situazione ideale per la produzione di calore si avrebbe nel caso di un ciclo di isteresi rettangolare, ma un ciclo di questa forma si può ottenere solo con un insieme di particelle monoassiali perfettamente allineate con  $H$  (condizioni difficilmente raggiungibili nelle applicazioni in vivo). Nella pratica il massimo calore ottenibile corrisponde a circa un quarto del calore prodotto nel caso ideale. [1,21]

### **2.2.2 Materiali superparamagnetici**

Nei materiali superparamagnetici è necessario fornire dall'esterno energia per allineare i momenti delle particelle e per raggiungere lo stato di saturazione.

Nei trattamenti di ipertermia, le nanoparticelle superparamagnetiche sono sospese in acqua o in un idrocarburo fluido, in modo da formare un ferrofluido. Quando viene rimosso il campo magnetico applicato ad un ferrofluido, la magnetizzazione di esso torna a zero (rilassamento del ferrofluido) a causa dell'energia termica dell'ambiente circostante. Il rilassamento avviene principalmente attraverso due meccanismi:

1. la rotazione browniana;
2. il rilassamento di Neel

ognuno di questi processi ha associato un proprio tempo di rilassamento.

Il primo meccanismo consiste nella rotazione fisica delle particelle sospese nel fluido e il suo tempo di rilassamento  $\tau_B$  caratteristico dipende principalmente dalle proprietà idrodinamiche del fluido (per esempio dalla viscosità). Il secondo meccanismo, invece, consiste nella rotazione dei momenti magnetici atomici entro la particella e il tempo di rilassamento caratteristico  $\tau_N$  dipende dal rapporto tra l'energia di anisotropia della particella e l'energia termica. Entrambi i tempi di rilassamento dipendono anche dalle dimensioni delle particelle, ma, per una data dimensione, il rilassamento browniano avviene a frequenza minore rispetto al rilassamento di Neel.

Il riscaldamento che si ottiene applicando un campo alternato a materiali superparamagnetici può essere analizzato mediante il modello sviluppato da Debye. Dato che il tasso di variazione di  $M$  in un ferrofluido è finito, il momento magnetico  $M$  risulta in ritardo rispetto ad  $H$ . Per piccole ampiezze di campo, si può descrivere la risposta di un ferrofluido ad un campo alternato per mezzo della sua suscettività magnetica complessa  $\chi = \chi' + i\chi''$ . La parte reale  $\chi'$  corrisponde all'immagazzinamento di energia, mentre la parte immaginaria  $\chi''$  corrisponde alla dissipazione di energia che genera calore:

$$P_{SPM} = \mu_0 \pi f \chi'' H^2$$

dove  $f$  è la frequenza del campo alternato applicato. Da questa espressione si deduce che, se  $M$  è in ritardo rispetto ad  $H$ , allora c'è una conversione positiva di energia magnetica in energia termica. [1]

### **2.2.3 Specific Absorption Rate (SAR) o Specific Loss Power (SLP)**

Il calore generato dalle particelle magnetiche è generalmente descritto in termini di SAR (o SLP) in unità di W/g. I valori  $P_{FM}$  e  $P_{SPM}$  possono essere ottenuti moltiplicando il SAR per la densità di particelle. Questo parametro è utile per confrontare l'efficacia di particelle magnetiche di dimensioni differenti. Si può allora osservare che, per le ampiezze di campo magnetico utilizzate nei trattamenti di ipertermia (circa 15 kA/m), i materiali

ferromagnetici, che non riescono a raggiungere la magnetizzazione di saturazione e dimostrano quindi un ciclo di isteresi ridotto, hanno un SAR basso, mentre i materiali superparamagnetici, grazie al diverso meccanismo di perdita di energia magnetica, generano comunque un calore sufficiente. [1,21]

## 2.2.4 Teoria di Debye

Il riscaldamento, ottenuto applicando un campo magnetico alternato a un ferrofluido, si può spiegare mediante una teoria sviluppata da Debye per analizzare la dispersione dielettrica nei fluidi dipolari e permette di comprendere la dipendenza della suscettività complessa dalla frequenza del campo. Grazie alla suscettività è infatti possibile indagare i meccanismi di rilassamento di cui si è parlato e altre proprietà del ferrofluido in esame, come il raggio medio delle particelle e il valore medio del campo di anisotropia. La teoria di Debye è applicabile a particelle magnetiche sferiche quando l'energia di interazione dipolo-dipolo  $U$  è inferiore all'energia termica  $k_B T$ .

Allora si può scrivere [1]:

$$\chi(\omega) = \chi_\infty + \frac{\chi_0 - \chi_\infty}{1 + i\omega\tau}$$

dove  $\tau$ , il tempo di rilassamento, è dato da [1]

$$\tau = \frac{1}{\omega_{max}} = \frac{1}{2\pi f_{max}}$$

dove  $f_{max}$  è la frequenza a cui  $\chi''(\omega)$  raggiunge il valore massimo,  $\chi_0$  è la suscettività statica e  $\chi_\infty$  è la suscettività a frequenza elevata. Dalla *figura 2.8* si vede che  $\chi'(\omega)$  è una funzione monotona decrescente all'aumentare della frequenza, mentre  $\chi''(\omega)$  presenta un massimo pari a metà del valore massimo di  $\chi'(\omega)$ .

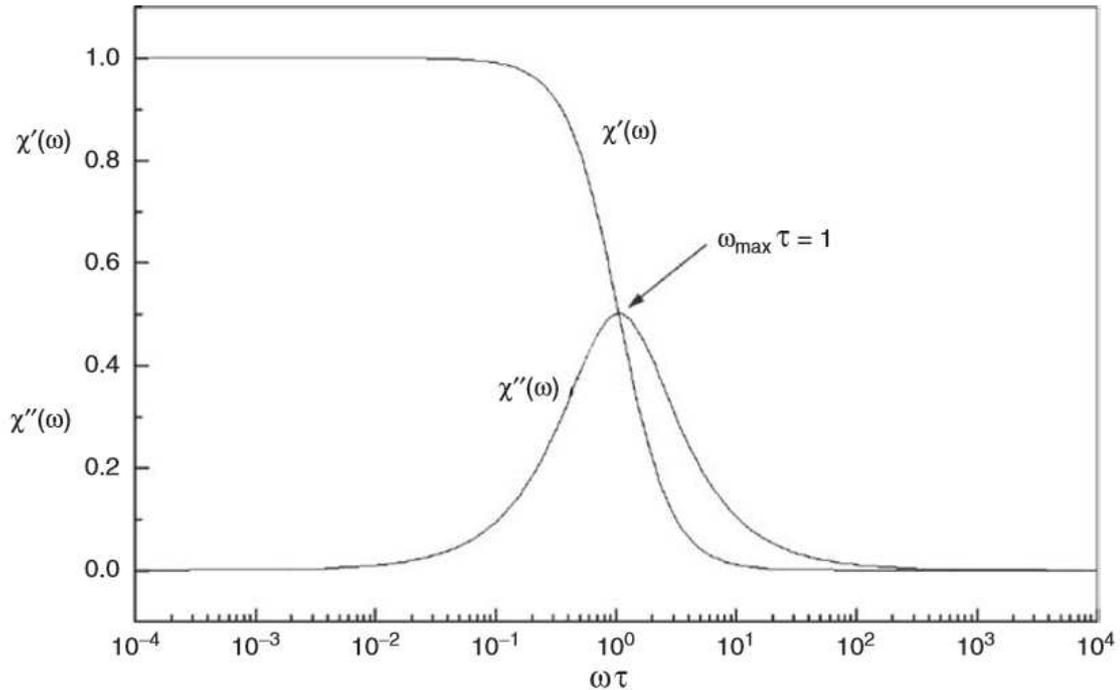


Figura 2.8: Grafici di  $\chi'(\omega)$  e  $\chi''(\omega)$  in funzione di  $\omega\tau$  secondo la teoria di Debye [1]

## 2.2.5 Rilassamento magnetico nei ferro fluidi

Si considerino delle nanoparticelle magnetiche in un fluido: se il diametro del nucleo magnetico è abbastanza piccolo e lo spessore del rivestimento è sufficientemente grande, è possibile trascurare le interazioni magnetiche tra le particelle, indipendentemente dalla loro concentrazione nel fluido. La suscettività magnetica, allora, dipende dall'orientazione del campo magnetico rispetto agli assi di anisotropia delle particelle e la suscettività totale presenta una componente longitudinale ( $\chi_{\parallel}$ ) e una e una componente trasversale ( $\chi_{\perp}$ ). Per un fluido con una distribuzione casuale degli assi di anisotropia la suscettività totale è data da:

$$\chi(\omega) = \frac{1}{3} [\chi_{\parallel}(\omega) + 2\chi_{\perp}(\omega)]$$

Dato che il tempo caratteristico per il rilassamento trasversale è di circa 0,1 ns, se la suscettività è misurata in un intervallo di frequenze che va da 10 a  $10^4$  Hz,

allora, come dimostrano Raikher e Shliomis, la componente trasversale di  $\chi_{\perp}$  può essere considerata una quantità puramente reale. Si ottiene quindi [26]:

$$Im\chi(\omega) = \frac{1}{3}\chi_{\parallel}(\omega) = \frac{1}{3}\chi_{\parallel}(0) \frac{\omega\tau_{\parallel}}{1 + (\omega\tau_{\parallel})^2}$$

dove il tempo longitudinale efficace è dato da [1,24]

$$\tau_{\parallel} = \frac{\tau_N\tau_B}{\tau_N + \tau_B}$$

Il tempo di rilassamento browniano è scritto come

$$\tau_B = \frac{3\eta V}{k_B T}$$

dove  $\eta$  è la viscosità del liquido e  $V$  è il volume idrodinamico efficace della particella. Il tempo di rilassamento longitudinale dipende fortemente dalla barriera di energia; di conseguenza il suo valore può cambiare di molti ordini di grandezza (da diversi ns a diversi anni). Per particelle uniformi e monoassiali la barriera di energia è  $\Delta E = KV$ . Per una grande barriera di energia ( $a = \Delta E/k_B T > 2$ ) e campo magnetico nullo il tempo di rilassamento di Neel può essere espresso come

$$\tau_N = \frac{1}{2}\pi^{1/2}\tau_D a^{-3/2} e^a$$

dove il tempo di diffusione libera  $\tau_D$  è dato da:

$$\tau_D = \frac{M_S V_m}{2\alpha\gamma k_B T}$$

dove  $\alpha$  è la costante di smorzamento e  $\gamma$  è il rapporto giromagnetico.

In un fluido magnetico reale occorre però introdurre delle funzioni di distribuzione del diametro delle nanoparticelle per il nucleo magnetico e per il rivestimento o per il diametro idrodinamico totale; la suscettività magnetica efficace è un integrale su queste distribuzioni

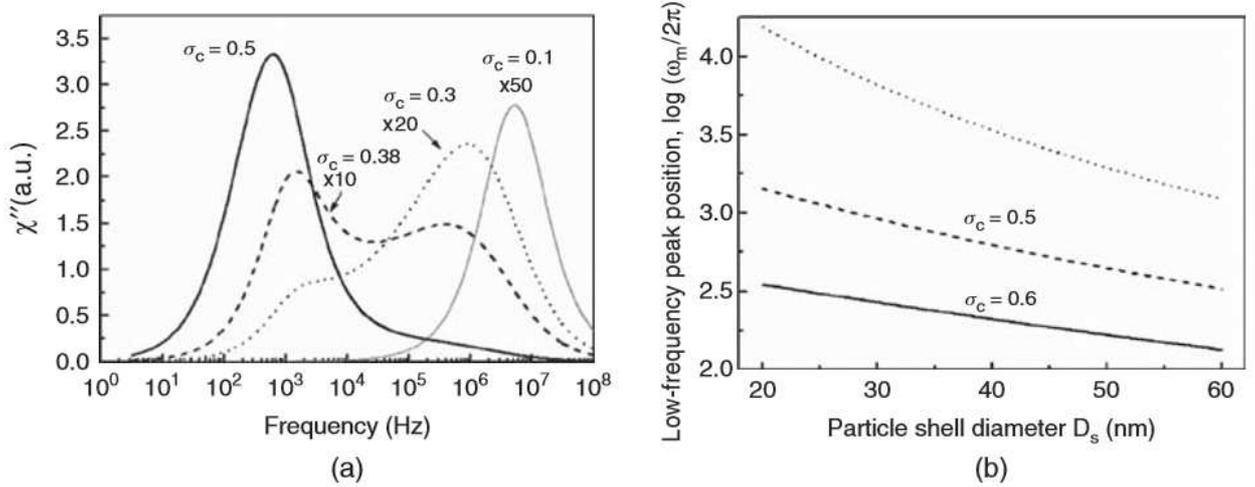
$$Im\chi(\omega) = \frac{1}{3}\hat{\chi}_0 \int_0^\infty dD_c \int_0^\infty dD P(D_c)P(D)D_c^6 \times \frac{\omega\tau(D_c, D)}{1 + [\omega\tau(D_c, D)]^2}$$

dove

$$\hat{\chi}_0 = \frac{nM_S^2 \left(\frac{\pi}{6}\right)^2}{3k_B T}$$

in cui  $n$  è la concentrazione di particelle per unità di volume e il tempo di rilassamento efficace  $\tau(D_c, D)$  è dato da:

$$\tau(D_c, D) = \frac{\tau_N^{-1}(D_c)\tau_B^{-1}(D)}{\tau_N^{-1}(D_c) + \tau_B^{-1}(D)}$$



*Figura 2.9:* a) Grafico di  $\chi''$  in funzione di  $\omega$  calcolata per diversi valori della dispersione di dimensioni  $\sigma_c$  per il nucleo magnetico delle nanoparticelle di magnetite ( $Fe_3O_4$ ); b) dipendenza della posizione del picco a bassa frequenza di  $\chi''$  dal diametro del rivestimento (linea continua:  $\sigma_c = 0,5$ ; linea tratteggiata:  $\sigma_c = 0,6$ ; linea punteggiata:  $\sigma_c = 0$ ). [1]

Come si può vedere *in figura 2.9* (a), la parte immaginaria della suscettività presenta due picchi (valori massimi). Generalmente il picco a frequenza minore è dovuto al rilassamento browniano, mentre quello a frequenza maggiore è dovuto al rilassamento di Neel. La posizione di entrambi i picchi può variare anche di un ordine di grandezza e dipende sia dall'ampiezza della

distribuzione dei diametri sia dallo spessore del rivestimento. Grazie alle relazioni

$$\omega_{m1}\tau_B(D) = 1$$

$$\omega_{m2}\tau_N(D_C) = 1$$

è inoltre possibile stimare il diametro del nucleo e il diametro totale della particella. [1,25,26]

### **3.Nanoparticelle magnetiche**

Le nanoparticelle di ossido di ferro sono state studiate più diffusamente di altre perchè l'ossido di ferro è un materiale fortemente ferromagnetico e perchè non sono tossiche per l'organismo. Dal momento che è sempre preferibile iniettare la minore quantità possibile di materiale, si cerca di sintetizzare nanoparticelle con il massimo potere di riscaldamento. Tra gli ossidi di ferro, la magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) è uno di quelli maggiormente utilizzati. Come è stato già spiegato esistono diversi processi di perdita di energia magnetica (isteresi e rilassamento) e le dimensioni delle particelle impiegate determinano quale di questi è il predominante. [1]

#### **3.1 SPIONs**

SPIONs è un acronimo col quale si indicano le nanoparticelle di ossido di ferro superparamagnetiche. Esse consistono in un nucleo di ossido di ferro e possono essere trasportate nella zona richiesta attraverso dei magneti esterni. Presentano diverse proprietà interessanti quali il superparamagnetismo, l'alta irreversibilità dei campi, un alto campo di saturazione, contributi extra di anisotropia o uno spostamento del ciclo in seguito al raffreddamento del campo. A causa di queste proprietà le particelle, dopo aver rimosso il campo esterno, non mantengono a lungo l'interazione magnetica.

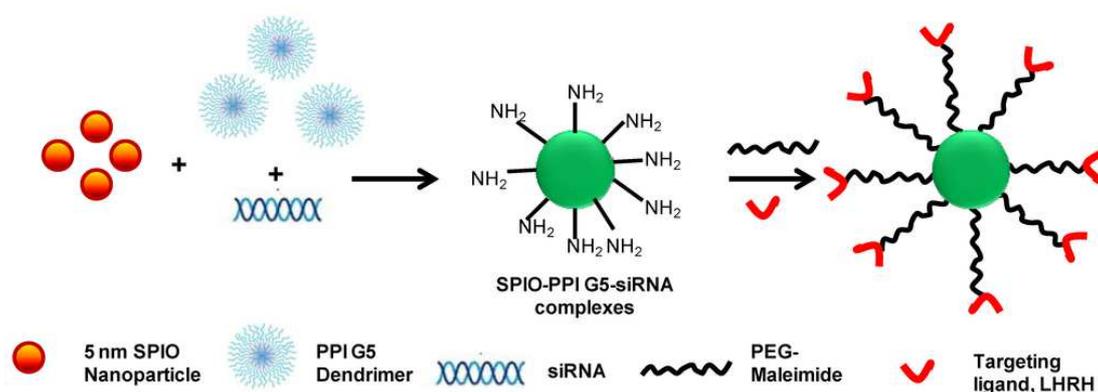
Il concetto di usare un campo magnetico esterno accoppiato a particelle magnetiche venne introdotto da Freeman nel tardo 1970; una varietà di nanoparticelle e microparticelle è stata sviluppata per rilasciare il farmaco nel specifico sito bersaglio in vivo. Tutt'oggi si continuano tali studi con gli obiettivi di:

- i) ridurre la quantità di distribuzione sistemica del farmaco citotossico e quindi gli effetti associati,
- ii) ridurre il dosaggio richiesto in maniera efficiente, cioè in modo da riuscire comunque a localizzare il farmaco.

Gli SPIONs hanno principalmente due configurazioni strutturali:

1. un nucleo magnetico (di solito magnetite,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o maghemite  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) rivestito da un polimero biocompatibile;
2. un polimero poroso biocompatibile in cui gli SPIONs sono confinati all'interno dei pori.

Per schermare la particella magnetica dall'ambiente circostante la si può collegare a gruppi carbossilici, biotina, avidina, carbodiimmide e altre molecole, col fine di aumentare la resa di targeting. Queste molecole agiscono quindi come “attachment points” (punti di fissaggio) per l'accoppiamento di farmaci citotossici o anticorpi bersaglio (come in *figura 3.1*).



*Figura 3.1:* Rappresentazione schematica dello sviluppo di uno [28]

Da un punto di vista fisico, il “magnetic targeting” deriva dalla forza magnetica esercitata sugli SPIONs dal gradiente di campo magnetico.

L'efficacia della terapia dipende da diversi parametri fisici, come la lunghezza del campo magnetico, il gradiente, le proprietà volumetriche e magnetiche delle particelle. Il processo di localizzazione del farmaco usando gli SPIONs è basato sulla competizione tra le forze esercitate sulle particelle da parte del flusso del sangue (blood compartment) e le forze magnetiche esercitate da un campo magnetico esterno applicato. Nella maggioranza dei casi il campo magnetico è generato da un forte magnete permanente fissato fuori dal corpo sopra al sito interessato. [1,4]

Il farmaco, normalmente sotto forma di un ferrofluido biocompatibile, è iniettato nel sistema circolatorio del paziente. Quando le forze magnetiche superano il tasso di flusso del sangue nelle arterie ( $10 \text{ cm s}^{-1}$ ) o nei capillari ( $0.05 \text{ cm s}^{-1}$ ), le particelle magnetiche sono mantenute in loco dall'alto gradiente del campo magnetico esterno. Una volta che il farmaco o i portatori sono concentrati nel bersaglio, il farmaco può essere rilasciato sia tramite attività enzimatica sia a seguito di cambiamenti delle condizioni fisiologiche, come il pH, l'osmolalità o la temperatura, e può essere assorbito dalle cellule endoteliali del tessuto interessato o essere assorbito dalle cellule tumorali. Questo sistema, in teoria, ha vantaggi maggiori rispetto ai normali “non-target” metodi della terapia con farmaci citotossici.

Gli SPIONs biocompatibili come la magnetite sono ampiamente utilizzati per applicazioni biomediche in vivo inclusa la MRI (magnetic resonance imaging) per migliorare il contrasto, rilascio nel tessuto specifico di agenti terapeutici, ipertermia e campo magnetico assistito per la terapia radionuclide. La loro lenta liberazione renale e il loro maggiore valore di rilassamento rispetto ai mezzi di contrasto a base di gadolinio, rende gli SPIONs tra i migliori candidati per l'imaging.

Molti SPIONs con dimensione del nucleo di circa 3-6 nm e rivestimento (di dimensione idrodinamica da i 20 ai 150nm), tra i quali il Feridex, l'Endorem, il Combidex e il Sinerem, sono stati approvati per l'MRI nei pazienti. Gli SPIONs (carichi di farmaco) hanno anche la caratteristica che possono essere guidati alla destinazione desiderata utilizzando un campo magnetico esterno,

mentre simultaneamente viene rintracciata la bio distribuzione delle particelle. Questo approccio prende il nome di teranostica o “theragnostic”, ovvero “therapeutic” e “diagnostic”. [2]

L'applicazione in biologia, la diagnosi e la terapia medica richiede che gli SPIONs siano stabili in acqua a pH neutro e in condizioni di salinità fisiologica. Una tale stabilità del colloide dipende dalla dimensione delle particelle, le quali devono essere sufficientemente piccole in modo tale evitare una precipitazione dovuta alla forza di gravità. Altri importanti fattori sono la carica e la chimica di superficie che danno luogo sia a repulsioni steriche e che a quelle coulombiane. Per controllare le proprietà di superficie degli SPIONs, essi sono rivestiti di un polimero biocompatibile durante o prima del processo di sintesi, col fine di impedire la formazione di grandi aggregati, i cambiamenti dalla struttura originale e la biodegradazione, quando esposto al sistema biologico. In aggiunta, il polimero di rivestimento può anche permettere il legame dei farmaci attraverso il legame covalente.

La biocompatibilità e la tossicità degli SPIONs sono degli altri principi da tenere in considerazione per le applicazioni biomediche. I parametri che determinano questi principi sono:

- la natura della componente magnetica reattiva (per esempio la magnetite, il ferro, il nichel, il cobalto, il neodimium-iron-boron o il samarium-cobalt);
- la grandezza finale delle particelle considerando sia il nucleo che i rivestimenti (shell)

Idealmente, gli SPIONs devono avere anche un'alta magnetizzazione in modo tale che il loro movimento nel sangue possa essere controllato con un campo magnetico esterno e in modo tale che possano essere immobilizzati nel tessuto in cui è stata riscontrata una patologia da curare.

Altri sono i materiali di particolare interesse come il cobalto e il nichel, ma essi risultano tossici e sensibili all'ossidazione. Le particelle di ossido di ferro come la magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o la maghemite ( $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$ ) sono di gran lunga le più usate per le applicazioni biomediche. [13]

Un altro aspetto importante dello “SPIONs delivery” è la loro internalizzazione in specifiche celle. Ciò è particolarmente limitato da tre fattori:

- a. la vita breve delle particelle nel sangue (short blood half-time)
- b. un targeting non specifico
- c. bassa efficienza di internalizzazione dei leganti innestati di superficie

Vari sforzi sono diretti verso il miglioramento di queste proprietà degli SPION e verso la modificazione dei loro metodi di sintesi per controllare meglio le loro dimensioni e superfici. [1,3,4,28]

## **3.2 Nanoparticelle d'oro**

Fino a poco tempo fa, la prevenzione, la diagnosi e il trattamento del cancro erano considerate separatamente. La mancanza di interazione tra questi campi ha ostacolato gli sforzi per affrontare in modo efficace questa malattia. Per questo motivo, recentemente è stato progettato un nuovo metodo che accorda simultaneamente diagnosi e terapie. Di particolare interesse in teranostica sono le nanoparticelle di ossido di ferro, di silice e d'oro. Combinando in maniera appropriata la dimensione, la composizione, la forma e la superficie delle nanoparticelle, l'assorbimento cellulare del farmaco nella cellula e l'imaging molecolare possono essere migliorate. Le nanoparticelle d'oro (AuNPs) sono state ampiamente utilizzate come vettori di consegna mirata del farmaco, come sensori e come agenti di contrasto per l'imaging molecolare delle cellule tumorali grazie alla loro stabilità, alla loro capacità di legarsi a biomolecole, alla loro caratteristiche di assorbimento plasmonico della superficie e alle loro proprietà ottiche.

Le nanoparticelle d'oro a risonanza plasmonica nella regione di luce infrarosso-vicino (NIR) dello spettro luminoso, convertono con efficacia la luce in calore, proprietà sfruttata per l'ablazione termica di masse cancerose nelle loro sedi tumorali, alle quali in precedenza le stesse nanoparticelle si sono incollate. Un elemento critico di questo processo è la dimensione delle nanoparticelle, che influenza sia l'attacco alle cellule tumorali che la loro efficienza fototermica. È stato riscontrato che il processo di segnalazione delle AuNPs

sulle cellule è il migliore possibile quando hanno dimensione compresa tra i 40 e i 50 nm.

Il paclitaxel (PTX) è uno dei farmaci chemioterapici più efficaci per il trattamento di vari tipi di cancro a causa della sua citotossicità efficace contro vari tipi di tumori umani ed animali. Tuttavia, i suoi effetti terapeutici sono limitati a causa della scarsa solubilità in acqua e la mancanza di selettività contro le cellule tumorali, portando ad effetti collaterali tossici sulle cellule sane. Un farmaco che presenta una migliore solubilità in acqua è il Beta-ciclodestrina ( $\beta$ -CD). Tuttavia questi agenti chemioterapici presentano dei problemi. Per ridurre al minimo i loro effetti collaterali tossici, alcuni ricercatori hanno introdotto sistemi mirati di drug delivery (DDS) per attaccare selettivamente le cellule tumorali.

È possibile progettare e preparare un agente teranostico basato su nanoparticelle d'oro legate alla superficie con dei recettori anti-cancro come il paclitaxel. Questo agente è stato valutato in base alla sua efficacia per la diagnosi ed il trattamento di tre tipi di tumori: HeLa del seno umano, il carcinoma A549 del polmone umano e il MG63 dell'osteosarcoma umano. Per valutare l'effetto delle AuNPs funzionalizzati, sono state studiate le loro assunzioni intracellulari e la loro citotossicità.

La biotina (promotore di crescita a livello cellulare) è una piccola vitamina B7 solubile e tutte le cellule viventi richiedono vitamine per la loro sopravvivenza. In particolare, le cellule tumorali hanno bisogno di tale vitamina per la loro rapida proliferazione, tanto è vero che è comune trovare, sulla superficie delle cellule tumorali, una sovraespressione dei specifici recettori di biotina. È stato riscontrato che essa coniugata a AuNPs può indurre efficacemente l'assorbimento intracellulare nelle cellule tumorali. Questo risultato suggerisce che tale promotore può essere utile come un biomarker per il cancro nel drug delivery.

In nanomedicina, dunque, le AuNPs possono essere utili o come nano-carrier di farmaci anti-cancro grazie alla loro citocompatibilità, stabilità e facilità di legame con le biomolecole o come agenti di imaging molecolari, da soli o in

combinazione con altri fluorofori, grazie alle loro proprietà di diffusione della luce nel visibile.

Degli studi hanno dimostrato, quindi, che l'oro, elemento proverbialmente passivo per i sistemi biologici, diviene invece fortemente attivo sotto forma di nanoparticelle e risulta un buon materiale che permette la penetrazione selettiva e l'accumulazione in cellule cancerogene. Questo accumulo, che facilita la rivelazione radiografica, può essere usato per attivare farmaci antitumorali causando direttamente la morte delle cellule tumorali. [19,27]

## **4. Teranostica. Diagnosi e cura**

Tra le più importanti applicazioni delle nanoparticelle in teranostica ci sono l'imaging mirato (target imaging) e la consegna terapeutica (therapeutic delivery), che include il targeting passivo e attivo. Il targeting passivo è stato provato con nanoparticelle di dimensione compresa tra i 10 e i 500 nm mediante un meccanismo noto col nome EPR (enhance permeability and retention), in cui le nanoparticelle si accumulano nel tumore dopo essere uscite dai vasi per mezzo di un processo detto endocitosi mediata da recettori.

Nel targeting attivo, le nanoparticelle sono unite a leganti ad alta affinità per le cellule tumorali. Queste nanoparticelle a target specifico potrebbero accumularsi nei tessuti malati, riducendo quindi l'assorbimento indesiderato nel tessuto sano, limitando così al minimo gli effetti collaterali. Il targeting può anche contribuire a raggiungere una maggiore efficienza e ridurre la frequenza complessiva del dosaggio somministrato. [1,3]

### **4.1 Composizione delle nanoparticelle**

Le nanoparticelle usate in teranostica, in gran parte, sono caratterizzate da quattro componenti basilari:

1. Un emettitore di segnale,
2. Un carico utile terapeutico (therapeutic payload),

3. Un trasportatore di carico utile (payload carrier),
4. Un legante.

L'emettitore possiede delle proprietà ottiche, magnetiche o radioattive che lo caratterizzano e può emettere il segnale in maniera spontanea o in seguito ad un'eccitazione da parte di una sorgente esterna. Tale segnale è individuato da rilevatori esterni ed è utilizzato per la costruzione dell'immagine. Il payload terapeutico può essere un medicinale chemioterapico o un acido nucleico come il DNA o il siRNA. Il trasportatore di solito include una matrice polimerica di materiali con gruppi funzionali molteplici, ai quali possono essere coniugati degli emettitori di segnale oppure il carico terapeutico. Il ligando di targeting è scelto in modo che leghi e formi un complesso con un marker della specifica patologia, facilitando così il trasporto di nanoparticelle nel sito di interesse e consentendo interazioni con la cellula o col tessuto malato. [4]

L'emettitore di segnale e il payload terapeutico possono essere incorporati nel vettore oppure coniugati sulla superficie del core della nanoparticella, mentre il legante di targeting è sempre unito covalentemente alla superficie del supporto, che consente l'interazione diretta con la cellula o tessuto bersaglio.

Le nanoparticelle possono essere ingegnerizzate per sviluppare strutture relativamente complesse, una nanoparticella può anche contenere molti emettitori di segnale dotati di diversi meccanismi di segnalazione offrendo così immagini multimodali che permettono di sfruttare i vantaggi delle singole modalità di imaging e ampliare l'applicabilità del vettore.

L'emettitore di segnale, nonché il payload terapeutico, può essere incapsulato in una nanoparticella o può essere coniugato ad un carrier payload. Una grande varietà di polimeri, sia di natura sintetica che naturale, sono utilizzati come payload carriers. Tali polimeri possono essere uniti alle nanoparticelle mediante legami covalenti e non covalenti durante la sintesi del nucleo della nanoparticella o tramite la modifica della superficie in seguito alla sintesi di nuclei.

I legami covalenti sono di solito formati attraverso composti chimici quali il silano, l'ammine o l'acido carbossilico. I legami non covalenti maggiormente utilizzati sono il legame ionico, idrofobico e ad idrogeno.

Questi rivestimenti polimerici contengono o un'enorme quantità di gruppi laterali o grandi blocchi di segmenti idrofobici e le molecole terapeutiche possono essere collegate facilmente attraverso legami covalenti o interazioni non covalenti. In caso di legame covalente, tali molecole reagiscono con i gruppi laterali sul polimero portante formando composti organici quali l'ammide, l'estere, il tioetere, il disolfuro, l'idrazone, o dei polipeptidi (aminoacidi uniti tra loro attraverso legami peptidici).

Le applicazioni cliniche richiedono che i polimeri portatori siano biodegradabili ed eventualmente eliminabili dall'organismo. Pertanto, le catene polimeriche spesso contengono più legami ammidici, esteri o glucosidi e si spezzano idroliticamente o enzimaticamente una volta che il vettore raggiunge il sito desiderato. I legami spezzati e le catene polimeriche degradabili fanno sì che il payload sia rilasciato, in maniera controllata, in loco. Il rilascio del payload può essere attivato sia da impulsi interni come una variazione del pH, una forza ionica, un cambiamento di temperatura o una degradazione idrolitica e enzimatica, o da uno stimolo esterno, come onde elettromagnetiche o eccitazione luminosa.

Alcuni leganti di targeting possono anche facilitare l'endocitosi mediante recettore e quindi migliorare notevolmente l'assorbimento cellulare dei payload. Per guidare le nanoparticelle verso il sito interessato è stata utilizzata un'ampia varietà di leganti di targeting, tra cui piccole molecole organiche, oligosaccaridi, aptameri, peptidi, anticorpi e altre proteine, caratterizzati da pesi molecolari compresi da poche centinaia a decine di migliaia di Daltons.

I siti di targeting dei liganti devono essere facilmente accessibili per l'interazione ligando-recettore. Pertanto, è molto difficile assemblare anticorpi o altre grandi molecole di leganti sulla superficie delle nanoparticelle in orientamento corretto, mentre molecole piccole di leganti spesso richiedono

delle lunghe molecole che facciano da collegamento per evitare un ostacolo sterico mediante il rivestimento delle nanoparticelle.

Al contrario, dei corti peptidi o aptameri possono essere ingegnerizzati in modo da avere una precisa modificazione e giusto assemblaggio sulla superficie della nanoparticella per ottenere la massima conservazione dell'attività del legante.

Possono essere collegati ad una particella anche più ligandi di targeting per ottenere un effetto multivalente. Tuttavia, dato che il legante di targeting immobilizzato sulla superficie potrebbe cambiare le proprietà fisico-chimiche delle nanoparticelle, una densità superiore del ligando non si traduce in un accumulo superiore nel tessuto bersaglio. Pertanto è necessario che la densità del ligando di ogni sistema di nanoparticelle per ciascuna applicazione prevista sia ottimizzata di caso in caso. [1,4,15]

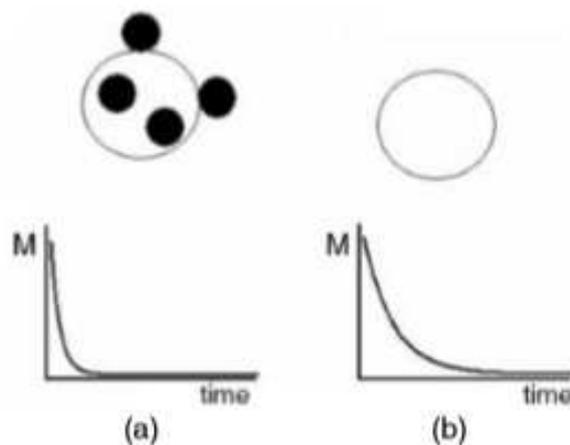
## **4.2 Nanoparticelle come agente di contrasto**

Esistono diverse tecniche di imaging non invasive che si utilizzano per visualizzare la distribuzione in tempo reale delle nanoparticelle. Le più comuni sono: la tomografia a risonanza magnetica (MRI), la tomografia computerizzata a raggi X (CT), la tomografia ad emissione di positroni (PET), la tomografia computerizzata ad emissione di fotone singolo (SPECT) e la tomografia ad ultrasuoni (US). Altre tecniche di imaging, come la tomografia mediante fluorescenza (FMT) e la tomografia fotoacustica (PAT), sono in via di sviluppo.

Ognuna di esse presenta dei vantaggi e degli svantaggi. Per esempio, l'MRI e la CT hanno un'elevata risoluzione spaziale e forniscono informazioni anatomiche dettagliate, ma mancano di sensibilità. Al contrario la PET e la SPECT sono molto sensibili, ma hanno una risoluzione limitata e dunque non permettono di avere precisione nell'immagine.

Per superare tali limiti, sono state sviluppate altre tecniche di imaging come la PET-CT, l'MRI-optical e l'MRI-PET. Le nanoparticelle sono particolarmente utilizzate in quest' ultime, specialmente come agenti di contrasto. [6,10]

Il motivo principale per cui si usano nanoparticelle magnetiche per l'imaging a risonanza magnetica è la riduzione di T1 e T2, in modo da migliorare il contrasto dell'immagine. In particolare a tale scopo sono state studiate le nanoparticelle di ossido di ferro. Come mostrato in *figura 4.1*,



*Figura 4.1*

le particelle SPM (superparamagnetiche) sono magneticamente sature nei campi magnetici applicati in MRI e sono in grado di creare un campo bipolare locale che diminuisce il valore di T1 e T2. Inoltre per migliorare ulteriormente la biocompatibilità, le nanoparticelle SPM a base di ossido di ferro sono sempre rivestite da uno strato di polimero, che può essere smaltito per via epatica dopo il trattamento. Nell' MRI, le nanoparticelle magnetiche vengono selettivamente assorbite dal sistema reticoloendoteliale e rimosse come sostanze estranee dal sistema di circolazione del sangue. Si è riscontrato che le nanoparticelle magnetiche con diametro inferiore a 10nm hanno un'emivita nel flusso sanguigno più lunga rispetto a quelle di 30nm di diametro. Le nanoparticelle più grandi sono riconosciute dal fegato e dalla milza, mentre quelle più piccole vengono raccolte dal sistema reticoloendoteliale nei tessuti sani in tutto il corpo. È l'assorbimento differenziale delle nanoparticelle magnetiche da parte di diversi tessuti che determina il contrasto nell'MRI. Per le cellule tumorali, i tempi di rilassamento non vengono modificati mediante l'introduzione di contrasto (nanoparticelle magnetiche) a causa della mancanza di un sistema reticoloendoteliale in tale zona. Perciò, l'identificazione di

linfonodi maligni, tumori del fegato e tumori cerebrali etc. può essere facilmente ottenuta in presenza di nanoparticelle magnetiche confrontando il contrasto dell'immagine. Si è anche notato che le nanoparticelle di ossido di ferro hanno la capacità di essere incapsulate in agenti a target specifico. Il rivestimento polimerico ramificato sulla superficie delle nanoparticelle può essere utilizzato per trasportare il DNA nel nucleo cellulare, e consente l'interazione intracellulare tra le nanoparticelle magnetiche e cellule staminali. Questi legami migliorano le prestazioni delle nanoparticelle magnetiche come agenti di contrasto per l'MRI. Un altro tipo di agenti di contrasto comuni utilizzati in risonanza magnetica sono i complessi ionici di gadolinio. [22]

Per l'imaging in vivo, la risonanza magnetica è un utile strumento a scopi diagnostici, all'alta risoluzione spaziale e alle capacità tomografiche multidimensionali. Tuttavia, questa tecnica soffre di bassa sensibilità del segnale e inoltre il rumore di fondo molto elevato rappresenta un problema significativo per la costruzione dell'immagine. Per superare questi limiti è necessario utilizzare degli amplificatori di segnale. Essi principalmente coinvolgono agenti che possono rispondere a stimoli di natura chimica o biologica nei siti in cui è stata riscontrata una patologia, come per esempio zone che presentano un pH fortemente acido, ipossia o temperature particolarmente elevate, e che innescano un forte aumento o diminuzione di intensità del segnale locale. Questi stimoli inducono un cambiamento a livello fisico o chimico degli emettitori di segnale ovvero provocano una variazione, per esempio, della densità elettronica, della struttura chimica, dello stato di aggregazione discreta, e quindi, in tal modo, possono modificare l'ampiezza o la composizione del segnale emesso.

I vettori maggiormente utilizzati sono le nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (in particolare quelle in magnetite,  $Fe_3O_4$ ) che possono essere coniugate con fluorofori per ottenere sia immagini a risonanza magnetica sia immagini biofotoniche. Grazie a questa dualità, è possibile utilizzare

- l'MRI per identificare dove è localizzato il tumore e per monitorare il post operazione,

- l'immagine biofotonica, con la risoluzione a livello cellulare, per riconoscere i confini del tumore in modo da rendere più precisa la resezione durante l'operazione.

La risonanza magnetica in vivo risulta essere una delle metodologie più potenti poiché è uno strumento non invasivo, né dal punto di vista dell'energia che utilizza, non avvalendosi di radiazioni ionizzanti, né dal punto di vista dell'esecuzione dell'esame, in quanto anche in caso di ricorso alla somministrazione del mezzo di contrasto questo ha un potere allergizzante molto basso e sicuramente inferiore a quello utilizzato con altri strumenti per esempio con la TAC.

La risonanza magnetica viene utilizzata in moltissimi campi (in ambito neurologico, neurochirurgico, traumatologico, oncologico, ortopedico, cardiologico, gastroenterologico) e offre diverse funzioni attive quali la diagnosi di un cancro, lo studio dell'espressione genica etc. [1,6,10,17,21,22]

### **4.3 Drug delivery**

Il rilascio controllato di farmaci è di grande importanza per le applicazioni terapeutiche, come ad esempio il trattamento del cancro. Le nanoparticelle magnetiche possono essere utilizzate nella somministrazione di farmaci. Il processo di localizzazione (targeting) del farmaco si basa sulla competizione tra le forze esercitate sui carriers da parte del sangue e le forze magnetiche generate da un magnete esterno. Quando le forze magnetiche superano quelle dovute al flusso del sangue, la particella viene trattenuta e può essere assorbita dalle cellule del tessuto o dell'organo di interesse. [2]

Vari materiali sono stati studiati come carrier di medicinali, geni e proteine in specifiche aree del corpo umano. La *figura 4.2* fornisce le scale dimensionali delle particelle necessarie a questo scopo.

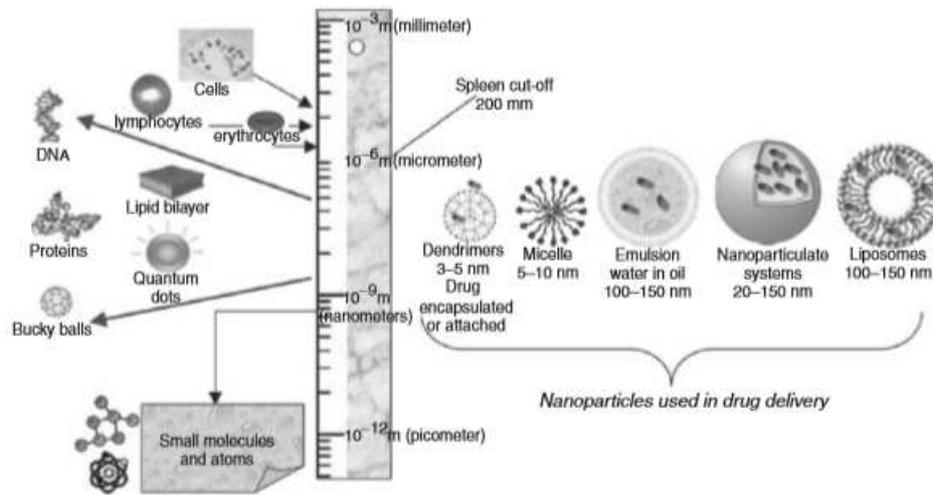


Figura 4.2: scale di nanoparticelle per il drug delivery [1]

In un tipico processo di drug delivery, i farmaci vengono caricati in materiali di riporto biocompatibili, trasferiti agli organi e rilasciati, in maniera controllata, per la terapia del cancro e il trattamento di altri disturbi.

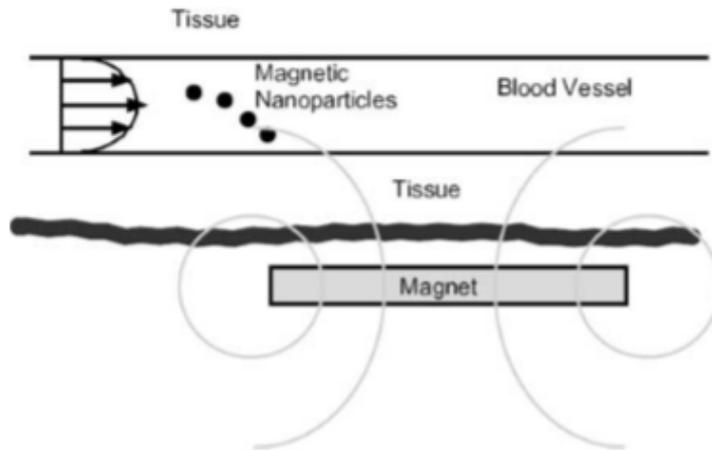
I nanomateriali dell'ordine dei nanometri sono sicuramente un buon candidato per consegna del farmaco soprattutto per la loro eccellente biocompatibilità, per la loro dimensione subcellulare e per le loro azioni mirate. Diversi materiali nanostrutturali si sono dimostrati efficaci nel drug delivery specialmente grazie alle loro proprietà magnetiche (superparamagnetismo, alta magnetizzazione di saturazione ed alta suscettività magnetica). Inoltre, sono state sviluppate delle tecniche chimiche e biofunzionalizzanti con lo scopo di migliorare sia la stabilità che biocompatibilità delle nanoparticelle magnetiche. La caratteristica più interessante di questo trattamento è la somministrazione controllata del farmaco in una zona specifica applicando un campo magnetico esterno, senza che le molecole destinate al drug delivery aumentino il loro livello nei tessuti sani dell'organismo. [1,2]

Nel trattamento del cancro, il drug targeting, magneticamente controllato, si basa su farmaci antitumorali legati con un ferrofluido. Il desorbimento da parte del ferrofluido avviene dopo aver raggiunto l'area di interesse e mediante l'applicazione di un campo magnetico esterno. In questo processo, si verificano effetti locali, tra cui l'irradiazione da parte di radionuclidi terapeutici

immobilizzati o l'ipertermia. Il metodo più semplice è la naturale diffusione del farmaco immobilizzato dai portatori (ovvero dalle nanoparticelle magnetiche). Tuttavia tale metodo non è del tutto efficiente in quanto il rilascio non riesce ad essere completamente controllato, sono state quindi ricercate nuove tecniche. Un rilascio che permette un maggiore controllo lo si ottiene cambiando i parametri fisiologici del paziente come la temperatura, il pH, l'osmolalità etc.

Il limite maggiore del drug delivery è l'intensità campo magnetico esterno, il valore necessario supera il livello idoneo per il corpo umano. Tale livello, tuttavia, non può generare un gradiente magnetico sufficientemente elevato da controllare il movimento mirato delle nanoparticelle o da attivare il desorbimento del farmaco in quanto il gradiente magnetico diminuisce con la distanza. Questa complicazione può essere attenuata inserendo un magnete vicino al target attraverso un intervento chirurgico poco invasivo. Un altro problema che può verificarsi nella somministrazione di farmaci è una possibile agglomerazione di nanoparticelle magnetiche, soprattutto a seguito della rimozione del campo magnetico esterno applicato, a causa della loro elevata energia superficiale. Inoltre, le nanoparticelle più piccole possiedono forza magnetica più debole. Dunque la dimensione ultrasmall richiesta per le nanoparticelle può comportare una maggiore difficoltà nel controllo del movimento o della posizione soprattutto in presenza di un'intensa forza dovuta per esempio ad un flusso sanguigno elevato. Di conseguenza, la somministrazione del farmaco magnetico è maggiormente controllabile nelle zone in cui il sangue ha un flusso caratterizzato da basse velocità. [8,9]

La chemioterapia è il trattamento maggiormente utilizzato per combattere il cancro. In queste terapie, i farmaci vengono somministrati con una distribuzione sistemica generale. Nonostante l'efficacia del trattamento, esso presenta diversi effetti collaterali soprattutto quando il farmaco attacca le cellule sane. Il drug delivery è stato studiato per ridurre gli effetti indesiderati e per migliorare l'effetto del rilascio controllato e localizzato. La *figura 4.3* illustra un sistema di consegna ipotetico del farmaco.



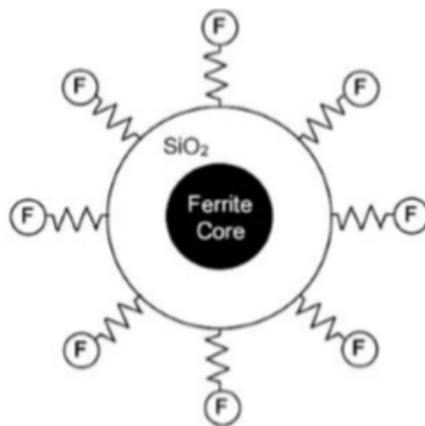
*Figura 4.3:* Rappresentazione schematica di un sistema di rilascio di un farmaco magnetico ipotetico. Un magnete è posizionato all'esterno del corpo e il gradiente del campo magnetico generato può catturare i carrier magnetici in una specifica area mentre fluiscono nel sistema circolatorio. [1]

In questo tipo di terapia, un farmaco citotossico viene legato a nanoparticelle magnetiche biocompatibili formando un farmaco / portatore complesso. In seguito il ferrofluido biocompatibile ottenuto viene iniettato nel sistema circolatorio del paziente e, una volta che entra in circolazione, viene acceso esternamente un magnete che genera un gradiente di campo magnetico in grado di catturare i carrier magnetici e concentrare il complesso in prossimità della zona interessata. Dopo che le cellule tumorali sono state circondate dal complesso, avviene il rilascio, in modo controllato, del farmaco, che viene in seguito inglobato dalle cellule malate. Dopo il trattamento, le nanoparticelle magnetiche sono metabolizzate negli organi, come la milza e il fegato.

I principi fisici alla base del drug delivery magnetico coinvolgono la forza magnetica esercitata sui carrier da un gradiente magnetico del campo. Oltre alle proprietà fisiche delle nanoparticelle, ad incidere su tale trattamento sono anche i parametri idrodinamici e fisiologici. I primi comprendono la velocità del flusso sanguigno, la concentrazione del ferrofluido, il percorso di infusione ed il tempo della circolazione; mentre i secondi comprendono la distanza dalla sorgente, la forza e la reversibilità del complesso farmaco / carrier e il volume

del tumore. E' stato dimostrato che il drug delivery più efficace può essere ottenuto in zone in cui l'afflusso di sangue è più lento e quando si è vicini alla sorgente magnetica.

Finora, molti materiali magnetici si sono dimostrati efficaci nel drug delivery. Le configurazioni strutturali più comuni sono due e prevedono o nuclei magnetici avvolti da rivestimenti biocompatibili o polimeri porosi biocompatibili che ricoprono nanoparticelle magnetiche. Il primo è di particolare interesse a causa della sua semplice preparazione e migliore proprietà di controllo. Una struttura rappresentativa a core-shell di un supporto magnetico è illustrato nella *figura 4.4*.



*Figura 4.4:* Illustrazione schematica di una nanoparticella core-shell funzionalizzata alla consegna di farmaci mirati. Questo materiale nano strutturato è costituito da un nucleo di ferrite, un guscio di silice,  $\text{SiO}_2$ , e gruppi funzionali attaccati allo strato della shell. [7]

I nuclei di ferrite (magnetite,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , o maghemite,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) sono rivestiti con silice biocompatibile o un polimero come il PVA. Il rivestimento svolge una duplice funzione:

- protezione dei nuclei magnetici da cambiamenti chimici inutili
- la fornitura di potenziali di funzionalizzazione.

Mediante i gruppi funzionali (biotina, avidina, anticorpi bersaglio etc.), i farmaci citotossici possono essere accoppiati alle nanoparticelle magnetiche.

Rispetto agli altri trattamenti si è constatato che il drug delivery consegna una quantità di farmaco superiore (fino a quattro volte in più) rispetto agli altri. L'utilizzo di nanoparticelle magnetiche nella somministrazione di farmaci presenta diversi vantaggi:

1. Il farmaco legato alle nanoparticelle magnetiche può penetrare attraverso piccoli capillari e può essere assorbito dalle cellule.
2. Mediante un campo magnetico esterno è possibile controllare il movimento del complesso, permettendo così l'accumulo nel sito desiderato.
3. Le nanoparticelle core-shell biocompatibili consentono il rilascio prolungato del farmaco.
4. Dopo essere stato iniettato nel corpo, il processo di assorbimento da parte delle cellule può essere visualizzato attraverso la risonanza magnetica.

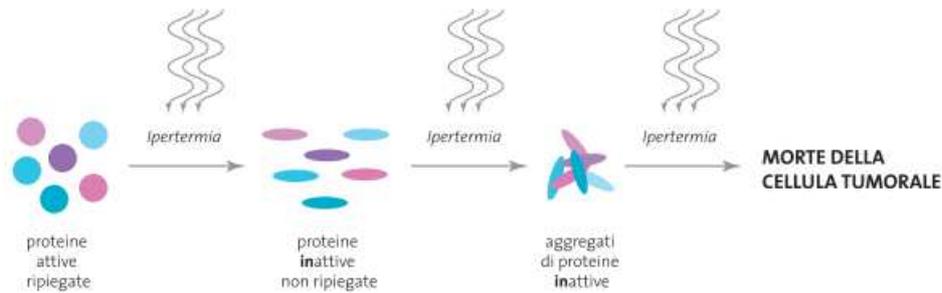
La ricerca di nuove molecole per il drug delivery magnetico è a basso costo e inoltre riduce il costo del prodotto farmaceutico.

Nonostante i notevoli vantaggi, ci sono, tuttavia, alcuni problemi associati alla somministrazione di farmaci in questa maniera. Per esempio, i portatori magnetici stessi non sono biodegradabili e possono causare alcuni effetti tossici. Inoltre, l'accumulo dei vettori magnetici può causare un embolizzazione nei vasi sanguigni nella zona trattata. Infine, quando si applica questa tecnica sull'uomo, l'intensità del campo magnetico applicato, rispettando il valore di sicurezza, potrebbe non essere efficace a causa della grande distanza tra il magnete e il sito di destinazione. Diverse indagini pre-cliniche e sperimentali sono state condotte per superare queste limitazioni e migliorare l'efficienza del drug delivery magnetico in maniera sicura. [2,7,8,9,16,20]

## 4.4 Ipertermia

I tumori maligni derivano dalla crescita di cellule mutate che per sopravvivere consumano più energia delle cellule normali. I vasi sanguigni non sono in grado di fornire sostanze nutritive ed ossigeno sufficienti per la loro proliferazione incontrollata. I tumori maligni stimolano quindi la crescita di altri vasi sanguigni (processo di angiogenesi tumorale). Questi nuovi vasi presentano strutture caotiche rispetto a quelle del tessuto normale. Hanno dimensioni e circuiti insoliti. Data l'irregolarità della struttura di questi vasi, spesso ampie zone dei tumori risultano ipossiche. Inoltre, poiché non sono in grado di smaltire a sufficienza le sostanze nocive attraverso il sangue, le cellule ipossiche hanno un valore di pH inferiore. In questi tumori spesso si osservano anche importanti variazioni della perfusione, poiché i vasi sanguigni instabili vanno incontro a collassi periodici e prelevano ossigeno dalle cellule. È molto difficile distruggere cellule con deficit di ossigeno ricorrendo all'irradiazione ionizzante (che produce radicali ossigeno che a loro volta attaccano il DNA), oppure alla chemioterapia (che necessita del flusso sanguigno per trasportare i citostatici). Poiché le cellule tumorali ipossiche tendono a metastatizzare, è dunque estremamente prioritario annientarle ai fini del trattamento del tumore. L'ipertermia distrugge le cellule tumorali facendo aumentare la temperatura interna del tumore. Sfrutta così i punti deboli sopra descritti dei tumori maligni: poiché il corpo tenta di raffreddare la temperatura in aumento per mezzo della perfusione, i tumori con perfusione ridotta o irregolare si mantengono ad una temperatura superiore, mentre i tessuti normali circostanti, dove il flusso del sangue è regolare, risultano più freddi in misura corrispondente. La scienza attribuisce la distruzione delle cellule tumorali in presenza di ipertermia al danno prodotto dalla temperatura alla membrana plasmatica, allo scheletro cellulare ed al nucleo cellulare. Il motivo che spiega la spiccata sensibilità delle cellule tumorali al trattamento ipertermico è la loro elevata acidificazione, che deriva dall'incapacità di smaltire metaboliti

anaerobici. L'ipertermia attacca le cellule iperacidificate, annienta la stabilità della proteina cellulare e la distrugge.



*Figura 4.5:* morte di una cellula

Vari studi quindi hanno dimostrato che le cellule malate sono più suscettibili ad alte temperature e che, quindi, è possibile sfruttare l'effetto ipertermico, applicando un campo magnetico ad alta frequenza, come metodo alternativo per il trattamento dei tumori. [11]

L'ipertermia prevede il riscaldamento di alcuni organi o tessuti malati, preferibilmente in un range di temperature che va dai 41°C ai 46°C. Il danno che si crea, a questo punto, nei tessuti sani è reversibile, mentre le cellule tumorali risultano essere irreversibilmente danneggiate. Questo rappresenta un vantaggio specialmente quando è utilizzato in combinazione con terapie come radio- o chemioterapia. È interessante notare come l'ipertermia sembra indurre delle modificazioni dei recettori della superficie cellulare in modo che le cellule tumorali siano riconosciute più facilmente dal sistema immunitario. Dunque tale trattamento artificialmente indotto è stato progettato per riscaldare le cellule maligne senza distruggere il tessuto sano circostante. Se vengono indotte temperature più elevate (~56°C), possono verificarsi altri effetti come la coagulazione o la carbonizzazione. Questa 'termoablazione' induce una risposta biologica completamente diversa, non utile per la terapia ipertermica del tumore. [1,7,14]

I trattamenti di ipertermia convenzionali, tra cui l'utilizzo di microonde, di ultrasuoni, di radiofrequenze e di infrarossi sono già stati impiegati con successo. Tuttavia, presentano alcuni svantaggi, tra i quali la loro incapacità di

indurre la formazione di calore, in maniera selettiva, nel tessuto tumorale, l'inibizione della conduzione di calore attraverso il tessuto meno conduttivi termicamente (per esempio il grasso o l'osso cranico), l'invasività dei metodi e la distribuzione disomogenea della temperatura.

Il trattamento ipertermico è applicato nel seguente modo: una volta iniettata una dose di particelle magnetiche nella regione in cui è stato trovato un tumore, viene applicato un campo magnetico alternato all'esterno del corpo. Se l'intensità del campo è sufficientemente forte e di frequenza adeguata, le nanoparticelle magnetiche assorbono energia e riscaldano il tessuto che le circonda. La temperatura circostante può essere mantenuta al di sopra della soglia terapeutica di 42°C per circa mezz'ora per distruggere il cancro.

Per ottenere un'efficace inattivazione delle cellule tumorali sono stati effettuati molti test in vitro con diversi tipi di cellule tumorali e SPION andando a variare le proprietà fisiche degli SPION, in modo da renderle ottimali: l'assorbimento delle particelle nelle cellule tumorali, la durata e la forza del campo magnetico etc. Sono stati poi confermati tali test mediante esperimenti in vivo sugli animali (per lo più nei topi) affetti da tumori sperimentalmente indotti. Da questi studi si notò che l'inattivazione omogenea delle cellule dei tessuti, compreso l'aumento della temperatura, è correlata con la distribuzione omogenea della SPION all'interno del tessuto di target. La temperatura utilizzata in questi esperimenti variava dai 47 agli 80 ° C.

Mediante queste ricerche è stato dimostrato che la posizione delle particelle all'interno della cellula (intracellulare, interstiziale, legata alla membrana) è molto importante in quanto influisce sull'efficienza dell'ipertermia. Il trattamento indotto intracellulare aumenta l'efficienza delle particelle e ha permesso di ridurre il loro dosaggio. Si riscontrò infatti che, anche dopo la mitosi, il 50% delle particelle erano ancora presenti all'interno delle cellule tumorali. Questo è vantaggioso se si applica l'ipertermia in maniera ripetuta. Ciò significa che, per questo tipo di applicazione, gli SPION vengono lentamente degradati dalle cellule, dal momento che i cambiamenti delle

proprietà fisiche di esse (cellule) ridurrebbero drasticamente l'energia termica assorbita.

Gli SPIONs funzionalizzati con gli anticorpi possono legarsi alla membrana cellulare. L'induzione dell'ipertermia pertanto danneggia localmente le membrane cellulari senza, però, apportare cambiamenti nell'ambiente. In questo modo, la concentrazione di particelle può essere ridotta. Attualmente, vengono svolti studi clinici in pazienti umani affetti da tumori alla prostata e tumori cerebrali utilizzando l'ipertermia magnetica locale in combinazione con la radioterapia.

Oltre alla terapia del cancro, l'ipertermia magnetica locale potrebbe essere utilizzata, anche, per la coagulazione del sangue nei piccoli vasi, per l'aumento della temperatura, in maniera selettiva, in cellule infettate da virus e come un meccanismo di rilascio di farmaci.

Il fatto che tale sperimentazione non abbia avuto risultati così efficaci anche sugli essere umani è dovuto principalmente alla necessità di una adeguata quantità di nanoparticelle magnetiche. Inoltre l'accumulo di particelle magnetiche nelle zone malate è ostacolato dal sistema reticolo-endoteliale che fagocita e rimuove qualunque materiale inattivo. Infatti nella maggior parte dei casi, i trattamenti di ipertermia con una quantità ridotta di nanoparticelle magnetiche e una ridotta frequenza del campo magnetico non sono efficaci in quanto la temperatura indotta è troppo bassa. Le simulazioni suggeriscono un livello caratterizzato da tasso di deposizione del calore di  $100\text{mWcm}^{-3}$  per distruggere le cellule tumorali, in modo efficace, nella maggior parte dei casi. La frequenza pratica e la intensità del campo magnetico variabile esterno hanno valore rispettivamente di 0.05-1.2MHz e di 0-15kAm<sup>-1</sup>. D'altra parte, sono necessari materiali sufficientemente magnetici nella zona interessata per generare calore sufficiente per il trattamento. L'iniezione diretta dei ferrofluidi nei tessuti tumorali è in grado di introdurre una grande quantità di materiali magnetici necessari per la generazione di calore. Il targeting con anticorpi e l'amministrazione intravascolare offrono un migliore metodo di riscaldamento, ma il problema in questo caso è la piccola quantità. Si stima che circa 5-10 mg

di materiale magnetico concentrato in un  $\text{cm}^3$  di tessuto malato è in grado di generare abbastanza calore per la distruzione delle cellule malate. Nei trattamenti di ipertermia le nanoparticelle più utilizzate sono quelle di Magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e di maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) per, per la loro elevata velocità di riscaldamento, per le loro proprietà magnetiche appropriate e per la loro eccellente biocompatibilità. Affinchè il trattamento abbia una buona riuscita è necessario inoltre ottimizzare la forma e le dimensioni delle nanoparticelle per ottenere la maggiore potenza di riscaldamento possibile e per regolare a piacere la temperatura di Curie del materiale, fornendo così un controllo automatico sull'assorbimento di energia; se la temperatura di Curie viene oltrepassata, infatti, le particelle diventano paramagnetiche e l'assorbimento di energia si interrompe. [13,14]

Nel 2005 Hilger e il suo team hanno dimostrato l'efficacia dell'uso di nanoparticelle magnetiche biocompatibili in ipertermia per il trattamento del cancro al seno. Il cancro al seno è una malattia molto comune per le donne. Allo stato attuale, questo tipo di tumori possono essere diagnosticati in fase precoce grazie a nuove tecniche. In generale, i trattamenti poco invasivi, senza grandi deformazioni dell'organo, sono preferibili per il benessere emotivo e fisico delle pazienti. Le tecniche sviluppate includono chemioembolizzazione, la chemioterapia interstiziale, agenti citotossici, trattamenti ad ultrasuoni, l'iniezione intratumorale, etc. Sono state proposte le nanoparticelle magnetiche per le loro capacità di accumulo localizzato e di generazione di calore. Nel trattamento di ipertermia, ci sono due situazioni differenti: il trattamento di tumori in situ e tumori multifocali. [1]

In fase iniziale, le cellule del cancro al seno rimangono nella loro zona di origine e non si espandono nei tessuti circostanti. Questi tumori in situ sono ancora piccoli e confinati all'interno di un vaso o di un lobulo. Per questa fase del tumore, il trattamento risulta minimamente invasivo può produrre un effetto positivo. I materiali magnetici possono essere applicati direttamente nei tessuti tumorali mediante metodi stereotassici radiologici per la perforazione

del tumore. Hilger e il suo team hanno condotto una ricerca sistematica su cavie (topi e ratti) sul controllo della localizzazione dei materiali magnetici e della determinazione del regime di temperatura. Il materiale magnetico utilizzato nei loro esperimenti era una miscela di nanoparticelle core-shell costituita da magnetite e maghemite, con nuclei di diametro 10-20nm e uno strato di rivestimento destrano. Idealmente, la dose di nanoparticelle da amministrare nel corpo dovrebbe essere la più bassa possibile. L'applicazione di un campo magnetico esterno con la corretta frequenza e ampiezza è fondamentale per ottenere il riscaldamento necessario.

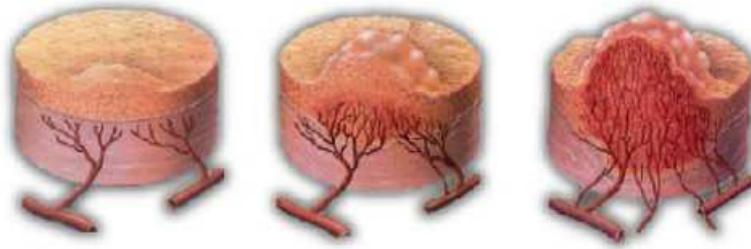
Insomma gli approcci basati sulle nanotecnologie offrono una promettente alternativa nella cura dei tumori, specialmente se in fase iniziale. Inoltre permette di ridurre gli effetti collaterali della chemioterapia che sono una delle cause di maggiore preoccupazione per coloro che si ammalano di cancro. Obiettivi primari di questo tipo di cura sono infatti:

- colpire ed eliminare in maniera più selettiva le cellule tumorali;
- diminuire la dose di farmaco da somministrare al paziente;
- monitorare il paziente durante la terapia.

[1,7,12,13,14,15,20]

#### **4.4.1 Risposta biologica al trattamento ipertermico**

Il trattamento ipertermico può presentare alcune “controindicazioni” quali il danneggiamento delle funzioni del citoscheletro, delle membrane e del nucleo delle cellule tumorali. La suscettibilità al calore delle cellule tumorali varia a seconda della fase del ciclo vitale in cui si trovano. Si è osservato che la massima sensibilità è nella prima fase del ciclo, ovvero nella fase mitotica: il calore al di sopra dei 41 °C, infatti, porta le cellule cancerogene verso l'acidosi, che ne diminuisce la vitalità. La differenza tra le cellule sane e quelle malate è che quelle sane sono caratterizzate da vasi distribuiti e ben ramificati e se sottoposte a temperature maggiori di quella normale di funzionamento, riescono a dissipare il calore in eccesso, grazie alla capacità di dilatazione fisiologica. Come si nota in *figura 4.6*:



*Figura 4.6:* Crescita anormale dei vasi sanguigni all'interno del tessuto tumorale.

i vasi sanguigni delle cellule tumorali, invece, sono caratterizzati da una crescita dei vasi sanguigni caotica e non uniforme con mancanza di elasticità. Quest'ultima comporta l'incapacità di vasodilatazione, che impedisce alla cellula malata un'adeguata dissipazione del calore. È proprio per questo motivo che le masse tumorali sono maggiormente suscettibili al calore e hanno una maggiore difficoltà a dissiparlo. Sostanzialmente, alla temperatura di circa 43-44 °C la maggior parte delle cellule tumorali tende a morire, mentre la maggior parte delle cellule sane a sopravvivere: questa è sicuramente tra le basi fisiologiche dell'efficacia terapeutica dell'ipertermia.

Normalmente, la parte più interna della massa tumorale, vista la relativa distanza dalla rete capillare, è caratterizzata da cellule ipossiche, ovvero carenti di zuccheri e altri elementi nutritivi. Di conseguenza queste cellule non riescono ad essere raggiunte dai farmaci chemioterapici somministrati, che tendono invece ad accumularsi nei tessuti sani ben vascolarizzati. Inoltre queste cellule si sono dimostrate relativamente resistenti alle radiazioni ionizzanti della radioterapia, che per agire necessitano di un ambiente ben ossigenato; tuttavia risultano estremamente sensibili al calore. Questo rappresenta uno dei motivi principali per cui, ad esempio, si vuole utilizzare l'ipertermia in combinazione con la radioterapia: le radiazioni, infatti, agiscono sulle cellule ben ossigenate, situate sulla parte più esterna della massa tumorale, mentre l'ipertermia va ad operare sulla parte più interna, caratterizzata da le cellule ipossiche (a basso contenuto di ossigeno). Questo

produce un aumento del loro livello di ossigenazione, rendendole così più suscettibili all'azione delle radiazioni.

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

## 5. Tossicità

La tossicità delle nanoparticelle, detta "nanotoxicology", è definita come la valutazione della sicurezza dei materiali nanostrutturati e dei nanodispositivi. Si è constatato che le nanoparticelle sono biologicamente attive, questo significa che, in termini di tossicità, queste attività biologiche possono portare ad una potenziale infiammazione e ad attività pro-ossidanti, ma anche ad attività antiossidanti. Gli studi hanno rivelato alcuni effetti tossicologici per gli uomini. Le nanoparticelle presenti nell'aria, a contatto con la pelle, sono in grado di penetrarla e di distribuirsi nei canali linfatici.

I parametri fondamentali della tossicologia convenzionale sono la concentrazione e il tempo. Questi fattori possono essere facilmente misurati per i singoli prodotti chimici e, dopo aver stabilito la natura della risposta della dose di una certa sostanza, possono essere determinati livelli di soglia, in base ai quali, un composto chimico può essere considerato "sicuro" o "pericoloso".

La "nanotoxicology" è uno studio emerso solo di recente, in seguito allo sviluppo della nanotecnologia ovvero all'utilizzo di vari nanomateriali in diverse serie processi e di prodotti industriali. La realizzazione di materiali di dimensioni sempre più piccole, porta a delle variazioni della chimica di superficie di queste strutture, aumentando la loro reattività.

È proprio la reazione tra l'aumento delle superfici reattive dei nanomateriali, dovuto all'aumento del rapporto superficie-volume, e la biochimica che è al

centro di questi studi. L'avvento di queste nuove scienze ha portato gli studiosi a reagire di fronte ad un sempre crescente utilizzo di nuovi nanomateriali, che ha portato, inevitabilmente, l'ambiente e l'uomo ad un certo grado di esposizione. Sono iniziate così ricerche mirate allo studio del potenziale tossicologico dei nanomateriali.

Crescenti preoccupazioni circa i possibili effetti negativi delle nanoparticelle sulla salute sono nate da precedenti esperienze con, per esempio, l'amianto e l'inquinamento atmosferico. [16]

Oltre alla composizione atomica, i nanomateriali sono stati classificati in base alla loro costruzione, ovvero se la nanostruttura è immobilizzata all'interno di un "bulk material", ad esempio come parte della superficie o se è, in alternativa, composta da particelle libere e non legate, capaci di muoversi all'interno dell'ambiente e il corpo. Queste ultime sono molto più preoccupanti da un punto di vista tossicologico. Infatti oltre alla grande mobilità, è elevato il loro rapporto superficie-volume, che le rende particolarmente interessanti dal punto di vista della ricerca e dello sviluppo. Le nanoparticelle possono essere ulteriormente sotto-classificate per quanto riguarda la loro posizione in un ambiente eterogeneo: ovvero se si trovano all'interno di un volume o sulla superficie di un materiale solido o se, in alternativa, si trovano all'interno di un volume di un liquido o di un gas. Tra queste sotto categorie, le nanoparticelle a cui bisogna prestare più attenzione sono quelle sospese in liquidi e miscelate ad un gas. Perché dovremmo essere preoccupati delle particelle sospese nell'aria? Col tempo diversi studi hanno portato all'evidenza che la cattiva qualità dell'aria coincide con un aumento della mortalità, tuttavia l'esposizione alle particelle attraverso vie aeree non rappresenta un grave rischio per la salute pubblica. Poco si sa riguardo agli effetti dell'esposizione a lungo termine alle nanoparticelle ingegnerizzate e non sono ancora disponibili dei dati epidemiologici, a causa della relativa novità della nanotecnologia.

Qualche informazione in più potrebbe essere fornita dai dati relativi alla polvere e all'inquinamento atmosferico, costituito da particelle ultrafini (<100 nm), e potrebbe contribuire a mostrare i possibili effetti pericolosi dovuti

all'esposizione a nanoparticelle artificiali a lungo termine, in seguito ad un loro rilascio nell'ambiente.

I meccanismi di interazione tra nanoparticelle e sistemi viventi non sono ancora pienamente compresi. La complessità viene dalla capacità delle particelle di legarsi ed interagire con la materia biologica e di cambiare le loro caratteristiche di superficie, a seconda dell'ambiente in cui operano. La conoscenza scientifica sui meccanismi di interazione nanoparticelle - cellule è stata raccolta negli anni recenti e indica che le cellule assorbono la nanoparticelle tramite meccanismi attivi o passivi. Anche particelle dello stesso materiale possono mostrare un comportamento completamente differente dovuto, per esempio, a piccole differenze di rivestimento superficiale, carica o dimensione. Questo rende la categorizzazione del comportamento delle nanoparticelle, a contatto con i sistemi biologici, molto intricata e quindi non semplice l'individuazione dei pericoli.

La complessità aumenta quando ci si sposta da esperimenti in-vitro a modelli in vivo. L'identificazione del pericolo in vivo, per quanto riguarda i nanomateriali, è ancora in una fase iniziale. Sono stati identificati i percorsi principali di ingresso (polmone, intestino ed, eventualmente, della pelle), e i bersagli (polmone, fegato, cuore e cervello). Tuttavia, per comprendere i meccanismi e i percorsi seguiti dalle nanoparticelle sono necessari ulteriori studi. Quando si ha a che fare con nanoparticelle di dimensioni minori ai 50nm, esistono altri meccanismi che si verificano all'interno del corpo come l'endocitosi, esattamente quelli che utilizzano i virus. Pertanto, se il corpo è esposto, è necessario prendere seriamente in considerazione i rischi tossicologici.

Per valutare la tossicità di una nano particella i fattori da considerare sono:

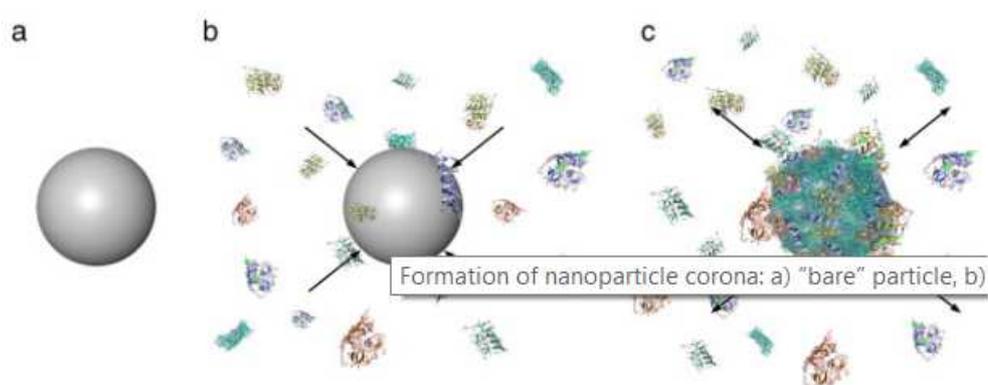
1. La forma, la taglia e la carica
2. La dose
3. La superficie
4. L'ambiente

Per quanto riguarda il primo punto è assolutamente fondamentale conoscere il materiale di partenza e le sue proprietà. In passato questo non era molto semplice per le nanoparticelle prodotte industrialmente, a causa dei processi di produzione e di conseguenza delle enormi variazioni delle proprietà del materiale. I progressi delle nanotecnologie hanno portato a processi di produzione più raffinati e allo sviluppo di nanomateriali con proprietà costanti ed uniformi. A parte la classificazione in base alla posizione nella nanostruttura, i nanomateriali e le nanoparticelle, in particolare, sono classificate in relazione alla loro "morbidezza" e / o "durezza". È solo attraverso la conoscenza delle proprietà delle particelle in esame che è possibile la loro valutazione tossicologica. Questo è importante sia per le particelle industriali ed ambientali, sia per nanoparticelle utilizzate in nanomedicina.

Per quanto riguarda il secondo punto è noto che la dose è uno dei parametri chiave. In nanotossicologia è importante valutare i regimi di dose applicabili e realistici al fine di trarre conclusioni significative da esperimenti in-vitro e in vivo per la valutazione del rischio per la salute pubblica. Ciò significa che tali studi dovrebbero testare la tossicità delle nanoparticelle su dosi reali piuttosto che dosi elevate e non realistiche, in modo da ottenere una reale risposta biologica. Quando si ha a che fare con alte dosi è più facile rilevare la pericolosità e mettere in atto precauzioni e protezioni. Tuttavia i principali problemi di salute pubblica sono dovuti ad esposizioni a basso dosaggio croniche nel corso del tempo, che possano portare ad un aumento di malattie degenerative.

Per quanto riguarda il terzo punto studi hanno portato all'evidenza che minore è il diametro di una particella sferica più il rapporto superficie-volume aumenta. Un aumento della superficie implica un aumento della reattività chimica. Quindi bisogna porre particolare attenzione al materiale di superficie di una nanoparticella, piuttosto che al suo materiale di base. Questa caratteristica, naturalmente, può essere sfruttata per "progettare" particelle con determinate proprietà superficiali in modo da stabilire alcuni percorsi

all'interno dei sistemi biologici. Tuttavia, ciò risulta essere molto complicato in quanto, in un contesto biologico, le nanoparticelle (*figura 5.1*) entrano in contatto con ambienti eterogenei, liquidi o gassosi, e ad esse si attaccano strutture più piccole come atomi, cluster di atomi o macromolecole vincolandole più o meno fortemente. Studi hanno dimostrato che non è il nanomateriale in sé, ma è la "corona" che definisce principalmente le proprietà del composto. Dunque risulta importante comprendere non solo il tipo di nanomateriale, ma anche l'ambiente il cui le nanoparticelle si muovono.



*Figura 5.1:* formazione della corona di una nanoparticella: (a) particella "svestita"; (b) nanoparticella in contatto con proteine; (c) formazione delle corona. [17]

Per quanto riguarda il quarto punto, più volte è stato detto che la nanoparticelle rilasciate nell'ambiente interagiscono con l'acqua, l'aria etc. Questo comporta un o una variazione di carica o di altre proprietà superficiali. È dunque necessario osservare il comportamento delle nanoparticelle nella sua interezza e quindi anche come si comportano con l'ambiente circostante. [1,16,17]

## 5.1 Nanoparticelle e cellule

Le nanoparticelle proprio come i virus, si diffondono da una particella ad un'altra per mezzo di un processo detto endocitosi. In tutti gli studi di nanotossicologia, la dose di particelle deve essere attentamente considerata. Va posta dunque attenzione non solo alla concentrazione iniziale, ovvero quando si va ad esporre le cellule alle nanoparticelle, ma anche alla quantità

effettiva di nanoparticelle assunte da una singola cellula. Sono disponibili varie tecniche per misurare l'assorbimento delle particelle e la distribuzione intracellulare.

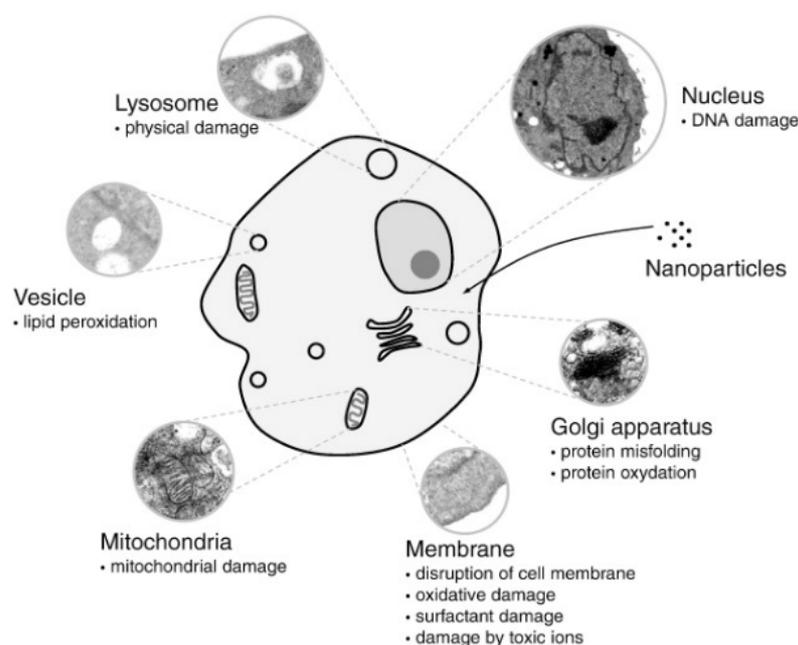
Comprendendo le dinamiche di assorbimento delle particelle e i percorsi in modo quantitativo, si possono trarre diverse conclusioni. I meccanismi sull'interfaccia possono essere sia di natura chimica che fisica (ROS). I meccanismi chimici includono :

- la produzione di specie reattive dell'ossigeno,
- la dissoluzione e il rilascio di ioni tossici,
- disturbi dell'attività di elettroni / ioni di trasporto della membrana cellulare,
- il danno ossidativo attraverso la catalisi,
- la perossidazione lipidica.

Il ROS può comportare processi secondari che possono causare danni alle cellule e perfino la morte delle cellule stesse. Inoltre, il ROS è uno dei principali fattori coinvolti nei processi infiammatori. I meccanismi fisici all'interfaccia sono principalmente il risultato della granulometria e delle proprietà superficiali. Questo include interruzioni: dell'attività della membrana, dei processi di trasporto, della conformazione e dell'aggregazione delle proteine. Entrambe le interazioni chimiche e fisiche portano ad una serie di processi nella cellula che costituiscono la "risposta" biologica. Queste risposte cellulari possono verificarsi prima o dopo l'internalizzazione delle particelle, o come risposta al meccanismo di assorbimento che porta, ad esempio, alla fagocitosi, ovvero un processo in cui una cellula prova, ma non riesce, a fagocitare completamente una particella a causa della sua dimensione o forma. In un contesto cellulare, le membrane racchiudono tutta la cellula. Al fine di agevolare gli scambi tra compartimenti e / o cellule, le membrane devono essere permeabili. La membrana cellulare esterna è l'interfaccia della cellula e la divide dal suo ambiente esterno e permette il trasporto selettivo di ioni, molecole e nanoparticelle. La stabilità della membrana può essere influenzata

dalle nanoparticelle sia direttamente (per esempio danni fisici) o indirettamente (ad esempio ossidazione), provocando eventualmente la morte cellulare. È la capacità delle membrane di controllare l'omeostasi intracellulare, attraverso meccanismi di permeabilità e trasporto selettivo, che la rende un bersaglio vulnerabile per possibili effetti dannosi. Le interazioni delle nanoparticelle con le membrane dipendono in gran parte dalle loro proprietà di superficie. Questo è il motivo per cui modificazioni superficiali sono cruciali nella progettazione di sistemi di somministrazione di farmaci per migliorare l'assorbimento delle nanoparticelle nelle cellule. Anche le dimensioni svolgono un ruolo importante in quanto influenzano la pressione superficiale e forze di adesione. [16,18]

La ricerca ha dimostrato che diversi nanomateriali possono deteriorare le membrane con diversi procedimenti (*figura 5.2*), che possono provocare il danneggiamento della membrana e della sua stabilità, nonché la formazione di pori di dimensioni nanometriche.



*Figura 5.2:* interazione delle nanoparticelle con le cellule. [16]

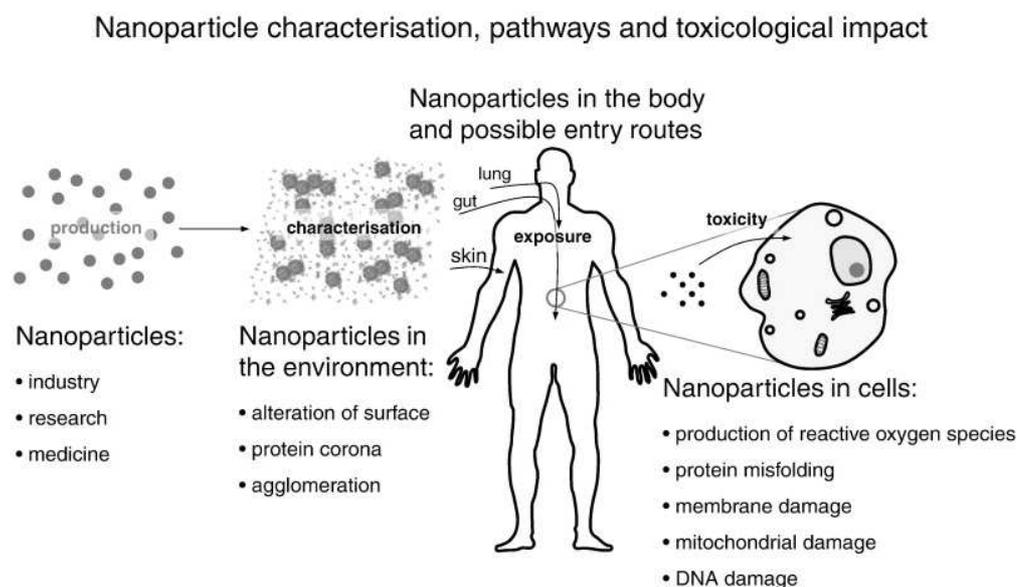
I cambiamenti morfologici della membrana e della sua stabilità sono dovuti principalmente alle proprietà fisico-chimiche delle nanoparticelle. L'impatto della dimensione e della forma dei nanomateriali incide sulla capacità delle cellule di digerire o espellere le nanoparticelle dopo l'accumulo.

L'apparato cellulare dipende in gran parte dalle proteine e da altre macromolecole. Esse esistono in forma di enzimi (ad esempio la gastrina), di cellule di segnalazione (ad esempio gli ormoni) o di proteine strutturali (ad esempio la tubulina). Il loro funzionamento normale è quindi essenziale per tutte le attività vitali della cellula. Quindi la conformazione molecolare corretta è fondamentale per il previsto funzionamento delle proteine ed anche lievi cambiamenti conformazionali possono alterare o distruggere la funzione della proteina. Le nanoparticelle, che possono essere della stessa grandezza delle molecole proteiche, sono in grado di interferire con i processi di segnalazione cellulare o di interagire con le proteine, modificandone la loro attività accompagnatrice o la loro configurazione. Alcuni studi hanno messo in evidenza che le nanoparticelle sono in grado, anche, di entrare nella membrana nucleare e questo a posto l'attenzione anche su possibili effetti genotossici. Tuttavia questi studi non sono stati in grado di identificare chiaramente quale parametro della nanoparticella è il responsabile sia in positivo che in negativo. Il meccanismo che porta al potenziale danno al DNA non è, comunque, del tutto chiaro. A parte l'intercalazione diretta o l'interazione fisica e / o elettrochimica con le nanoparticelle, si crede che è il ROS che, ancora una volta, gioca un ruolo chiave nel danno al DNA. Ciò significa che le particelle non devono necessariamente raggiungere il nucleo, ma potrebbero ad esempio indurre genotossicità via stress ossidativo. [1,16,18]

## **5.2 Le nanoparticelle e l'uomo**

Al fine di valutare la tossicità delle nanoparticelle, i modelli in vitro non sono sufficienti per prevedere i possibili rischi per gli esseri umani. Gli studi in vivo sono necessari per chiarire i meccanismi, i percorsi e le vie d'ingresso delle nanoparticelle in un organismo multicellulare complesso. Ciò è necessario non solo per i nanomateriali utilizzati nei processi industriali, in cui potrebbe verificarsi l'esposizione umana attraverso l'ambiente, ma anche, soprattutto, per i nanomateriali utilizzati in nanomedicina, la cui esposizione fa parte del progetto. Per quanto riguarda le nanoparticelle prodotte su scala industriale,

diversi sono i nanomateriali che attualmente si producono e a cui bisogna prestare attenzione: il biossido di titanio, il biossido di silicio, l'ossido di zinco, l'argento etc. Le nanoparticelle di ossido di ferro e d'oro sono le più utilizzate per le applicazioni nanoterapeutiche grazie alle loro eccezionali proprietà di bio-coniugazione. La ricerca mostra che, a parte la potenziale nano tossicità dovuta alle proprietà "a nudo" della particella, sono di fondamentale importanza il rivestimento e la superficie, per comprendere e per prevedere gli effetti tossicologici. Si teme che le nanoparticelle possano accedere al flusso sanguigno attraverso l'assimilazione gastro-intestinale o che possano accedere anche ad altri organi. Gli studi sulla loro bio distribuzione hanno trovato basse concentrazioni nel fegato, nella milza, nel cuore e nel il cervello. Tuttavia non è ancora chiaro fino a che punto il corpo è in grado di espellerle o se le residue tendano ad accumularsi in particolari organi e/o se possano, in qualche modo, bloccare e compromettere i sistemi di escrezione del corpo.



*Figura 5.3* [16]

Ricapitolando studiare e capire i meccanismi di tossicità delle nanoparticelle a livello cellulare, permette di fare previsioni e di capire se esse possano causare danni in alcune parti del corpo. Per esempio il ripiegamento e la fibrillazione

delle proteine, potrebbero causare gravi problemi neurologici, tuttavia gli studi condotti finora si basano più che altro su esperimenti in vitro. [16]

In seguito al disastro dell'amianto, tutt'oggi si pone attenzione all'infiammazione cronica come risultato dell'esposizione alle nanoparticelle. È stato inoltre notato che si possono avere degli effetti tossicologici anche nel feto. Per esempio le nanoparticelle d'oro possono attraversare la barriera materno-fetale e provocare danni agli embrioni. I meccanismi tuttavia non sono ancora pienamente compresi e richiedono ulteriori ricerche.

Per utilizzare le nanoparticelle magnetiche a scopi biomedicali, esse devono soddisfare, contemporaneamente, diverse condizioni, quali:

1. Minima tossicità per il corpo umano;
2. Buone proprietà magnetiche;
3. Dimensioni ristrette;
4. Facilità di variazione della superficie (rivestimento) per permettere funzionalità mirate in specifici contesti biomedicali.

Per soddisfare le prime due condizioni (fondamentali per l'ipertermia magneto-fluida), l'uso di ossidi di ferro, in particolare, di nanoparticelle di magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e maghemite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) è altamente preferibile, in quanto essi risultano particolarmente biocompatibili. Sono stati proposti altri materiali, come ferriti di cobalto e manganese oppure metalli e leghe metalliche come Fe e FePt, che permettono una facile sintesi; tuttavia risultano tossici per l'organismo. Tale tossicità può essere fortemente ridotta ricoprendo le nanoparticelle ed incapsulandole in un materiale appropriato.

Attualmente si stanno cercando delle risoluzioni ai problemi di salute e di sicurezza legati ai materiali nanostrutturati. Dunque da un lato, la nanotecnologia ha lo scopo di cogliere i vantaggi dei nanomateriali e nanodispositivi con prestazioni straordinarie e meno consumo di energia. Da l'altro, il suo sviluppo deve affrontare il problema della loro sicurezza, connessa ai potenziali pericoli e rischi sia per gli esseri umani che per l'ambiente. Pertanto, in un certo senso, la nanotecnologia è applicabile solo

quando i possibili vantaggi superano i potenziali rischi, o quando, almeno, è possibile controllarli. [1,16]

Negli ultimi anni l'utilizzo di nanoparticelle a scopo medico è aumentato notevolmente. Numerosi nanomateriali possono essere preparati mediante metodi chimico-fisici moderni. Attualmente la maggior parte delle nanoparticelle impiegate sono composte da metalli di transizione, carbonio, silicio e ossido di metallo, che possono causare gravi problemi a seguito dell'inalazione, dell'ingestione, dell'assorbimento della pelle e dell'iniezione nei corpi umani. Le nanoparticelle, che presentano un alto valore del rapporto superficie-volume, risultano biologicamente sfavorevoli. Infatti esse possono essere assorbite attraverso i polmoni se inalate e assorbite attraverso l'apparato gastrointestinale se ingerite. Tuttavia, non è facile generalizzare tale problema, in quanto la tossicità è determinata da:

- caratteristiche dei materiali quali la composizione chimica, la dimensione delle particelle, la solubilità, la chimica della superficie, la forma e la struttura;
- fattori fisiologici come la dose, il metodo di somministrazione, la biodegradabilità, la farmacocinetica e la bio distribuzione.

Per quanto riguarda le nanoparticelle magnetiche, sono stati avviati degli studi sui loro effetti tossici, poiché risultano essere particolarmente versatili in applicazioni in vivo. Si può notare che quelle di dimensioni maggiori mostrano citotossicità superiori rispetto a quelle più piccole. In molti casi, le nanoparticelle magnetiche vengono iniettate in organismi viventi - sia a fini diagnostici che terapeutici-. Pertanto si devono prendere seriamente in considerazione, oltre alla tossicità acuta, la tossicità a lungo termine, comprese degradazione e stimolazione delle cellule con conseguente rilascio di mediatori infiammatori.

Insomma, come mostrarono gli studi condotti dal dott. Chiu-Wing Lam del Wyle Laboratories, Houston, nel 2003, componenti inoffensivi di dimensioni micrometriche, possono essere tossici a scala nanometrica. Per ridurre al massimo gli effetti negativi è necessario tener conto che:

- Le nanoparticelle si possono depositare a livello del polmone creando un effetto infiammatorio in loco;
- Esistono delle indagini che suggeriscono che le nanoparticelle possano entrare nel tessuto cerebrale ed alterarne la trasmissione;
- Attraverso l'esposizione cutanea possano entrare nel circolo ematico
- esiste un assorbimento gastroenterico.

[1,16,17,18,24]

## 6. Conclusioni e prospettive future

La teranostica è sicuramente una disciplina relativamente recente, ma negli ultimi anni si sta sviluppando ad un ritmo incredibilmente veloce. I ricercatori hanno creato numerosi sistemi a base di nanoparticelle che possono essere utilizzati sia per la terapia, come il trattamento di ipertermia o di radioterapia e il drug delivery per la consegna mirata di farmaci chemioterapici, sia per la diagnosi, come l'utilizzo delle nanoparticelle come agenti di contrasto per l'imaging.

Diversi sono gli approcci che includono modalità di multi-imaging e che possono facilitare il monitoraggio delle nanoparticelle sia in vitro che in vivo. Per controllare la terapia e la risposta a livello cellulare, l'uso di agenti fluorescenti, come per esempio coloranti organici fluorescenti o punti quantici, consente il raggiungimento di immagini ad alta risoluzione, che permettono la definizione di diversi organelli anche all'interno della cellula.

Tuttavia, si ottengono i migliori risultati di imaging in vivo con metodi quali la PET o la SPECT o l'MRI, in quanto essi superano i problemi della fluorescenza di fondo e permettono una miglior immagine.

Le nanoparticelle come agenti di contrasto, utilizzate in teranostica, possono giocare un ruolo molto importante, in quanto permettono di monitorare il rilascio del farmaco in fase precoce e permettono lo studio di esso a livello terapeutico.

In vitro questi agenti di imaging hanno portato risultati soprattutto per quanto riguarda la modifica della struttura chimica e dell'architettura in modo da mettere a punto le proprietà farmacologiche migliori.

In vivo, invece, essi sono importanti per studi avanzati sicuramente promettenti a livello clinico. Per ora non sono stati raggiunti importanti risultati, ma questo campo è relativamente giovane e diverse questioni relative all'ambiguità e / o alla differenza tra le concentrazioni ottimali per la terapia e per gli agenti di imaging sono in procinto di essere risolte. Ad esempio, per sistemi con agenti nucleari di imaging, come il 2-[<sup>18</sup>F]-2-desossiglucosio (FDG), e con agenti antitumorali chemioterapici, come la doxorubicina, i dosaggi richiesti per il successo delle singole modalità sono notevolmente diversi (in termini di ordini di grandezza). I sistemi con agenti MRI a base di gadolinio e farmaci terapeutici sono in grado di affrontare problemi simili, grazie alla bassa sensibilità intrinseca della RM. Il dosaggio minimo richiesto per tali agenti di imaging Gd-based, come, per esempio, il Magnevist, è 100 mg / kg, che è notevolmente superiore alla dose terapeutica appropriata.

Questi problemi possono essere superati studiando diverse e nuove combinazioni di agenti diagnostici e terapeutici, sviluppando nuovi farmaci che prevedono maggiori o minori concentrazioni e creando tecniche di imaging più avanzate e più sensibili che prevedano che la dose richiesta per la terapia e Imaging sia la stessa. La ricerca in questo settore, che permette di superare questi ostacoli e che può essere adatta per diverse applicazioni, è in continuo sviluppo e in tempi brevi sarà possibile avere un suo utilizzo concreto. [19]

## Bibliografia

- [1] Varadan, V.K., Chen, L., Xie, J. (2008) *Nanomedicine - Design and Applications of Magnetic Nanomaterials, Nanosensors and Nanosystems*. Chichester, U.K.: Wiley.
- [2] JANIB, Siti M.; MOSES, Ara S.; MACKAY, J. Andrew. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 2010, 62.11: 1052-1063.
- [3] NEUBERGER, Tobias, et al. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, 293.1: 483-496.
- [4] ELSABAHY, Mahmoud; WOOLEY, Karen L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41.7: 2545-2561.
- [5] Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ricardo Ibarra, M. and Santamaría, J. (2007) Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nanotoday*, 2 (3), 22– 32.
- [6] FARRAR, Christian T., et al. Impact of field strength and iron oxide nanoparticle concentration on the linearity and diagnostic accuracy of off-resonance imaging. *NMR in Biomedicine*, 2008, 21.5: 453-463.
- [7] FANG, Chen; ZHANG, Miqin. Nanoparticle-based theragnostics: integrating diagnostic and therapeutic potentials in nanomedicine. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 2010, 146.1: 2.

- [8] CHENG, Jianjun, et al. Formulation of functionalized PLGA–PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, 2007, 28.5: 869-876.
- [9] Xie, Jin, Seulki Lee, and Xiaoyuan Chen. "Nanoparticle-based theranostic agents." *Advanced drug delivery reviews* 62.11 (2010): 1064-1079.
- [10] BARDHAN, Rizia, et al. Theranostic nanoshells: from probe design to imaging and treatment of cancer. *Accounts of chemical research*, 2011, 44.10: 936-946.
- [11] JORDAN, Andreas, et al. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 1999, 201.1: 413-419.
- [12] HERGT, Rudolf, et al. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2006, 18.38: S2919.
- [13] HERGT, R., et al. Maghemite nanoparticles with very high AC-losses for application in RF-magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2004, 270.3: 345-357.
- [14] FORTIN, Jean-Paul, et al. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129.9: 2628-2635.
- [15] GONZALES-WEIMULLER, Marcela; ZEISBERGER, Matthias; KRISHNAN, Kannan M. Size-dependant heating rates of iron oxide

nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 2009, 321.13: 1947-1950.

[16] ELSAESSER, Andreas; HOWARD, C. Vyvyan. Toxicology of nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 2012, 64.2: 129-137.

[17] Leslie-Pelecky, D.L. and Rieke, R.D. (1996) Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of Materials*, 8 (8), 1770– 83.

[18] DREHER, Kevin L. Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 2004, 77.1: 3-5.

[19] Gold nanoparticles surface-functionalized with paclitaxel drug and biotin receptor as theranostic agents for cancer therapy. *Biomaterials*, 2012, 33.3: 856-866.

[20] KELKAR, Sneha S.; REINEKE, Theresa M. Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjugate chemistry*, 2011, 22.10: 1879-1903.

[21] Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K. and Dobson, J. (2003) Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36, R167– R181

[22] Wohlfarth, E.P. (1958) Relations between different modes of acquisition of the remanant magnetization of ferromagnetic particles. *Journal of Applied Physics*, 29, 595– 6.

[23] Darling, S.B. and Bader, S.D. (2005) A materials chemistry perspective on nanomagnetism. *Journal of Materials Chemistry*, 15, 4189– 95.

[24] Zeng,H.,Li,J.,Wang,Z.L.,LiuJ.P.andSun,S.(2004a)Bimagnetic core/shell FePt/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Nano Letters*, 4, 187– 90.

[25] Brown, W.F. Jr. (1963) Thermal fluctuations of a single-domain particle. *Physical Review*, 130, 1677– 86.

[26] Chung, S.H., Hoffmann, A., Guslienko, K., Bader, S.D., Liu, C., Kay, B., Makowski, L. and Chen L. (2005) Biological sensing with magnetic nanoparticles using Brownian relaxation (invited). *Journal of Applied Physics*, 97, 10R101.

[27] GRZELCZAK, Marek, et al. Shape control in gold nanoparticle synthesis.*Chemical Society Reviews*, 2008, 37.9: 1783-1791.

[28] BISWAS, Swati; TORCHILIN, Vladimir P. Dendrimers for siRNA delivery.*Pharmaceuticals*, 2013, 6.2: 161-183.