

ALMA MATER STUDIORUM · UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Scuola di Scienze
Corso di Laurea Magistrale in Fisica

Studio delle proprietà magnetiche del sistema
nanogranulare magnetite/idrossiapatite per
potenziali applicazioni in nanomedicina

Relatore:
Prof. Lucia Del Bianco

Presentata da:
Marco Unibosi

Correlatore:
Dott. Isidoro Giorgio Lesci

Sessione III
Anno Accademico 2013/2014

Indice

1	Nanoparticelle magnetiche e Superparamagnetismo	7
1.1	Nanomagnetismo	7
1.2	Superparamagnetismo	12
2	Applicazioni biomedicali delle nanoparticelle magnetiche	22
2.1	Ipertermia	25
2.2	Drug Delivery e Separazione magnetica	29
2.2.1	Separazione magnetica	29
2.2.2	Drug Delivery	31
2.3	Magnetic Resonance Imaging	32
2.3.1	Principi di funzionamento	33
2.3.2	Nanoparticelle magnetiche nell'MRI	35
2.4	Tissue engineering e ricostruzione ossea	36
3	Sintesi e caratterizzazione chimico-strutturale	39
3.1	Sintesi dei campioni	39
3.1.1	Sintesi delle nanoparticelle di magnetite	39
3.1.2	Sintesi dei campioni di idrossiapatite	42
3.1.3	Sintesi dei campioni HA e magnetite	44
3.2	Caratterizzazione chimico-strutturale	45
3.2.1	XRD	45
3.2.2	FT-IR	46
3.2.3	TEM	48
4	Analisi magnetica: SQUID	51
4.1	Apparato sperimentale	51
4.2	Risultati sperimentali	53
4.2.1	Analisi SQUID di NPMagn	53
4.2.2	Analisi SQUID di MagnHA1 e MagnHA2	60

5	Analisi magnetica: Mossbauer	67
5.1	Principi di funzionamento	67
5.1.1	Spostamento Isomerico	70
5.1.2	Sdoppiamento quadrupolare elettrico	72
5.1.3	Interazione iperfine di dipolo magnetico	73
5.2	Risultati sperimentali	75
	Bibliografia	87

Abstract

Abbiamo sintetizzato un nuovo sistema nanogranulare consistente di nanoparticelle di magnetite inserite in idrossiapatite carbonata biomimetica per possibili future prospettive nell'ambito del tissue engineering osseo. Sono stati sintetizzati e studiati tre campioni nanogranulari, uno composto di nanoparticelle di magnetite e due composti di idrossiapatite contenenti magnetite per circa lo 0.8wt.% ed il 4wt.%. Le nanoparticelle di magnetite e il materiale composto sono stati analizzati tramite diffrazione a raggi X (XRD), spettroscopia all'infrarosso (FT-IR) e microscopia in trasmissione elettronica (TEM). Queste analisi hanno fornito informazioni sulla struttura delle nanoparticelle, come il *size* medio di circa 6 nm e hanno rivelato, sulla loro superficie, la presenza di gruppi idrossilici che incentivano la crescita successiva della fase di idrossiapatite, realizzando una struttura nanocristallina lamellare. I primi studi magnetici, condotti tramite un magnetometro SQUID, hanno mostrato che sia le nanoparticelle as-prepared sia quelle ricoperte di idrossiapatite sono superparamagnetiche a $T=300\text{K}$ ma che il rilassamento della magnetizzazione è dominato da interazioni magnetiche dipolari di intensità confrontabile all'interno dei tre campioni. I valori di magnetizzazione più bassi di quelli tipici per la magnetite bulk ci hanno portato ad ipotizzare un possibile fenomeno di canting superficiale per gli spin delle nanoparticelle, fenomeno presente e documentato in letteratura. Nei tre campioni, quello di sole nanoparticelle di magnetite e quelli di idrossiapatite a diverso contenuto di magnetite, si forma uno stato collettivo bloccato a temperature inferiori a circa 20K. Questi risultati indicano che le nanoparticelle di magnetite tendono a formare agglomerati già nello stato as-prepared che sostanzialmente non vengono alterati con la crescita di idrossiapatite, coerentemente con la possibile formazione di legami idrogeno elettrostatici tra i gruppi idrossilici superficiali. L'analisi Mössbauer del campione di magnetite as-prepared ha mostrato un comportamento bimodale nelle distribuzioni dei campi iperfini presenti alle varie temperature. Passando dalle basse alle alte temperature lo spettro collassa in un doppietto, coerentemente con il passaggio dallo stato bloccato allo stato superparamagnetico per il sistema.

Introduzione

L'impiego della nanotecnologia in ambito medicale ha avuto una forte accelerazione negli ultimi anni. All'interno di questo ambito, il crescente interesse per le nanoparticelle magnetiche è dovuto in estrema sintesi al fatto che possano essere magnetizzate e manipolate da un campo magnetico esterno, costituendo degli strumenti molto validi per individuare, stimolare e controllare entità biologiche di varie dimensioni alle quali abbiano aderito o si siano avvicinate. Rispetto ad altri approcci, l'uso di nanoparticelle magnetiche ha il vantaggio di poter sfruttare le multi-potenzialità di queste ultime, aumentandone lo spettro applicativo e potendo condurre terapie mirate attraverso un approccio terapeutico. Negli ultimi anni si sono moltiplicati gli articoli e le ricerche condotte su svariate applicazioni in ambito medico di particelle magnetiche, tra le quali si possono citare il *drug delivery* mirato, il *drug release* controllato, i trattamenti ipertermici di tumori, il *tagging* e *labelling* di entità biologiche accompagnate da processi di separazione magnetica, l'incentivazione del *tissue engineering* e il miglioramento del contrasto nell'MRI.

Il nostro scopo è la sintesi e la caratterizzazione chimico-fisica di campioni di idrossiapatite carbonata contenenti nanoparticelle di magnetite che possano eventualmente in studi futuri essere utilizzati come base per *scaffold* da inserire al posto di tessuti ossei danneggiati o malati in operazioni di tipo maxillofacciali. L'apatite è la componente inorganica maggioritaria all'interno dei tessuti biologici rigidi come ossa e denti; in queste strutture il biominerale è formato da idrossiapatite carbonata *platelet-like* nanostrutturata. La biocompatibilità, la bioattività, l'osteoconduttività ed il legame diretto al tessuto osseo sono alcune delle caratteristiche che promuovono l'applicazione di nano-idrossiapatite biomimetica sintetica come un eccellente biomateriale da essere utilizzato come *bone filler* e sostituto nella chirurgia ortopedica, maxillofacciale e odontoiatrica oltre che appunto come base per scaffolds da impiegare nel tissue engineering. Come vedremo nel capitolo rivolto alla descrizione delle applicazioni medicali, è stato dimostrato che la presenza di nanoparticelle magnetiche all'interno di scaffold biomimetici incentivi l'adesione cellulare, la proliferazione e la differenziazione degli osteoblasti, cellule alla base del tessuto osseo, con o senza l'applicazione di un campo magnetico esterno. Tuttavia fino ad ora poca attenzione è stata rivolta all'analisi delle proprietà magnetiche dei materiali utilizzati per la produzione di scaffolds e spesso l'unica richiesta seguita

è che le nanoparticelle siano sufficientemente piccole da essere superparamagnetiche alla temperatura ambiente, in modo da non avere rimanenza una volta spento il campo magnetico esterno. Il comportamento magnetico dei materiali nanogranulari è infatti fortemente legato alle dimensioni e alle interazioni tra le particelle; questi aspetti vanno quindi attentamente considerati nella prospettiva di creare materiali nanogranulari multifunzionali per la rigenerazione tessutale dove, inoltre, le nanoparticelle magnetiche potrebbero agire anche come *drug carriers* e permettere un rilascio controllato di medicinale per effetto di stimoli magnetici o termici. In questo contesto, abbiamo sintetizzato e studiato un nuovo sistema nanogranulare formato da nanoparticelle di Fe_3O_4 con un diametro medio di 6nm incorporate in idrossiapatite nanocristallina, quindi con grandi potenzialità come materiale magnetico biocompatibile. Nel dettaglio sono stati condotti degli studi su campioni di sola magnetite nanostrutturata e su due tipologie di campioni di idrossiapatite contenenti percentuali differenti di magnetite, circa lo 0.8 wt.% e il 4 wt.%; le analisi hanno permesso di ottenere informazioni sulla distribuzione delle particelle all'interno della matrice formata da idrossiapatite e sulle caratteristiche chimico-fisiche dei campioni. Mostriamo come la configurazione delle nanoparticelle sia determinata sia dall'interazione magnetica sia da quella elettrostatica, quest'ultima causata dalla presenza di gruppi idrossilici sulla superficie delle nanoparticelle a seguito del particolare processo di sintesi. I gruppi idrossilici rappresentano l'elemento chiave nell'incentivare la crescita della matrice di idrossiapatite attorno alle particelle di magnetite e di conseguenza risulta di vitale importanza la procedura di sintesi nella determinazione delle proprietà strutturali e magnetiche del materiale nanogranulare sintetizzato e quindi delle sue prospettive future nell'ambito della nanomedicina. Le analisi condotte hanno fatto affidamento su più tecniche sperimentali:

- Misure di diffrazione a raggi X (XRD);
- Misure di spettroscopia all'infrarosso (FT-IR);
- Misure di microscopia *Transmission Electron Mycroscopy* (TEM);
- Misure di proprietà magnetiche tramite magnetometro SQUID;
- Misure di spettroscopia Mössbauer.

Il lavoro di tesi si concentra soprattutto nella parte di studio connessa alle proprietà magnetiche del materiale, in particolare viene dato ampio spazio alle analisi condotte attraverso il magnetometro SQUID e lo spettrometro Mössbauer. Le misure XRD e FT-IR sono state condotte presso i laboratori del dipartimento Ciamician dell'università di Bologna, le immagini TEM sono state raccolte presso il dipartimento SIMAU dell'università politecnica delle Marche ed infine le analisi magnetiche sono state effettuate ai laboratori del CNISM presso il dipartimento di Fisica e Scienze della Terra dell'università di Ferrara.

La tesi è articolata nei seguenti capitoli:

- *Capitolo 1*: Viene presentata una introduzione ai concetti fondamentali del nanomagnetismo e del fenomeno del superparamagnetismo, illustrando la teoria alla base delle analisi magnetiche condotte attraverso lo SQUID ed una breve introduzione al fenomeno visto tramite il Mössbauer;
- *Capitolo 2*: Vengono illustrate le più importanti applicazioni bio-medicali delle nanoparticelle magnetiche suddividendo il capitolo in sezioni.
- *Capitolo 3*: Viene presentato il processo di sintesi e di caratterizzazione chimico-fisica dei campioni attraverso XRD, FT-IR e TEM.
- *Capitolo 4*: È dedicato alla presentazione del magnetometro SQUID e all'analisi magnetica condotta sui campioni di magnetite e di idrossiapatite contenente magnetite.
- *Capitolo 5*: Viene illustrata la teoria alla base dell'utilizzo della tecnica Mössbauer. In seguito vengono mostrate le misure condotte sui campioni sintetizzati per questo lavoro di tesi ed a seguire i risultati che ne derivano.

Capitolo 1

Nanoparticelle magnetiche e Superparamagnetismo

In questo primo capitolo illustreremo la teoria fisica, sviluppatasi nel corso del ventesimo secolo, che spiega il comportamento dei materiali ferro-(ferri-)magnetici o antiferromagnetici nanostrutturati. Il capitolo è stato suddiviso in una prima parte di introduzione ai concetti di *dominio magnetico* e di *parete di dominio* ed in una seconda parte di spiegazione del fenomeno del *superparamagnetismo*, fondamentale nella scala delle nanodimensioni.

1.1 Nanomagnetismo

Le proprietà magnetiche dei materiali vengono normalmente studiate analizzandone l'andamento con la temperatura ed il campo magnetico. Tuttavia, con l'avvento del nanomagnetismo e la miniaturizzazione delle dimensioni, ci si è resi conto che per comprendere a fondo il comportamento dei materiali magnetici è necessario tenerne in considerazione anche il volume. Come vedremo, la variazione delle dimensioni produce cambiamenti così sostanziali nelle proprietà magnetiche intrinseche da poter parlare di veri e propri regimi magnetici differenti. Quando il valore misurato di una proprietà chimica o fisica di un sistema risulta essere dipendente dalle dimensioni del campione in esame si dice che quella proprietà esibisce un *size effect*. Usualmente solo le proprietà sensibili alla struttura del campione mostrano andamenti diversi a seconda delle dimensioni di quest'ultimo; ad esempio la magnetizzazione di saturazione M_S è indipendente dalle dimensioni del campione fino a chè gli atomi contenuti sulla superficie non sono significativi se paragonati al numero totale di atomi, come sarà nel nostro caso.[1] I corpi magnetici hanno una struttura a multidominio e sono cioè suddivisi in regioni magnetizzate in modo uniforme, i domini appunto, separate da pareti di dominio. Da quando venne proposta nel 1906 da Weiss all'interno di una teoria che comprendeva anche il concetto

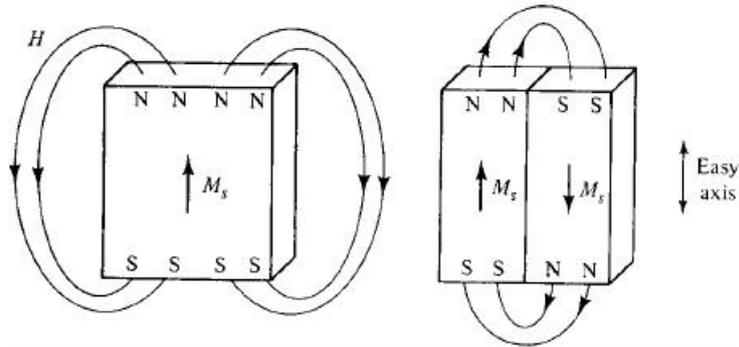


Figura 1.1: Suddivisione del blocco in domini

di campo molecolare, l'idea dei domini ha riscontrato successo da un punto di vista sperimentale solo a partire dalla metà del ventesimo secolo con il lavoro di H.J.Williams, R.M.Bozorth e W.Shockley.[1] L'esistenza dei domini magnetici è stata ampiamente dimostrata sperimentalmente nel corso degli anni; attualmente le tecniche più utilizzate che permettono di visualizzare la suddivisione (o la non suddivisione) di un materiale in domini si possono suddividere in due categorie:

- Tecniche che evidenziano pareti di dominio
 - Metodo Bitter
 - Microscopio a scansione di sonda
 - TEM
- Tecniche che evidenziano i domini
 - Metodi ottici che coinvolgono gli effetti Kerr e Faraday
 - Analisi di elettroni polarizzati
 - Contrasto di fase differenziale

La suddivisione in domini è legata al processo di minimizzazione dell'energia magnetostatica associata all'interazione del campo magnetico generato dal corpo stesso con i campi magnetici esterni. Come spiegheremo meglio in seguito all'interno di questo capitolo, la formazione di pareti di dominio ha un costo energetico che viene bilanciato con altri termini in gioco (*energia di scambio* ed *energia di anisotropia*) limitando la suddivisione in domini ad un certo numero ottimale di questi ultimi. Inizialmente la suddivisione del materiale in domini magnetici prende piede per ridurre l'estensione spaziale del campo magnetico prodotto dal campione e quindi diminuirne l'interazione magnetostatica con campi esterni.(fig. 1.1) Una volta iniziato il processo di suddivisione in domini entrano in gioco i contributi energetici contrapposti di anisotropia e di scambio

che determinano quanti e come siano disposti i domini stessi regolando la posizione e lo spessore delle pareti di tra di essi. L'energia di scambio deriva dall'interazione a corto raggio spin-spin che tende a mantenere gli spin \vec{s}_i e \vec{s}_j paralleli o antiparalleli a seconda che il materiale sia rispettivamente ferromagnetico (ferrimagnetico) o antiferromagnetico. Formalmente, l'interazione ferromagnetica (antiferromagnetica) si traduce in un segno positivo (negativo) della costante di accoppiamento J nell'equazione 1.1.

$$E = -2J(\vec{s}_i \cdot \vec{s}_j) \quad (1.1)$$

L'interazione di scambio, che varia proporzionalmente a ϕ^2 e non a ϕ , tende quindi a formare pareti spesse il più possibile per suddividere in un numero molto ampio di passaggi il cambio di verso e/o direzione della magnetizzazione passando da un dominio all'altro. (fig. 1.2) A limitare superiormente lo spessore delle pareti di dominio è l'energia

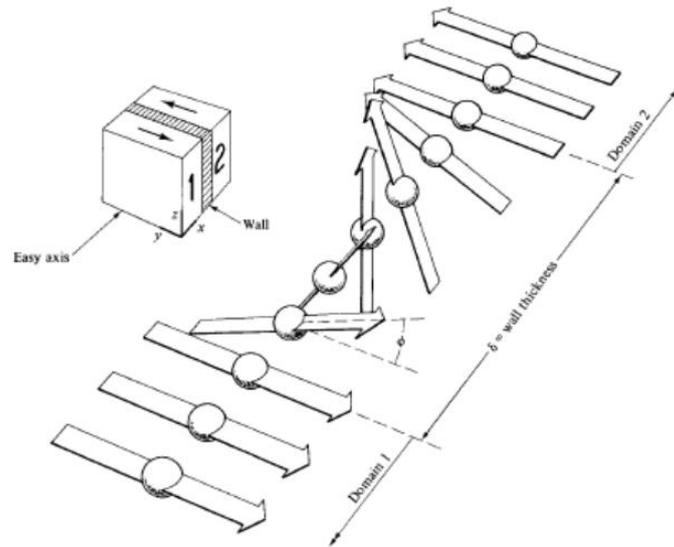


Figura 1.2: Rappresentazione di una parete di dominio

di anisotropia; questa scaturisce dal fatto che esistono direzioni preferenziali all'interno dei materiali magnetici lungo le quali è più conveniente energeticamente che si orienti la magnetizzazione. L'anisotropia magnetica complessiva di un particolare campione è composta dalla somma di una serie di contributi minori associati a diverse cause, in particolare questi si possono suddividere in:[2]

- anisotropia magnetocristallina;
- anisotropia magnetostatica;
- anisotropia superficiale;

- anisotropia di strain.

Nei materiali *bulk* le energie magnetocristallina e magnetostatica sono le maggiori fonti di anisotropia. Nelle nanoparticelle anche gli altri tipi di anisotropia possono essere dello stesso ordine di grandezza e di conseguenza vanno tenute in considerazione se si vuole descrivere nel dettaglio il comportamento magnetico di un certo campione.[2] Fiorani e Tronc mostrano come in realtà, pur avendo origini e forme differenti, l'insieme di tutte le energie di anisotropia presenti in un sistema possa condensarsi nell'equazione 1.2 dove K_t è la costante di anisotropia totale che tiene conto di tutti i contributi, V è il volume della particella e θ è l'angolo tra la direzione di facile magnetizzazione e quella della magnetizzazione effettiva.(fig. 1.3) [2]

$$E = K_t V \sin^2(\theta) \quad (1.2)$$

Sperimentalmente risulta molto complicato riuscire a scindere la costante K_t nei vari

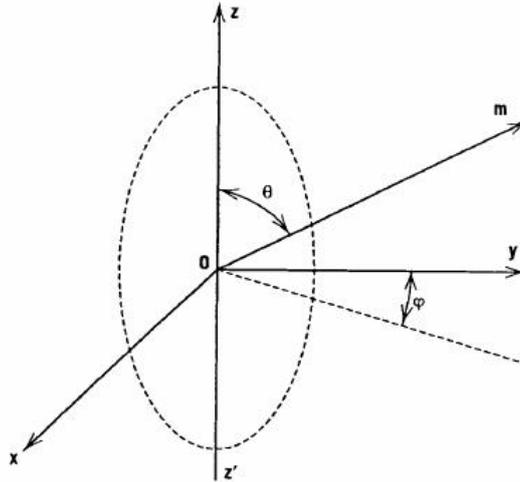


Figura 1.3: Sistema standard di assi per le nanoparticelle magnetiche

contributi anisotropici; come illustreremo nella prossima sezione, la caratteristica rilevante da un punto di vista applicativo è la distribuzione delle energie di barriera E_B tipica di un certo sistema. La distribuzione delle energie di barriera è legata alla costante di anisotropia complessiva dalla formula 1.9 e può essere determinata da misure magnetiche.

L'energia di anisotropia quindi contribuisce positivamente tutte le volte che la direzione di uno spin differisce da quella di facile magnetizzazione e di conseguenza tende a mantenere la parete di dominio spessa il meno possibile cercando di ridurre i passaggi attraverso i quali ruotano gli spin tra domini adiacenti. Sommando i contributi sopra descritti e minimizzando si ottiene uno spessore ottimale per la parete di dominio descritto dall'equazione 1.3, all'interno della quale $A = nJs^2/a$, indicando con n il numero

di atomi per cella unitaria e con a il passo reticolare.

$$\delta = \pi \sqrt{\frac{A}{K_t}} \quad (1.3)$$

Spessori tipici delle pareti di dominio si aggirano intorno alle decine di nanometri e di conseguenza è naturale pensare che particelle con diametri inferiori a questi valori rimangano a singolo dominio. All'interno di ogni parete di dominio è immagazzinata una certa quantità di energia magnetostatica, considerando una struttura uniassiale e pareti di dominio tra domini con magnetizzazione di verso opposto (pareti a 180°) la densità di energia immagazzinata è data dalla formula 1.4:

$$\sigma_{180} = 4\sqrt{AK_t} \quad (1.4)$$

La suddivisione in domini, una volta iniziata, non prosegue all'infinito ma si assesta ad una situazione in cui i vari contributi energetici si compensano ed equilibrano. Se il volume del campione in esame si riduce notevolmente, entrando nel campo delle nanoparticelle ad esempio, è possibile che l'energia immagazzinata in una parete di dominio equivalga o sia superiore alla diminuzione energetica magnetostatica ricavata dalla sua stessa formazione. Considerando particelle semisferiche, il raggio critico al di sotto del

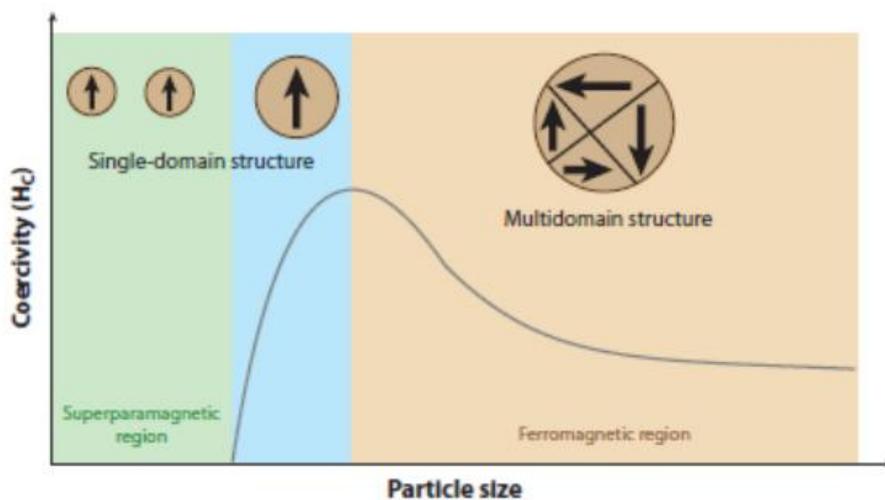


Figura 1.4: Andamento del campo coercitivo H_C con le dimensioni del sistema

quale non si formano i domini magnetici è dato dall'equazione 1.5 nella quale M_S è la magnetizzazione di saturazione e $E_\sigma = 2(K_t A)^{1/2}$ è l'energia della parete.[3]

$$r_C = \frac{9E_\sigma}{\mu M_S^2} \quad (1.5)$$

La diminuzione delle dimensioni ed il passaggio da uno stato multidomini ad uno a singolo dominio sono accompagnati da un aumento del campo coercitivo H_C e della magnetizzazione rimanente M_r fino ad un valore di massimo, secondo l'andamento mostrato in figura 1.4. Diminuendo ulteriormente il volume delle particelle magnetiche, la barriera di potenziale che separa i minimi di energia definiti dalla formula 1.2 si abbassa fino ad essere paragonabile o minore dell'energia termica k_bT del sistema. Questo implica che la barriera energetica K_tV possa essere superata, permettendo una fluttuazione della magnetizzazione complessiva come avviene per i singoli spin nei materiali paramagnetici ed implicando quindi un abbassamento repentino del campo coercitivo fino al suo azzeramento complessivo secondo un andamento descritto dall'equazione 1.6 nella quale D rappresenta il diametro della particella mentre g e h sono due costanti.

$$H_C = g - \frac{h}{D^{-3/2}} \quad (1.6)$$

L'intero momento della particella può ruotare mentre i singoli spin al suo interno rimangono magneticamente accoppiati per l'interazione di scambio molto intensa. Il comportamento magnetico appena introdotto, tipico di un insieme di particelle nanometriche, è chiamato *superparamagnetismo* e verrà illustrato nella prossima sezione.

1.2 Superparamagnetismo

Il fenomeno del superparamagnetismo fu scoperto e teorizzato nel 1959 da Bean e Livingston e si riscontra nei sistemi magnetici nanostrutturati con particelle all'interno di un certo range di volumi e temperature.[4] In sostanza, come vedremo meglio qui di seguito, al di sotto di un certo volume critico (V_C), la barriera energetica di anisotropia diventa sufficientemente bassa da essere superata dal contributo termico k_bT presente nel sistema, provocando un continuo passaggio degli spin da una posizione di equilibrio all'altra e rendendo mediamente nulla la magnetizzazione. La dimensione critica delle particelle perchè il sistema sia nello stato superparamagnetico dipende intrinsecamente dalla costante di anisotropia e dal valore della magnetizzazione di saturazione M_S tipica del materiale. Come abbiamo introdotto nella sezione precedente, molte proprietà magnetiche misurate in sistemi nanostrutturati risentono del fenomeno del *size effect*, soprattutto nel caso in cui il numero di atomi appartenenti alla superficie delle nanoparticelle è paragonabile al numero di atomi presenti all'interno. In particolare, nel regime superparamagnetico, le proprietà magnetiche che si rilevano dipendono dalla relazione che intercorre tra il tempo di misura t_m specifico dello strumento utilizzato ed il tempo di rilassamento τ associato al superamento della barriera di potenziale K_tV . Il passaggio di uno spin da una posizione di equilibrio all'altra, infatti, è descrivibile come un processo di rilassamento con un tempo caratteristico τ . Si considerano quindi due casi:

- se $\tau \ll t_m$, durante la misura il rilassamento appare così veloce che il dato ottenuto rappresenta un valore medio degli orientamenti dei momenti delle particelle. Considerando la statistica del fenomeno, il valore ottenuto si media a 0, analogamente al caso di materiali paramagnetici, con la differenza che in questo caso ad oscillare sono i momenti complessivi delle nanoparticelle, con valori di alcune migliaia di magnetoni di Bohr ($1\mu_B = 9,27400949(80) \cdot 10^{-24} JT^{-1}$), da cui il nome del fenomeno;
- se $\tau \gg t_m$, il rilassamento avviene così lentamente che nel processo di misura si osservano le proprietà quasi statiche del sistema, facendolo risultare quindi nello stato bloccato.

Come si può comprendere quindi, lo stato superparamagnetico per un determinato sistema non definisce una caratteristica semplicemente intrinseca al sistema stesso ma è legata anche alla tecnica di misura utilizzata. Per descrivere formalmente il fenomeno in esame, consideriamo una particella a singolo dominio in presenza di un campo applicato H . L'energia del sistema non è descritta solo dal termine anisotropico introdotto nella sezione precedente, ma entra in gioco anche il campo magnetico a modificare la distribuzione di spin e la barriera di potenziale.(eq. 1.7)

$$E = KV \sin^2(\theta) - HVM_{nr} \cos(\theta) \quad (1.7)$$

Quando $H < 2E_B/(VM_{nr})$ ci sono comunque due minimi energetici a $\theta = 0$ e $\theta = \pi$ dei quali però uno è più profondo dell'altro e quindi favorito. Se $H > 2E_B/(VM_{nr})$ esiste solo un minimo e di conseguenza non è presente alcun rilassamento superparamagnetico come si vede in figura 1.5. Dopo lo spegnimento del campo magnetico, la barriera di

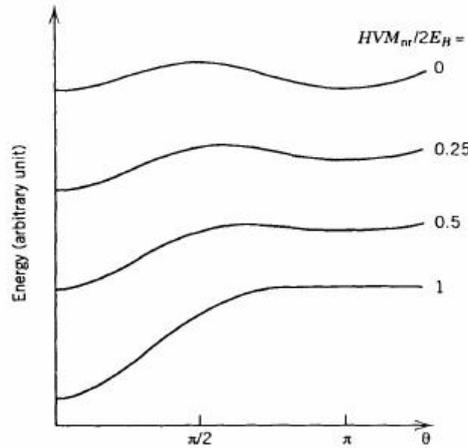


Figura 1.5: Rappresentazione dei minimi energetici al variare del campo H

potenziale torna alla sua forma originaria, con una conseguente diminuzione della magnetizzazione secondo un andamento arrheniano tipico dei fenomeni di rilassamento. (eq.

1.8)[4]

$$M(t) = M_0 \exp\left(\frac{t}{\tau}\right) \quad (1.8)$$

A livello teorico e sperimentale risulta quindi di vitale importanza la determinazione del tempo di rilassamento τ legato ai parametri fisico-strutturali del campione dalla relazione 1.9 dove f_0 è la frequenza tipica alla quale il sistema tenta il superamento della barriera ed è dell'ordine dei 10^9 Hz.

$$\frac{1}{\tau} = f_0 \exp\left(-\frac{E_B}{kT}\right) \quad (1.9)$$

Per ciascun materiale e ciascuna tecnica sperimentale si può definire una temperatura critica T_B , chiamata *temperatura di bloccaggio*, che separa lo stato superparamagnetico da quello bloccato e che ha un valore tale per cui $\tau = t_m$. Di conseguenza, assegnato un determinato materiale, T_B non è definita in modo univoco ma è legata al tempo di misura della tecnica sperimentale. Dalla formula 1.9 è evidente che la variazione maggiore di τ deriva dall'esponenziale di $\frac{E_B}{k_b T}$. Sperimentalmente è possibile determinare E_B e τ ma è complicato correlare E_B ai vari contributi anisotropici senza una precisa conoscenza delle loro origini e delle simmetrie all'interno del campione in esame. Come mostreremo a breve, la temperatura di bloccaggio del sistema aumenta con l'aumentare del volume delle particelle e con il diminuire del tempo di misura. Invertendo la formula 1.9 e considerando 1) che l'energia di barriera è definita come $E_B = K_t V$ e 2) che si imposta $\tau = t_m$ per analizzare l'andamento della temperatura di bloccaggio, si può esplicitare quest'ultima ottenendo la formula:

$$T_B = \frac{K_t V}{k_b \ln(t_m f_0)} \quad (1.10)$$

Dalla formula 1.10 si può quindi verificare l'affermazione precedente secondo cui la temperatura di bloccaggio cresce linearmente con il volume della particella e diminuisce al crescere del tempo di misura. In tabella 1.1 abbiamo riportato i valori tipici dei tempi di misura e delle relative temperature di bloccaggio per le tecniche di analisi magnetica utilizzate in questo lavoro di tesi, lo SQUID e il Mössbauer. Le due tecniche hanno, come si vede, tempi di misura molto differenti e di conseguenza anche i valori di T_B risultano diversi di un ordine di grandezza. Dalle formule precedenti si vede inoltre la dipendenza esponenziale del tempo di rilassamento dal volume della particella; questo spiega perché il fenomeno del superparamagnetismo sia visibile solo in sistemi nanostrutturati ed il fatto che una piccola variazione volumica possa comportare cambiamenti radicali nel valore di τ .(fig. 1.6) Passando dall'analisi del fenomeno per una singola particella a ciò che avviene per sistemi di particelle, quello che si riscontra sperimentalmente è che si ha a che fare con delle distribuzioni di volumi e non con particelle identiche strutturalmente e volumicamente. Di conseguenza, il fatto che vi siano volumi più o meno variegati all'interno del campione comporta che vi sia anche una distribuzione di energie di barriera e di temperature di bloccaggio.(fig. 1.7) Ad una data temperatura e per una assegnata

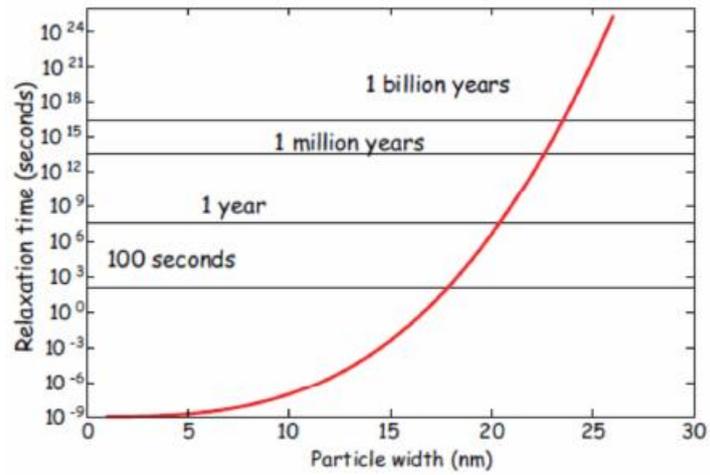


Figura 1.6: Andamento dei tempi di rilassamento con le dimensioni delle particelle

Tabella 1.1: Tempi di misura e temperature di bloccaggio

Tecnica	Tempo di misura (s)	T_B
SQUID	10^2	$T_B = \frac{K_t V}{25k_b}$
Mossbauer	10^{-10}	$T_B = \frac{K_t V}{2k_b}$

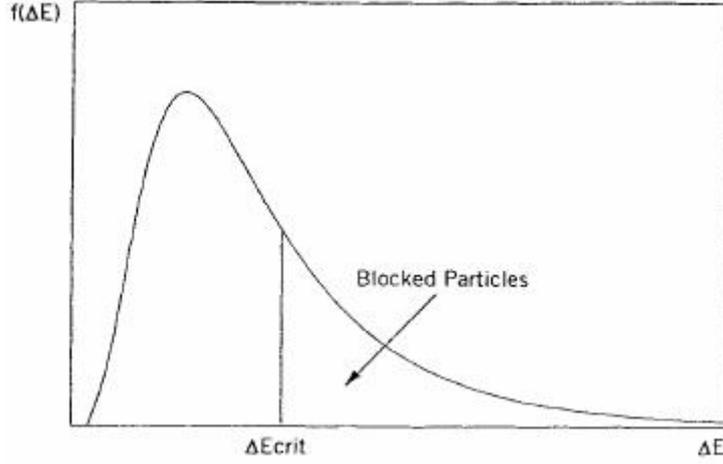


Figura 1.7: Rappresentazione schematica della distribuzione di energie di barriera

tecnica di misura, una frazione di particelle sarà nello stato superparamagnetico avendo $E_B < E_{Bc}$ mentre la rimanente parte di particelle si manterrà nello stato bloccato con $E_B > E_{Bc}$, avendo indicato con $E_{Bc} = K_t V_C = k_b T_{Bc}$ l'energia di barriera critica. Il regime superparamagnetico al quale si accede diminuendo il volume delle particelle ha anche un limite inferiore, volumicamente parlando, al di sotto del quale la fisica del sistema non può essere ulteriormente descritta attraverso i modelli appena introdotti a causa dell'eccessiva presenza di atomi sulla superficie delle particelle. Il limite inferiore cui si è appena accennato si può stimare attorno ai 2 nm . [2] Fino ad ora non è stata considerata l'influenza che le interazioni magnetiche tra le particelle possono avere sul tempo di rilassamento e di conseguenza sul comportamento superparamagnetico o bloccato del sistema. La descrizione degli effetti delle interazioni risulta essere molto complicata poiché dipende da vari fattori come la distribuzione volumica, la sistemazione geometrica (in molti casi disordinata) delle particelle nel materiale ospitante e l'orientazione reciproca dei momenti magnetici. Le interazioni più importanti all'interno di campioni magnetici nanostrutturati sono quelle dipolari. L'energia di interazione dipolare tra una particella i e una particella j che produce un campo magnetico H_{ij} sulla prima è data da:

$$E_{ij} = -H_{ij} \cdot u_i M_i V_i \quad (1.11)$$

dove il campo magnetico H_{ij} generato da j su i è dato da:

$$H_{ij} = (M_j V_j / d_{ij}^3) [3(\vec{u}_i \cdot \vec{r}_{ij}) \vec{r}_{ij} - u_j] \quad (1.12)$$

indicando con M_i e M_j le magnetizzazioni lungo i versori \vec{u}_i e \vec{u}_j . Poiché l'interazione di scambio tra spin della stessa particella è generalmente maggiore dell'interazione dipolare, si considera che gli spin all'interno di ogni nanoparticella rimangano paralleli (o antiparalleli), escludendo la superficie e nel suo intorno per la rottura di simmetria. [3]

Come vedremo infatti anche nell'analisi dei risultati di questo lavoro di tesi, l'influenza del disordine superficiale deve essere preso in considerazione nella descrizione magnetica di particelle molto piccole. In un primo tentativo di modellizzazione delle interazioni (nel limite di basse interazioni) è stato aggiunto all'energia di barriera per le particelle isolate un termine H_iMV che tiene conto dei campi presenti sulla particella i -esima ottenendo la formula:

$$\tau = \tau_0 \exp E_B/k_b(T - T_0) \quad (1.13)$$

dove T_0 è un parametro legato alla intensità delle interazioni tra le particelle. Il modello è stato successivamente perfezionato conducendo all'espressione:

$$\tau = \tau_0 \exp -n_1 \exp [(K_t V + n_1 M^2 V a_1)/k_b T] \quad (1.14)$$

in cui n_1 è il numero di particelle vicine e a_1 è un parametro che tiene conto della distribuzione angolare e spaziale delle particelle. Dall'espressione precedente è evidente il mantenimento dell'andamento esponenziale; si ha una variazione del fattore pre-esponenziale, che diminuisce col numero di particelle vicine, e dell'energia di barriera che aumenta in base alla forza dell'interazione tra particelle. Quando $E_B/k_b T \geq 3$ si può utilizzare la formula nota per il tempo di rilassamento 1.9.[3] Per visualizzare il comportamento magnetico del sistema ed eventualmente il passaggio dallo stato bloccato allo stato superparamagnetico, si possono impiegare diverse tecniche che possono essere suddivise in base al fatto che determinino proprietà statiche o dinamiche del sistema. In questo lavoro di tesi ci concentreremo su misure svolte tramite SQUID e Mössbauer. Considerando innanzitutto l'analisi che si può condurre tramite un magnetometro SQUID, si possono ottenere cicli di magnetizzazione per visualizzare l'andamento della rimanenza e del coercitivo in funzione della temperatura, fare uso di misure denominate ZFC (*Zero Field Cool*) e FC (*Field Cool*) per determinare la distribuzione delle energie di barriera presente nel campione e studiare la natura delle interazioni presenti tramite misure DCD e IRM. Il passaggio di un campione allo stato superparamagnetico attraverso lo studio di cicli di magnetizzazione è molto evidente e si riscontra nella sparizione del tipico ciclo di isteresi. Nel caso di particelle con momenti non allineati e con una costante di anisotropia K_t diversa da 0, non sono strettamente applicabili le formule tipiche dei materiali paramagnetici ma sono sempre verificati due aspetti tipici del comportamento superparamagnetico:

- 1. Le curve di magnetizzazione raccolte a diverse temperature si sovrappongono quando M è plottata in funzione di H/T ;
- 2. Non è presente il fenomeno dell'isteresi magnetica così che sia la rimanenza M_r sia la coercitività H_C sono nulle.

Come vedremo anche nella parte sperimentale all'interno di questo lavoro di tesi, per un campione con una definita distribuzione volumica delle particelle, l'aumento della

temperatura comporta una diminuzione progressiva di coercitivo e rimanenza in funzione della temperatura stessa, seguendo un andamento descritto dall'equazione 1.15, dove H_{C0} rappresenta il coercitivo per $T=0$.

$$H_C = H_{C0} \left(1 - \left(\frac{T}{T_B}\right)^{\frac{1}{2}}\right) \quad (1.15)$$

Il passaggio allo stato superparamagnetico quindi si riscontra facilmente sia dalla sparizione dell'isteresi magnetica all'interno dei cicli, sia dall'azzeramento di coercitivo e rimanenza all'aumentare della temperatura. Come anticipato, il passaggio allo stato

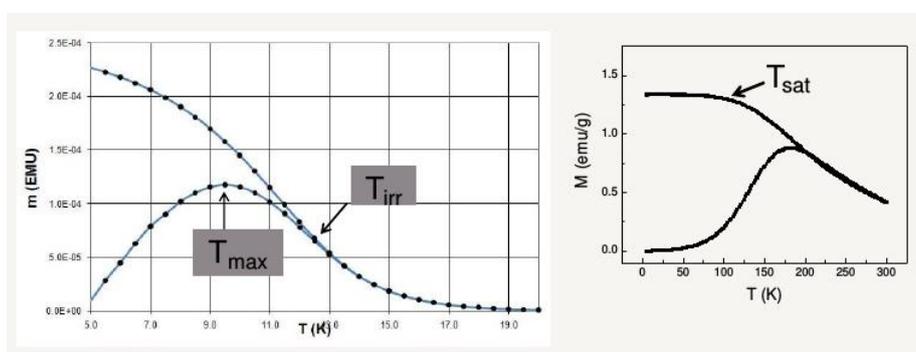


Figura 1.8: Rappresentazione del tipico andamento delle misure ZFC-FC

superparamagnetico è individuabile attraverso lo SQUID anche tramite misure ZFC-FC. Nelle misure ZFC il campione viene raffreddato con una certa velocità v_c da una temperatura alla quale il sistema si trova nello stato superparamagnetico fino ad una temperatura T_{min} in cui risulta nello stato bloccato. Giunti alla temperatura T_{min} viene applicato un campo magnetico H , piccolo per non disturbare eccessivamente il sistema, e si inizia a scaldare il materiale con una velocità v_h misurandone la magnetizzazione. Giunti quindi ad una temperatura in cui il sistema si trova nuovamente nello stato superparamagnetico si inizia la misura in modalità FC riabbassando la temperatura fino a T_{min} mantenendo però il campo H applicato. Infine si riporta la temperatura al valore iniziale mantenendo il campo magnetico acceso. Un immagine tipica di misura ZFC-FC è mostrata in figura 1.8 e ne daremo qui di seguito la spiegazione. Alla temperatura $T = T_{min}$, dopo il processo iniziale di raffreddamento nella misura ZFC, il sistema si trova in uno stato di equilibrio termodinamico. Accendendo il campo lo stato di equilibrio viene disturbato e quando il campione viene riscaldato il tempo di rilassamento τ diminuisce ed il momento delle particelle cambia direzione sempre più velocemente nello stesso verso del campo. Questo si traduce nell'aumento della magnetizzazione M_{ZFC} con la temperatura fino ad un valore di massimo ad una temperatura T_M dovuto al fatto che in presenza di un campo, come già detto precedentemente, uno dei due minimi di energia sarà più favorito rispetto al secondo e di conseguenza la sua popolazione aumenta.

A temperature $T > T_M$ il tempo di rilassamento diventa così piccolo che si raggiunge nuovamente l'equilibrio termodinamico e M_{ZFC} inizia a diminuire coincidendo da una certa temperatura T_{irr} con la curva ottenuta attraverso la misura in condizioni di FC. (fig. 1.9) In prima approssimazione, considerando sempre che nei sistemi reali è sempre presente una distribuzione volumica delle particelle, T_M corrisponde alla temperatura media di bloccaggio $\langle T_B \rangle$ mentre la temperatura, indicata in figura 1.8 con T_{sat} , alla quale la misura FC raggiunge un plateau rappresenta la temperatura di bloccaggio delle particelle più piccole e T_{irr} quella di bloccaggio delle particelle più grandi. Ovviamente se la distribuzione volumica è molto stretta, le tre temperature appena citate saranno molto ravvicinate ed in linea teorica potrebbero coincidere. In figura 1.9, oltre a mostrare

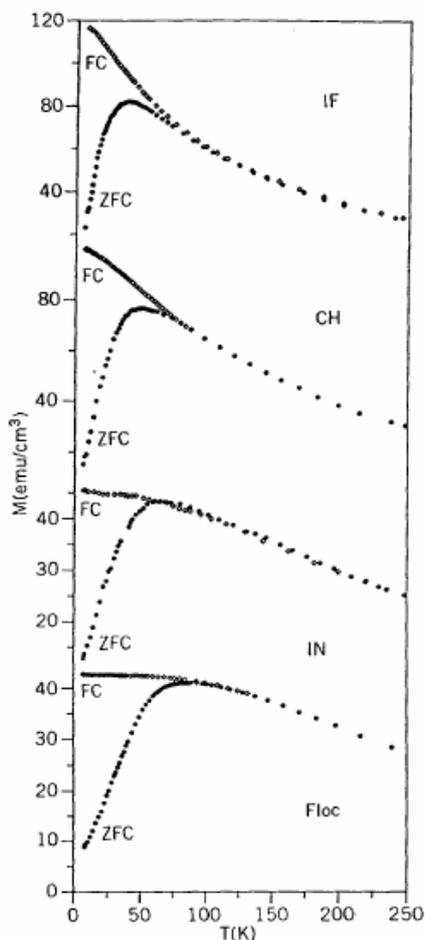


Figura 1.9: Esempio dell'effetto delle interazioni tra le particelle in misure ZFC-FC

il tipico andamento delle misure appena descritto, viene evidenziato l'effetto delle interazioni tra le particelle. In particolare in figura, partendo dall'alto e scendendo, vengono mostrati sistemi in cui le particelle sono sempre più interagenti. Già visivamente risulta

quindi chiaro come T_M , quindi la temperatura di bloccaggio attribuibile al sistema, aumenti con l'aumentare delle interazioni. Tramite le misure ZFC-FC si può ricavare anche la distribuzione delle energie di barriera e quindi, nota la costante di anisotropia K_t del sistema, anche la distribuzione dei volumi.[5] In particolare, l'irreversibilità magnetica, definita come $M_{FC} - M_{ZFC}$ mostra le caratteristiche superparamagnetiche del sistema in esame; derivando infatti questa curva rispetto alla temperatura e normalizzando per l'area sottostante, si ottiene la distribuzione di energie di barriera di anisotropia che, come abbiamo detto, è strettamente legata alle dimensioni delle particelle. [5] Il passaggio dallo stato bloccato allo stato superparamagnetico, o viceversa, può essere visualizzato anche tramite misure in spettroscopia Mössbauer. (fig. 1.10) La tecnica Mössbauer, che illustreremo più approfonditamente nel capitolo dedicato, si basa sull'emissione e l'assorbimento risonante di raggi γ da parte di atomi di Fe inseriti nel materiale da analizzare e rileva le fluttuazioni del momento magnetico \vec{m} delle particelle attraverso le fluttuazioni dell'interazione magnetica iperfine. Trattando con particelle nanometriche bisogna considerare che il Mössbauer fornisce spettri diversi a seconda della configurazione chimico-fisica in cui gli atomi risonanti sono inseriti; se il contributo degli atomi superficiali è molto intenso, risulta difficile analizzarlo separatamente dal contributo dovuto al fenomeno del rilassamento magnetico tipico di particelle di piccole dimensioni.[2] Nei campioni reali, come già spiegato per le misure ZFC-FC, si ha una distribuzione dei

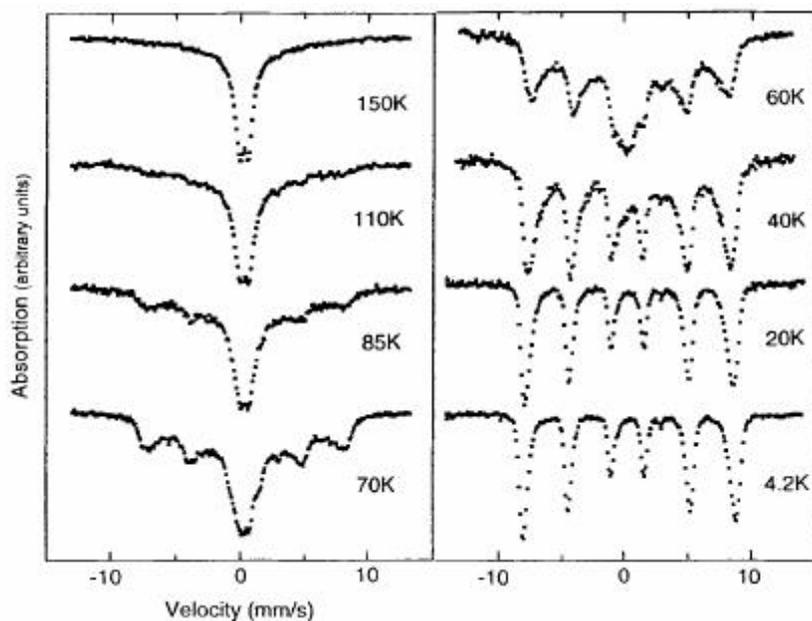


Figura 1.10: Immagini Mössbauer al variare della temperatura

volumi e delle forme delle particelle e di conseguenza lo spettro Mössbauer risultante è dato dalla somma dei sottospettri relativi a diversi tempi di rilassamento, quindi a

diversi volumi di particelle. Se solo una piccola frazione di particelle ha un tempo di rilassamento nella regione superparamagnetica, gli effetti del rilassamento sulla forma dello spettro sono deboli e quest'ultimo risulta composto di una componente di sestetto simile al caso bulk aggiunta ad una componente paramagnetica in proporzioni variabili con la temperatura. Aumentando la temperatura da una T_0 nella quale il sistema risulta nello stato bloccato, il sestetto tipico dei materiali magnetici contenenti *Fe* collassa in un doppietto o in un singoletto a seconda dell'interazione quadrupolare presente sul nucleo eccitato. Generalmente la dipendenza dalla temperatura delle frazioni bloccata e non bloccata viene utilizzata per misurare la temperatura media di bloccaggio T_B che viene identificata come quella temperatura alla quale le componenti di singoletto e di doppietto rappresentano ciascuna il 50% dell'area spettrale complessiva.[2, 6]

Capitolo 2

Applicazioni biomedicali delle nanoparticelle magnetiche

L'avvento e lo sviluppo nel corso del ventesimo secolo di tecniche di sintesi e caratterizzazione di materiali nanostrutturati ha portato ad un forte avanzamento nel loro studio sia da un punto di vista teorico sia da un punto di vista applicativo. In particolare l'intreccio della nanotecnologia e della biologia molecolare si è tradotto in una nuova affascinante area di ricerca denominata *nanobiotecnologia*. [7] Le possibili ramificazioni all'interno di questa area sono molteplici ed in questo lavoro di tesi ci concentreremo sull'impiego in ambito medicale di nanoparticelle con proprietà magnetiche. Il crescente interesse per questi sistemi è dovuto essenzialmente alla possibilità di controllare dall'esterno le particelle attraverso campi magnetici, facendole quindi diventare degli strumenti ottimali per l'individuazione e l'eccitamento di entità biologiche di vario genere (dal DNA alle cellule stesse) alle quali si trovino vicino o a cui abbiano aderito chimicamente, senza dover quindi fare ricorso a tecniche invasive. [8] La possibilità di far aderire nanoparticelle magnetiche alle cellule ci consegna un importante strumento per studiare la funzione cellulare e i percorsi dei segnali molecolari interni alle cellule stesse: studiare i meccanismi che governano l'attività dei canali ionici, svelare i percorsi molecolari che portano ad attività come l'apoptosi, la produzione di proteine e la risposta agli stress e sviluppare nuovi trattamenti per svariate condizioni mediche. In questo contesto l'utilizzo di nanoparticelle magnetiche ha alcuni vantaggi rispetto alle altre tecniche come la nanoindentazione o le pinzette ottiche, ad esempio il fatto che si possa agire a distanza attraverso un campo magnetico. [9] Poter sintetizzare micro- o nano-particelle magnetiche di dimensioni opportune permette di fare in modo che queste interagiscano con molecole di piccole dimensioni come le proteine (5-50 nm) oppure con intere cellule umane o tumorali (10-100 μm), aumentandone di conseguenza molto lo spettro applicativo. [10, 8] Il controllo magnetico a distanza si basa sulla forza che un campo magnetico esercita su particelle dotate di momento magnetico; per esercitare dall'esterno una forza di tipo traslazionale sulle particelle è necessario avere un gradiente di campo magnetico. Consideriamo quin-

di una particella magnetica nanodimensionale con momento magnetico \vec{m} ed un campo magnetico esterno applicato \vec{B} . La forza esercitata da un gradiente di campo magnetico sulla particella, considerata puntiforme, viene definita come:

$$\vec{F}_m = (\vec{m} \cdot \nabla) \vec{B} \quad (2.1)$$

Supponendo ora che la particella sia inserita in un mezzo con una suscettibilità magnetica χ , che abbia un volume V_m e che non ci siano correnti elettriche o campi elettrici variabili nel tempo all'interno del materiale, si giunge con qualche passaggio all'espressione 2.2, dove si evince che F_m è legata alla derivata della densità di energia del campo magnetostatico.

$$F_m = V_m \Delta \chi \nabla \left(\frac{1}{2} \vec{B} \cdot \vec{H} \right) \quad (2.2)$$

L'applicazione in ambito medico richiede che le nanoparticelle soddisfino particolari requisiti funzionali tra cui ad esempio essere biocompatibili, avere un alto valore di magnetizzazione M_S e una ristretta distribuzione volumica.[11] L'alto valore di magnetizzazione di saturazione è necessario per poter controllare agevolmente dall'esterno le particelle secondo l'equazione 2.2. Le particelle metalliche a base di ferro hanno valori di magnetizzazione più elevati delle tradizionali particelle a base di ossidi di ferro ma, diversamente da queste, sono altamente tossiche per l'organismo. La questione della tossicità è appunto strettamente collegata al requisito della biocompatibilità. La tossicità di una particolare sostanza è difficilmente determinabile in modo ben definito poichè bisogna tenere conto di vari fattori come la dose impiegata, la modalità di somministrazione, la forma, la struttura e la chimica superficiale delle nanoparticelle.[12] I materiali più largamente utilizzati attualmente sono a base di ossido di ferro, in particolare magnetite (Fe_3O_4) e maghemite ($\gamma - Fe_2O_3$), biocompatibili come dimostrato da vari studi e con un valore di M_S relativamente alto nella fase *bulk*, di circa 98 emu/g per la magnetite.[11, 8]

Le nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro, identificate con la notazione SPION (*Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle*), hanno caratteristiche compatibili con una vasta gamma di applicazioni (fig. 2.1) e possono essere disperse all'interno di appropriati solventi formando delle sospensioni omogenee chiamate *ferrofluidi*. In effetti gli studi in questo ambito si sono moltiplicati negli ultimi anni dimostrandone l'efficacia e la multimodalità [12], con ottime prospettive in tematiche come:

- Separazione cellulare;
- Riparazione tissutale;
- Trasporto guidato di medicinale;
- Aumento di contrasto in MRI;

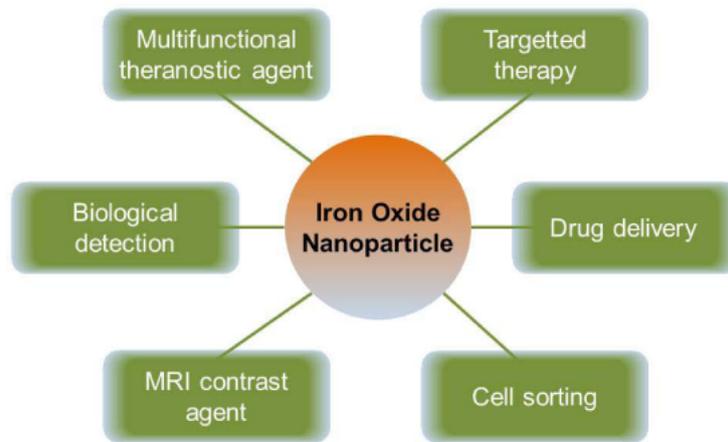


Figura 2.1: Schema delle possibili applicazioni delle SPION

- Trattamenti ipertermici.

Nel momento della sintesi, la superficie delle nanoparticelle può essere modificata aggiungendo uno o più strati atomici di materiale biocompatibile organico (come PVA, dextrano o fosfolipidi), inorganico (come l'oro) o a base di ossidi (come l'ossido di silicio o di alluminio); una volta ricoperte possono essere ulteriormente funzionalizzate attraverso l'applicazione di recettori specifici a seconda della terapia che si deve intraprendere. Le particelle a base di ossidi presentano anche una maggiore stabilità per quanto riguarda l'inserimento in *scaffold* di materiale organico o inorganico e per quanto riguarda l'eventuale reazione ossidativa al contatto con l'ambiente. In particolare la stabilità delle particelle è uno dei fattori sui quali si deve lavorare ancora molto per poter raggiungere livelli ancora migliori. L'interazione magnetica dipolo-dipolo tra le particelle ed il fatto che la superficie abbia caratteristiche idrofobiche tendono nella maggior parte dei casi a far agglomerare le particelle formando dei *cluster* che, per le dimensioni, perdono la caratteristica di superparamagnetismo e non sono più impiegabili in utilizzi diagnostici e terapeutici. Per ovviare a questa problematica, nella fase di sintesi, vengono spesso utilizzate sostanze chiamate surfattanti che impediscano l'aggregazione delle nanoparticelle e che possono essere di carattere organico o inorganico.[11] Tutte le applicazioni biomedicali e di bio-ingegneria richiedono che le particelle abbiano dimensioni inferiori ai 100 nm con una distribuzione dei volumi particolarmente stretta e piccata in modo che le proprietà chimico-fisiche siano il più possibile omogenee all'interno del campione.[11] Metodi fisici per la sintesi di nanoparticelle magnetiche come la litografia a fasci elettronici o la deposizione da fase gassosa sono poco utilizzati perchè soffrono di un basso controllo della dimensione delle particelle nella scala delle nanodimensioni. Usualmente vengono impiegati metodi chimici perchè più semplici da realizzare, meno costosi e più efficienti con un sufficiente controllo delle dimensioni e della composizione.[11] Una

ulteriore caratteristica grandemente sfruttata nel campo del nanomagnetismo per scopi terapeutici è la possibilità di fare in modo che le particelle assorbano energia da un campo esterno alternato e la rilascino sotto forma di calore all'interno del campione in cui sono inserite, dando quindi vita al processo chiamato *ipertermia*, del quale parleremo più approfonditamente. Di seguito illustreremo alcune delle principali applicazioni qui accennate mostrando quindi la multimodalità nell'utilizzo di nanoparticelle magnetiche, con le quali è possibile intrecciare *imaging* e cura del tumore localizzato, secondo un approccio denominato *teranostico*.

2.1 Ipertermia

Il significato etimologico del termine ipertermia è generazione di calore e rispetto al trattamento di malattie cancerogene è utilizzato per indicare un approccio basato sulla generazione di calore nei pressi del sito tumorale. [13] I primi studi sperimentali sull'applicazione di materiali magnetici per ipertermia si registrano nel 1957 con il lavoro di Gilchrist. I fondamenti dell'impiego dell'ipertermia per scopi medici si basano sul fatto che le cellule mostrano segni di apoptosi quando sono scaldate tra i 41°C e i 47°C e di necrosi quando sono scaldate sopra i 50°C, in aggiunta al fatto che le cellule tumorali sono considerate più suscettibili al calore rispetto alle cellule sane per il loro maggiore tasso di metabolismo.[12] Perché il processo di morte cellulare non regredisca una volta conclusa la seduta ipertermica, una temperatura di circa 42°C deve essere mantenuta per almeno 30 minuti.[8]

Una interessante forma di ipertermia è quella indicata attraverso il termine *self-regulated*; in questa tipologia di tecnica la ricerca si sta sviluppando attorno alla fisica dei materiali per individuare quali possano avere una temperatura di Curie utile a far sì che, una volta raggiuntala, il materiale diventi paramagnetico e quindi non disperda ulteriormente calore. Questo tipo di ipertermia è molto utile per evitare temperature eccessivamente alte e quindi dannose anche per le cellule sane.[13]

Molti studi hanno dimostrato che i trattamenti ipertermici aumentano la citotossicità della radiazione e del trattamento con medicinali, di conseguenza sono spesso affiancati a cure basate su chemioterapia, radioterapia, chirurgia, terapia genica e immunoterapia.[11] L'ipertermia si può categorizzare a seconda che la zona interessata sia più o meno estesa, in particolare si parla di:[13]

- *local hyperthermia*, quando l'area di interesse è molto ridotta, come un tumore;
- *regional hyperthermia*, quando l'area interessata è più estesa, come ad esempio tessuti o organi;
- *whole body hyperthermia*, quando devono essere trattate cellule metastatiche disperse nel corpo del paziente.

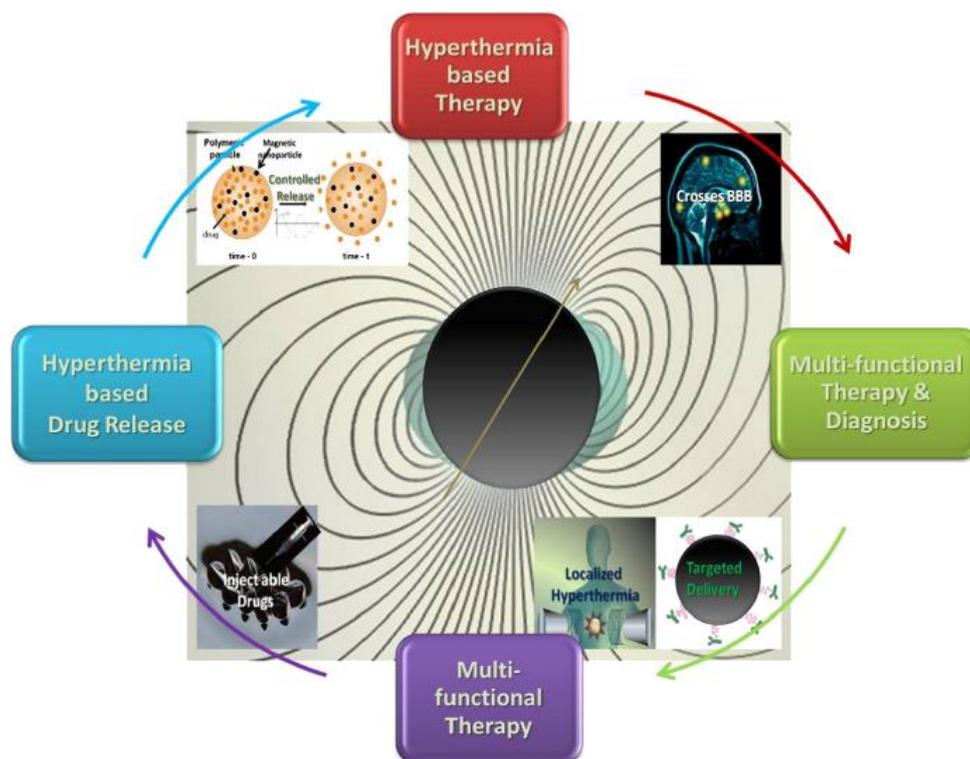


Figura 2.2: Rappresentazione schematica di alcuni vantaggi unici dei nanomateriali magnetici per la terapia basata su processi ipertermici e *drug delivery* controllato

Le tecniche attualmente disponibili per indurre trattamenti ipertermici sono basate su ultrasuoni, radiazione a radiofrequenza, microonde, infrarossi e tubi con acqua calda. Rispetto alle altre tecniche ipertermiche in circolazione, l'impiego di nanoparticelle magnetiche ha da subito mostrato alcuni vantaggi tra i quali il maggiore assorbimento tessutale di particelle e di calore, la possibilità di etichettare le particelle con agenti chimici superficiali in modo che aderiscano e colpiscano solo le cellule da distruggere[8], la possibilità di controllo dall'esterno attraverso gradienti di campo magnetico senza quindi essere invasivi ed il fatto che le nanoparticelle magnetiche possano essere visualizzate attraverso MRI mantenendo quindi un approccio teranostico durante l'intervento.[12, 13] La frequenza e l'intensità del campo magnetico applicato hanno un limite superiore dettato dal fatto che vi possano essere eventuali risposte fisiologiche alle alte frequenze tra le quali la stimolazione muscolare, la possibile stimolazione cardiaca e l'aritmia. Generalmente il range di frequenze e di intensità sicure si considera essere tra 0.05 - 1.2 MHz e $0-15 \text{ kAm}^{-1}$. [8] Pur rimanendo all'interno di parametri fisici sicuri, nell'impiego di tecniche ipertermiche, bisogna porre comunque attenzione a possibili effetti di bordo come la necrosi cerebrale, gli edemi, le emorragie focali e gli infarti.[11] Indubbiamente anche la quantità di nanoparticelle inserita è fondamentale per il tasso di energia dissi-

pata ed il mantenimento di alte temperature per un tempo sufficiente; in particolare si considera che 5-10 mg di materiale magnetico in ciascun cm^3 di tessuto tumorale possa essere appropriato perchè la terapia sortisca gli effetti desiderati.[8] Mostriamo quindi i principi fisici alla base dell'utilizzo di nanoparticelle magnetiche per l'ipertermia; la procedura che presentiamo consiste nella dispersione di particelle magnetiche nel tessuto o nell'organo colpito dalla malattia e quindi nell'applicazione di un campo magnetico alternato di intensità e frequenza sufficienti a provocare un riscaldamento adeguato. La quantità di calore generato all'interno del materiale dipende dalla tipologia di particelle magnetiche ivi inserite e dalle caratteristiche del campo magnetico applicato; particelle poste attorno ad un sito tumorale lo riscaldano diversamente a seconda che siano ferromagnetiche o superparamagnetiche ed inoltre, considerato uno specifico campione, il calore liberato dipenderà dal valore del campo applicato, dalla sua frequenza e dal tasso di raffreddamento del tessuto ad opera della circolazione sanguigna.[11] Nel caso in cui le particelle siano ferromagnetiche, l'energia dissipata termicamente è individuabile nell'area interna al ciclo di isteresi presente nella curva di magnetizzazione e di conseguenza, per un campo H di frequenza f avremo una potenza di dissipazione P_{FM} data dall'equazione 2.3.

$$P_{FM} = \mu_0 f \oint H dM \quad (2.3)$$

Nel caso invece in cui le particelle siano superparamagnetiche, l'energia dissipata non può essere interpretabile come l'area interna ad un ciclo di isteresi in quanto risulta inesistente; in questo caso vi sono due differenti trattazioni a seconda che le particelle magnetiche siano inserite in un fluido più o meno viscoso e quindi libere di ruotare oppure che siano fissate al reticolo cristallino e quindi statiche. Nel primo caso il passaggio di energia dal campo magnetico al materiale avviene tramite una vera e propria rotazione delle particelle attorno ai siti cristallini e si parla di rilassamento di Brown. Qui il riscaldamento dovuto al rilassamento browniano è legato alla viscosità del fluido che ostacola la rotazione della particella. Nel caso in cui le particelle siano ancorate staticamente al reticolo cristallino il riscaldamento avviene tramite la rotazione dei momenti magnetici al loro interno ed è chiamato rilassamento di Néel; qui la perdita di energia nel campione è dovuta all'anisotropia cristallina che tenderebbe a mantenere i momenti magnetici allineati in una particolare direzione.(fig.2.3) Le equazioni del rilassamento magnetico si riducono per questi sistemi all'equazione 2.4 in cui τ è il tempo di rilassamento, $M_0 = \chi_0 H_0 \cos(\omega t)$ è la magnetizzazione di equilibrio nel campo applicato $H(t) = H_0 \cos(\omega t)$ e χ_0 è la suscettività di equilibrio.[14]

$$\frac{\partial M(t)}{\partial t} = \frac{1}{\tau}(M_0(t) - M(t)) \quad (2.4)$$

Per piccoli campi, assumendo trascurabile l'interazione tra le particelle, la potenza dissipata nel materiale è descritta da:

$$P_{SPM} = \mu_0 f \pi \chi'' H^2 \quad (2.5)$$

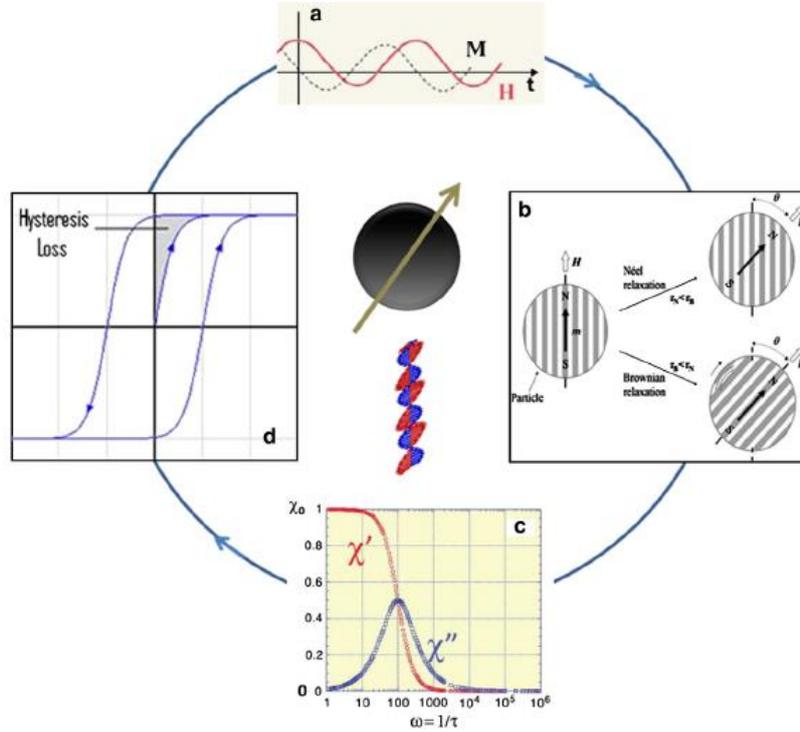


Figura 2.3: Rappresentazione schematica dei meccanismi possibili per la conversione di energia magnetica in calore

dove χ'' è la parte immaginaria della suscettività complessa χ ed è legata ai parametri strutturali del campione dalla relazione:

$$\chi'' = \frac{\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \chi_0 \quad (2.6)$$

Il tempo di rilassamento τ è legato alle caratteristiche strutturali e composizionali del sistema attraverso la relazione 2.7 in cui Γ è dato da $\Gamma = K_t V / k_b T$, indicando con K_t la costante di anisotropia, con V il volume della particella e con k_b la costante di Boltzmann.[14]

$$\tau = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \tau_0 \frac{\exp \Gamma}{\Gamma} \quad (2.7)$$

Le misure di generazione di calore da parte di particelle magnetiche vengono usualmente descritte tramite il tasso specifico di assorbimento ($SAR = \text{Specific Absorption Rate}$). Moltiplicando il SAR per la densità di particelle si ottengono la P_{FM} e la P_{SPM} , quindi questo parametro permette di fare un confronto tra l'efficacia delle particelle di diverse grandezze ed in diversi regimi magnetici. Mentre per particelle ferromagnetiche sono necessari campi elevati (di circa 100 kAm^{-1}) per avere dei cicli saturi e quindi una buona dissipazione di calore, i materiali superparamagnetici risultano capaci di generare

impressionanti livelli di riscaldamento anche con campi più bassi.[8] E' importante comprendere che perchè la tecnica di riscaldamento appena illustrata abbia effetto, il tasso di riscaldamento deve superare il tasso di raffreddamento del tessuto tumorale. Più è esteso il tumore e minore risulta il rapporto superficie/volume, rendendo conseguentemente più semplice il riscaldamento ed il mantenimento della temperatura necessaria all'apoptosi.[15] La chiave per ottenere dei buoni risultati è il miglioramento di un parametro chiamato SPL (*Specific Power Loss*) che indica appunto quanto calore venga disperso nel materiale da parte delle particelle magnetiche. Per confrontare risultati ottenuti da diversi gruppi di ricerca il parametro di riferimento è l'ILP (*Intrinsic Loss Power*) che non è altro se non il rapporto SPL/SAR normalizzato per $H^2 f$, quindi tipico del materiale in esame e non delle condizioni sperimentale impiegate.[15] Per migliorare questi parametri, la direzione scelta attualmente dai ricercatori non va verso l'aumento del campo magnetico o della frequenza ma bensì nell'individuazione della giusta dimensione delle nanoparticelle perchè sia possibile una dispersione maggiore di calore.[15]

2.2 Drug Delivery e Separazione magnetica

In questa sezione mostreremo due applicazioni delle nanoparticelle magnetiche basate essenzialmente sugli stessi principi fisici: il *drug delivery* e la separazione magnetica. Il principio alla base di entrambe le applicazioni è l'utilizzo della forza magnetica esercitata da un gradiente di campo magnetico, già introdotta all'inizio nel capitolo con l'equazione 2.2.

2.2.1 Separazione magnetica

In medicina e nelle analisi di laboratorio è spesso vantaggioso separare specifiche entità biologiche dall'ambiente nativo in modo da poter creare campioni concentrati da analizzare più a fondo successivamente. Il procedimento è caratterizzato da due fasi:

- individuazione e selezione delle entità biologiche desiderate attraverso nanoparticelle magnetiche opportunamente ricoperte e funzionalizzate.
- separazione ed estrazione delle entità etichettate attraverso un dispositivo di separazione magnetica *fluid based*.

Come anticipato nella parte introduttiva del capitolo, etichettare le molecole biologiche con nanoparticelle è possibile attraverso una lavorazione chimica della superficie di queste ultime con materiale biocompatibile come dextrans, PVA o fosfolipidi, che, oltre a fornire un legame tra cellule e particelle, forniscono maggiore stabilità colloidale a queste ultime.[8, 16]

I siti specifici sulla superficie delle cellule sono caratterizzati dalla presenza di anticorpi

o di altre macromolecole come ormoni o acido folico. Considerando che gli anticorpi si legano specificatamente al loro antigene appropriato, facendo aderire quest'ultimo ad una nanoparticella si ottiene una tecnica molto accurata per l'etichettatura e selezione di cellule.[8] Il materiale etichettato viene separato dal resto della soluzione attraverso

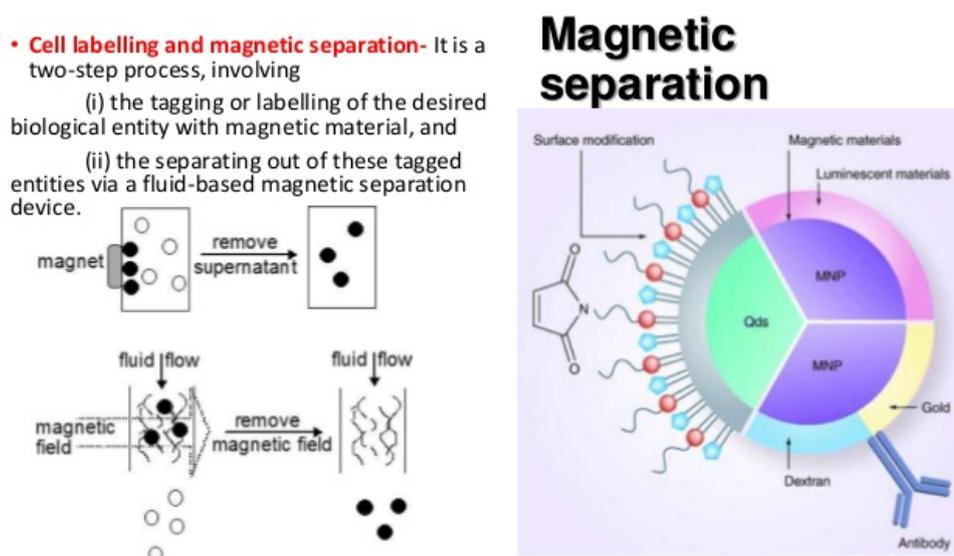


Figura 2.4: Rappresentazione schematica della bioseparazione

il passaggio in una regione in cui è presente un forte gradiente di campo magnetico che immobilizza le nanoparticelle e permette quindi la creazione di campioni concentrati.(fig. 2.4) Nel caso in cui il processo avvenga in una soluzione in fase di scorrimento, la forza magnetica esercitata sulle particelle deve essere abbastanza elevata da superare quella di trascinarsi idrodinamico. La struttura di un separatore magnetico può riassumersi in un magnete permanente all'esterno del contenitore in cui è inserita la soluzione o avere conformazioni più complesse. Attraverso l'impiego di un solo magnete permanente si hanno tassi di raccolta di materiale molto bassi ed è spesso conveniente velocizzare il processo. A tal fine un modo alternativo è creare forti gradienti di campo magnetico attraverso un sistema quadrupolare (fig. 2.5) che generi il gradiente radialmente lungo il tubo e permetta da una parte la raccolta durante lo scorrimento della soluzione e dall'altra di specializzare ulteriormente la tecnica creando anelli composti di molecole e particelle diverse.[8] In aggiunta alla possibilità di creare campioni concentrati, questa tecnica è stata utilizzata ed implementata per l'analisi batteriologica, ad esempio del sangue. In particolare, essendo le nanoparticelle ricoperte molto specializzate e selettive, è possibile individuare in modo più dettagliato eventuali cellule tumorali nel sangue o sviluppare sistemi di conteggio cellulare più precisi e avanzati.[8, 7]

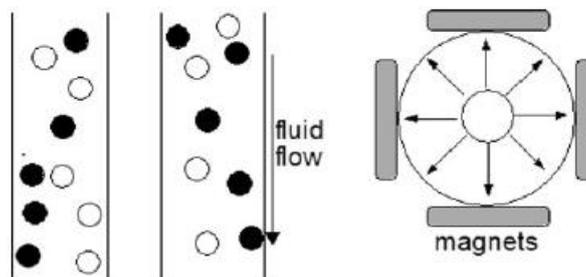


Figura 2.5: Vista laterale (sinistra) e dall'alto (destra) di un separatore quadrupolare

2.2.2 Drug Delivery

Il termine *drug delivery* indica il meccanismo attraverso il quale si conducono sostanze e medicinali in particolari zone del corpo colpite da malattie o tumori perchè qui agiscano in modo più mirato, limitandone quindi gli effetti collaterali sul resto del corpo, tipici ad esempio delle tecniche chemioterapiche. La funzionalizzazione delle particelle magnetiche attraverso una lavorazione chimica superficiale ed il seguente caricamento su di esse di farmaci permettono di renderle selettive nell'individuazione delle cellule tumorali e di conseguenza di aderirvi in modo specifico.(fig. 2.6a) Lo scopo dell'impiego di nanoparticelle magnetiche per questi utilizzi è duplice, da una parte infatti si cerca di ridurre la distribuzione sistemica di medicinale citotossico riducendo gli effetti di bordo correlati e dall'altra si riduce il dosaggio richiesto per un effetto del farmaco comunque efficace.[8] Il moto all'interno dei vasi sanguigni di particelle magnetiche è regolato da vari fattori tra cui la forza magnetica e le interazioni magnetiche, il trascinamento viscoso, le interazioni tra particelle e fluido, la gravità, il galleggiamento e la cinetica termica o moto Browniano.[10] Il processo consiste essenzialmente nell'inserimento intravascolare di nanoparticelle magnetiche debitamente lavorate chimicamente e nella loro guida, attraverso gradienti di campi magnetici (eq. 2.2), verso punti del corpo colpiti da una malattia (fig. 2.6b). Una volta giunte nella posizione voluta, il medicinale può essere rilasciato attraverso attività enzimatica o attraverso cambiamenti nelle condizioni fisiologiche come il pH, l'osmolalità o la temperatura.[8] Per questo tipo di applicazioni le dimensioni, la carica e la chimica superficiale delle nanoparticelle sono caratteristiche particolarmente importanti poichè influenzano fortemente il tempo di circolazione nel corpo attraverso i vasi sanguigni. [11]

Si ritiene che il range ottimale di diametri per questo utilizzo sia tra i 10 e i 100 nm. Il limite inferiore si basa sul fatto che particelle troppo piccole sono facilmente espulse attraverso pulizia renale. Il limite superiore diversamente non è ben definito ma si imposta in base alla tipologia di tumore in cui devono penetrare le nanoparticelle.[12] L'impiego di questa tecnica per lo sviluppo di cure mirate riscontra ancora varie problematiche da superare, per citare le maggiori: (a) la possibilità di formazione di embolie nella zona in cui si accumulano le nanoparticelle magnetiche, (b) le difficoltà nel tradurre su scala

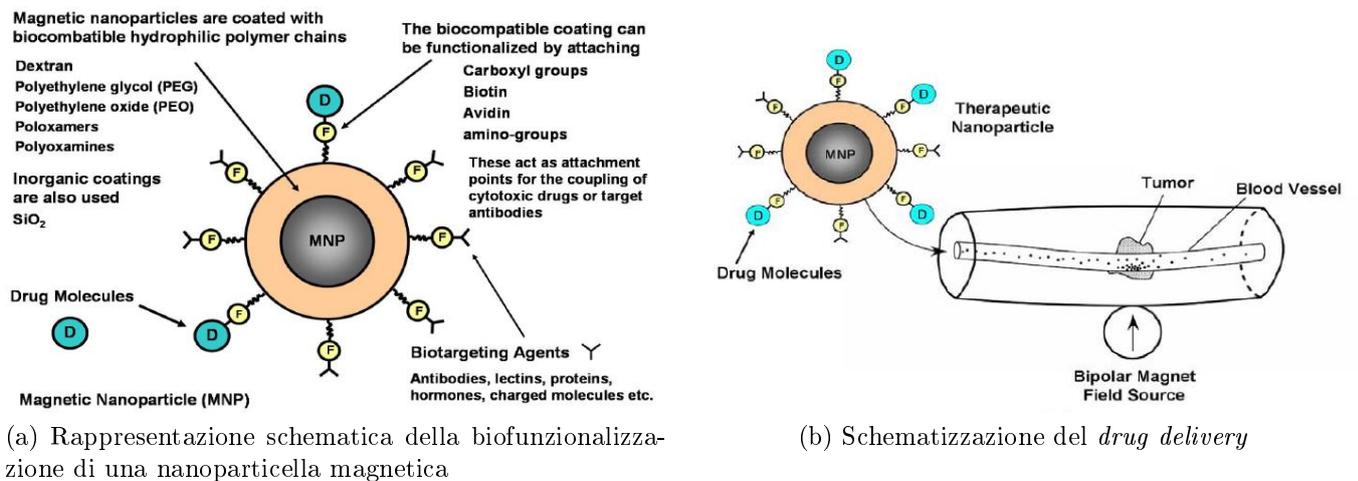


Figura 2.6: Schematizzazioni dei processi di biofunzionalizzazione e *drug delivery*

umana i modelli e gli esperimenti finora condotti su animali di piccola taglia come i topi, (c) il fatto che, una volta rilasciato, il medicinale non è più controllabile e (d) le risposte eventualmente tossiche del corpo alle nanoparticelle magnetiche che rimangono in circolazione.[8] I risultati ottenuti con le prime applicazioni *in vivo* del drug delivery hanno mostrato casi di regressione tumorale dove diversamente, impiegando cure ordinarie chemioterapiche e generalizzate, non si avevano.

2.3 Magnetic Resonance Imaging

L'MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) è una tecnica di *imaging* basata sul principio della risonanza magnetica nucleare e utilizzata assiduamente in radiologia. Generalmente questa tecnica viene considerata non dannosa nei confronti del paziente che non è sottoposto a radiazioni ionizzanti come nel caso delle tecniche che fanno uso di raggi X o isotopi radioattivi.[17] Le informazioni che si ottengono dalle immagini di risonanza magnetica sono di natura diversa rispetto a quelle degli altri metodi di *imaging*, infatti è possibile la discriminazione tra tessuti sulla base della loro composizione biochimica. Gli scanner MRI sfruttano forti campi magnetici statici ed oscillanti in radiofrequenza per formare immagini del paziente.[18] La tecnica è ampiamente utilizzata in ambito medico e ha un nome specifico a seconda del settore in cui viene applicata; ad esempio possiamo citare alcune applicazioni come quella nel campo della *neuro-imaging*, dell'*imaging* cardiovascolare, dell'*imaging* del sistema muscolare e scheletrico e di quello gastro-intestinale.[18] Spesso la tecnica MRI viene scelta come approccio pre-diagnostico per operazioni chirurgiche di tumori come il cancro al retto o alla prostata.[18] La raccolta delle immagini avviene attraverso uno scanner MRI in cui viene posizionato il paziente

e di cui illustreremo qui di seguito il funzionamento.(fig. 2.7)



Figura 2.7: Tipico scanner MRI

2.3.1 Principi di funzionamento

Il corpo umano è composto in larga parte da acqua che, a sua volta, per ogni molecola contiene due atomi di idrogeno che essenzialmente possono essere considerati come protoni. Il principio di funzionamento è basato sul sottoporre il paziente ad un forte campo magnetico statico che può andare, a seconda delle analisi da condurre, da alcuni decimi di tesla fino a 8 e 9 tesla.[17] Quando una persona entra all'interno dello scanner MRI, il forte campo magnetico \vec{B}_0 presente all'interno fa sì che i momenti magnetici dei protoni si allineino con esso. I tessuti da analizzare acquisiscono una magnetizzazione netta \mathbf{M} per l'azione del campo B_0 . L'allineamento dei momenti con il campo non è mai completo, piuttosto si genera un moto di precessione attorno alla direzione del campo B_0 ad una certa frequenza, chiamata frequenza di Larmor, dell'ordine dei MHz. Applicando una radiazione magnetica alternata, perpendicolare al campo iniziale e con una frequenza pari alla frequenza di Larmor tipica per le condizioni sperimentali presenti, è possibile inclinare maggiormente i momenti magnetici rispetto alla direzione iniziale di un angolo chiamato *flip angle*. Applicando il campo magnetico alternato alla giusta frequenza fa sì che si fornisca energia al sistema sfruttando il fenomeno della risonanza, da cui il nome alla tecnica. L'impulso magnetico a radiofrequenza viene quindi spento facendo tornare i momenti magnetici dei protoni presenti nei vari tessuti alla configurazione originaria comportando una variazione del flusso di campo magnetico nell'intorno del paziente e traducendosi quindi in un voltaggio sulle spire di raccolta poste attorno. Applicando campi magnetici aggiuntivi che varino linearmente nello spazio, si possono selezionare specifiche zone da visualizzare. Il fenomeno del rilassamento che si sviluppa una volta spento il campo magnetico alternato ha luogo con due costanti di tempo distinte; la prima, indicata con T1, rappresenta il tempo di ritorno della magnetizzazione

lungo la direzione del campo costante B_0 e dipende dall'interazione dei protoni con le molecole circostanti mentre la seconda, indicata con T2, rappresenta il tempo con cui si distrugge la componente della magnetizzazione trasversale al campo B_0 e dipende dalla mutua interazione di protoni vicini.[8](fig. 2.8) L'immagine viene ottenuta attraverso una trasformata 2D di Fourier delle frequenze spaziali del segnale. I tumori ed i tessuti malati possono essere quindi rilevati per il diverso tasso di ritorno alla situazione di magnetizzazione originaria da parte di protoni inseriti in ambienti diversi; questo effetto viene utilizzato per creare contrasto tra diversi tipi di tessuto nel corpo. Se ipotizzia-

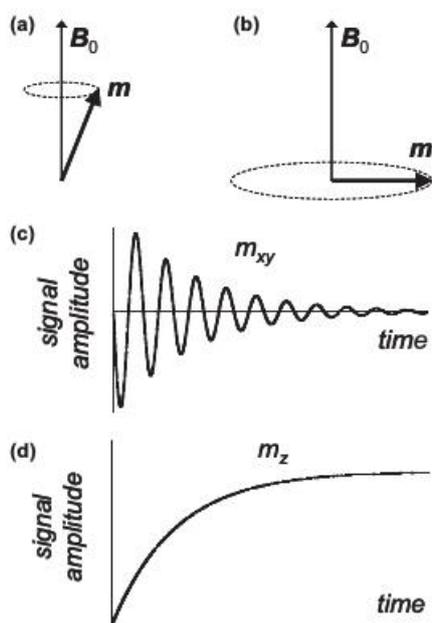


Figura 2.8: Illustrazione della risonanza magnetica per un insieme di protoni con momento magnetico netto \mathbf{m} in presenza di un campo magnetico esterno B_0

mo di avere il campo applicato B_0 lungo l'asse z , le componenti della magnetizzazione longitudinale e trasversale si rilasseranno secondo le formule 2.8 e 2.9.

$$m_z = m \cdot (1 - \exp -t/T1) \quad (2.8)$$

$$m_{x,y} = m \cdot \sin(\omega_0 t + \phi) \exp -t/T2 \quad (2.9)$$

Come già illustrato il segnale della magnetizzazione decade, idealmente, esponenzialmente con un tempo T2; tuttavia in pratica sono presenti piccole differenze nel campo magnetico statico in diverse posizioni spaziali che portano a variazioni della frequenza di Larmor lungo il corpo. Questo porta a interferenza distruttiva che accorcia il tempo T2 fino ad un tempo indicato con T*2. Tipicamente nei tessuti morbidi T1 è attorno

ad 1 secondo mentre T_2 e T_2^* sono alcune decine di millisecondi. Questi valori possono variare molto a seconda del tessuto e a seconda del campo magnetico esterno.

2.3.2 Nanoparticelle magnetiche nell'MRI

Diversamente da altre tecniche di imaging che permettono la raccolta di informazioni su una sola grandezza fisica, l'imaging a risonanza magnetica produce immagini che rispecchiano differenti proprietà fisiche a seconda del tipo di sequenza utilizzata. Immagini di differenti grandezze fisiche vengono dette avere differente *contrasto*. Le modalità di imaging più comuni sono:

- densità protonica;
- pesata T_1 ;
- pesata T_2 .

Per avere una immagine tomografica complessiva si devono raccogliere almeno due di questi contrasti. In effetti la nitidezza delle immagini in risonanza magnetica deriva dalle differenze nell'intensità del segnale raccolto da diversi punti del campione sondato; questo dipende dalla densità relativa di nuclei eccitati e dalle differenze nei tempi di rilassamento dopo l'eccitamento pulsato. In alcune situazioni è necessario ricorrere ad agenti di contrasto. Gli agenti di contrasto possono essere semplici come l'acqua oppure materiali scelti per le loro specifiche proprietà magnetiche. Negli ultimi anni si è

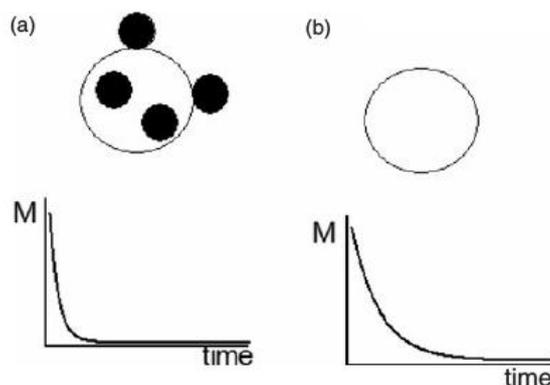


Figura 2.9: Effetto dell'internalizzazione di nanoparticelle magnetiche nelle cellule sul tempo T_2^*

sviluppata la ricerca attorno all'utilizzo di nanoparticelle superparamagnetiche di ossidi di ferro per il miglioramento del contrasto.[19] Come si vede dalla figura 2.10 con l'aggiunta di nanoparticelle magnetiche la risoluzione delle immagini MRI aumenta molto,



Figura 2.10: Immagine MRI del cranio senza MNP e con MNP

permettendo l'individuazione di zone malate o tumorali altrimenti impossibili da vedere. In particolare l'utilizzo di agenti di contrasto non fa altro che accorciare i tempi di rilassamento T1 e T2. Come infatti anticipato, il reale tempo di rilassamento trasversale si indica usualmente con T^*2 ed è legato al tempo T2 dall'equazione 2.10 in cui γ è il fattore giromagnetico.

$$\frac{1}{T^*2} = \frac{1}{T2} + \gamma \frac{\Delta B_0}{2} \quad (2.10)$$

Questo comporta che inserendo nanoparticelle magnetiche all'interno del tessuto o addirittura all'interno delle cellule, si generano dei campi dipolari localizzati che, come descritto dall'equazione 2.10, riducono il tempo di decadimento aumentando il contrasto nell'immagine.[8]

2.4 Tissue engineering e ricostruzione ossea

Il termine *tissue engineering* (TE), che in italiano è traducibile come ingegneria tissutale o ingegneria dei tessuti, identifica procedure di rigenerazione dei tessuti biologici mediante la semina di cellule in *scaffolds* di opportuni materiali sui quali possano aderire, crescere, differenziarsi e proliferare. Un secondo approccio utilizzabile per la riparazione dei tessuti consiste nello sfruttare il processo ipertermico per scaldare due tessuti messi a contatto e portarli essenzialmente a fondersi attraverso una denaturazione proteica.[11] I primi studi al riguardo sono degli anni '20 quando Heilbronn e Seifriz utilizzarono micro- e nano-particelle magnetiche per sondare le proprietà meccaniche e reologiche delle cellule attraverso stress generati magneticamente.[15] In generale gli scaffolds sono realizzati con materiali biodegradabili o bioassorbibili, che possano quindi essere sostituiti nel tempo da tessuto riprodotto dal sistema in cui vengono inseriti.[20, 21] La medicina rigenerativa

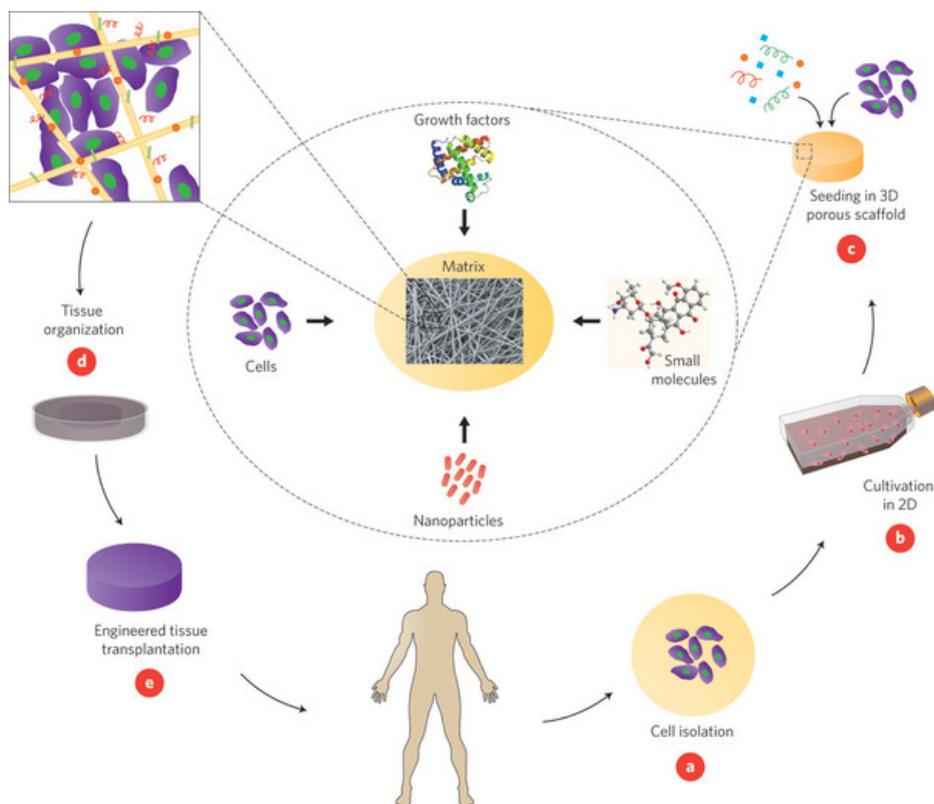


Figura 2.11: Principi di ingegneria tissutale

basata sull'impiego di materiali magnetici offre possibilità uniche non riscontrabili con altri metodi o materiali. In particolare gli scaffold magnetici possono fornire un rilascio controllato di fattori di crescita ($GF = Grow Factors$), una stimolazione meccanica delle cellule impiantate, una maggiore sedimentazione cellulare e la possibilità di assemblare scaffold nella configurazione scelta.[22] L'impiego di nanoparticelle magnetiche in questo ambito è connesso con il meccanismo dell'attuazione cellulare provocata da stimoli esterni alle normali funzionalità biologiche del sistema. Come descrive infatti Dobson, attraverso l'adesione di nanoparticelle magnetiche alle cellule umane si possono sondare meccanismi biologici eccitando particolari recettori cellulari o canali di comunicazione ionica.[9] Il principale risultato del TE è condurre le cellule proprie del paziente nelle zone del tessuto danneggiato per costruire un rimpiazzo funzionale in vivo o in vitro. L'inserimento delle nanoparticelle magnetiche all'interno degli scaffold ha dato buoni risultati sul miglioramento della proliferazione cellulare. Gli studi si stanno concentrando sul *tagging* di cellule chiamate *grow factors* che vengono attratte all'interno degli scaffold dalle nanoparticelle magnetiche e lì agiscono come centri di nucleazione di tessuto biologico.(fig. 2.11) Sempre rispetto all'inserimento di particelle magnetiche all'interno degli scaffold, è stato dimostrato che la presenza di un campo magnetico rende queste

strutture maggiormente bioassorbibili, permettendo quindi un controllo dall'esterno sulla velocità di degradazione del tessuto inserito e di conseguenza permettendo una puntuale formazione di tessuto da parte del corpo.[23] L'ingegneria tissutale è un'area interdisciplinare che integra i principi dell'ingegneria, della biologia cellulare e della medicina puntando alla rigenerazione di cellule specifiche e/o di interi tessuti funzionali. Da un punto di vista etico i trapianti tissutali sono stati proposti recentemente in alcuni ambiti come sostituti nella sperimentazione animale per quanto riguarda il campo della ricerca di nuovi medicinali. Come si vede in fig. 2.11 generalmente le cellule che devono essere coltivate vengono isolate dal tessuto originale tramite biopsia, fatte sviluppare in vitro e impiantate in uno scaffold poroso tridimensionale. La sfida è raggiungere un buon livello di seminazione e assicurarsi l'efficacia delle interazioni intercellulari, anche tra cellule di tipi diversi. All'interno delle varie tipologie di tessuti che si possono ingegnerizzare con tecniche chimico-fisiche sta prendendo piede e forza la rigenerazione ossea per fini ortopedici o in sostituzione di tessuti ossei a seguito di operazioni chirurgiche maxillofacciali. L'abilità di manipolare e controllare in modo remoto componenti cellulari specifiche dà l'opportunità di studiare molto più a fondo il funzionamento cellulare e i percorsi dei segnali molecolari. In particolare, lo studio dei canali ionici all'interno delle cellule e dell'effetto di stress meccanici su questi, attivandoli o disattivandoli, sta facendo avanzare molto la ricerca in questo ambito e può quindi portare nei prossimi anni a importanti innovazioni in questo ambito.

Capitolo 3

Sintesi e caratterizzazione chimico-strutturale

Il presente capitolo è suddiviso in due parti:

- Sintesi dei campioni;
- Caratterizzazione chimico-strutturale.

Nella prima parte illustreremo le procedure di sintesi con le quali sono stati fabbricati i campioni studiati all'interno di questo lavoro di tesi. Nella seconda parte presenteremo la caratterizzazione chimica e strutturale condotta sui campioni e necessaria per gli studi magnetici svolti successivamente sugli stessi. Le tecniche impiegate in questa prima fase di studio dei campioni comprendono XRD, FT-IR e TEM.

3.1 Sintesi dei campioni

Di seguito illustreremo i processi di sintesi impiegati suddividendo la presente sezione in tre parti relative ai diversi materiali.

3.1.1 Sintesi delle nanoparticelle di magnetite

La magnetite ha formula chimica Fe_3O_4 , appartiene alla famiglia delle ferriti cubiche, ha una struttura cubica a spinello ed un alto valore di magnetizzazione di saturazione nella fase *bulk*, pari a $480\text{emu}/\text{cm}^3$ ad una temperatura di 20°C pari.[1] Le ferriti cubiche hanno composizione chimica generale $MO + Fe_2O_3$ in cui M è un metallo divalente come Mn, Fe, Ni, Mg o Co; nel caso della magnetite il metallo divalente presente è appunto il ferro. Gli ioni metallici nelle ferriti occupano due tipologie di siti cristallografici differenti identificati come siti A e siti B. Le forze di scambio tra ioni su siti A e ioni su siti B

sono antiferromagnetiche mentre quelle che si instaurano tra ioni appartenenti alla stessa tipologia di sito cristallino sono ferromagnetiche. Gli ioni O^{2-} sono impacchettati in un arrangiamento cubico FCC e gli ioni metallici più piccoli (nel caso della magnetite, Fe^{2+} e Fe^{3+}), occupano gli spazi tra i primi. I siti A sono siti tetraedrici (fig. 3.1a) in cui i vertici sono occupati dagli atomi di ossigeno mentre i siti B sono ottaedrici (fig. 3.1 b) ed i vertici sono nuovamente occupati da ossigeno. Di conseguenza gli ambienti chimici in cui sono inseriti gli ioni A e B sono effettivamente diversi.

Per la sintesi della magnetite 17,5 mmol di $FeSO_4$ e 17,1 mmol di $Fe_2(SO_4)_3$, disciolti

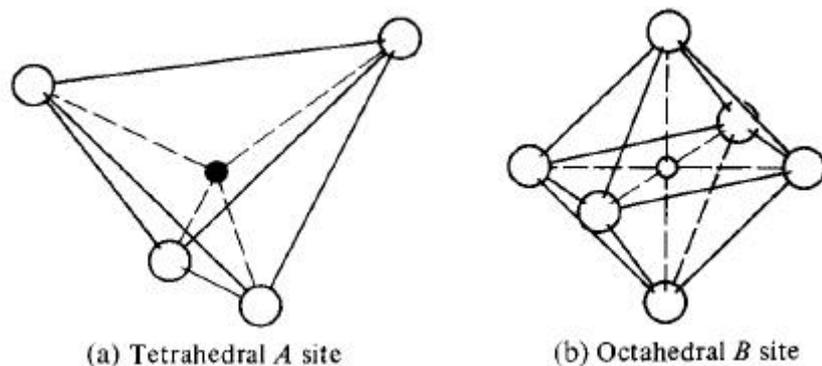


Figura 3.1: Siti cristallini nelle ferriti cubiche

in 120 ml di acqua MQ (acqua di MilliQ), vengono fatti gocciolare per 45 minuti in una soluzione di idrossido di tetrabuttilammonio, generato *in situ* attraverso una reazione tra 0,4 mol di $TBABr$ e 1,5 mol di $NaOH$ in 800 mL di acqua MQ, mantenendo il tutto in forte mescolamento. I cationi TBA^+ nell'ambiente di reazione svolgono il ruolo di agente disperdente per i nano-cristalli di magnetite impedendone un eccessivo agglomeramento e permettendo quindi che risulti nanostrutturata.

Nella figura 3.2 sono rappresentati dei nanocristalli di magnetite Fe_3O_4 con la superficie ricoperta di gruppi OH^- che fungono da ponte con le molecole di acqua. Tra una particella e l'altra si frappongono i cationi di tetrabuttilammonio rappresentati come piccoli segmenti che si dipartono dagli atomi di azoto. Una volta assolta la loro funzione disperdente, queste molecole vengono rimosse dalla superficie dei nanocristalli mediante lavaggio con NH_4OH ed etanolo, lasciando quindi sulla superficie degli stessi nanocristalli solo gli OH^- , legati agli atomi di Fe della magnetite, come si vede in figura 3.3. In figura 3.4 è rappresentato il caso in cui non venga aggiunto alcun disperdente; in questo caso le particelle di magnetite si aggregano in cristalli più grandi ed il campione perde la caratteristica di nanogranulosità.

Il mescolamento viene fatto continuare per un'ora dopo l'aggiunta delle soluzioni contenenti Fe e per due ulteriori ore a seguito dello spegnimento della sorgente di calore. La miscela viene fatta poi raffreddare per 12 ore fino al raggiungimento della temperatura ambiente. Un precipitato nero di magnetite (frazione **A**) si forma sul fondo del conte-

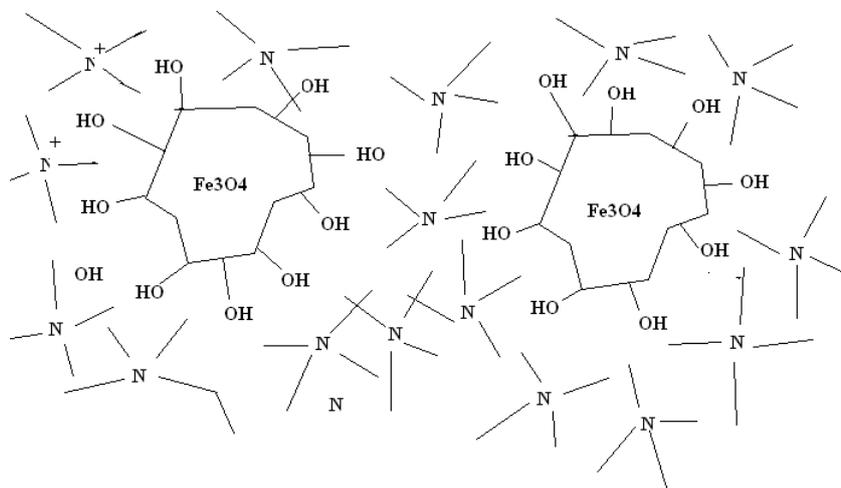


Figura 3.2: Rappresentazione schematica della sintesi in presenza di TBABr, *i disegni qui riportati hanno solo una funzione illustrativa e non rappresentano la reale struttura del campione*

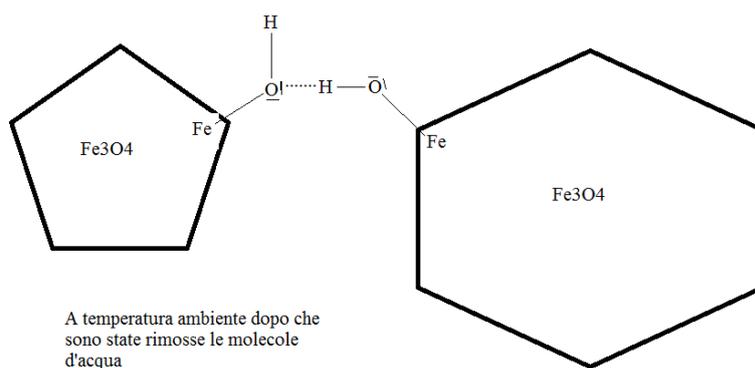


Figura 3.3: Rappresentazione delle nanoparticelle dopo la rimozione del TBABr, *i disegni qui riportati hanno solo una funzione illustrativa e non rappresentano la reale struttura del campione*

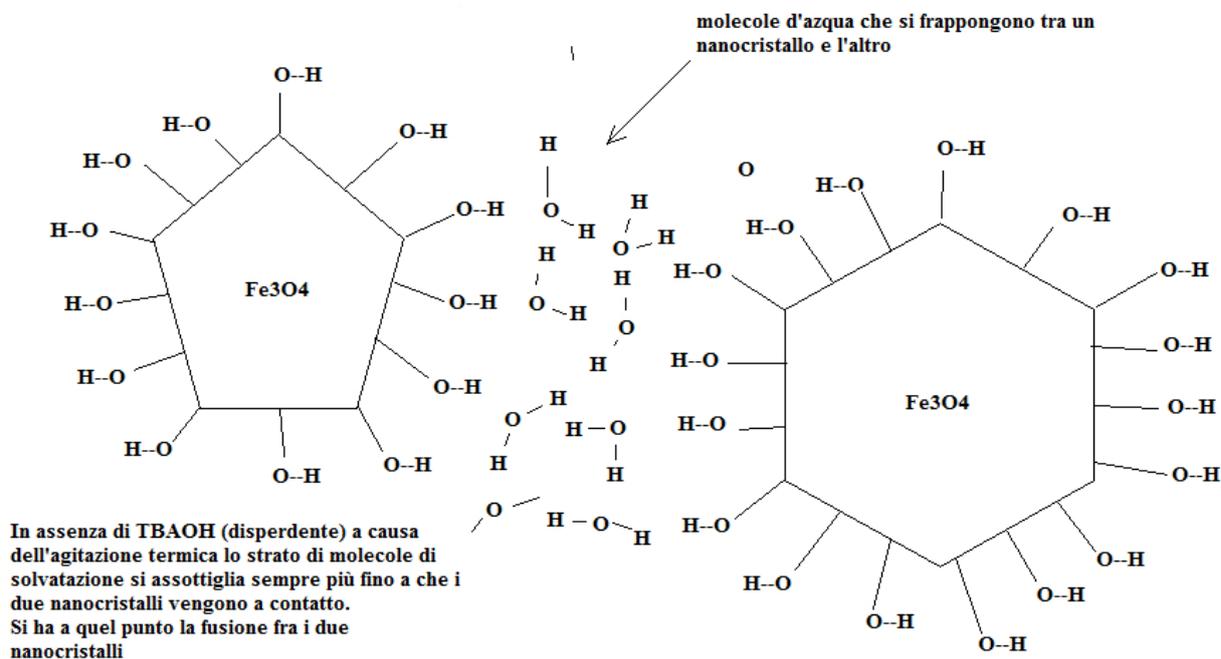


Figura 3.4: Struttura schematica della sintesi in assenza di $TBABr$, i disegni qui riportati hanno solo una funzione illustrativa e non rappresentano la reale struttura del campione

nitore della reazione mentre una fase grigia composta di TBAOH-TBABr, galleggiante sulla superficie della miscela, viene trasportata in un becker e solubilizzata con l'aggiunta di una piccola quantità di metanolo al fine di recuperare le nanoparticelle di magnetite intrappolate all'interno (frazione **B**). La soluzione con metanolo viene sottoposta ad un processo di centrifuga per separare la frazione **B** dal resto della soluzione ed aggiungerla infine alla frazione **A**. Le due frazioni vengono lavate con 170 ml di NH_4OH 1,6 molare e successivamente con etanolo. Infine la magnetite viene anidrificata su P_2O_5 in condizioni di vuoto. Nel seguito le nanoparticelle di magnetite preparate secondo il procedimento appena descritto verranno indicate per brevità con la notazione NPMagn.

3.1.2 Sintesi dei campioni di idrossiapatite

I fosfati di calcio sono i costituenti inorganici più importanti dei tessuti biologici rigidi. In particolare, sotto forma di idrossiapatite carbonata (CHA), sono presenti nella struttura dei denti e delle ossa fornendo loro stabilità, durezza e funzionalità.[24] In questi tessuti il biomminerale si presenta con una struttura *platelet-like*, spesso pochi nanometri e lunga decine di nanometri.(fig. 3.5) La grande presenza di fosfati di calcio nei vertebrati li rende quindi molto importanti nel campo della biomedicina in quanto molte malattie e disturbi derivano dalla presenza di irregolarità nel sistema scheletrico o nel sistema

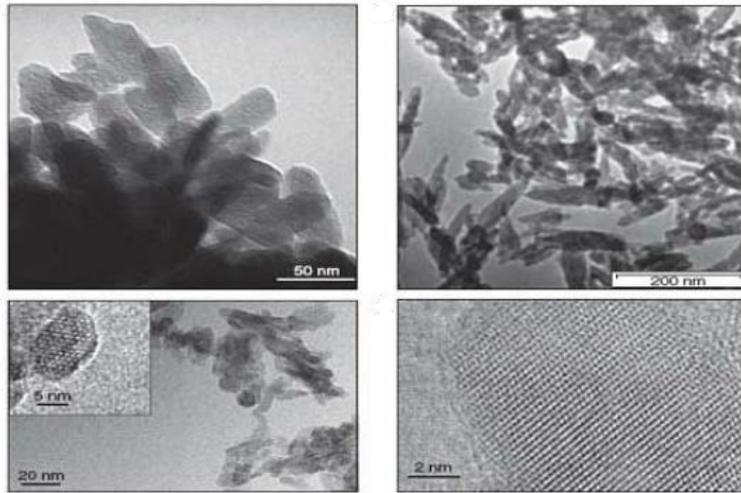


Figura 3.5: Immagini SEM di idrossiapatite a diversi ingrandimenti, tratte da [26]

dentale, come l'osteoporosi o tumori ossei.[24]

I recenti sviluppi nella ricerca dei biomateriali si focalizzano sul superamento dei limiti delle ceramiche di fosfato di calcio e sul miglioramento della loro bioreattività sfruttando i vantaggi unici forniti dalla nanotecnologia.[25] All'interno della famiglia degli ortofosfati di calcio, l'idrossiapatite è il minerale più stabile e meno solubile, appartiene alla famiglia delle apatiti ed ha formula chimica $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. L'idrossiapatite pura cristallizza nel gruppo spaziale monoclino $P2_1/b$ anche se a temperature superiori ai 250°C si ha una transizione di fase ad uno stato con cristallizzazione esagonale. In realtà le impurità, come sostituzioni parziali degli ioni idrossido, tendono a stabilizzare la fase esagonale che quindi risulta essere quella presente in natura.[21] L'idrossiapatite si può ottenere in vari modi: *wet precipitation*, metodi di nebulizzazione idrotermali e ultrasuoni, elettrodeposizione, sintesi sol-gel e deposizione a stato solido. Le dimensioni, la morfologia, il grado di cristallinità e le proprietà superficiali dei materiali sono caratteristiche da tenere sotto controllo per ottimizzare le funzioni biomedicali degli scaffold da inserire nel tessuto osseo umano; la biocompatibilità, la bio-attività, l'osteconduttività e il legame diretto all'apparato osseo promuovono l'applicazione dell'idrossiapatite biometrica come un eccellente materiale utilizzabile per riempire vuoti ossei, per sostituzioni ortopediche e maxillofacciali e per la chirurgia odontoiatrica. La sintesi di materiali composti di idrossiapatite e nanoparticelle magnetiche è stato inoltre molto incentivato da studi recenti per il loro possibile utilizzo nella costruzione di scaffold biomimetici per la rigenerazione ossea.[26] In figura 3.5, presa dal lavoro di Roveri *et al.*, sono mostrate quattro immagini SEM, raccolte a diverse risoluzioni, di un campione di idrossiapatite sintetica.[26] Per la sintesi dell'idrossiapatite carbonata sono state inizialmente preparate due soluzioni che denomineremo *A* e *B*. Per la preparazione della soluzione *A*, 17,2

mmol di H_3PO_4 e 48,3 mmol di trietanolammina (TEA) sono stati mescolati con 10 ml di acqua MQ in un contenitore e versati poi in un *filler* fissato su una beuta a base rotonda. Sono stati utilizzati 10 ml ulteriori di acqua MQ per risciacquare e ripulire le pareti del contenitore. Per la soluzione B, 55,5 mmol di TEA sono stati amalgamati in un mortaio di porcellana con 28 mmol di $Ca(CH_3COOH)_2$. La miscela ottenuta è stata attentamente trasferita in una beuta a base rotonda utilizzando 20 ml di acqua MQ per rimuoverla completamente dalla superficie interna del mortaio. La soluzione B a questo punto è stata posta in mescolamento ed immersa in un bagno termico a base di acqua e ghiaccio. La soluzione A è stata quindi fatta gocciolare per 30 minuti nella soluzione B e mantenuta sotto forte mescolamento. La miscela ottenuta è stata poi diluita con 120 ml di acqua MQ precedentemente raffreddata. Il mescolamento è continuato a velocità massima per 3 ore dopo il gocciolamento della soluzione A e successivamente a bassa velocità per ulteriori 12 ore. Il prodotto solido della reazione è stato separato dalla fase liquida per centrifugazione, ripetutamente lavato con acqua MQ ed infine anidrificato su P_2O_5 in condizioni di vuoto.

3.1.3 Sintesi dei campioni HA e magnetite

Per la sintesi dei campioni composti da idrossiapatite e nanoparticelle di magnetite, 0,86 mmol della magnetite NPMagn e 18,6 mmol di $Ca(OH)_2$ sono stati mescolati in un mortaio e finemente polverizzati fino ad ottenere una polvere grigio-marrone. Attraverso piccole dosi sono stati quindi attentamente aggiunti 100 ml di NH_4OH 1 molare alla polvere ottenuta. (In questa fase sono stati utilizzati $Ca(OH)_2$ e NH_4OH al posto di $Ca(CH_3COOH)_2$ e trietanolammina per evitare la formazione di complessi di acetato di ferro e di Fe-TEA che potessero consumare i nanocristalli di magnetite)

Il contenuto del mortaio, mescolato e amalgamato dopo ogni aggiunta, è stato trasferito in un recipiente a base rotonda con tre ingressi, fornito di un mescolatore meccanico e un *feeding funnel* contenente 22 ml di una soluzione di H_3PO_4 0,5 molare e di trietanolammina 1,16 molare. La soluzione ottenuta è stata fatta gocciolare per 35 minuti nella dispersione di magnetite e $Ca(OH)_2$ mescolata nel contenitore di reazione e precedentemente raffreddata tramite un bagno termico di acqua-ghiaccio. La soluzione viene quindi posta in forte mescolamento, per un tempo di 3 ore, e quindi in mescolamento più lento per un tempo di 12 ore. La temperatura è stata mantenuta tra i 18 e i 20 °C inserendo il tutto in un bagno termico a base d'acqua.

La fase solida della miscela di reazione è stata separata da quella liquida tramite un processo di centrifugazione. All'interno della fase solida, il *layer* più esterno, di colore grigio-marrone più chiaro è stato poi separato attentamente con una spatola di plastica dalla parte interna, mostrandone il colore marrone più intenso. Il layer interno è stato ulteriormente disperso in acqua MQ e centrifugato per migliorare il processo di separazione e recuperare quanto più prodotto possibile. Questo passaggio è stato svolto per 5 volte. Sia la frazione chiara sia quella scura sono state lavate con acqua MQ, centrifugate

e anidificate in condizioni di vuoto su P_2O_5 . Sono stati quindi ottenuti due diversi campioni, una frazione marrone chiara ed una marrone scura. Le misure di magnetizzazione condotte successivamente sui due campioni ci hanno permesso di stimarne il contenuto di magnetite, rispettivamente $\sim 0,8$ wt.% per quello chiaro (denominato in seguito con MagnHA1) e ~ 4 wt.% per quello scuro (denominato in seguito con MagnHA2).

3.2 Caratterizzazione chimico-strutturale

I primi studi condotti sui campioni consistono in analisi svolte tramite XRD, FT-IR e TEM. In questa sezione illustreremo i risultati ottenuti da queste misure preliminari che serviranno poi come base di partenza per le analisi magnetiche che mostreremo nel prossimo capitolo.

3.2.1 XRD

Gli spettri XRD dei campioni sono stati ottenuti utilizzando un diffrattometro PANanalytical θ/θ attraverso una radiazione $K\alpha$ di Cu con $\lambda = 1.541873$ Å, generata attraverso un voltaggio di 40 kV e una corrente di 40 mA. I dati sono stati raccolti in modalità continua, con un filtro al Ni del fascio primario, le fessure di divergenza fissate a $1/4^\circ$, un soller a 0.0023° sui fasci incidente e secondario e una fessura antiscatter di $1/4^\circ$. È stata utilizzata la modalità di scansione a step del detector RTMS (Real Time Multiple Strip) con un tempo di 50 secondi per ogni step. Il *sample holder* sul quale vengono posizionate le polveri da analizzare è di vetro, profondo 1 mm, alto 20 mm e largo 15 mm. Gli spettri dei campioni sono mostrati in figura 3.6. Gli spettri sono stati analizzati attraverso l'impiego del software *X'Pert HighScore Plus* che, attraverso un vasto database interno, permette di associare i picchi degli spettri XRD ai rispettivi materiali. Studiando in primo luogo lo spettro del campione NPMagn (fig.3.6a) si vedono picchi allargati corrispondenti alla fase dell' Fe_3O_4 . Tramite il metodo Sherrer è stata calcolata la grandezza media D dei grani cristallini, stimata pari a circa 6 nm riferendoci in particolare al picco più intenso (311) e considerando come costante di Sherrer il valore $K = 0.89$. Nell'equazione 3.1 w identifica la larghezza a metà altezza del picco considerato.

$$D = \frac{K\lambda}{w \cos \theta} \quad (3.1)$$

In fig. 3.6b è mostrato lo spettro ottenuto dal campione contenente idrossiapatite e magnetite MagnHA2. In questo spettro si possono riconoscere i picchi tipici dell'idrossiapatite in cui però l'allargamento dei massimi indica un basso grado di cristallinità. I picchi più intensi tipici dell'idrossiapatite sono stati evidenziati elencandone gli indici di Miller in figura. All'interno dello spettro non è possibile, confrontandolo con quello relativo al campione NPMagn, riscontrare la fase tipica della magnetite, il che è imputabile alla bassa percentuale di magnetite presente all'interno.

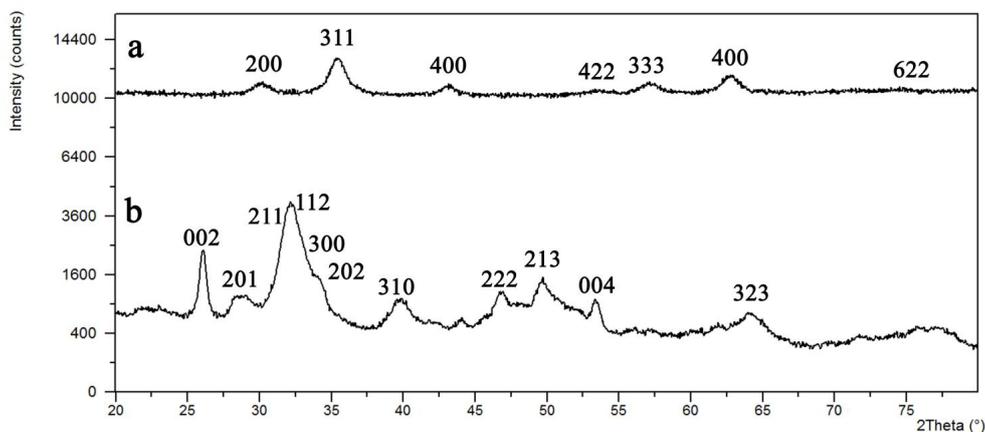


Figura 3.6: Spettri XRD dei campioni NPMagn(a) e MagnHA2(b)

3.2.2 FT-IR

Gli spettri FT-IR sono stati raccolti in modalità di assorbimento sondando i campioni attraverso uno spettrometro NICOLET 380 FT-IR con una radiazione dai 4000 ai 400 cm^{-1} ed una risoluzione di 4 cm^{-1} . Per la misura vengono preparati dischi a base di *KBr* sufficientemente trasparenti alla radiazione infrarossa. I dischi sono ottenuti macinando finemente una miscela di *KBr* del tipo *Sigma Aldrich FTIR* al 99% (400 mg) e 2 mg di ciascun campione. 75 mg della polvere ottenuta vengono poi trasferiti in una *pellet die* della Helma e anidrificati per 8 ore con pentossido di fosforo in condizioni di vuoto; i campioni vengono poi posti in una pressa meccanica e sottoposti ad una pressione corrispondente ad un peso di 10 tonnellate per un tempo di 90 secondi. Una volta pressati, i campioni vengono estratti sotto forma di dischi da inserire nello spettrometro FT-IR. Gli spettri ottenuti dai campioni NPMagn e MagnHA2 sono visibili in fig.3.7, rispettivamente i grafici (a) e (b).

Lo spettro FT-IR delle nanoparticelle di magnetite mostra un forte assorbimento legato ai modi vibrazionali $Fe - O$ al valore di 577 cm^{-1} confermando quindi che la fase principale presente è data dalla magnetite. Una piccola quantità di materiale organico, probabilmente TBABr residuo, è visibile dalla banda molto larga presente tra i 1100 e gli 800 cm^{-1} e dai due piccoli picchi di assorbimento a 874 cm^{-1} e 964 cm^{-1} . Una banda molto larga di assorbimento tra i 3600 cm^{-1} e i 2500 cm^{-1} , centrata a 3412 cm^{-1} , ed una più stretta a 1630 cm^{-1} sono ascrivibili a strati di molecole di H_2O che sono legate ai gruppi $Fe - O - H$ della superficie della nanoparticelle di magnetite. Linee di assorbimento simili, a 3432 cm^{-1} e 1637 cm^{-1} , sono visibili anche nello spettro del campione MagnHA2 di fig. 3.7b, rivelando la presenza di gruppi $P - O - H$. Analizzando lo spettro relativo al campione MagnHA2 si riscontra che le bande più intense sono legate alla fase minerale dell'idrossiapatite, in accordo con le proporzioni composizionali del campione. Entrando nel dettaglio, le bande di assorbimento a 568 cm^{-1} e 604 cm^{-1}

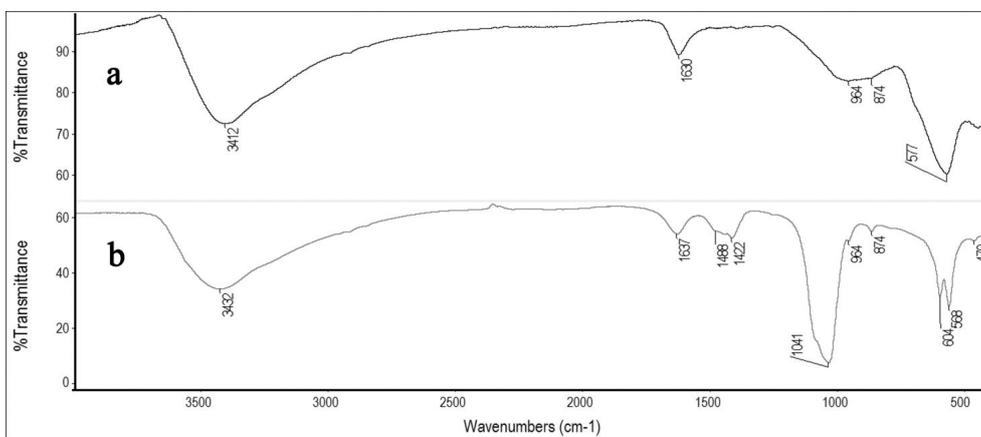


Figura 3.7: Spettri FT-IR di NPMagn(a) e MagnHA2(b)

corrispondono alle vibrazioni di piegamento degli ioni $(PO_4)^{3-}$ mentre le vibrazioni di tensione, sempre del gruppo fosfato, sono visibili nei picchi a 1100 cm^{-1} e 1041 cm^{-1} , rappresentanti rispettivamente la componente simmetrica e quella asimmetrica. Il fatto che l'idrossiapatite prodotta sia biomimetica, cioè carbonata, viene confermato dalle bande di assorbimento a 1488 cm^{-1} e 1422 cm^{-1} che sono consistenti con la presenza di un gruppo carbonato in sostituzione di un gruppo idrossilico o di un gruppo fosfato all'interno del reticolo cristallino dell'HA. La bassa percentuale di nanoparticelle di magnetite presenti le rende difficilmente individuabili nello spettro FT-IR del campione MagnHA2; la loro effettiva presenza nel composto è indirettamente rivelata da picchi di assorbimento a 874 cm^{-1} e 964 cm^{-1} , associabili al TBABr utilizzato per la sintesi della magnetite. I gruppi Fe—O—H sulla superficie delle nanoparticelle legano molecole d'acqua tramite legami a ponte di idrogeno. Queste legano altre molecole d'acqua sempre con lo stesso tipo di legame, formando una sfera di solvatazione attorno ai nano-cristalli tenendoli separati impedendo che si tocchino e rallentandone l'aggregazione. Tuttavia, nel corso della sintesi, l'agitazione termica contrasta la formazione delle sfere di solvatazione ed i nano-cristalli vengono a contatto fra di loro fondendosi in cristalli più grossi, micrometrici.

Per limitare questo processo è stato utilizzato il TBAOH che agisce come disperdente perché, date le grandi dimensioni della molecola rispetto a quella d'acqua, riesce a tenere meglio separate le nanoparticelle formando gusci più resistenti tra di esse. Sia l'acqua sia il residuo TBAOH vengono rimossi in seguito a lavaggio con etanolo nella sintesi dei campioni. I nanocristalli vengono quindi a contatto gli uni con gli altri instaurando forti legami a ponte di idrogeno questa volta fra gruppi Fe—O—H appartenenti a nano cristalli vicini. Si formano così clusters di nano cristalli di magnetite che, come mostreremo qui di seguito, sono visibili al TEM.

I gruppi Fe—O—H sono quindi i maggiori responsabili della crescita dell'idrossiapatite

te attorno ai nano cristalli di magnetite promuovendo la formazione di uno strato di $Ca(OH)_2$ sopra i nano-cristalli raggruppati in clusters e permettendo la reazione del fosfato $Ca(OH)_2$ superficiale e la conseguente formazione dell'idrossiapatite.

3.2.3 TEM

Le analisi TEM sono state condotte attraverso un microscopio Philips CM200 operante a 200 kV ed equipaggiato con un filamento di LaB_6 . I campioni per l'analisi TEM sono stati preparati disperdendo una piccola quantità di materiale in etanolo e agitandolo con ultrasuoni per circa un minuto. Una goccia della sospensione ottenuta è stata depositata su una griglia commerciale per TEM ricoperta da un sottile film di carbonio. La griglia è stata poi tenuta in aria fino ad aver ottenuto la completa evaporazione dell'etanolo. In fig. 3.8a viene mostrata l'immagine TEM del campione NPMagn. Nel riquadro in alto a sinistra abbiamo inserito il corrispondente *pattern* di diffrazione su un'area scelta (SAED = *Selected Area Electron Diffraction*).

Le particelle appaiono semisferiche o ellittiche a prima vista, con diametri che spaziano

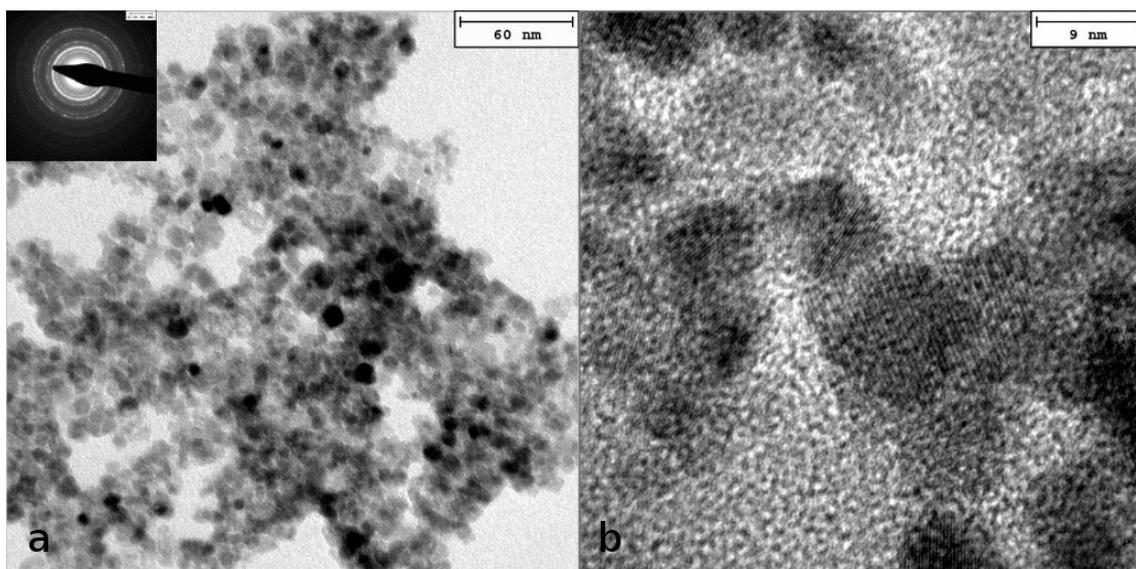


Figura 3.8: a)Immagine TEM di NPMagn, b)Immagine HR-TEM di NPMagn

circa tra i 4 e i 10 nm. Una caratteristica che risulta evidente nel campione NPMagn e che sarà ancora più visibile nei campioni MagnHA1 e MagnHA2 è che le nanoparticelle di magnetite tendono a formare degli aggregati senza disperdersi in modo omogeneo. Osservando la figura 3.8a, alcune particelle sembrano essere maggiori di 10 nm ma un'osservazione più accurata evidenzia come queste siano in realtà composte a loro volta da particelle più piccole. Lo spettro SAED indica che il campione è policristallino con la presenza di cerchi concentrici e, tramite un confronto con i valori tabulati, risulta

che la sequenza dei diametri degli anelli è consistente con quella tipica della struttura dell' Fe_3O_4 . Immagini TEM in alta risoluzione (HR-TEM) mostrano come le nanoparticelle siano a singolo cristallo non evidenziando alcun bordo di grano all'interno di esse. La forma delle nanoparticelle risulta essere squadrata, coerentemente con la struttura cubica a spinello tipica di questo materiale. Il diametro medio ottenuto da un'analisi dell'immagine HR-TEM (fig. 3.8b) si aggira attorno ai 6 nm, in accordo con le regioni cristalline coerenti stimate tramite la tecnica XRD. Osservando attentamente, sono visibili, dislocate nel campione, zone in cui è presente materiale amorfo, riconducibili alla presenza di TBABr residuo. Per quanto riguarda l'analisi TEM dei campioni contenenti idrossiapatite, le immagini che mostriamo sono relative al campione MagnHA2, cioè il campione a più alto contenuto di magnetite e sono mostrate in figura 3.9.

Si riconosce la struttura lamellare dell'HA in cui le piastrine hanno dimensioni tra i 10 e i 70 nm e sono sovrapposte a formare una struttura complicata ed intricata. Le misure SAED sono state inserite in figura 3.9a nell'inserto in alto a sinistra e rivelano la cristallinità delle piastrine. L'analisi delle distanze dei cerchi presenti nell'inserto sono consistenti con la struttura dell'idrossiapatite. In particolare gli anelli di diffrazione visibili, iniziando da quello più centrale, corrispondono alle seguenti distanze interplanari: 0.346 nm, 0.281 nm, 0.228 nm, 0.195 nm, 0.184 nm e 0.173 nm. Questi valori sono in buon accordo con i dati di diffrazione riportati per l'HA ("International Centre for Diffraction Data" - ICDD card n. 09-0432). Nel dettaglio, solamente di anelli di diffrazione

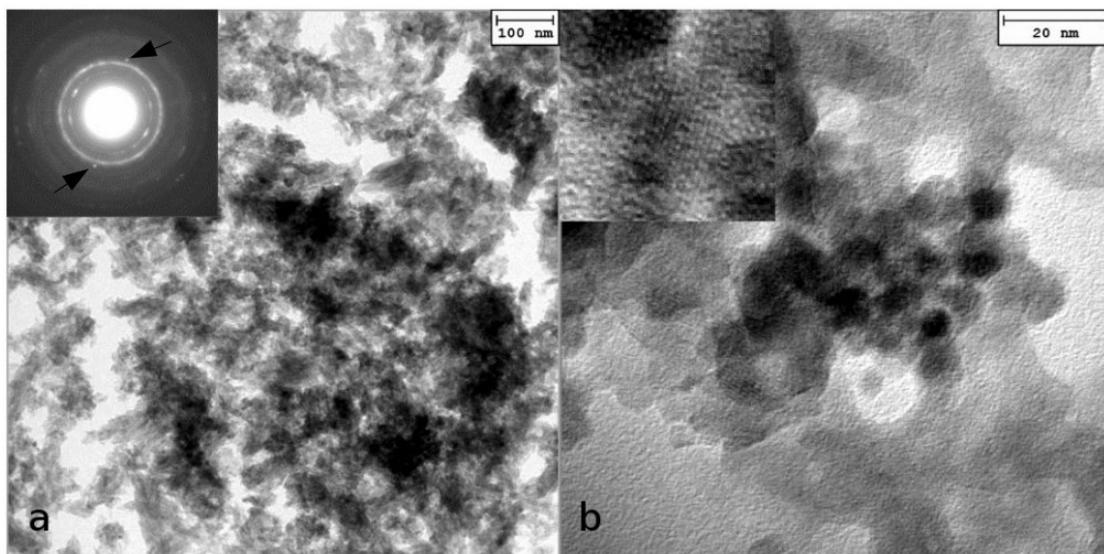


Figura 3.9: a) Immagine TEM di $HA + Fe_3O_4$, b) Immagine HR-TEM di $HA + Fe_3O_4$

che hanno una intensità relativa maggiore di 20 sono visibili nel pattern SAED e corrispondono rispettivamente alle seguenti famiglie di piani reticolari dell'HA: 002, 211, 310, 222, 213 e 004. Gli anelli di diffrazione che hanno una intensità relativa più bassa di 20

non possono essere rilevabili perchè aumentando il tempo di esposizione al fascio cresce il contributo del rumore nell'immagine. I punti all'esterno degli anelli sono associabili alla presenza delle nanoparticelle, in particolare quelli indicati tramite delle frecce in figura 3.9a sono riferibili alla famiglia di piani 311 della magnetite. Le nanoparticelle di magnetite, come già accennato nella descrizione del campione NPMagn, tendono visibilmente a formare agglomerati all'interno della matrice di HA il ch , in aggiunta alla bassa percentuale presente, rende ancora pi  difficoltosa la loro ricerca all'interno del campione. In figura 3.9b viene mostrato uno di questi agglomerati in cui le particelle di magnetite appaiono pi  scure di quelle di idrossiapatite ma con forma e dimensione sostanzialmente invariate rispetto a quelle dedotte dal campione NPMagn. L'immagine HR-TEM (inserto in figura 3.9b) inoltre conferma la natura cristallina delle particelle di Fe_3O_4 , in particolare si possono distinguere molto bene i piani 111 tipici della magnetite con una distanza interplanare $d = 0.485\text{nm}$.

Capitolo 4

Analisi magnetica: SQUID

L'analisi magnetica condotta sui campioni NPMagn, MagnHA1 e MagnHA2 è suddivisibile in due parti, la prima parte si è svolta utilizzando un magnetometro SQUID mentre la seconda parte si è svolta utilizzando uno spettrometro Mossbauer, entrambi presenti nei laboratori di magnetismo dell'università di Ferrara. Nel presente capitolo presentiamo lo studio ed i risultati ottenuti dall'impiego dello SQUID mentre i risultati ricavati dal Mössbauer verranno presentati nel capitolo successivo. Il presente capitolo è a sua volta suddiviso in due parti. Nella prima parte presentiamo l'apparato sperimentale utilizzato in questo lavoro di tesi mentre nella seconda parte vengono descritte le misure ed i relativi risultati.

4.1 Apparato sperimentale

Lo SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*) è un magnetometro estremamente sensibile basato sul funzionamento delle *giunzioni Josephson*. In particolare, lo strumento utilizzato per questo lavoro di tesi è un MPMS (*Magnetic Property Measurement System*), prodotto dalla *Quantum Design*, un dispositivo specifico per lo studio magnetico di piccoli campioni. Il magnetometro può operare in un range di temperature che vanno dai 2K ai 400K con una risoluzione magnetica di 10^{-7} emu e con la possibilità di applicare campi magnetici fino a 5.5 T.

Il sistema è composto di due componenti strutturali principali: il *dewar* con la sonda (figura 4.1(A)) e la console di controllo (figura 4.1(B)). All'interno del dewar è presente una sonda criogenica che integra un magnete superconduttore con il sistema di rilevamento SQUID ed un apparato di controllo della temperatura che ha precisione dell'ordine del mK. Il sistema di rilevamento comprende le bobine di *pick-up* e l'elettronica di controllo Model 2000 SQUID Amplifier. Il campione viene inserito dall'alto attraverso una sonda che permette di calibrare la posizione con una scala graduata di risoluzione 0.0003 cm. Lo strumento utilizzato per il presente lavoro di tesi, diversamente da altri SQUID in cir-

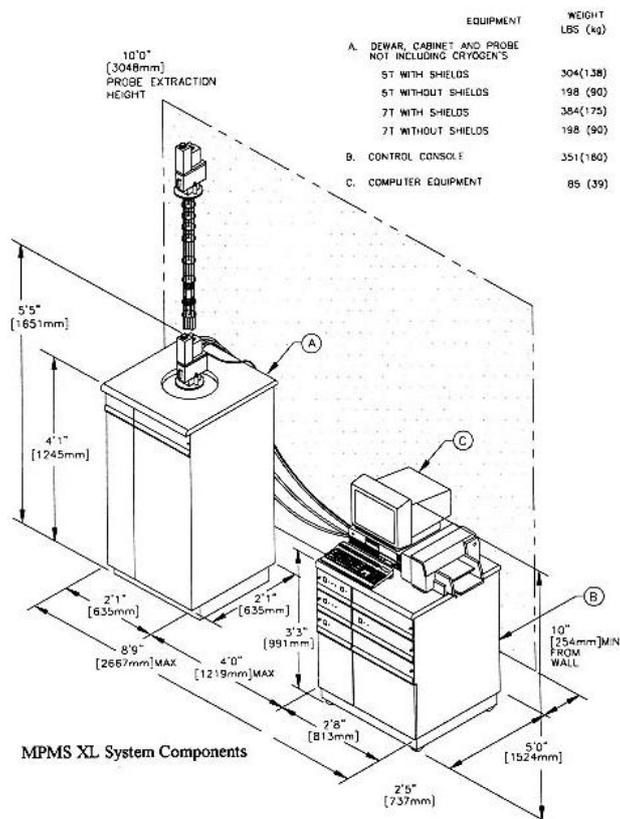


Figura 4.1: Rappresentazione schematica di un dispositivo SQUID-MPMS

colazione, non ha un vero e proprio schermo magnetico attorno alla spira di rilevazione; questo permette rapide variazioni di campo magnetico con l'eventuale rischio di influenza da parte di campi esterni. A risolvere il problema di eventuali sorgenti di interferenza magnetica, le spire di rilevazione operano in derivata seconda. Il sistema di rilevazione è formato da un anello superconduttore con una giunzione Josephson, un trasformatore di flusso superconduttore con trasmettitore a radiofrequenza ed un insieme di tre bobine di pick-up, il tutto collegato con l'elettronica appropriata di controllo e un circuito di retroalimentazione esterna. Per eliminare eventuali correnti residue nell'anello superconduttore al variare del campo magnetico, il trasformatore è dotato di un riscaldatore che può far passare l'anello superconduttore al suo stato normale. Il funzionamento, come già accennato, si basa sulla giunzione Josephson (vero cuore dello SQUID), e sul principio di induzione magnetica. In particolare il campione viene inserito al centro delle bobine di pick-up e fatto oscillare provocando una variazione di flusso magnetico all'interno delle stesse. La variazione di flusso provoca una variazione della corrente circolante nelle bobine superconduttrici. La variazione di corrente, mediante il trasformatore di flusso, viene trasmessa nell'*input coil* dello SQUID e tradotta in una variazione equivalente di

tensione. In contemporanea il circuito di retroalimentazione fornisce una tensione necessaria a compensare la variazione di flusso e a ristabilire l'equilibrio nell'anello. I valori di tensione/corrente somministrati dal sistema di retroalimentazione durante un percorso completo del campione si traducono, per mezzo di un algoritmo matematico, nel dato sperimentale equivalente al valore del momento magnetico del campione.

4.2 Risultati sperimentali

In questa sezione presenteremo i risultati ottenuti dall'analisi SQUID condotta sui campioni NPMagn, MagnHA1 e MagnHA2.

4.2.1 Analisi SQUID di NPMagn

Le prime analisi condotte sul campione NPMagn sono state misure di cicli di isteresi a diverse temperature, da $T = 6K$ a $T = 300K$. (fig. 4.2) Nello specifico, le misure di magnetizzazione sono state condotte a temperature di 6K, 25K, 50K, 75K, 100K, 150K, 200K e 300K. I cicli ottenuti alle temperature di 6K e 300K sono stati messi a confronto e sono mostrati in figura 4.2.

Una delle prime caratteristiche che siamo andati a ricavare dai cicli di isteresi è il valore

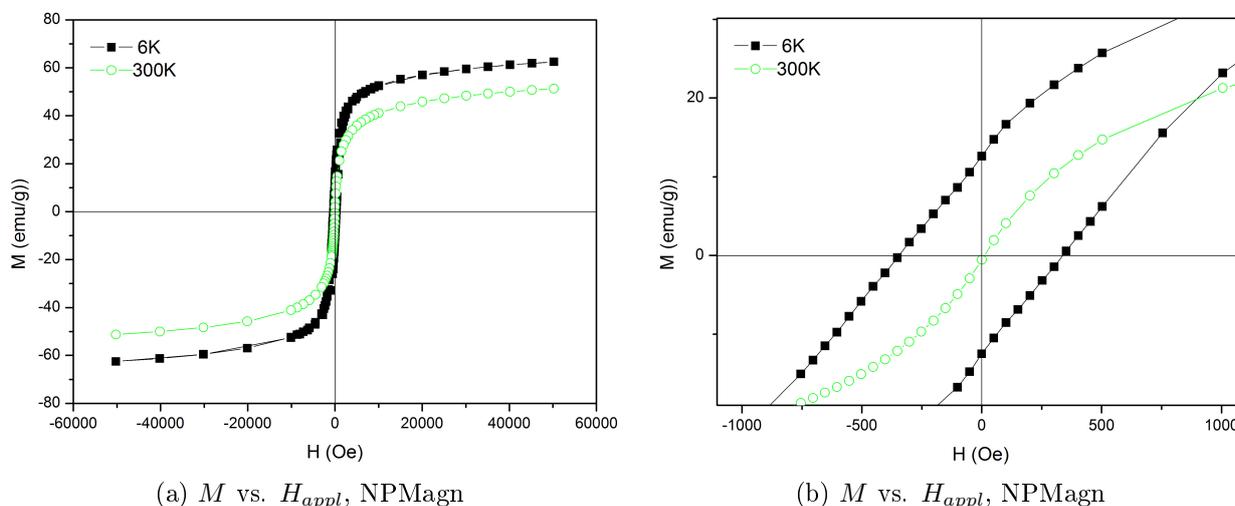


Figura 4.2

teorico della magnetizzazione di saturazione per campi magnetici tendenti all'infinito. Non potendo ovviamente applicare dei campi infiniti, il valore di M_S è stato ricavato plottando i valori della magnetizzazione ottenuti a campi più elevati in funzione di $\frac{1}{H}$. Effettuando un fit lineare dei dati, si considera quale valore della magnetizzazione di

saturatione a campi infiniti quello dell'ordinata all'origine.(fig. 4.3)

I risultati ottenuti attraverso il procedimento appena illustrato sono mostrati in tabella

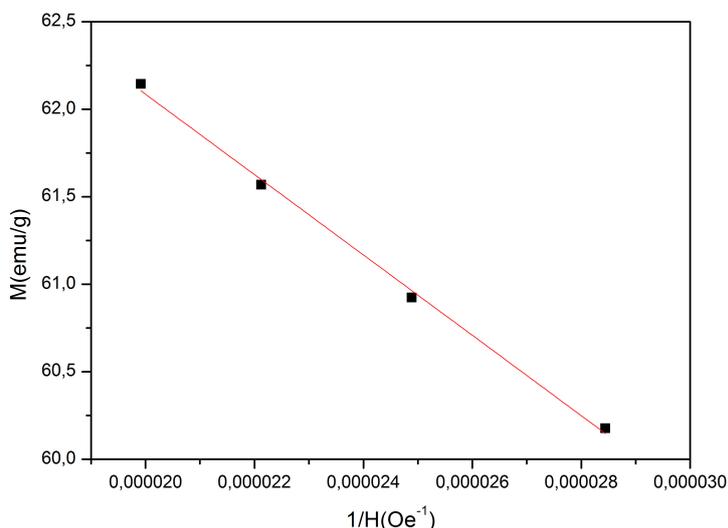


Figura 4.3: Procedimento per ottenere i valori ideali di $M_S = \lim_{H \rightarrow \infty} M$

4.1. Il valore di $M_S = (67.7 \pm 0.2)$ emu/g, estrapolato con il metodo appena descritto alla temperatura di 6K, corrisponde a circa il 70% del valore della magnetizzazione di saturazione tabulata per la magnetite bulk che vale ~ 98 emu/g.

Il basso valore della magnetizzazione di saturazione può essere dovuto in parte alla presenza di molecole di H_2O e di $TBABr$ residuale sulla superficie delle nanoparticelle ed in parte al *canting* degli spin superficiali. Come infatti viene descritto in letteratura, quando il diametro delle nanoparticelle di materiali ferrimagnetici, come la magnetite, è inferiore alla decina di nanometri, si verifica il fenomeno del *canting* degli spin superficiali.[28] Il *canting* superficiale degli spin avviene per una rottura della coordinazione sui bordi delle particelle e diventa fondamentale nel momento in cui il rapporto superficie/volume risulta consistente. In particolare l'ordine degli spin nei materiali bulk nasce dal fatto che la forza di scambio inter-reticolare è più forte della forza di scambio intra-reticolare. Una variazione nel numero di coordinazione dei cationi superficiali risulta in una distribuzione netta di campi di scambio, positivi e negativi, rispetto al sottoreticolo cationico. Poichè l'interazione di scambio è mediata da uno ione di ossigeno, quando quest'ultimo manca dalla superficie vengono rotti anche i legami e di conseguenza l'ordine superficiale.[27] La tendenza dei cicli a non saturare anche a basse temperature supporta l'ipotesi del *canting* degli spin superficiali.

Studiando ulteriormente i cicli di isteresi abbiamo ricavato l'andamento del campo coercitivo H_C e della rimanenza M_r in funzione della temperatura. Come risulta evidente

dalla figura 4.4a il campo coercitivo diminuisce drasticamente con l'aumento della temperatura e per $T = 100K$ risulta praticamente azzerato. L'andamento della rimanenza con la temperatura è simile a quella del coercitivo come si può vedere dalla figura 4.4b. Il rapporto tra la magnetizzazione rimanente a $T=6K$ (M_{r-6K}) e il valore di magne-

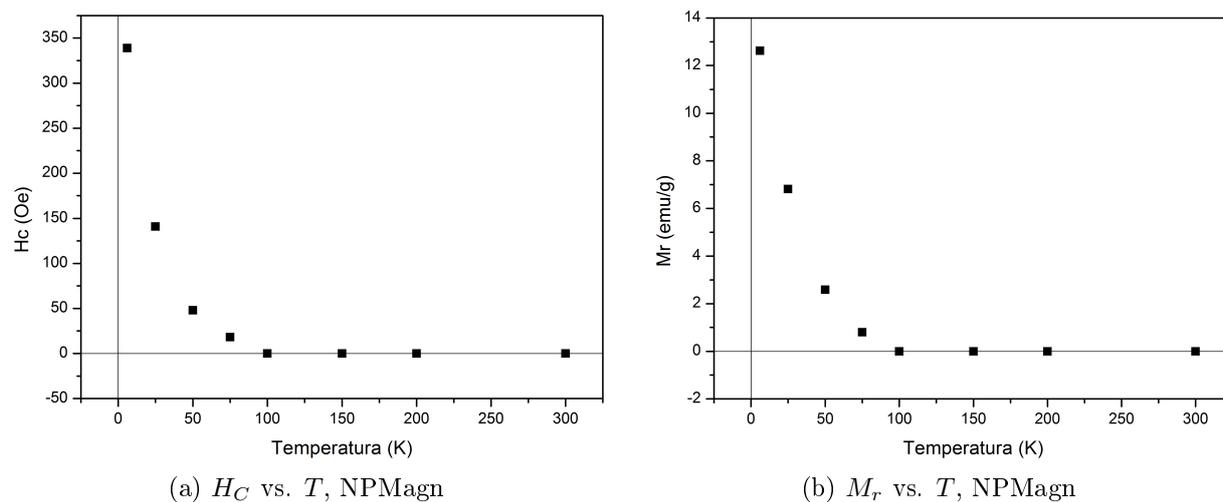


Figura 4.4

tizzazione alla stessa temperatura rilevata per un campo di $H=5T$ (M_{5T-6K}) identifica la frazione di particelle stabilmente nello stato ferrimagnetico ed è mostrata in tabella 4.1.[28]

Come si può vedere il valore di $M_{(r-6K)}/M_{(5T-6K)}$ non cambia al variare del campione e questo è ulteriormente attribuibile al fatto che le effettive interazioni tra le particelle ed il conseguente comportamento magnetico non dipendono dal contenuto di magnetite. Dalla figura 4.2b, inoltre, si evince come alla temperatura ambiente non si abbia più alcun tipo di isteresi ed il campione risulti superparamagnetico, consistentemente con la teoria presentata nel capitolo 1.

In una seconda fase sono state effettuate misure di magnetizzazione sul campione NP-Magn in funzione della temperatura attraverso le procedure ZFC-FC. Nel processo ZFC il campione è stato portato, in assenza di campo applicato, dalla temperatura ambiente alla temperatura $T_{min} = 5K$, raggiunta la quale è quindi stato applicato un campo H_{appl} statico. Alla presenza del campo il campione è stato scaldato con una velocità di innalzamento della temperatura di $v_h = 3K/min$ fino a 300K. Successivamente il campione è stato riportato, in presenza del campo H_{appl} , alla temperatura T_{min} e quindi ulteriormente a $T=300K$ svolgendo quindi la misura in modalità FC.

L'intero procedimento è stato condotto per 3 volte a diversi valori di campo applicato, in particolare è stato sequenzialmente acceso un campo di 20 Oe, 100 Oe e 200 Oe. In figura 4.5 vengono mostrati gli andamenti della suscettività magnetica ($\chi_{ZFC} = \frac{M_{ZFC}}{H_{appl}}$

e $\chi_{FC} = \frac{M_{FC}}{H_{appl}}$) in funzione della temperatura per i diversi valori di campo applicato. L'andamento della *irreversibilità magnetica*, definita come la differenza tra M_{FC} e

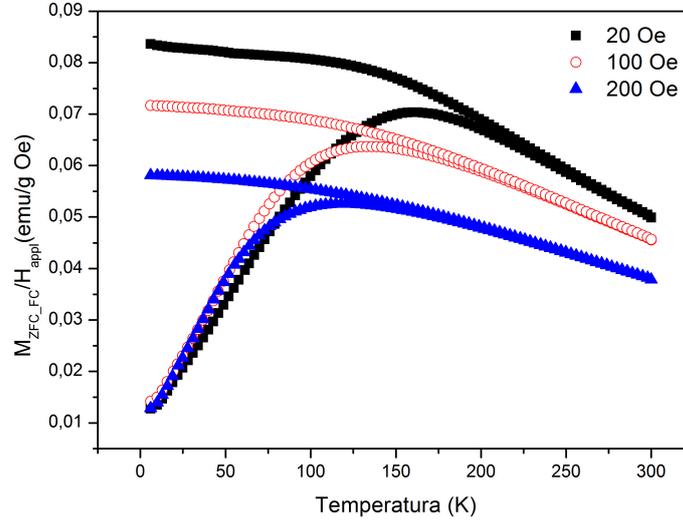


Figura 4.5: $\chi_{ZFC_FC} = M_{ZFC_FC}/H_{appl}$ vs. T, NPMagn

M_{ZFC} , in funzione della temperatura è mostrato in figura 4.6 e rivela la presenza di processi di rilassamento magnetico.

Come abbiamo introdotto nel capitolo 1, all'interno di campioni nanogranulari, non essendo le nanoparticelle perfettamente identiche, si deve assumere l'esistenza di una distribuzione di barriere energetiche di anisotropia e di conseguenza una distribuzione di temperature di bloccaggio T_B . Assumendo ciò, il valore della temperatura alla quale si ha un picco nella misura ZFC viene usualmente considerato come il valore medio $\langle T_B \rangle$ al di sopra del quale il sistema entra nel regime superparamagnetico e al di sotto del quale si mantiene nel suo stato bloccato. Riferendoci alle misure condotte con $H_{appl} = 20\text{Oe}$ in modo da non risentire eccessivamente dell'influenza del campo magnetico[29], la temperatura di bloccaggio risulta essere $T_B \sim 160\text{K}$, molto più alta del valore atteso in via teorica considerando nanoparticelle di magnetite isolate e delle stesse dimensioni di quelle da noi utilizzate in questo lavoro. Stimando infatti la temperatura di bloccaggio attraverso il metodo classico di Bean e Livingston e considerando un tempo di misura $t_m = 100\text{s}$ per questa tecnica sperimentale, la barriera di potenziale si ricava come $KV = 25k_bT_B$, dove $K = 1.1 \cdot 10^5 \text{erg/cm}^3$ è la costante di anisotropia cristallina della magnetite bulk, V è il volume della particella e k_b è la costante di Boltzmann.[4] Considerando particelle con un diametro di 10 nm, la temperatura di bloccaggio sarebbe $T_B \sim 17\text{K}$, quindi un'ordine di grandezza minore rispetto a quella effettivamente misurata.

L'alto valore sperimentale di T_B rivela la presenza di interazioni magnetiche tra le nanoparticelle; le interazioni, infatti, provocano un aumento delle barriere energetiche effettive

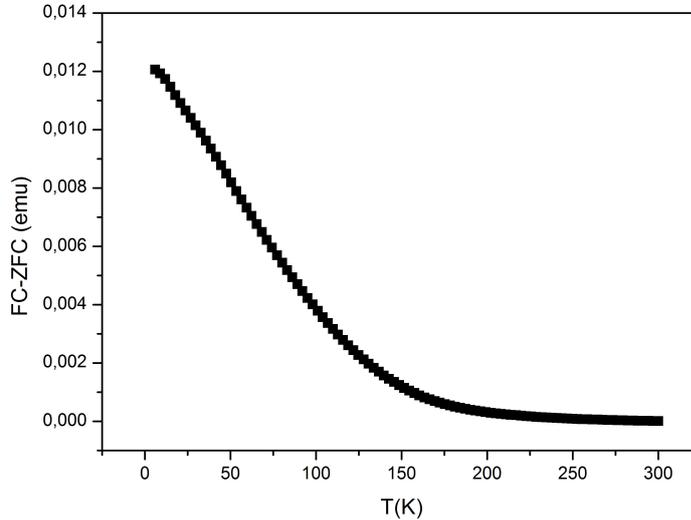


Figura 4.6: Irreversibilità vs. Temperatura, NPMagn

di anisotropia e di conseguenza anche delle temperature necessarie ad apportare sufficiente energia termica per superarle ed entrare nel regime superparamagnetico.[2] Continuando l'analisi delle misure ZFC-FC, è stata calcolata la derivata rispetto alla temperatura della differenza dei valori FC e di quelli ZFC, $-\frac{d(M_{FC}-M_{ZFC})}{dT}$. Le curve ottenute, normalizzate per la propria area, vengono mostrate in figura 4.7.

Come spiegato nel primo capitolo, in caso di fenomeni di rilassamento indipendenti, questa curva riflette la distribuzione delle barriere energetiche di anisotropia del sistema, strettamente connessa alla distribuzione volumica.[5] Il rilassamento non può essere considerato indipendente per le interazioni presenti tra le nanoparticelle, tuttavia si possono ottenere informazioni qualitative dall'analisi delle curve e dal confronto con quelle analoghe relative ai campioni contenenti idrossiapatite. Riferendoci quindi alla figura 4.7, per un campo applicato di 20 Oe, la distribuzione presenta un massimo a $T \sim 50K$ molto allargato verso valori di temperatura più alta consistentemente con la presenza di interazioni magnetiche. Aumentando il campo applicato si può vedere come la distribuzione di energie di barriera, oltre che restringersi, si sposti verso valori di temperatura più bassa come ci si aspetta per un insieme di particelle che rilassano quasi indipendentemente; possiamo quindi parlare di superparamagnetismo interagente.

Collegando gli studi che stiamo presentando ora con quelli svolti sui cicli di isteresi, si può come per un campo applicato di 20 Oe, ad una temperatura di 100K, il sistema sia comunque molto lontano dal regime superparamagnetico nonostante le precedenti misure di H_C e M_r fornissero valori praticamente nulli per queste grandezze. Questo può essere attribuibile alle forti interazioni di natura dipolare tra le nanoparticelle che tendono a

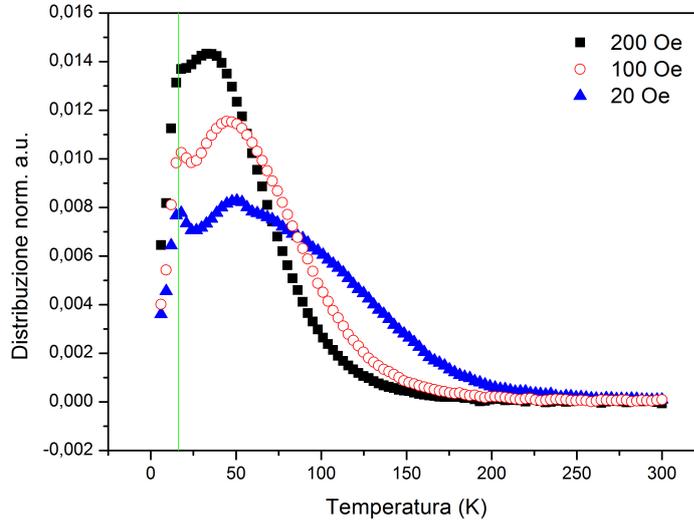


Figura 4.7: Energie di barriera normalizzate in funzione della temperatura, NPMagn

smagnetizzare il campione portandolo verso comportamenti magnetici più *soft*.

Al di sotto dei 20K è visibile un picco nelle distribuzioni di energia di barriera che non si sposta al variare del campo applicato, evidenziato in figura 4.7 con una linea verde. Questo fa supporre la presenza di uno stato collettivo magnetico *spin-glass like* a temperature molto basse evidenziando ulteriormente il ruolo delle interazioni magnetiche tra le particelle. Uno stato magnetico a vetro di spin infatti si può originare dalla frustrazione delle interazioni dipolari competitive che possono essere, a seconda, ferromagnetiche o antiferromagnetiche.[30] La rapida crescita di H_C passando dalla temperatura di 25K alla temperatura di 5K rafforza ulteriormente questa interpretazione.

Un metodo per studiare la natura delle interazioni magnetiche presenti all'interno di sistemi di nanoparticelle magnetiche è l'analisi della *isothermal remanence curve* (IRM) e della *demagnetised remanence curve* (DCD).[31]

In una misura IRM il campione è inizialmente nello stato smagnetizzato e la magnetizzazione rimanente viene di volta in volta registrata dopo l'applicazione e la rimozione in sequenza di un campo magnetico crescente, fino ad un valore massimo di campo del valore di 50kOe. In una misura DCD il campione è inizialmente nello stato magnetizzato ad un campo applicato $H=50kOe$; successivamente la magnetizzazione rimanente viene registrata dopo aver sequenzialmente applicato e rimosso un campo applicato negativo di valore assoluto crescente. In entrambi i casi i valori di rimanenza ottenuti vengono plottati in funzione del campo magnetico applicato. I risultati per il campione NPMagn, raccolti ad una temperatura $T=5K$ sono mostrati in figura 4.8: le curve IRM e DCD

sono normalizzate per il valore positivo di rimanenza di saturazione e vengono indicate rispettivamente con m_R e m_D . In un sistema magnetico che consiste di particelle con ani-

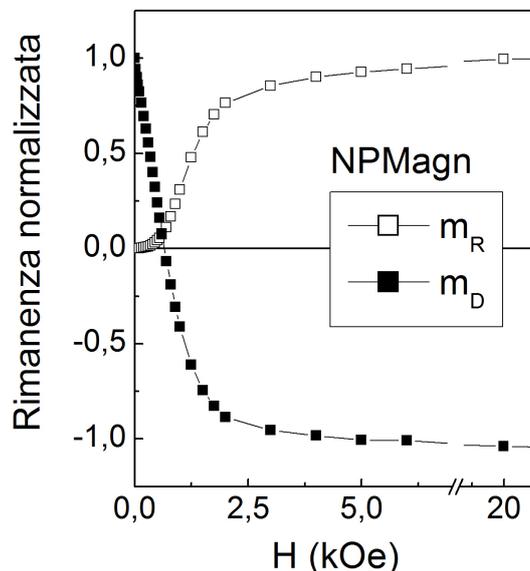


Figura 4.8: Misure DCD e IRM per il campione NPMagn

sotropia uniassiale e non interagente, m_R e m_D sono correlate dalla relazione di Wohlfart 4.1.[32]

$$m_D(H) = 1 - 2m_R(H) \quad (4.1)$$

Eventuali deviazioni da una relazione lineare tra le due grandezze derivano da un accoppiamento magnetico tra le particelle e possono essere rivelate plottando il parametro $\Delta M(H) = m_D(H) - [1 - 2m_R(H)]$ in funzione di H , facendo quello che viene chiamato un ΔM -plot.[31] Un valore positivo di ΔM è usualmente ascrivibile all'accoppiamento di scambio tra le particelle mentre un valore negativo è una indicazione che le interazioni smagnetizzanti dipolari sono predominanti. I ΔM -plot a $T=5K$ e $T=25K$ sono mostrati in figura 4.9; si ottengono valori negativi ad entrambe le temperature di misura, confermando che le interazioni dipolari sono dominanti nel controllo del comportamento magnetico delle nanoparticelle di Fe_3O_4 nello stato *as-prepared*. Questa conclusione è in accordo con la presenza di gruppi OH^- sulla superficie delle nanoparticelle che di conseguenza sono separate per quanto riguarda l'accoppiamento magnetico di scambio. Il valore assoluto del picco nel ΔM -plot è una rappresentazione della intensità delle interazioni magnetiche mentre la sua posizione lungo l'asse x , che indichiamo con H_P , può essere considerata una misura della resistenza della magnetizzazione rimanente al rovesciamento e quindi della durezza magnetica effettiva del sistema.[33]

Dall'analisi dei dati si riscontra come il valore di H_P sostanzialmente raddoppi passando dalla temperatura di $T=25K$ a quella di $T=5K$, andando da ~ 400 Oe a ~ 800 Oe,

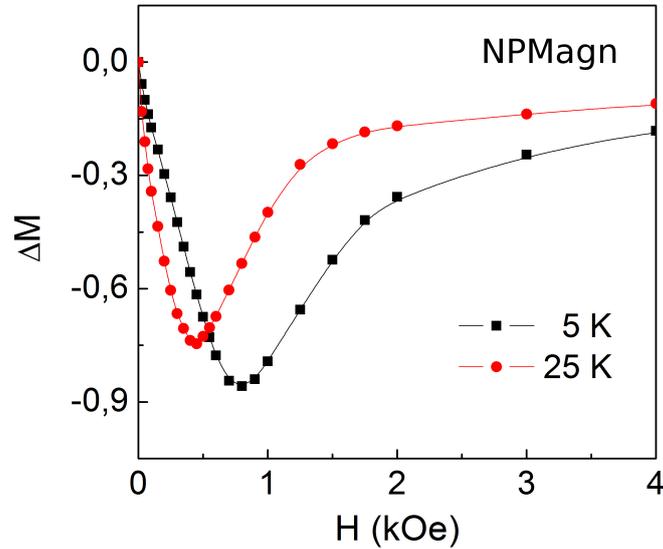


Figura 4.9: ΔM -plot, NPMagn

comportandosi quindi come il coercitivo H_C . Questo comportamento è coerente con l'esistenza di un regime *frozen cluster-glass* a temperature molto basse.

4.2.2 Analisi SQUID di MagnHA1 e MagnHA2

Prima di concentrarci sui campioni MagnHA1 e MagnHA2, contenenti le nanoparticelle di magnetite, è bene illustrare il comportamento magnetico della idrossiapatite pura (HA) in modo da poter meglio interpretare le misure successive tenendolo come riferimento.

In letteratura l'idrossiapatite viene sempre considerata come un materiale diamagnetico.[34] In realtà, dai cicli di isteresi condotti alle temperature $T = 5K$ e $T = 100K$, si evince che mentre a $T = 5K$ il materiale è paramagnetico, a $T = 100K$ domina il comportamento diamagnetico.(fig. 4.10) Il comportamento paramagnetico a basse temperature viene confermato dall'andamento divergente della magnetizzazione in funzione della temperatura quando quest'ultima tende a 0 in un campo applicato $H_{appl} = 10kOe$, come si vede in figura 4.11. Il comportamento paramagnetico a basse temperature può essere associato alla massiccia presenza di gruppi OH^- sulla superficie dei *platelets* di idrossiapatite. Nel suo stato elettronico fondamentale, infatti, il gruppo OH^- è paramagnetico con un momento associato di $2\mu_B$, indicando con μ_B il magnetone di Bohr.[35] Il paramagnetismo a basse temperature dell'HA in effetti caratterizza in modo evidente l'evoluzione termica della magnetizzazione come viene mostrato in figura 4.12 dove le curve di M vs. T per i campioni MagnHA1 e MagnHA2 sono mostrate insieme a quella del campione NPMagn, per un campo applicato $H_{appl} = 50kOe$. Tramite misure di magnetizzazione

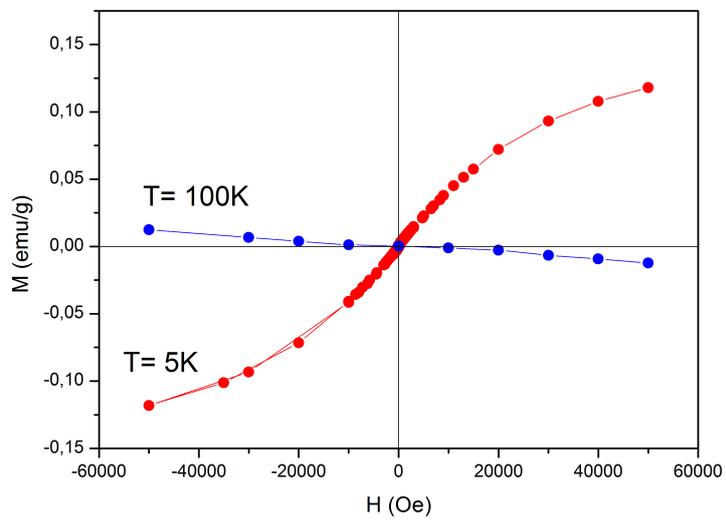


Figura 4.10: Cicli di isteresi HA

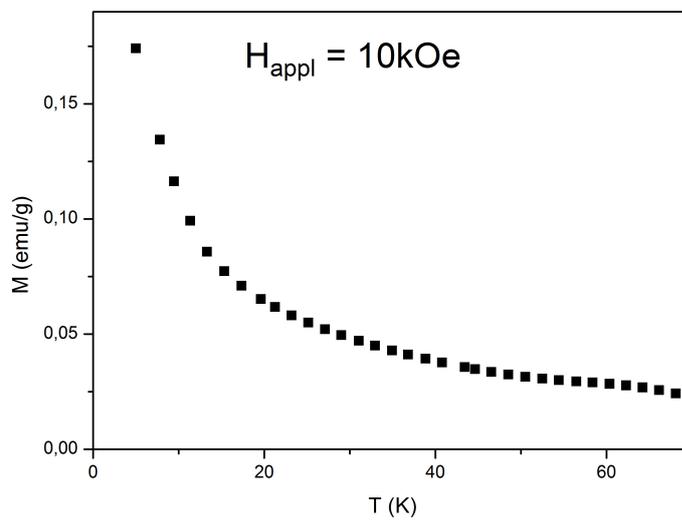


Figura 4.11: M vs. T , $H_{appl}=10kOe$, HA

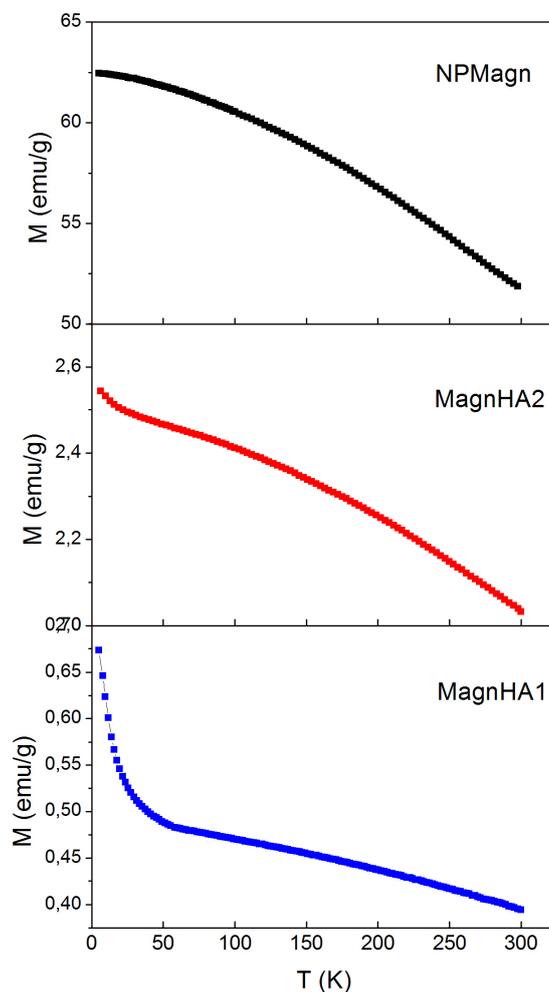


Figura 4.12: M vs. T , $H_{appl}=50\text{kOe}$

condotte alla temperatura di 300K si è potuto stimare, come già anticipato, il contenuto di magnetite nei campioni MagnHA1 e MagnHA2, rispettivamente dello 0.8wt.% e del 4wt.%. (vd. tabella 4.1)

Le misure attraverso le quali determinare la concentrazione di nanoparticelle di Fe_3O_4 sono state condotte alla temperatura ambiente in modo da minimizzare il contributo paramagnetico dell'idrossiapatite presente a basse temperature.

Passiamo quindi alla presentazione dell'analisi magnetica dei campioni MagnHA1 e MagnHA2 condotta attraverso il magnetometro SQUID. Come per il campione NPMagn, sono stati effettuati cicli di isteresi a varie temperature in modo da ricavare l'andamento del campo coercitivo H_C e della rimanenza M_r in funzione della temperatura stessa. I cicli di isteresi, analogamente a quanto fatto per il campione NPMagn, sono stati ottenuti alle temperature di 6K, 25K, 50K, 75K, 100K, 150K, 200K e 300K.

Tabella 4.1: Valori di magnetizzazione per i campioni sintetizzati

Campione	$M_{(5T-6K)}(\pm 0.01)$ (emu/g)	$M_{(S-6K)}(\pm 0.05)$ (emu/g)	$M_{(r-6K)}/M_{(5T-6K)} (\pm 0.02)$	Fe_3O_4 wt. (%)
NPMagn	62.51	67.7	0.20	-
MagnHA1	0.67	0.77	0.22	0.78 ± 0.02
MagnHA2	2.62	2.83	0.19	4.10 ± 0.08

In figura 4.13 vengono mostrati i cicli ottenuti con il campione MagnHA2 alle temperature di 6K e di 300K; i cicli ottenuti con il campione MagnHA1 non vengono mostrati in quanto totalmente simili a quelli presentati.

Gli andamenti del campo coercitivo e della rimanenza rispecchiano essenzialmente

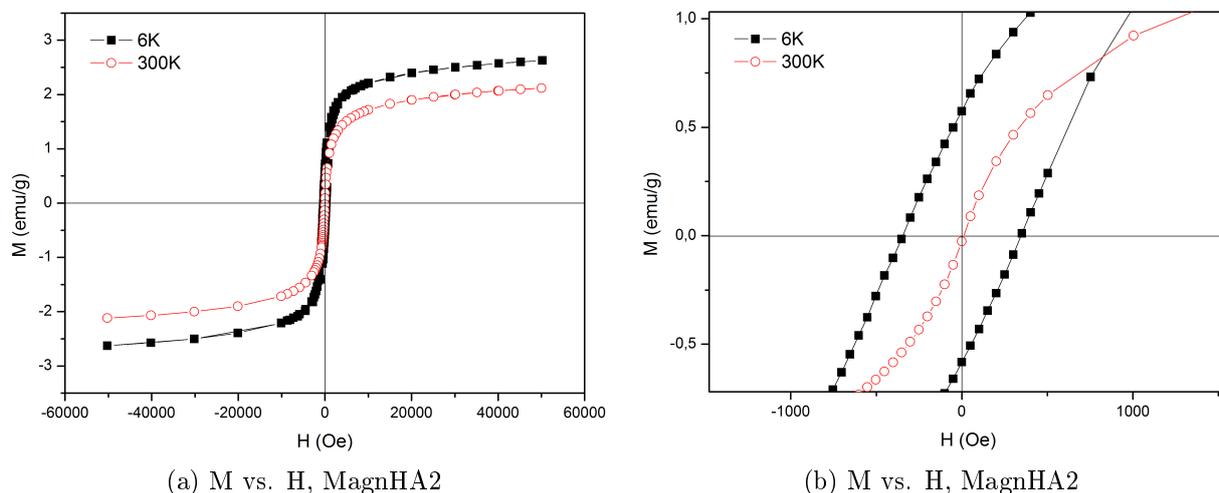


Figura 4.13

quelli già visti nel caso del campione NPMagn (fig. 4.14) così come anche il rapporto M_{r-6K}/M_{5T-6K} per entrambi i campioni MagnHA1 e MagnHA2. (tabella 4.1)

Dai risultati ottenuti attraverso i cicli di isteresi si può quindi notare una complessiva similarità nei comportamenti magnetici dei tre campioni; la presenza dell'idrossiapatite non influenza quindi eccessivamente le caratteristiche magnetiche trasmesse ai campioni dalle nanoparticelle magnetiche.

Per confermare la similarità delle caratteristiche magnetiche sono state condotte misure ZFC-FC sui campioni MagnHA1 e MagnHA2 ottenendone le distribuzioni di barriere energetiche. In particolare in figura 4.15a viene mostrato un confronto tra l'andamento delle distribuzioni delle energia di barriera per i tre campioni, normalizzate per la propria area, in presenza di un campo applicato $H_{appl} = 200e$, mentre in figura 4.15b abbiamo inserito un ingrandimento della figura a sinistra, nella zona dei picchi, per mostrare la

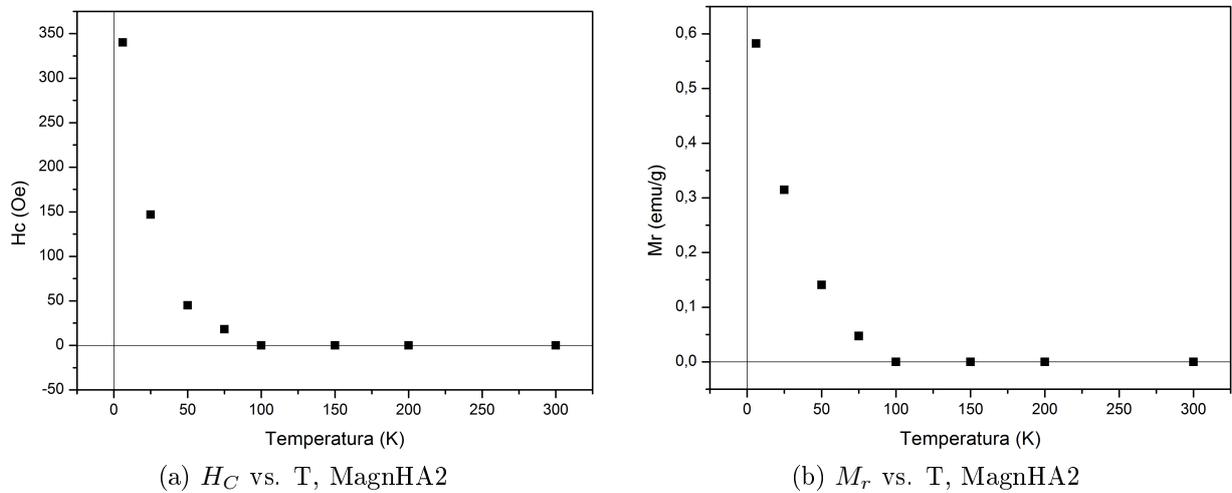


Figura 4.14

presenza anche in questi campioni del picco alla temperatura di 20K. Le distribuzioni

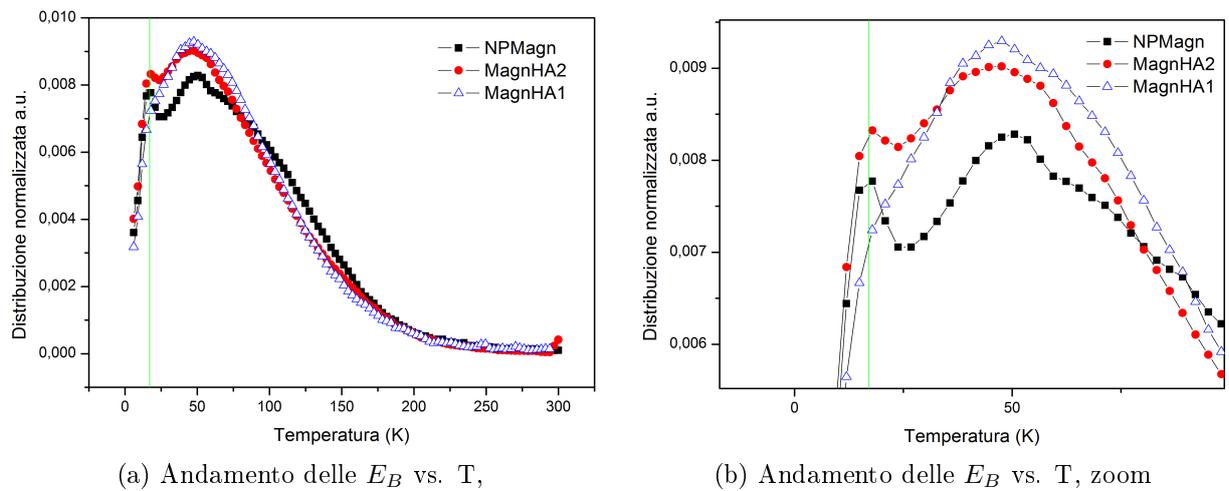


Figura 4.15

energetiche appaiono molto simili, con la differenza che per i campioni MagnHA1 e MagnHA2 sono leggermente più strette nel range di temperature intermedie. In particolare, come già detto, è presente in tutti i campioni il picco alla temperatura $T \sim 20K$, meno visibile per il campione MagnHA1. Questo fatto denota come le interazioni magnetiche tra le nanoparticelle di magnetite siano sostanzialmente le stesse pur con una loro bassa concentrazione, portando ad una similarità nelle distribuzioni delle energie di anisotropia effettive. Questi dati rivelano che le nanoparticelle magnetiche non si disperdono in modo omogeneo all'interno della matrice di HA durante la sintesi in quanto questo com-

porterebbe una forte riduzione delle interazioni magnetiche tra di esse; bensì i risultati indicano che le nanoparticelle di Fe_3O_4 incorporate nell'HA formano degli agglomerati più o meno estesi, dominati magneticamente da interazioni dipolari simili a quelle presenti all'interno del campione NPMagn.

L'analisi condotta attraverso le misure DCD e IRM supporta questa conclusione. A $T=5K$ il ΔM -plot per i tre campioni è infatti interamente negativo, come si vede in figura 4.16. Si vede una piccola riduzione nel valore assoluto di picco di ΔM passando dal

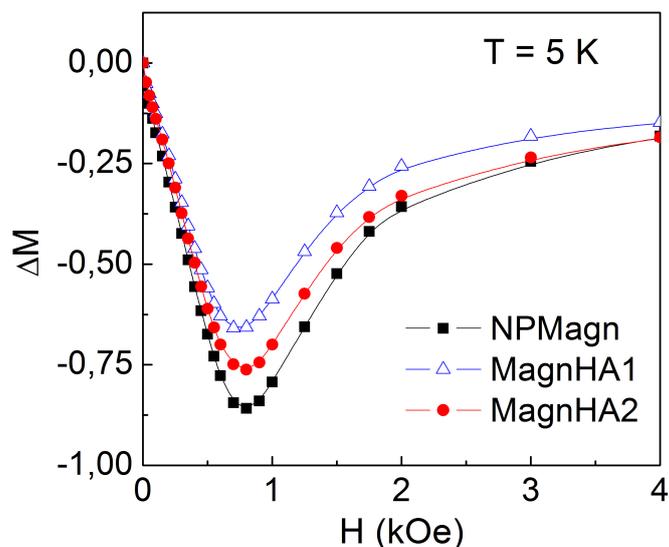


Figura 4.16: ΔM -plot

campione NPMagn al campione MagnHA2. Persino nel campione MagnHA1, dove il contenuto di magnetite è inferiore all'1 wt.%, le interazioni dipolari influenzano chiaramente il processo di magnetizzazione. È inoltre evidente dalla figura 4.16 che sostanzialmente la posizione di H_P lungo l'asse x non cambia in accordo con i valori molto simili di H_C misurati per i tre campioni.

Questi risultati indicano che le nanoparticelle non sono disperse in modo omogeneo all'interno della matrice di idrossiapatite poiché questo abbasserebbe considerevolmente le interazioni magnetiche tra di esse, specialmente nel campione MagnHA1 o, in ogni caso, altererebbero la distribuzione delle barriere energetiche di anisotropia.

I risultati magnetici, affiancati alle immagini TEM raccolte, indicano quindi che anche nei campioni MagnHA1 e MagnHA2, come nel campione NPMagn, le nanoparticelle di magnetite sono per la maggior parte disposte in agglomerati, dominati magneticamente dalle interazioni dipolo-dipolo. Le misure magnetiche condotte quindi confermano l'idea che gli agglomerati di nanoparticelle si formino già nello stato *as-prepared* a causa dell'intreccio delle interazioni dipolari ed elettrostatiche e dei legami chimici. In quest'ottica, la

crescita successiva della fase di idrossiapatite si sviluppa attorno agli interi agglomerati non rompendoli ma tendendo a separarli frapponendosi tra di essi.

Capitolo 5

Analisi magnetica: Mossbauer

In questo capitolo ci occupiamo di presentare l'analisi magnetico-strutturale dei campioni presentati nei precedenti capitoli, condotta attraverso lo spettrometro Mössbauer. Il capitolo è suddiviso in due parti. Nella prima parte viene illustrata la teoria alla base della tecnica sperimentale oggetto di questo capitolo. Nella seconda parte vengono mostrati e discussi i risultati ottenuti.

5.1 Principi di funzionamento

L'effetto Mössbauer fu scoperto nel 1957 dall'omonimo fisico che all'epoca stava effettuando esperimenti per il conseguimento della sua tesi di dottorato. La scoperta gli valse il premio Nobel nel 1961. L'effetto si basa sull'assorbimento risonante di raggi γ da parte di nuclei atomici. I livelli energetici nucleari sono tipici di una particolare specie atomica e di conseguenza i raggi γ che vengono emessi a seguito di un processo di diseccitamento possono essere riassorbiti solo da nuclei della stessa specie atomica rendendo il processo di assorbimento risonante molto specifico e selettivo. In realtà i livelli energetici non possono essere definiti attraverso un unico valore di energia ma è necessario associare una incertezza Γ ad ogni livello, derivante dal tempo di vita medio del livello stesso e descrivibile tramite il principio di indeterminazione di Heisenberg.(eq. 5.1)

$$\Delta E = \Gamma = \frac{\hbar}{\tau} \quad (5.1)$$

dove \hbar è la costante di Planck divisa per 2π , corrispondente al valore di $6.5822 \cdot 10^{-16}$ (eV·s) e τ è il tempo di vita medio specifico del livello.

La specie atomica più utilizzata per condurre questo tipo di misure è il ^{57}Fe . Per quanto riguarda appunto il ^{57}Fe , il suo stato eccitato ha una energia di 14.4 keV con un tempo di vita media $\tau = 1,43 \cdot 10^{-7}\text{s}$ e quindi una larghezza relativa di banda del livello energetico di ampiezza $\frac{\Gamma}{E} = 3 \cdot 10^{-13}$. Nell'emissione di radiazione da parte di un nucleo eccitato

devono ovviamente valere i principi di conservazione dell'energia e della quantità di moto e di conseguenza, supponendo il nucleo emittente fermo prima del processo, si risconterà un rinculo dello stesso con momento pari a quello del fotone emesso (eq.5.2).

$$p_n = p_\gamma = \frac{E_\gamma}{c} \quad (5.2)$$

dove c è la velocità della luce, p_n il momento di rinculo del nucleo e p_γ quello del fotone emesso. Considerando l'energia di rinculo del nucleo, non serve utilizzare le formule relativistiche se la consideriamo sufficientemente piccola ($E_r \ll Mc^2$) e possiamo scrivere che:

$$E_r = \frac{p_n^2}{2M} = \frac{E_\gamma^2}{2Mc^2} = \frac{E_0^2}{2Mc^2} \quad (5.3)$$

dove E_0 è l'energia della transizione nucleare. Riferendoci al ^{57}Fe , l'energia di rinculo risulta essere $1,95 \cdot 10^{-3}$ eV.

Esattamente come si ha una perdita di energia per il rinculo durante l'emissione del raggio γ , si deve considerare che per eccitare un nucleo della stessa specie non basta la sola energia E_0 relativa alla pura differenza energetica tra i livelli nucleari eccitato e fondamentale ma è necessario aggiungere l'energia relativa al rinculo che si presenta anche nel momento dell'assorbimento. Conseguentemente a quanto appena descritto, l'energia del raggio necessaria perché vi sia assorbimento risonante deve essere $E_\gamma = E_0 + E_r$.(fig. 5.1) Analizzando quindi le linee di emissione e di assorbimento, queste

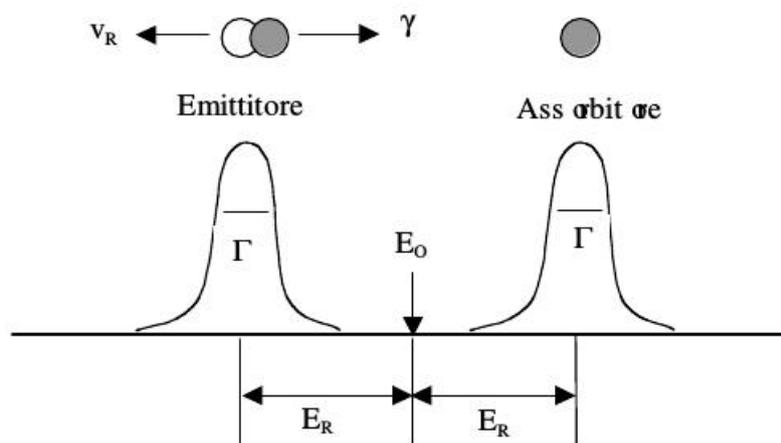


Figura 5.1: Rappresentazione della differenza tra energia di rinculo e assorbimento

risultano essere separate da una un'energia pari a $2E_r$ che nel caso del ^{57}Fe è $\sim 10^6$ volte maggiore della larghezza naturale di linea Γ che abbiamo valutato precedentemente. Questo fatto comporta che le due bande energetiche di emissione e di assorbimento non

si sovrappongono e che l'assorbimento risonante non possa quindi verificarsi. Per ovviare a questa problematica si possono sfruttare due possibili meccanismi:

- mediante il movimento dell'emettitore rispetto l'assorbitore viene introdotto un termine energetico dovuto all'effetto Doppler variando l'energia del fotone secondo la relazione $E_\gamma = E_0 - E_r + E_D$ nella quale $E_D = \frac{v}{c} E_\gamma \cos \alpha$ rappresenta l'energia associata allo spostamento in cui α è l'angolo tra il momento dell'atomo emettitore ed il momento del fotone emesso.
- si può aumentare la temperatura dell'emettitore e dell'assorbitore. L'agitazione termica infatti provoca un allargamento di entrambe le bande ed è possibile riuscire a farle sovrapporre benchè l'intensità della risonanza sia molto bassa.

R. Mössbauer osservò che l'assorbimento risonante nei nuclei atomici aumenta a bassa temperatura. Questo strano fenomeno pareva indicare che tanto l'emissione quanto l'assorbimento della radiazione gamma avvenissero senza il rinculo dei nuclei. Il fenomeno si può spiegare in questo modo: se E_r è piccola rispetto all'energia di legame dell'atomo emittente al solido ($\sim 10\text{eV}$) ma confrontabile o superiore all'energia per la creazione di un fonone ($\sim 10^{-3}\text{eV}$), l'atomo rimane legato al solido ma E_r si dissipa al suo interno tramite la creazione di fononi; se d'altra parte E_r è piccola rispetto sia all'energia di legame sia all'energia per la creazione di un fonone, il nucleo si comporterà come se fosse rigidamente legato al solido; in tal modo l'energia di rinculo si dissipa nell'intero solido quindi la massa M presente nella formula 5.3 è la massa macroscopica del campione ed E_r risulta trascurabile. Questo comporta che la distanza tra le bande energetiche di emissione e di assorbimento si riduca notevolmente e sia di conseguenza possibile l'assorbimento risonante. La frazione di raggi γ che è emessa (o assorbita) senza perdita di energia dovuta al rinculo è legata alle proprietà dinamiche del reticolo del solido in cui i nuclei emittitori (o assorbitori) sono inglobati. La frazione di eventi in cui l'emissione (o l'assorbimento) avviene senza rinculo è data dal *fattore* f definito come:

$$f = e^{-k^2 \langle x^2 \rangle} \quad (5.4)$$

dove k è il vettore d'onda del fotone e $\langle x^2 \rangle$ è il valore quadratico medio dell'ampiezza di vibrazione del nucleo emettitore (o assorbitore) nella direzione di propagazione della radiazione. Per il ^{57}Fe , il fattore f è 0.91 a temperatura ambiente. Dall'equazione 5.4 possiamo trarre le seguenti conclusioni:

- il numero di transizioni senza rinculo dipende dall'energia del fotone e per alti valori energetici è trascurabile;
- la risonanza è tanto maggiore quanto minori sono le ampiezze di vibrazione $\langle x^2 \rangle$ e quindi la temperatura T .

È quindi possibile osservare processi di emissione e assorbimento di radiazione γ per nuclei atomici identici quando le transizioni avvengono senza il rinculo dei nuclei. La larghezza della linea energetica è estremamente sottile e coincide con l'ampiezza naturale ($\Gamma = 10^{-9}$ eV). La risoluzione di questa tecnica sperimentale è dell'ordine di 10^{-13} eV e ci permette quindi di risolvere gli sdoppiamenti dei livelli energetici che vengono prodotti dalle interazioni iperfini. Lo spettro Mössbauer è composto da una singola linea di assorbimento solo se i livelli energetici nucleari coinvolti nella transizione non sono divisi dalle interazioni iperfini nella sorgente e nell'assorbitore. Ci sono essenzialmente due tipi di informazione che si possono ottenere analizzando e studiando gli spettri Mössbauer. Le linee assolute e relative dello spettro sono determinate da effetti elettronici sui livelli energetici nucleari che si raggruppano nella denominazione *parametri iperfini*. A loro volta questi parametri sono suddivisibili in tre contributi distinti:

- spostamento isomerico;
- interazione iperfine di quadrupolo elettrico;
- interazione iperfine di dipolo magnetico.

La seconda tipologia di informazioni si ricava studiando le intensità relative delle linee di assorbimento e risiede in:

- determinare le direzioni relative tra gli assi cristallini, il campo iperfine e la direzione di emissione del raggio γ ;
- shift Doppler di secondo ordine che essenzialmente è uno spostamento dell'intero spettro derivante dalle vibrazioni dello ione Mössbauer eccitate termicamente.

In questo lavoro di tesi ci concentriamo sulla prima tipologia di informazioni e qui di seguito illustriamo il significato dei tre termini che entrano in campo nella determinazione dello spettro.

5.1.1 Spostamento Isomerico

Lo spostamento isomerico, anche chiamato interazione monopolare elettrica, deriva dall'interazione elettrostatica tra la distribuzione di nube elettronica che ha una certa probabilità di trovarsi nel nucleo e la carica nucleare stessa. Questa interazione produce uno spostamento energetico sia del livello fondamentale sia dello stato eccitato (fig. 5.2). Da questo spostamento energetico si possono ottenere informazioni dirette sulla densità elettronica al nucleo e quindi informazioni sullo stato di valenza dello ione sotto esame. [36]

Per un nucleo semisferico carico di raggio $\langle r \rangle$ possiamo scrivere l'interazione come:

$$\delta E = \frac{2}{5}\pi Z e^2 \Psi^2(0) \langle r^2 \rangle \quad (5.5)$$

dove Z è il numero atomico, e la carica elettronica e $\Psi^2(0)$ rappresenta la densità elettronica al nucleo espressa come quadrato della funzione d'onda corrispondente. Il valore di $\langle r^2 \rangle$ è diverso per ogni stato eccitato e di conseguenza lo spostamento δE varia per ogni livello nucleare. Considerando che i raggi dello stato fondamentale e dello stato ec-

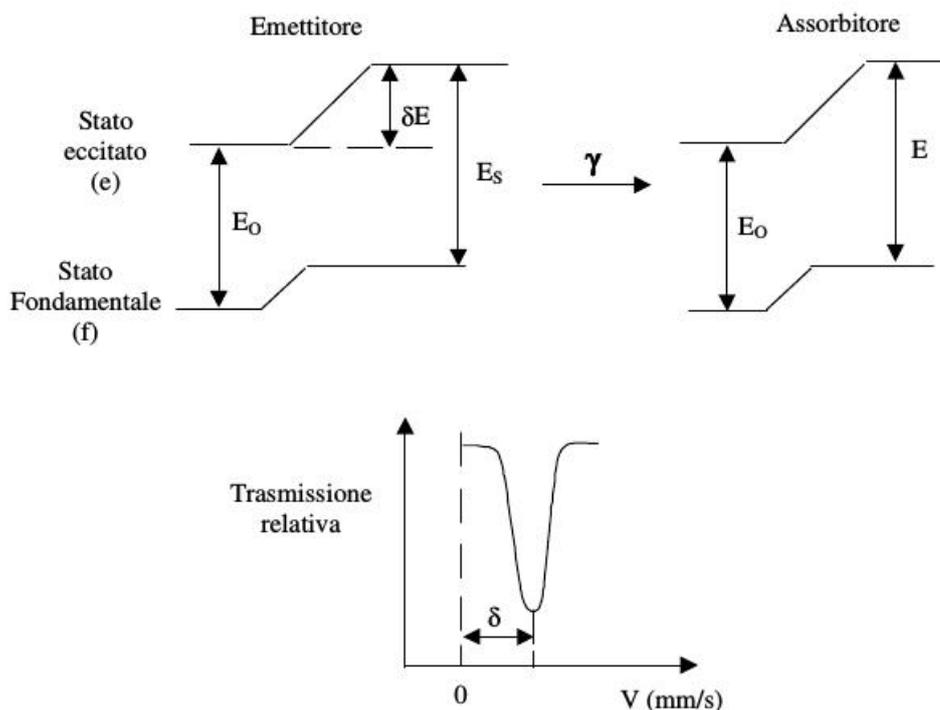


Figura 5.2: Spostamento dei livelli energetici a causa dell'interazione monopolare elettrica e spettro Mössbauer relativo

citato sono diversi, in una transizione nucleare tra lo stato eccitato e quello fondamentale avremo uno spostamento isomerico dato da:

$$\delta E_e - \delta E_g = \frac{2}{5} \pi Z e^2 \Psi^2(0) (\langle r \rangle_e^2 - \langle r \rangle_g^2) \quad (5.6)$$

che rappresenta quindi la differenza netta nell'energia del raggio γ in emissione e assorbimento derivante dalla densità elettronica nel nucleo. Quello che si osserva in una misura Mössbauer (e che viene definito come spostamento isomerico) è essenzialmente la differenza tra queste variazioni energetiche tra l'atomo assorbitore (A) e l'atomo sorgente (S). Supponendo un nucleo sferico di raggio R , l'isomer shift può quindi esprimersi come:

$$\delta = \frac{4}{3} \pi Z e^2 R^2 \frac{\Delta R}{R} (\Psi_A^2(0) - \Psi_S^2(0)) \quad (5.7)$$

dove $\frac{\Delta R}{R}$ è la variazione relativa del raggio tra lo stato eccitato e lo stato fondamentale mentre il termine tra parentesi rappresenta la differenza tra le densità elettroniche nel nucleo dell'atomo sorgente e dell'atomo assorbitore. ΔR risulta in ogni caso negativo per il ^{57}Fe perché lo stato eccitato ha un raggio minore di quello dello stato fondamentale. Parlando di densità elettroniche nel nucleo è naturale pensare che gli elettroni che influenzano lo spostamento isomerico siano quelli s . A prescindere dall'ambiente chimico in cui è inserito il ferro, non si riscontrano variazioni nelle bande elettroniche $1s$ e $2s$ mentre quando si considerano gli elettroni $3s$ si manifestano le prime differenze dipendenti dall'ambiente chimico. Nel suo stato fondamentale, il ^{57}Fe ha una struttura elettronica $3s^2 3p^6 3d^6 4s^2$. Ionizzando l'atomo di ferro a seconda del composto in cui viene utilizzato, cambia la configurazione elettronica e di conseguenza anche la densità di elettroni al nucleo. Ad esempio per composti ionici come l' FeCl_3 in cui lo ione ferro ha una valenza $3+$, sono stati rimossi i due elettroni $4s$ ed un elettrone della shell $3d$ spostando quindi il picco di assorbimento verso velocità maggiori. Composti in cui il ferro è ionizzato con valenza $2+$ o $1+$ hanno, nell'ordine, shift isomerici sempre minori perché gli elettroni presenti nella shell d hanno una funzione schermante per gli elettroni $3s$ nei confronti del nucleo.[37]

5.1.2 Sdoppiamento quadrupolare elettrico

L'accoppiamento di quadrupolo elettrico deriva dal fatto che il nucleo non è perfettamente sferico ma può avere una forma più o meno ellissoidale. L'interazione quadrupolare elettrica consiste nell'interazione tra il *momento quadrupolare elettrico* del nucleo (eQ) ed il *gradiente del campo elettrico* nella posizione in cui si trova il nucleo stesso. L'interazione produce uno sdoppiamento nella linea di assorbimento proporzionale alla sua intensità e all'assenza di simmetria del campo elettrico cristallino.(fig. 5.3) I sottolivelli energetici generati attraverso lo splitting di quadrupolo hanno energie date da:

$$E_Q = \frac{eQ}{4I(2I-1)} [3m_I^2 - I(I+1)] \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (5.8)$$

dove I indica lo spin nucleare, m_I identifica la proiezione di I lungo un asse preferenziale (tendenzialmente si sceglie l'asse z) e $\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}}$ è il parametro di asimmetria in cui V_{xx} , V_{yy} e V_{zz} sono le componenti del tensore gradiente di campo elettrico diagonalizzato in un opportuno sistema di riferimento. Come si può evincere dalla formula, in realtà non tutti i livelli energetici vengono splittati dall'interazione di quadrupolo elettrico ma bensì solo quelli con uno spin nucleare complessivo maggiore di $1/2$. Il fatto che, ad esempio per il ^{57}Fe , lo splitting di quadrupolo generi solo due linee spettrali è proprio dovuto al fatto che lo stato nucleare con spin complessivo $I = 1/2$ non viene splittato ma solo perturbato avendo solamente due valori possibili per m_I con $I_z = \pm 1/2$ che risultano essere degeneri.(fig. 5.3)

Nello spettro Mössbauer si osservano due linee risonanti che corrispondono alle transizioni

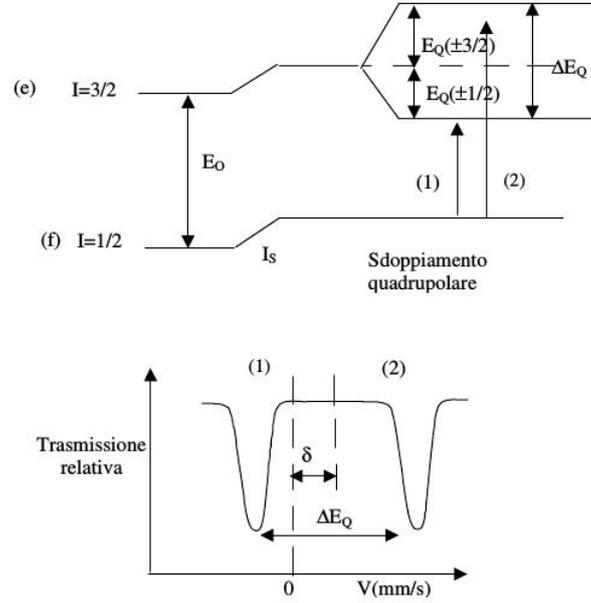


Figura 5.3: Rappresentazione schematica dello sdoppiamento quadrupolare elettrico

permesse dalla regola di selezione $\Delta m_I = 0, \pm 1$ e formano quello che viene chiamato *doppetto quadrupolare* in cui la distanza tra le due linee è data da $\Delta E_Q = eQV_{zz}/2$. Per quanto riguarda l'espressione 5.8, l'informazione che può essere ricavata dall'interazione di quadrupolo può essere fattorizzata in una parte strettamente nucleare, rappresentata dal parametro Q , ed in una dovuta allo ione e all'ambiente in cui è inserito, rappresentata dal gradiente di campo elettrico $-eq$; questa seconda grandezza rappresenta la parte rilevante negli studi di fisica dello stato solido.[36]

5.1.3 Interazione iperfine di dipolo magnetico

L'interazione di dipolo magnetico, anche denominata *effetto Zeeman*, deriva dall'accoppiamento del momento magnetico nucleare con il campo magnetico effettivo presente nel nucleo e si traduce in uno splitting degli stati nucleari eccitati e fondamentale nel caso in cui abbiano $I > 0$. L'interazione tra il momento magnetico nucleare $\vec{\mu}$ ed il campo magnetico presente nel nucleo \vec{H} è data da:

$$H_m = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} = -g\mu_n \vec{I} \cdot \vec{H} \quad (5.9)$$

dove μ_n è il magnetone nucleare. L'interazione separa ogni stato nucleare con spin $I > 0$ in $2I + 1$ sottolivelli non degeneri con energia definita dagli autovalori:

$$E_m = -\frac{\mu_n H m_I}{I} = -g\mu_n H m_I \quad (5.10)$$

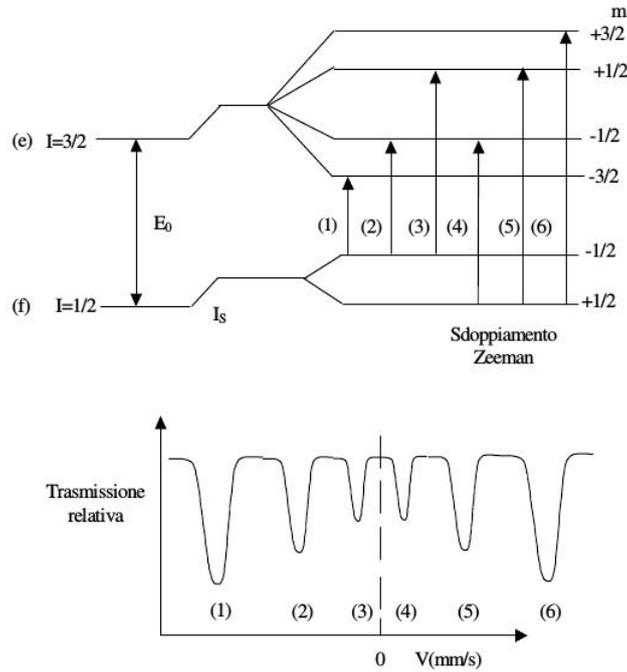


Figura 5.4: Rappresentazione schematica dell'effetto Zeeman

in cui $m_I = I, I - 1, \dots, -I$ e g è il fattore di Landè. Il campo iperfine generato da un singolo elettrone è dato dalla formula 5.11.

$$H = -2\mu_B \left[\frac{8\pi}{3} \psi^2(0)(s) + \left(\frac{1}{r^3} \right) + \left(\frac{3\vec{r}(\vec{s} \cdot \vec{r}) - r^2 s}{r^5} \right) \right] \quad (5.11)$$

Dalla formula 5.11 si evince come vi siano in realtà 3 contributi a definire nel complesso il campo iperfine presente nel nucleo. Il primo contributo, primo termine nella formula, è chiamato *interazione di contatto di Fermi* ed è dovuto agli elettroni s presenti nel nucleo. Nel caso di atomi magnetici come il ^{57}Fe gli elettroni della shell $3d$ polarizzano gli elettroni s interni attraverso l'interazione di scambio. Il secondo contributo deriva dal movimento degli elettroni negli orbitali, moto che viene anche chiamato per l'appunto corrente orbitale. Il terzo contributo deriva dall'interazione dipolare dovuta agli spin elettronici esterni. Le transizioni permesse che vengono rilevate tramite a tecnica Mössbauer seguono la regola di selezione per le transizioni magnetiche nucleari:

- $\Delta I = 1;$
- $\Delta m_I = 0, \pm 1.$

e di conseguenza sono visibili in totale 6 linee spettrali.

5.2 Risultati sperimentali

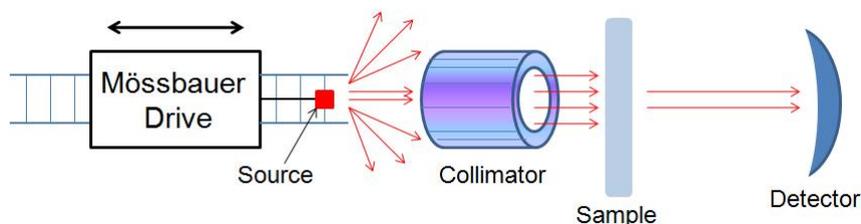


Figura 5.5: Rappresentazione schematica dello spettrometro Mössbauer

Gli spettri sono stati raccolti utilizzando uno spettrometro in trasmissione tradizionale, con una velocità massima della sorgente impostata a 11.433 mm/s. Tramite lo spettrometro Mössbauer è stato caratterizzato il campione NPMagn alle temperature di 28K(fig. 5.7a), 50K(fig. 5.8a), 100K(fig. 5.8c), 150K(fig. 5.8e), 180K(fig. 5.9a) e 300K(fig. 5.12). Non è stato possibile analizzare in modo approfondito, con questa tecnica sperimentale, i campioni MagnHA1 e MagnHA2; la presenza molto bassa di Fe_3O_4 impedisce una buona risoluzione negli spettri ottenuti essendo l'area risonante proporzionale alla concentrazione di atomi di ^{57}Fe nel campione. La bassa presenza di atomi di ferro si affianca alle caratteristiche tipiche dei sistemi nanostrutturati di questo tipo nei quali i forti effetti superficiali fanno collapsare i due sestetti tipici della magnetite in un unico sestetto allargato ed in cui il fenomeno del superparamagnetismo dovuto alle particelle più piccole è permanente. Per il campione MagnHA2 è stato quindi ricavato solo lo spettro alla temperatura di 300K.(fig. 5.6) Come si può vedere dalla figura 5.6 l'area risonante complessiva del doppietto è molto piccola e di conseguenza, se si pensa di doverla suddividere su un intero sestetto, il fondo dello spettro renderebbe essenzialmente invisibile il dato di interesse sperimentale. Per fittare gli spettri Mössbauer è stato utilizzato il software apposito NORMOS mentre le immagini allegate sono state successivamente elaborate attraverso il software Origin.

Iniziando l'analisi degli spettri Mössbauer dalle temperature più basse, ci siamo dapprima concentrati sullo spettro ottenuto a $T=28K$.(fig. 5.7a) In figura sono mostrati lo spettro ed il fit ad esso associato.

Da una prima analisi dello spettro risulta da subito evidente il fatto che non sia possibile identificare i due sestetti tipici della magnetite bulk, relativi ai diversi siti reticolari del ferro, ma bensì un unico sestetto con picchi allargati. Questo è tipico di campioni costituiti di particelle di piccole dimensioni, consistentemente quindi con quanto rilevato dal TEM e dall'XRD. In particolare quello che avviene a basse dimensioni è che gli effetti superficiali aumentano enormemente ed i due sestetti legati alle diverse posizioni del ferro nel reticolo cristallino della magnetite collapsano in un unico sestetto allargato.[2, 38] Per fittare quindi i dati raccolti è stato necessario servirsi di distribuzioni di campi iper-

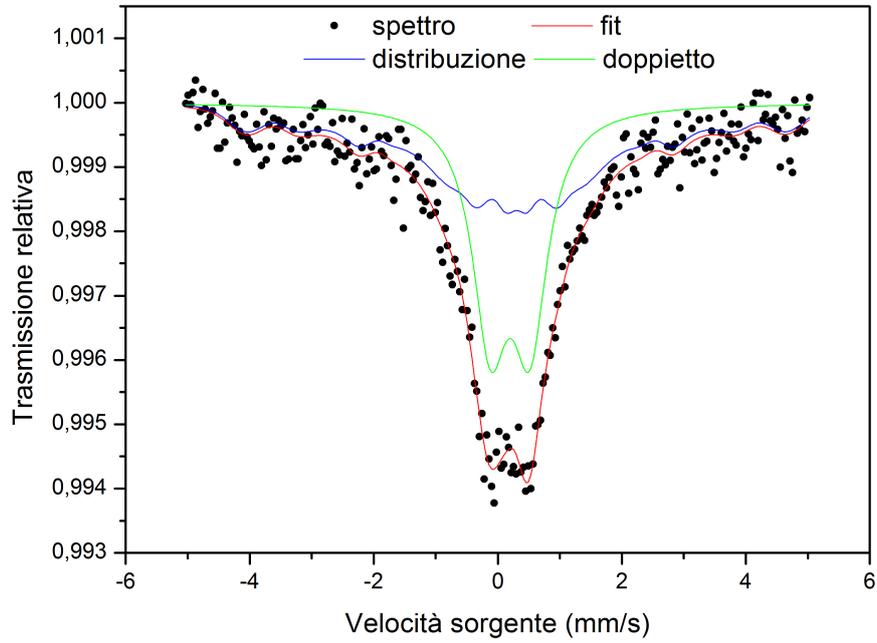
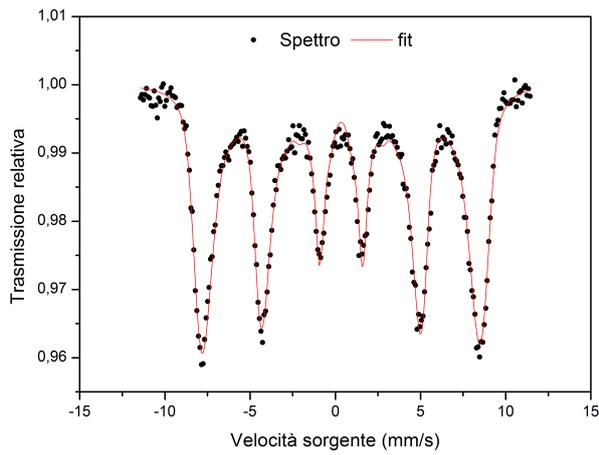
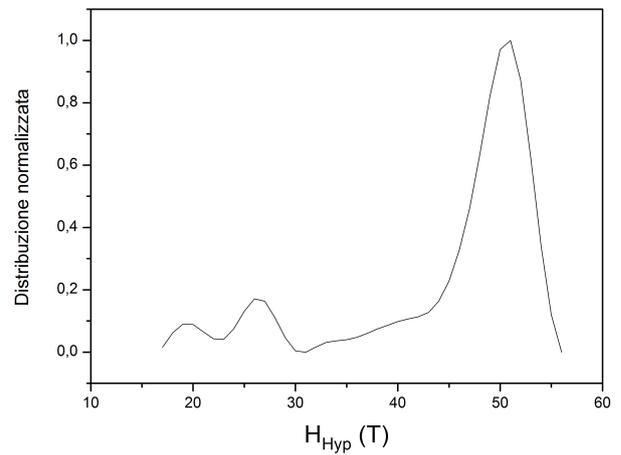


Figura 5.6: Spettro Mössbauer MagnaHA2, T=300K



(a) Spettro Mössbauer NPMagn, T=28K



(b) Distribuzione di campi iperfini, T=28K

Figura 5.7

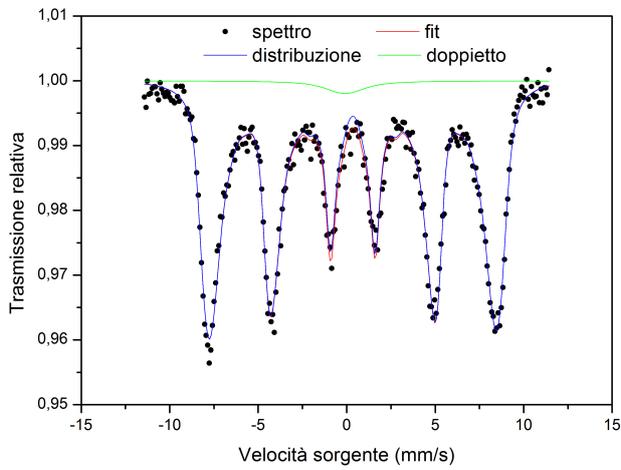
fini, rappresentate, normalizzate dividendo per il valore di picco, di fianco a ciascuno spettro alle varie temperature.(fig. 5.7b, 5.8b, 5.8d, 5.8f, 5.9b) L'approccio utilizzato è consistente con l'idea che vi sia una configurazione magnetica di *canting* degli spin sulla superficie delle nanoparticelle.[39]

Come si vede dalle figura 5.7b, la distribuzione di campi iperfini è bimodale. In particolare sono presenti due picchi, uno a $\sim 51\text{T}$, consistente con i valori tabulati per sistemi nanoparticellari di magnetite[40] ed uno a $\sim 26\text{T}$, molto più basso rispetto al precedente. La presenza, poi protratta e rafforzata anche alle temperature più alte, di campi iperfini con valori così bassi rappresenta il fatto che una certa frazione di nanoparticelle risenta già a basse temperature di effetti di rilassamento termico.

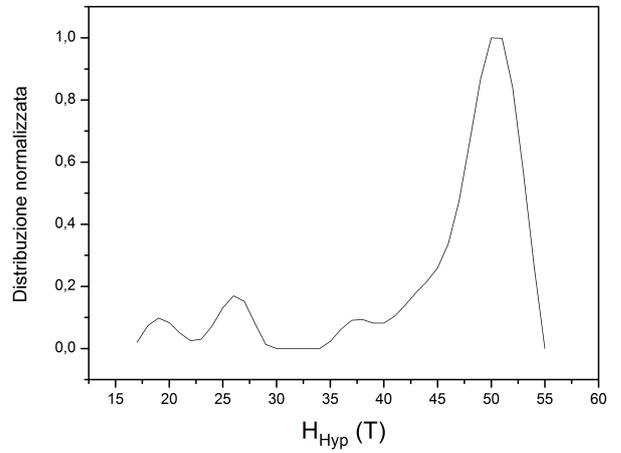
L'ipotesi che abbiamo formulato per spiegare già a così basse temperature la presenza di particelle nello stato superparamagnetico è che ve ne siano alcune molto piccole che risentono quindi maggiormente degli effetti termici. Il fatto di avere volumi minori avrebbe una duplice azione sul comportamento magnetico di queste nanoparticelle, da una parte risentirebbero maggiormente degli effetti termici e dall'altra avrebbero un momento magnetico associato minore che quindi comporterebbe contemporaneamente anche una minore interazione dipolare con le altre particelle, riducendo quindi lo spostamento della temperatura di bloccaggio associata ed incentivando ulteriormente lo stato superparamagnetico. Analogamente possiamo anche supporre che vi siano particelle mediamente più isolate dalle altre anche nel campione NPMagn composto solo di magnetite; ciò è possibile se consideriamo la presenza attorno ad alcune particelle di H_2O o $TBABr$ residui, come rilevato tramite FT-IT, che ne schermano quindi l'interazione con l'ambiente circostante.

Come si può vedere dagli spettri, aumentando la temperatura il sistema entra gradualmente nel regime superparamagnetico. Questo è evidente dal fatto che il sestetto presente alle basse temperature collassa gradualmente nell'unico doppietto presente a $T=300\text{K}$.(fig. 5.12) Per tenere conto dell'emergere di una crescente componente superparamagnetica, nell'effettuare il fit è stato quindi necessario, a partire dallo spettro ottenuto a $T=50\text{K}$, aggiungere alla distribuzione di campi iperfini anche un contributo di doppietto. Abbiamo analizzato l'andamento dell'area risonante associabile rispettivamente a doppietto e distribuzione iperfine individuando, come ci si poteva aspettare, una progressiva maggiore incidenza del primo rispetto alla seconda.(vedi tabella 5.1 e fig. 5.10)

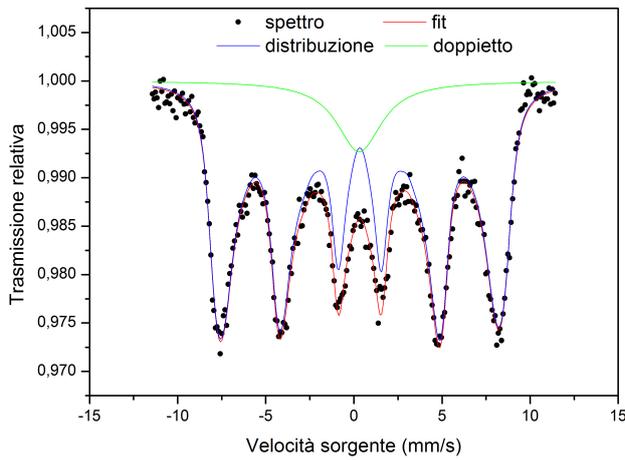
Nel caso di sistemi nanostrutturati come il presente, è possibile definire per il Mössbauer la temperatura media di bloccaggio come la temperatura alla quale l'area risonante associabile al doppietto è equivalente all'area risonante associabile alla distribuzione di campi iperfini.[6] Plottando l'area risonante associata alla distribuzione di campi iperfini in funzione della temperatura è stato possibile individuare una temperatura di bloccaggio per il sistema stimabile a $\sim 289\text{K}$. Come si può vedere quindi, la temperatura di bloccaggio rilevata tramite la spettroscopia Mössbauer è molto più elevata di quella rilevata tramite il magnetometro SQUID; il fenomeno, come illustrato nel primo capitolo, è legato ai



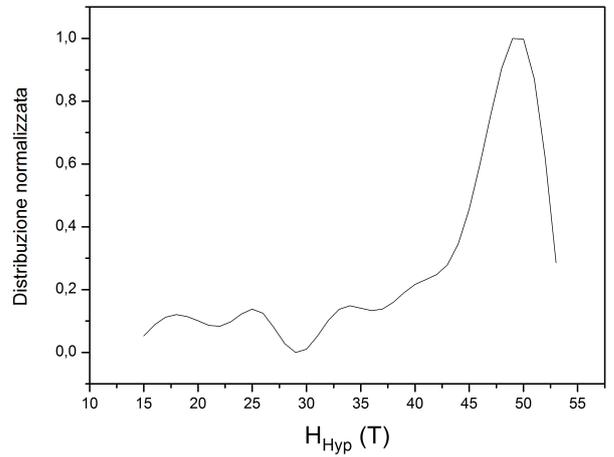
(a) Spettro Mössbauer NPMagn, T=50K



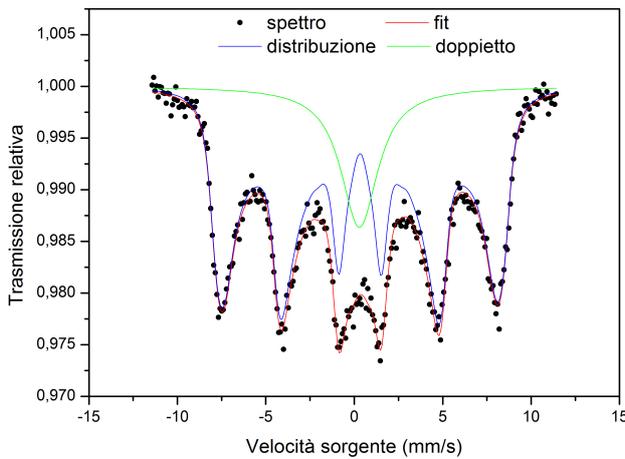
(b) Distribuzione di campi iperfini, T=50K



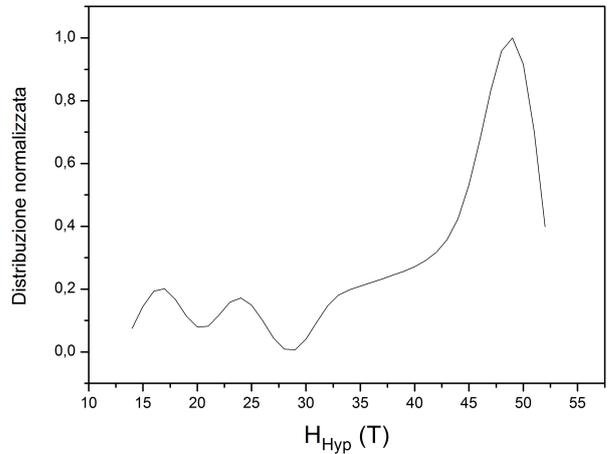
(c) Spettro Mössbauer NPMagn, T=100K



(d) Distribuzione di campi iperfini, T=100K



(e) Spettro Mössbauer NPMagn, T=150K



(f) Distribuzione di campi iperfini, T=150K

Figura 5.8

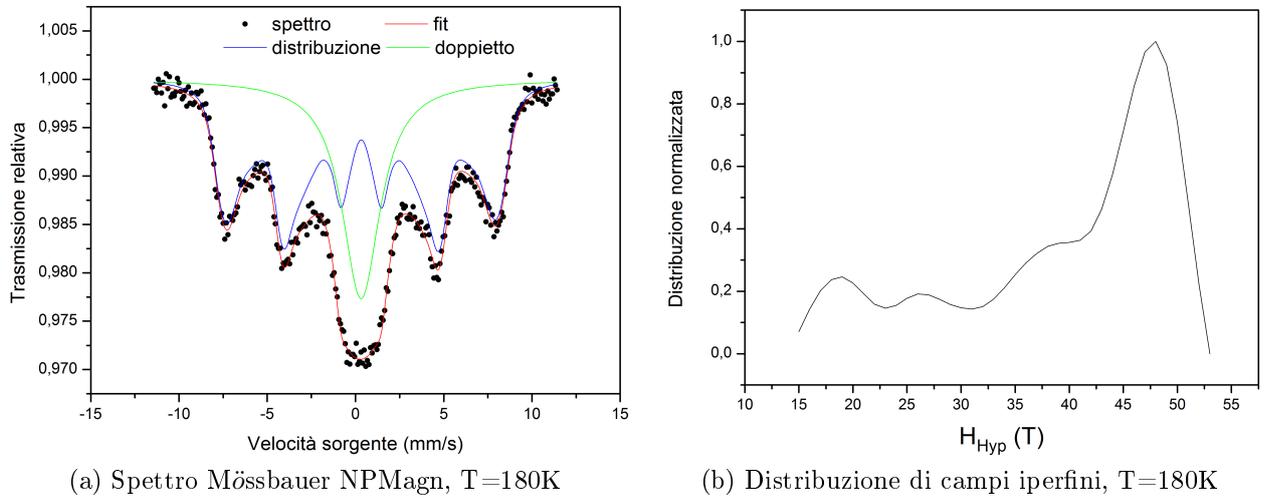


Figura 5.9

tempi di misura molto differenti di queste due tecniche.

Concentrandoci sulle distribuzioni di campi iperfini, si evince come aumentando la temperatura assumano sempre maggiore importanza le componenti iperfini a campi più piccoli. In particolare, dalla figura 5.11, si vede come la distribuzione si sposti sistematicamente verso campi iperfini con valori più bassi e nel contempo assuma maggiore importanza la componente a campi iperfini minori. Questo comportamento è consistente con il passaggio del sistema da uno stato bloccato ad uno in cui la componente superparamagnetica assume sempre maggiore importanza.

Questo tipo di andamento è consistente con l'aumento del numero di particelle nello stato superparamagnetico già illustrato precedentemente. Come si può vedere (fig. 5.12), a T=300K lo spettro presenta una larga banda di fondo che, per essere fittata, necessita di un contributo proveniente da una distribuzione di campi iperfini centrata a valori molto bassi. La componente iperfine presente alle alte temperature può essere interpretata con la presenza di particelle di dimensioni più grandi della media o maggiormente interagenti con quelle vicine, forse situate al centro degli agglomerati di particelle individuati tramite lo studio TEM e tramite l'analisi delle interazioni condotta con lo SQUID.

Per quanto riguarda la struttura degli spin superficiali delle nanoparticelle magnetiche, come suggerito in letteratura, è necessario condurre ulteriori misure Mössbauer in presenza di campo magnetico in modo da verificare se anche nel nostro caso avvenga o meno un loro canting a giustificare il basso valore della magnetizzazione di saturazione ed i picchi allargati del Mössbauer.[28]

L'area risonante associata ai picchi dello spettro è correlabile all'angolo tra la direzione del campo iperfine effettivo e quella del raggio γ identificato dall'angolo θ nella formula

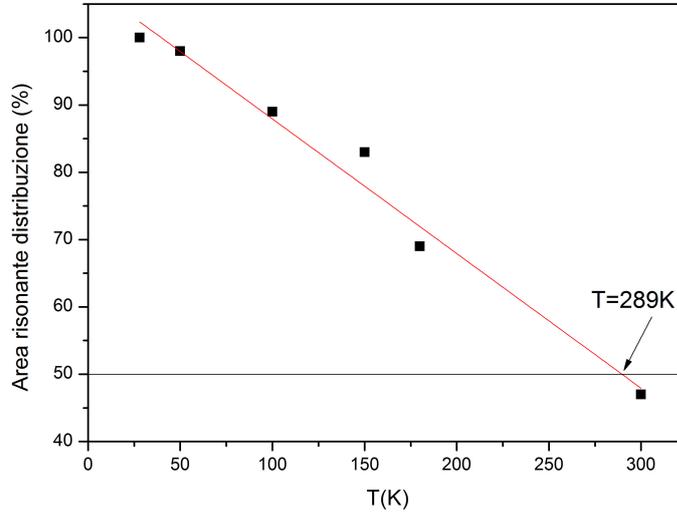


Figura 5.10: Andamento area risonante della distribuzione iperfine

5.12.

$$\frac{A_{2,5}}{A_{1,6}} = \frac{4 \sin^2 \theta}{3(1 + \cos^2 \theta)} \quad (5.12)$$

Dalla formula si può comprendere come, applicando un campo lungo la direzione di emissione dei raggi γ , il secondo e quinto picco dello spettro dovrebbero sostanzialmente sparire avendo reso l'angolo medio tra il raggio γ ed il campo iperfine uguale a 0.[39, 28] I valori di *isomer-shift* medi per le distribuzioni e per il doppietto sono consistenti con i valori tabulati e sono stati inseriti in tabella 5.1.[40]

Tabella 5.1: Parametri iperfini del campione NPMagn

Temperatura (K)	Isomer Shift (mm/s)	Isomer shift medio distribuzione (mm/s)	A_{distr} (%)
28	/	0.45	100
50	0.02	0.46	98
100	0.41	0.44	89
150	0.40	0.44	83
180	0.43	0.44	69
300	0.35	0.31	47

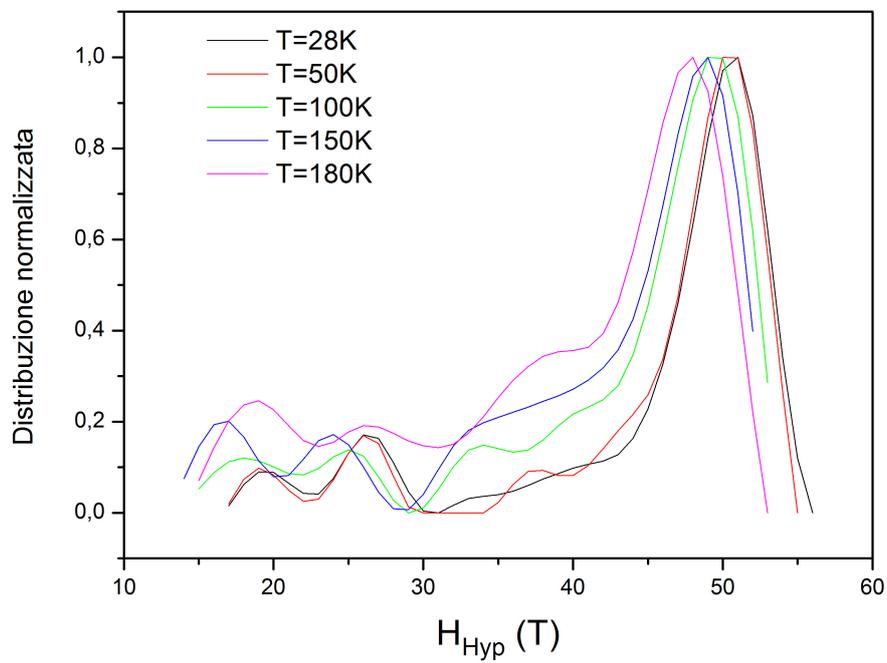


Figura 5.11: Distribuzioni iperfini alle varie temperature

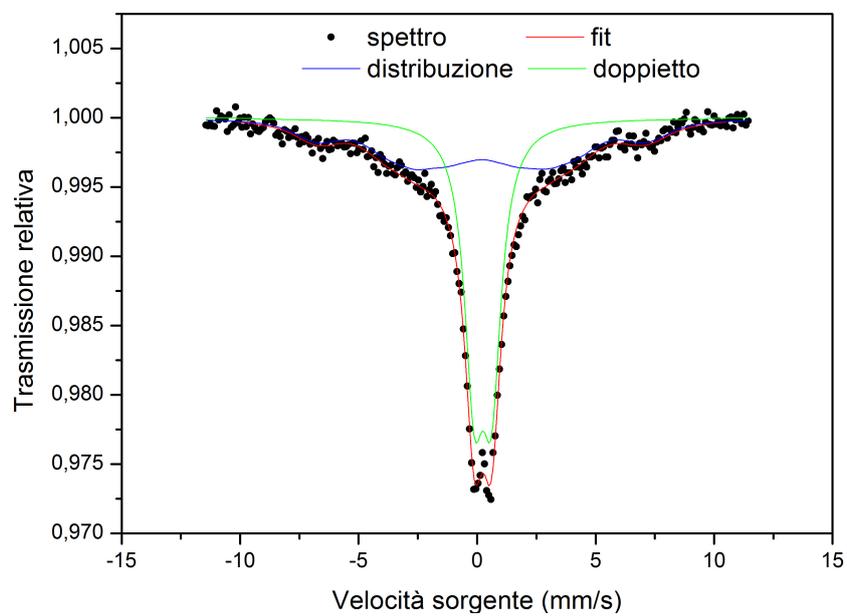


Figura 5.12: Spettro Mössbauer NPMagn, $T=300\text{K}$

Conclusioni

I forti investimenti degli ultimi anni nell'utilizzo della nanotecnologia in ambito biomedicale hanno portato ad un aumento molto accelerato della pubblicazione di articoli sull'impiego di nanoparticelle magnetiche multifunzionali per usi medico-terapeutici. Questo lavoro di tesi costituisce un tassello nella complicata creazione di scaffold biomimetici a base di idrossiapatite contenenti magnetite per l'incentivazione della rigenerazione ossea e processi di tissue engineering. Attraverso un metodo chimico innovativo sono stati sintetizzate tre tipologie di campioni: uno di magnetite nanostrutturata (*as-prepared*), indicato con NPMagn e due di idrossiapatite carbonata con un diverso contenuto di magnetite, nel primo, denominato MagnHA1, circa lo 0.8wt.% e nel secondo, denominato MagnHA2, circa il 4wt.%. Attraverso l'analisi XRD e le immagini TEM siamo stati in grado di determinare il *size* medio delle nanoparticelle magnetiche, di circa 6 nm. Nella fase di sintesi, l'impiego di un materiale disperdente come il TBABr, molecola molto grande, ha reso possibile sintetizzare magnetite nanostrutturata, impedendo la fusione di particelle adiacenti e la creazione di cluster molto più grandi. Tramite l'analisi FT-IR è stata dedotta la presenza dei legami Fe-O-H all'interno dei campioni, a conferma dell'esistenza delle nanoparticelle di magnetite e di gruppi idrossilici sulla superficie di esse. Abbiamo ipotizzato che siano i gruppi idrossilici sulla superficie delle nanoparticelle a fare da ponte nella crescita dell'idrossiapatite attorno alle nanoparticelle. Una delle caratteristiche più interessanti (visualizzata tramite microscopia TEM) legata a tutti i campioni sintetizzati è l'agglomeramento di particelle e non la loro dispersione omogenea all'interno del materiale. Questo agglomeramento, come mostra l'analisi magnetica, comporta che le interazioni tra le particelle non subiscano forti variazioni nel passare dal campione NPMagn ai campioni MagnHA1 e MagnHA2.

La maggior parte del lavoro di tesi si è concentrato sull'analisi magnetica dei campioni NPMagn, MagnHA1 e MagnHA2. I campioni presentano caratteristiche superparamagnetiche, come dimostrano sia le misure SQUID sia gli spettri Mössbauer raccolti. Tramite il magnetometro SQUID sono stati misurati i cicli di isteresi per i vari campioni, ottenendo un valore della magnetizzazione di saturazione per il campione NPMagn di 67.7emu/g, pari a circa il 70% del valore bulk tabulato. Questo risultato può essere in parte causato dalle molecole di acqua e di TBABr presenti sulla superficie ma è noto che

i sistemi nanostrutturati risentano del fenomeno del *canting* superficiale degli spin. Dai cicli di isteresi ottenuti a diverse temperature, è stato possibile visualizzare l'andamento del coercitivo e della rimanenza con la temperatura; gli andamenti riscontrati sono tipici dei sistemi superparamagnetici. Per quanto riguarda il campione NPMagn, attraverso misure ZFC-FC abbiamo calcolato che la temperatura media di bloccaggio per il sistema è di $\sim 160\text{K}$ in presenza di un campo applicato $H=20\text{ Oe}$. A livello teorico, seguendo la famosa formula di Bean-Livingston, la temperatura di bloccaggio per una particella con diametro di 6nm si dovrebbe assestare attorno ai 17K , quindi un ordine di grandezza in meno rispetto al risultato ottenuto. La differenza tra il valore della temperatura di bloccaggio calcolato e il valore atteso mostra come in realtà abbiano un ruolo rilevante le interazioni magnetiche dipolari presenti all'interno dei campioni. È infatti ormai assodato che le interazioni magnetiche tra particelle nei sistemi nanostrutturati spostano la temperatura di bloccaggio verso valori più alti in quanto il sistema tende a reagire in modo più interconnesso all'interno. Dall'analisi delle distribuzioni di barriere di energia di anisotropia si riscontra che ad una temperatura di circa 20K è presente un picco che non si sposta al variare del campo magnetico applicato e che possiamo associare al passaggio ad una fase *spin-glass like*. Passando ai campioni MagnHA1 e MagnHA2, attraverso i cicli di isteresi, ottenuti alla temperatura $T=300\text{K}$ è stato possibile determinarne il contenuto di magnetite, al 4% e 0.8% circa. Le caratteristiche magnetiche sono simili a quelle rilevate per il campione di magnetite, in particolare l'andamento del coercitivo e della rimanenza con la temperatura. Un confronto tra le distribuzioni delle barriere energetiche ottenute con $H_{appl}=20\text{Oe}$ per i tre campioni mostra che essenzialmente hanno lo stesso andamento con la temperatura e che di conseguenza anche le interazioni presenti nei campioni sono simili. La natura dipolare delle interazioni e la loro similarità all'interno dei tre campioni sono state rivelate grazie ad analisi DCD e IRM della magnetizzazione rimanente. La similarità degli andamenti magnetici e le immagini TEM raccolte ci portano a pensare che le particelle tendano ad agglomerarsi in gruppi più grandi di particelle fortemente interagenti già nella fase *as-prepared* che vengono successivamente ricoperti dalla crescita successiva dell'idrossiapatite. In particolare il fatto che le caratteristiche di raggruppamento delle nanoparticelle si riscontrino anche nel campione di magnetite ci porta a pensare che siano le interazioni elettrostatiche ed i legami chimici a condurre verso l'agglomeramento delle particelle che, a temperatura ambiente, sono nello stato superparamagnetico e non possono quindi risentire delle interazioni dipolari.

Tramite il Mössbauer è stato caratterizzato il campione NPMagn in quanto la risposta alla radiazione sarebbe stata troppo bassa per gli altri campioni, essendo proporzionale al contenuto di ^{57}Fe . In particolare, già a $T=28\text{K}$, risulta evidente il collasso dei due sestetti tipici della magnetite in un unico sestetto allargato, fenomeno ricorrente per i sistemi nanostrutturati dovuto agli effetti di superficie. La transizione dallo stato bloccato allo stato superparamagnetico è visibile anche tramite spettroscopia Mössbauer attraverso il passaggio da un sestetto di assorbimento ad un unico doppietto. In particolare, però, il

fondo della radiazione molto rumoroso ci porta a pensare che già alla temperatura di 28K vi possano essere particelle molto piccole nella fase superparamagnetica. Avendo a che fare con sistemi nanostrutturati con dimensioni medie così piccole ed un unico sestetto allargato, gli spettri sono stati fittati tramite delle distribuzioni di campi iperfini. Le distribuzioni iperfini mostrano un andamento bimodale; i valori di campi iperfini più alti sono consistenti con quelli tabulati in letteratura e, aumentando la temperatura, risulta evidente come la componente iperfine più bassa aumenti di intensità rispetto a quella più alta. La componente di campi iperfini a valori più bassi rappresenta la presenza di una fase superparamagnetica all'interno dei campioni e di particelle più piccole della media che di conseguenza risentono meno delle interazioni dipolari generate da quelle vicine. Seguendo quanto descritto in letteratura, abbiamo determinato la temperatura media di bloccaggio per questo sistema e attraverso questa tecnica sperimentale come il valore della temperatura alla quale il 50% dell'area risonante dello spettro è associabile a componenti iperfini ed il rimanente 50% dell'area ad una componente di doppietto. La temperatura di bloccaggio per questi sistemi risulta essere di circa 289K. Anche in questo caso la temperatura di bloccaggio risulta essere più alta del valore ottenibile per via teorica, in perfetta sintonia con quanto riscontrato attraverso il magnetometro SQUID. Per quanto riguarda le misure Mössbauer dei campioni contenenti idrossiapatite, è stato possibile effettuare solo la misura a 300K per il campione MagnHA2. L'impossibilità sperimentale nel sondare il campione a temperature più basse deriva dal fatto che l'area risonante molto piccola verrebbe spalmata su un intero sestetto, rendendolo praticamente invisibile nel fondo molto largo della radiazione. Studi ulteriori attraverso il Mössbauer in presenza di un campo magnetico applicato potranno evidenziare la presenza di canting superficiale da parte degli spin appartenenti alle nanoparticelle di magnetite.

Ringraziamenti

Si ringraziano il dottor F. Spizzo dell'Università di Ferrara per l'aiuto fornito nelle misure magnetiche condotte tramite SQUID e Mössbauer; i dottori I.G. Lesci e G. Fracasso del dipartimento Ciamician dell'Università di Bologna per la parte di sintesi e caratterizzazione chimico fisica dei campioni studiati; il dottor G. Barucca dell'Università Politecnica delle Marche per la raccolta e l'interpretazione delle immagini TEM utilizzate in questo lavoro; i dottori R. Scotti e L. Ciocca del dipartimento di Scienze Biomediche e Neuro-motorie dell'Università di Bologna per aver finanziato il progetto e la dottoressa L. del Bianco del dipartimento di Fisica dell'Università di Bologna per essersi resa disponibile ad essere la mia relatrice in questo lavoro di tesi.

Ringraziamenti

Ringraziare in modo adeguato tutte le persone che mi sono state vicine in questi ultimi tre anni di università non è sicuramente facile e sono sicuro che non mi riuscirà.

Parto col ringraziare sicuramente mio padre per tutto il lavoro che ha fatto in questi anni e per tutto quello che, volente o nolente, è riuscito ad insegnarmi.

Non posso non ringraziare anche mio fratello Luca per le continue discussioni e i litigi che a volte possono sicuramente essere stati una determinante valvola di sfogo per entrambi.

Un abbraccio ed un ringraziamento a parte meritano Flavia, Andrea, Adele e Giorgio per avermi fatto sentire parte di un mondo diverso in cui forse si vivrebbe meglio.

Per essermi stati vicini, avermi supportato, aiutato, spronato ringrazio lei, Nonna, Loredana, Remo, Vilma, Piero, Silvia, Nicola, Maria, Pierangelo, Simonetta e Alessandra...una famiglia invidiabile!

Un ringraziamento particolare va a Mimì per essermi sempre stata vicina, avermi capito nei momenti difficili e soprattutto essere stata una cugi-nquilina invidiabile da chiunque.

A proposito di coinquiline, non dimenticherò mai le serate passate a guardare serie televisive a oltranza con Megghy e Giulia, grazie!

Per tutto quello che è ed è stata, perchè non ci siamo mai e poi mai abbandonati sopportandoci fino allo sfinimento reciproco, perchè ormai, come dice lei, siamo una cosa sola, è Fabia.

Un grazie dal sapore intenso e corposo, detta alla Masterchef, va a Serena e Lorenzo perchè non so come avrei passato tutti questi anni e queste serate senza di voi, la vostra compagnia, i vostri consigli ed il vostro sostegno.

Zia e Cri, grazie del vostro aiuto e delle vostre parole...della vostra compagnia in biblioteca e di tutto quello che avete fatto per me e con me in questi anni.

Ovviamente un grazie va a tutti i miei compagni della magistrale per i bei momenti passati insieme: Federico, Claudio, Giacomo e Lorenzo.

Domizia, ti ho tenuto fuori dal gruppo perchè non posso far altro che ringraziarti a parte per avermi fatto da badante durante la magistrale, per le miriadi di risate che ci siamo fatti, le lunghe chiacchierate e tutto quello che abbiamo fatto in questi due anni (ormai tre).

Infine non posso non ringraziare te Lucia, perchè sei stata la relatrice più comprensiva e paziente che potessi trovare o sperare di trovare. Grazie di cuore.

A te

Bibliografia

- [1] B.D., Cullity; C.D., Graham, *Introduction to magnetic materials*(2009).
- [2] J.L., Dormann; D. Fiorani; E. Tronc, *Magnetic relaxation in fine-particle systems; Adv. in Chem. Phys.*, XCVIII (1997).
- [3] D. Fiorani, *Static and dynamic properties of superparamagnetic particles; Magnetic properties of matter* (1996).
- [4] C.P. Bean; J.D. Livingston, *Superparamagnetism; Journal of Applied Physics* (1959).
- [5] K. O’Grady; R.W. Chantrell, *Remanence curves of fine particle systems I: Experimental Studies; Studies of magnetic properties of fine particles and their relevance to materials science* (1992).
- [6] Steen Mørup; Mikkel Fougth Hansen; Cathrine Frandsen, *Magnetic interactions between nanoparticles; Beilstein Journal of Nanotechnology* (2010).
- [7] Gao Jinhao; Gu Hongwei; Xu Bing, *Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications*, Accounts of chemical research (2009).
- [8] Q.A. Pankhurst; J. Connolly; S.K. Jones; J. Dobson, *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*, Journal of Physics D: Applied Physics (2003).
- [9] Jon Dobson, *Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles*, Nature Nanotechnology (2008).
- [10] Edward P. Furlani, *Magnetic Biotransport: Analysis and Applications*, Materials (2010).
- [11] Ajay Kumar Gupta; Mona Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*, Biomaterials (2005).

- [12] Tran Nhiem; Thomas Webster, *Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges*, Journal of Materials Chemistry (2010).
- [13] Challa S.S.R. Kumar; Faruq Mohammad, *Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery*, Advanced Drug Delivery Reviews (2011).
- [14] R.E. Rosenweig, *Heating magnetic fluid with alternating magnetic field*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials (2002).
- [15] Q.A. Pankhurst; N.T.K. Thanh; S.K. Jones; J. Dobson, *Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*, Journal of Physics D: Applied Physics (2009).
- [16] Hao Rui; Zhichuan jun Xing Rui; Xu Zhichuan; Hou Yanglon; Gao Song; Sun Shouheng, *Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles*, Advanced Materials (2010).
- [17] Imaging a risonanza magnetica, http://it.wikipedia.org/wiki/Imaging_a_risonanza_magnetica
- [18] Magnetic resonance imaging, http://en.wikipedia.org/wiki/Magnetic_resonance_imaging.
- [19] Physics of magnetic resonance imaging, http://en.wikipedia.org/wiki/Physics_of_magnetic_resonance_imaging.
- [20] Ingegneria tissutale, http://it.wikipedia.org/wiki/Ingegneria_tissutale.
- [21] L. Harivardhan Reddy; Josè L. Arias; Julien Nicolas; Patrick Couvreur, *Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications*, Chemical Reviews (2012).
- [22] Richard Sensening; Yulia Sapir; Cristin MacDonald; Smadar Cohen; Boris Polyak, *Magnetic nanoparticle-based approaches to locally target therapy and enhance tissue regeneration in vivo*, Nanomedicine (2012).
- [23] Jie Meng; Bo Xiao; Yu Zhang; Jian Liu; Huadan Xue; Jing Lei; Hua Kong; Yuguang Huang; Zhengyu Jin; Ning Gu; Haiyan Xu, *Super-paramagnetic responsive nanofibrous scaffolds under static magnetic field enhance osteogenesis for bone repair in vivo*, Scientific Reports (2013).
- [24] Sergey V. Dorozhkin; Matthias Epple, *Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates*, Angew. Chem. Int. Ed. (2002).
- [25] S.J. Kalita; A. Bhardwaj; H.A. Bhatt, *Material Science Engeneering C* (2007).

- [26] N. Roveri; E. Foresti; M. Lelli; I.G. Lesci; M. Marchetti, *Microscopic investigations of Synthetic Biomimetic Hydroxyapatite*, Microscopy: Science, Technology, Applications and Education (2010).
- [27] R.H. Kodama; A.E. Berkowitz; E.J. McNiff Jr; S. Foner, *Surface Spin Disorder in NiFe₂O₄ Nanoparticles*, Physical Review Letters (1996).
- [28] J.M.D. Coey, *Noncollinear Spin Arrangement in Ultrafine Ferrimagnetic Crystallites*, PHYSICAL REVIEW LETTERS (1971).
- [29] R. W. Chantrell; N. S. Walmsley; J. Gore; M. Maylin, *Theoretical studies of the field-cooled and zero-field cooled magnetization of interacting fine particles*, JOURNAL OF APPLIED PHYSICS (1999).
- [30] J.A. Mydosh, *Disordered magnetism and spin glasses*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials (1996).
- [31] R.W. Chantrell; K. O'Grady, *Remanence Curves of Fine Particle Systems II: Theoretical Studies of Interactions*, Studies of Magnetic Properties of Fine Particles and their Relevance to Materials Science (1992).
- [32] E.P. Wohlfarth, *Relations between different modes of acquisition of the remanent magnetization of ferromagnetic particles*, Journal of Applied Physics (1958).
- [33] J. Garcia-Otero; M. Porto; J. Rivas, *Henkel plots of single-domain ferromagnetic particles*, Journal of Applied Physics (2000).
- [34] P. Sharrock; G. Bonel, *Colour centres in plasma-sprayed hydroxyapatite*, Biomaterials (1992).
- [35] Benjamin K. Stuhl; Matthew T. Hummon; Mark Yeo; Goulven Quémener; John L. Bohn; Jun Ye, *Evaporative cooling of the dipolar hydroxyl radical*, Nature (2012).
- [36] Richard L. Cohen, *Applications of Mossbauer Spectroscopy* (1976)
- [37] Leopold May, *An introduction to Mossbauer Spectroscopy* (1980).
- [38] E. Bonetti; L. Del Bianco; S. Signoretti; P. Tiberto, *Synthesis by ball milling and characterization of nanocrystalline Fe₃O₄ and Fe/Fe₃O₄ composite system*, Journal of Applied Physics (2001).
- [39] A.H. Morrish; K. Haneda, *Surface magnetic properties of fine particles*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials (1983).

- [40] G.F. Goya, T.S. Berquo; F.C. Fonseca; M.P. Morales, *Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles*, JOURNAL OF APPLIED PHYSICS (2003).