

**ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

---

---

FACOLTA' DI CHIMICA INDUSTRIALE

Corso di Laurea Magistrale in Chimica Industriale

Classe LM71 – scienze e tecnologie della chimica industriale

**Ingegnerizzazione e design di  
nanoparticelle core-shell di  
magnetite/silice**

**Candidato:**

Lorenzo Caruana

**Relatore:**

Prof.ssa Maria Cristina Cassani

**Correlatori:**

Dott.ssa Anna Luisa Costa

Dott. Enrico Rampazzo

**Sessione seconda**

---

---

**Anno Accademico 2010-2011**

---

# Indice Generale

---

	<b>ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>1.1</b>	<b>Stato dell'arte</b>	<b>3</b>
<b>1.2</b>	<b>Proprietà magnetiche delle nanoparticelle</b>	<b>5</b>
1.2.1	Grandezze fondamentali	5
1.2.2	Fondamenti di magnetismo	6
1.2.3	Superparamagnetismo	9
<b>1.3</b>	<b>Impieghi terapeutici e diagnostici</b>	<b>12</b>
1.3.1	Diagnostica di risonanza magnetica per immagini	13
1.3.2	Ipertermia	13
1.3.3	Target drug delivery	14
1.3.4	Separazione magnetica	15
<b>1.4</b>	<b>Fondamenti di fotochimica</b>	<b>15</b>
1.4.1	Luminescenza, resa quantica e tempo di vita dello stato eccitato	15
1.4.2	Anisotropia di fluorescenza	19
<b>1.5</b>	<b>Sintesi delle nanoparticelle magnetiche</b>	<b>21</b>
1.5.1	Coprecipitazione	22
1.5.2	Sintesi in ambiente confinato: microemulsioni	22
1.5.3	Sintesi attraverso i polioli	23

<b>1.6</b>	<b>Coating delle nanoparticelle magnetiche</b>	<b>23</b>
<b>1.7</b>	<b>Funzionalizzazione dei coating con molecole fluorofore</b>	<b>27</b>
<b>1.8</b>	<b>Scopo della tesi</b>	<b>28</b>
<b>2.</b>	<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>Procedure sperimentali</b>	<b>31</b>
2.1.1	Strumentazione	<b>31</b>
2.1.2	Solventi e prodotti commerciali	<b>32</b>
2.1.3	Soluzioni	<b>32</b>
<b>2.2</b>	<b>Tecniche di caratterizzazione delle nanoparticelle</b>	<b>32</b>
2.2.1	Misure magnetiche	<b>32</b>
2.2.2	Microscopia a trasmissione di elettroni TEM	<b>33</b>
2.2.3	Dynamic light scattering	<b>34</b>
<b>2.3</b>	<b>Prove di ricopertura con SiO<sub>2</sub> di nanoparticelle di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanosol</b>	<b>35</b>
2.3.1	Sintesi del rivestimento di SiO <sub>2</sub> mediante metodo delle microemulsioni	<b>35</b>
2.3.1.1	<i>Studi sulla stabilità delle microemulsioni</i>	<b>35</b>
2.3.1.2	<i>Sintesi del rivestimento di SiO<sub>2</sub> mediante metodo delle microemulsioni</i>	<b>36</b>
2.3.1.3	<i>Incapsulamento di fluorofori nella matrice di SiO<sub>2</sub></i>	<b>40</b>
2.3.2	Sintesi del rivestimento di SiO <sub>2</sub> mediante metodo di Stöber	<b>42</b>
<b>2.4</b>	<b>Prove di ricopertura con SiO<sub>2</sub> di nanoparticelle di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> in polvere nanometrica</b>	<b>43</b>

2.4.1	Stabilizzazione delle nanoparticelle di $\text{Fe}_3\text{O}_4$	<b>43</b>
2.4.2	Sintesi del rivestimento di $\text{SiO}_2$ mediante metodo delle microemulsioni	<b>44</b>
2.4.3	Sintesi del rivestimento di $\text{SiO}_2$ mediante metodo di Stöber	<b>45</b>
2.4.3.1	<i>Sintesi di un rivestimento composito <math>\text{SiO}_2</math> / Pluronic L121</i>	<b>46</b>
<b>3.</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONI</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Ricopertura con <math>\text{SiO}_2</math> di nanoparticelle di <math>\text{Fe}_3\text{O}_4</math> nanosol</b>	<b>49</b>
3.1.1	Caratterizzazione del nanosol di $\text{Fe}_3\text{O}_4$	<b>49</b>
3.1.2	Metodo delle microemulsioni	<b>51</b>
3.1.2.1	<i>Studi sulla stabilità delle microemulsioni</i>	<b>51</b>
3.1.2.2	<i>Effetto della quantità di TEOS</i>	<b>52</b>
3.1.2.3	<i>Effetto della quantità di acqua</i>	<b>56</b>
3.1.2.4	<i>Effetto della percentuale di <math>\text{Fe}_3\text{O}_4</math> nel sistema</i>	<b>62</b>
3.1.2.5	<i>Caratterizzazione magnetica</i>	<b>64</b>
3.1.2.6	<i>Caratterizzazione delle nanoparticelle funzionalizzate con fluorofori</i>	<b>67</b>
3.1.3	Metodo di Stöber	<b>76</b>
<b>3.2</b>	<b>Ricopertura con <math>\text{SiO}_2</math> di nanoparticelle di <math>\text{Fe}_3\text{O}_4</math> in polvere nanometrica</b>	<b>78</b>
3.2.1	Metodo delle microemulsioni	<b>78</b>
3.2.2	Metodo di Stöber	<b>80</b>
3.2.2.1	<i>Sintesi di un rivestimento composito <math>\text{SiO}_2</math> / Pluronic L121</i>	<b>81</b>

# DESIGN AND ENGINEERING OF MAGNETIC CORE-SHELL $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - SILICA NANOPARTICLES

## ABSTRACT

In the past decade the study of superparamagnetic nanoparticles has been intensively developed for many biomedical applications such as magnetically assisted drug delivery, MRI contrast agents, cells separation and hyperthermia therapy. All of these applications require nanoparticles with high magnetization, equipped also with a suitable surface coating which has to be non-toxic and biocompatible. In this master thesis, the silica coating of commercially available magnetic nanoparticles was investigated. Silica is a versatile material with many intrinsic features, such as hydrophilicity, low toxicity, proper design and derivatization yields particularly stable colloids even in physiological conditions. The coating process was applied to commercial magnetite particles dispersed in an aqueous solution. The formation of silica coated magnetite nanoparticles was performed following two main strategies: the Stöber process, in which the silica coating of the nanoparticle was directly formed by hydrolysis and condensation of suitable precursor in water-alcoholic mixtures; and the reverse microemulsions method in which inverse micelles were used to confine the hydrolysis and condensation reactions that bring to the nanoparticles formation. Between these two methods, the reverse microemulsions one resulted the most versatile and reliable because of the high control level upon monodispersity, silica shell thickness and overall particle size. Moving from low to high concentration, within the microemulsion region a gradual shift from larger particles to smaller one was detected. By increasing the amount of silica precursor the silica shell can also be tuned. Fluorescent dyes have also been incorporated within the silica shell by linking with the silica matrix. The structure of studied nanoparticles was investigated by using transmission electron microscope (TEM) and dynamic light scattering (DLS). These techniques have been used to monitor the synthetic procedures and for the final characterization of silica coated and silica dye doped nanoparticles. Finally, field dependent magnetization measurements showed the magnetic properties of core-shell nanoparticles were preserved. Due to a very well defined structure that combines magnetic and luminescent properties together with the possibility of further functionalization, these multifunctional nanoparticles are potentially useful platforms in biomedical fields such as labeling and imaging.



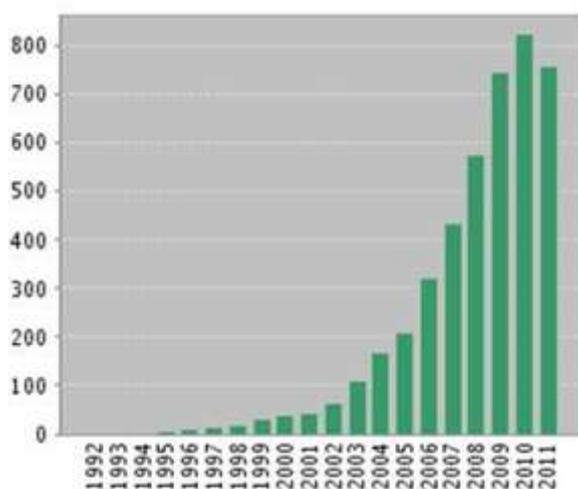
# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Stato dell'arte<sup>[1]</sup>

Nel corso degli ultimi decenni i materiali nanostrutturati, aventi cioè una delle dimensioni al di sotto dei 100 nm, hanno suscitato molto interesse a causa delle loro particolari proprietà chimico-fisiche e biologiche. Questo interesse è principalmente dovuto al fatto che un materiale nanostrutturato ha delle proprietà chimico-fisiche profondamente diverse rispetto al corrispondente materiale massivo. Le proprietà chimiche, ottiche, elettriche, termiche, magnetiche sono peculiari a livello nanometrico e queste caratteristiche possono essere sfruttate nelle nanoscienze e nella nanotecnologia.

Le nanoparticelle si identificano come aggregati atomici, molecolari o polimerici con un diametro compreso tra 1 e 100 nm, ma possono avere anche forme diverse (nanotubi, nanorods ecc.), vengono studiate dal punto di vista chimico-fisico ed utilizzate in molti campi applicativi come la biologia, la medicina, l'elettronica e la scienza dei materiali. In particolare le nanoparticelle magnetiche sono state studiate per essere impiegate in campo biomedico per varie applicazioni diagnostiche e terapeutiche, basate per esempio sulla separazione o il riconoscimento di biomolecole, il miglioramento del contrasto nella Risonanza Magnetica (MRI), l'ipertermia magnetica per la terapia contro il cancro ed il rilascio localizzato di farmaci (target drug delivery). I numerosi ambiti di utilizzo hanno spesso reso la realizzazione e lo studio di questi sistemi fortemente interdisciplinari. Grazie a questo impulso sono state sviluppate una serie di nuove tecniche di preparazione, alcune delle quali permettono di avere un ottimo controllo sulla dimensione delle particelle, l'omogeneità delle dimensioni e la qualità strutturale.

La maggior parte dei lavori sulle nanoparticelle magnetiche per applicazioni biomediche riguarda la **magnetite** ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), un materiale magnetico, che può essere preparato in forma di particelle con dimensioni fino a 4 nm e con proprietà magnetiche a temperatura ambiente adatte alle principali applicazioni biomediche. In forma nanostrutturata, la magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o la maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) sono dei promettenti candidati per numerose applicazioni biomediche per via di proprietà magnetiche come l'alta coercitività, la bassa temperatura Curie, l'alta suscettibilità magnetica, non presenti sul materiale massivo. Tra le applicazioni più importanti si può ricordare: la bioseparazione magnetica, la rilevazione di bio-analiti, la diagnosi e la terapia clinica, la somministrazione di medicinali specifici<sup>[1]</sup>. Proprio per queste applicazioni biomediche, negli ultimi anni le ricerche riguardo le nanoparticelle (NPs) hanno visto una costante crescita (**Fig.1.1**).



**Fig.1.1** Numero di pubblicazioni scientifiche per anno (Topics: "iron oxide magnetic nanoparticles" fonte <http://apps.webofknowledge.com>)

Tutte queste applicazioni richiedono che le nanoparticelle siano biocompatibili, stabili in condizioni fisiologiche e il più possibile monodisperse. Per quanto riguarda le nanoparticelle magnetiche di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , il comportamento superparamagnetico si manifesta quando le dimensioni sono  $< 100$  nm e sono tanto più intense quanto minore è il diametro delle nanoparticelle. Tuttavia le NPs magnetiche, a seguito di attrazioni dipolari, aggregano facilmente, perdendo gran parte delle loro caratteristiche. Per questo è necessario stabilizzare le sospensioni colloidali di nanoparticelle magnetiche durante la loro formazione mediante opportuni agenti "passivanti" che ne impediscano l'aggregazione e la precipitazione. Sospensioni colloidali stabili possono essere modificate attraverso la funzionalizzazione con numerosi substrati, rendendo così possibile un'ingegnerizzazione della nanoparticella.

Per questi motivi il rivestimento delle nanoparticelle magnetiche con **silice** ( $\text{SiO}_2$ ) sta diventando un promettente e importante approccio in questo campo: la silice forma sulla superficie delle NP uno shell intrinsecamente idrofilo che scherma l'attrazione dipolare tra di esse, limitandone di fatto l'aggregazione e favorendone la dispersione. Un altro vantaggio del rivestimento in silice è dato dalla presenza di gruppi silanoli che possono essere successivamente modificati in modo da introdurre sulla superficie della nanoparticella gruppi funzionali, recettori o biomolecole adatti a legare substrati o analiti di interesse. Infine la silice è biologicamente inerte e conferisce alle nanoparticelle magnetiche una minore tossicità<sup>[2]</sup>. Queste caratteristiche offrono la possibilità di progettare e sintetizzare vettori magnetici che possono essere utilizzati per il trasporto di specifici leganti sino al tessuto biologico bersaglio (attraverso il sistema di ricognizione antigene/anticorpo), oppure come traccianti fluorescenti se nello shell di silice viene introdotto un fluoroforo<sup>[3,7]</sup>. Numerosi articoli riguardanti il rivestimento con  $\text{SiO}_2$  di nanoparticelle magnetiche di ossidi di ferro sono riportati in letteratura<sup>[4-7]</sup>.

## 1.2 Proprietà magnetiche delle nanoparticelle<sup>[8]</sup>

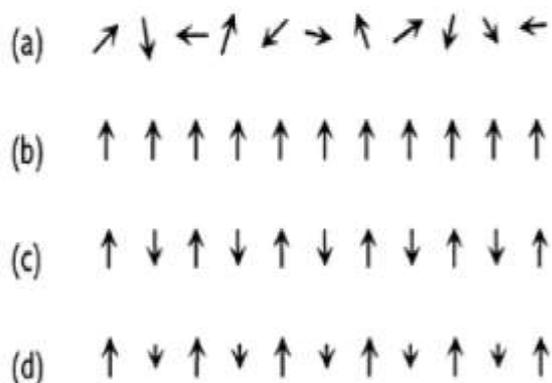
### 1.2.1 Grandezze fondamentali

<u>GRANDEZZA</u>	<u>SIMBOLO</u>	<u>UNITA' DI MISURA</u>	<u>FORMULAZIONE MATEMATICA</u>	<u>DEFINIZIONE</u>
<i>Campo magnetico</i>	H	Ampere/metro	$H = \frac{i}{2r}$	Campo di forza attorno a un magnete o ad un circuito percorso da corrente
<i>Momento magnetico</i>	m	Ampere-metro <sup>2</sup>	$m = i \times A$	Misura l'intensità del campo magnetico
<i>Magnetizzazione</i>	M	Ampere/metro	$M = \frac{m}{v}$	Momento magnetico per unità di volume
<i>Permeabilità magnetica</i>	$\mu$	Henry/metro	$\mu = \frac{B}{H}$	Esprime la facilità di propagazione del flusso magnetico in un mezzo
<i>Induzione magnetica</i>	B	Tesla	$B = \mu_0 (H + M)$	Fenomeno per cui un corpo, sottoposto all'azione di un campo magnetico, si magnetizza a sua volta
<i>Suscettività magnetica</i>	$\chi$	adimensionale	$\chi = \frac{M}{H}$	Esprime la magnetizzazione indotta ad un materiale per azione di un campo magnetico esterno

### 1.2.2 Fondamenti di magnetismo

I materiali *diamagnetici* sono composti da atomi privi di un momento magnetico netto, in quanto i loro elettroni sono disposti in orbitali completi, privi elettroni spaiati. Questo porta ad una forma di repulsione del materiale in presenza di un campo magnetico. A causa dell'interazione tra il campo magnetico e gli orbitali elettronici del materiale, in presenza di un campo esterno si genera una

debole magnetizzazione ( $M$ ) del campione che è contraria in direzione a quella del campo ( $H$ ) applicato, che scompare al venire meno del campo stesso, esattamente l'opposto di ciò che accade nei materiali ferromagnetici. Il diamagnetismo è un fenomeno intrinseco di tutti i materiali, ma risulta evidente solo quando ferromagnetismo e paramagnetismo non ne mascherano gli effetti. Negli atomi che non presentano momento magnetico intrinseco, questo fenomeno rappresenta l'unico effetto risultante dall'applicazione di un campo esterno, inoltre il momento così indotto è indipendente dalla temperatura. I solidi inorganici che mostrano effetti magnetici diversi dal comportamento *diamagnetico*, contengono elettroni spaiati. Le proprietà magnetiche sono legate ai moti orbitalici e di spin degli elettroni atomici. Sono possibili diversi effetti magnetici per un ipotetico cristallo monodimensionale (**Fig.1.2**)



**Fig.1.2** I diversi effetti magnetici del campo

In particolare si hanno i seguenti casi:

**a)** Gli elettroni spaiati presentano momenti magnetici orientati in modo casuale sui diversi atomi; il materiale si definisce allora *paramagnetico*. Questo comportamento è quindi tipico di atomi o ioni con elettroni spaiati entro orbitali elettronici incompleti. Essi mostrano un momento magnetico netto ( $M$ ) e, in presenza di un campo magnetico esterno ( $H$ ) sono in grado di magnetizzarsi nella stessa direzione del campo. Si tratta, ad ogni modo, di fenomeni di magnetizzazione debole che svanisce non appena il campo magnetico viene allontanato. Le sostanze paramagnetiche presentano una relazione lineare e direttamente proporzionale tra  $M$  e  $H$ : i valori di suscettività (tipicamente  $10^{-2} \div 10^{-4}$ ) sono positivi e decrescono all'aumentare della temperatura secondo la relazione

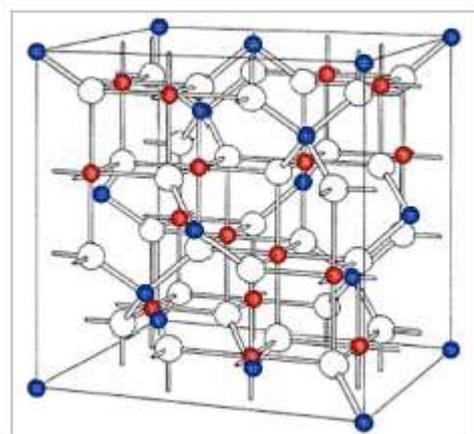
$$\chi = C / T$$

dove  $C$  è la costante di Curie. Questa dipendenza dalla temperatura si spiega considerando il materiale come un insieme di momenti magnetici indipendenti, dovuti a ciascun atomo o molecola che compone la sostanza. In assenza di un campo applicato, i singoli vettori  $m$  assumono direzioni casuali a causa dell'agitazione termica, cosicché la magnetizzazione netta risultante è nulla. Tuttavia, se si applica un campo, i momenti magnetici tendono a disporsi lungo la sua stessa direzione, anche se contrastati dall'agitazione termica che ne consente solo una parziale orientazione.

**b)** I momenti magnetici interagiscono tra loro dando origine a fenomeni di magnetismo cooperativo. Si nota una situazione di totale allineamento dei momenti con risultante diversa da zero; in questo caso il materiale è detto *ferromagnetico*. A differenza dei materiali paramagnetici, nei materiali ferromagnetici gli orbitali atomici instaurano fra loro un mutuo processo di interazione denominato "interazione di scambio" e generato per un fenomeno di tipo quantomeccanico, dovuto alla relativa orientazione dei momenti di spin e dei momenti orbitali. Tra le caratteristiche principali dei materiali ferromagnetici bisogna ricordare la presenza di una magnetizzazione spontanea che permane anche in assenza di un campo magnetico esterno e che può essere aumentata fino a raggiungere la magnetizzazione di saturazione, sottoponendo il campione ad un campo magnetico via, via più forte. L'energia termica può però produrre degli effetti di redistribuzione spaziale dei momenti magnetici, portando cambiamenti al comportamento del materiale. In particolare, ogni materiale ferromagnetico ad una temperatura, detta Temperatura di Curie, diversa da materiale a materiale, perde la disposizione ordinata degli spin elettronici ed assume un comportamento paramagnetico.

**c)** I momenti mostrano un allineamento antiparallelo, le strutture ferrimagnetiche di diversi sottoreticoli risultano esattamente identiche, ma orientate in direzioni opposte, creando così, in assenza di campo esterno, un annullamento reciproco dei momenti magnetici e quindi una magnetizzazione netta nulla; tale comportamento è definito *antiferromagnetico*.

**d)** L'allineamento dei momenti è antiparallelo, ma presenta diversa popolazione nelle due orientazioni; il momento magnetico risultante è non nullo e il comportamento è di tipo *ferrimagnetico*. Negli ossidi di ferro, per esempio, il reticolo strutturale può risultare composto da due sottoreticoli, denominati  $a$  e  $b$ , entrambi formati da atomi di ferro legati ad atomi di ossigeno, ma aventi diverso stato d'ossidazione:  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  (**Fig.1.3**)



**Fig.1.3** La struttura cristallina della magnetite  $Fe_3O_4$ . Gli atomi in blu sono di  $Fe^{2+}$  con coordinazione tetraedrica. Gli atomi rossi presentano una coordinazione ottaedrica e sono 50/50  $Fe^{2+} / Fe^{3+}$ , gli atomi bianchi sono di ossigeno

Per questa ragione, nei materiali ferrimagnetici, né la struttura né i momenti magnetici dei due sottoreti sono uguali, questo comporta la comparsa di un momento magnetico netto, approssimativamente pari alla differenza tra i momenti magnetici netti relativi al reticolo  $a$  e al reticolo  $b$ . Se le intensità dei momenti magnetici del reticolo  $a$  e del reticolo  $b$  non sono uguali, il materiale presenterà un momento magnetico complessivo non nullo, assumendo un comportamento macroscopico non dissimile a quello delle sostanze ferromagnetiche.

**Tab.1.1** Suscettività magnetiche per i diversi tipi di comportamento

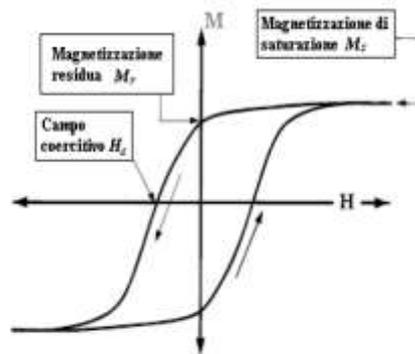
Comportamento	$\chi$ tipici	Variazioni di $\chi$ all'aumento di T	Dipendenza dal campo H
<i>Diamagnetismo</i>	$-10^{-6} \div -10^{-1}$	Nessuna	No
<i>Paramagnetismo</i>	$10^{-6} \div 10^{-1}$	Diminuisce	No
<i>Ferromagnetismo</i>	$\sim 10^3$	Diminuisce	Si
<i>Antiferromagnetismo</i>	$0 - 10^{-2}$	Aumenta	(Si)

La densità di flusso magnetico  $B$  è correlata con la forza del campo esterno e con la magnetizzazione da:

$$B = \mu_0(1 + \chi)H$$

e si può immaginare come la densità delle linee di forza che permeano il mezzo. La densità di flusso magnetico, aumenta se  $M$  si somma ad  $H$ , mentre diminuisce laddove  $M$  si opponga ad  $H$ . I materiali che presentano una suscettività magnetica positiva sono detti paramagnetici, quelli che manifestano una suscettività magnetica negativa sono detti diamagnetici. Nelle sostanze ferromagnetiche la suscettibilità  $\chi \gg 1$  e si nota una forte attrazione dai campi magnetici. Peculiarità di questi materiali

è la capacità di conservare per un certo tempo la magnetizzazione indotta da un campo magnetico esterno, anche quando questo venga rimosso (magnetizzazione residua). In particolare, l'applicazione di un campo magnetico  $H$  induce una magnetizzazione  $M$  nel campione. Tale fenomeno può essere rappresentato su un grafico, in cui la curva caratteristica evidenziata è detta *curva d'isteresi*. Quando un campo magnetico ( $H$ ) viene applicato ad un materiale di questo tipo, si ha una sorta di memorizzazione. Se si aumenta il campo inducente fino ad un valore di saturazione della densità del flusso magnetico ( $B$ ) e poi lo si porta a zero, si ottiene che il materiale presenta una densità di flusso permanente in assenza di induzione, ovvero rimane magnetizzato. Invertendo la direzione del campo, il campo indotto residuo contrasta il campo inducente e per un preciso valore di  $H$ , detto campo coercitivo, la densità di flusso è nulla. Superato questo punto il flusso inizia a salire nella direzione del campo inducente fino a giungere a saturazione. Ripercorrendo il ciclo in senso opposto il fenomeno si manifesta specularmente (**Fig1.4**).



**Fig.1.4** Curva d'isteresi di un materiale ferromagnetico

### 1.2.3 Superparamagnetismo

È noto che un cristallo si divide spontaneamente in domini allo scopo di ridurre la sua energia magnetostatica. Tuttavia il guadagno energetico dovuto alla suddivisione in domini non è indipendente dalla dimensione del cristallo, infatti rapportando l'energia per unità di area di un cristallo singolo dominio ( $E_S$ ) a quella di un cristallo multidominio ( $E_M$ ) si ha:

$$E_S = 2\pi M_S^2 L$$

$$E_M = 2\sqrt{1.7M_S^2 L\gamma}$$

Dove  $\gamma$  è l'energia per unità di area di parete di dominio,  $M_S$  è la magnetizzazione di saturazione e  $L$  è lo spessore del cristallo; dalle equazioni precedenti si nota come il rapporto tra le due energie  $E_S$  ed

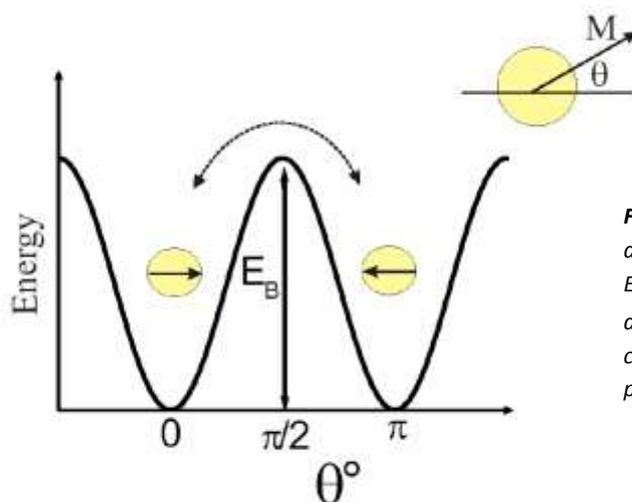
$E_M$  sia proporzionale alla radice quadrata di  $L$ . Ne deriva che quando  $L$  diminuisce, anche il guadagno energetico diminuisce, fino al punto che, al di sotto di uno spessore critico  $L_c$ , il cristallo singolo dominio avrà energia inferiore. Per ottenere una stima di  $L_c$  occorre eguagliare le energie del cristallo prima e dopo la suddivisione in domini e risolvere rispetto a  $L$ :

$$L_c = \frac{1.7\gamma}{\pi^2 M_S^2}$$

Il diametro usuale delle nanoparticelle non rivestite è compreso tra 15 e 30 nm. Poiché ogni cristallo di materiale magnetico nella sospensione colloidale è più piccolo di ogni singolo dominio magnetico (per la magnetite  $\approx 40\text{nm}$ ), questo è completamente magnetizzato. Oltre al valore di magnetizzazione, il singolo dominio è caratterizzato da un'altra importante proprietà: l'anisotropia magnetica che esprime la dipendenza direzionale delle proprietà magnetiche. Le particelle anisotrope tendono ad allinearsi preferibilmente nella direzione che minimizza l'energia libera magnetica. Se consideriamo quindi le nanoparticelle costituite da singoli domini magnetici, ciascuno avrà una energia di anisotropia pari a:

$$E = KV \text{sen}^2 \theta$$

dove:  $K$  è la costante di anisotropia,  $\theta$  è l'angolo formato tra l'asse preferenziale ed il vettore magnetizzazione e  $V$  è il volume della nanoparticella. Per ogni singola particella, le direzioni preferenziali che minimizzano l'energia magnetica libera (a  $\theta = 0$  e  $\theta = \pi$ ) corrispondono all'allineamento parallelo o antiparallelo del vettore magnetizzazione, rispetto all'asse preferenziale. L'energia di anisotropia rappresenta quindi la barriera energetica da superare per allineare il vettore magnetizzazione in direzione parallela o antiparallela all'asse preferenziale (**Fig.1.5**).



**Fig.1.5** Rappresentazione della distribuzione dell'energia di anisotropia.  $E_B$  rappresenta l'energia richiesta per la rotazione del vettore magnetizzazione e  $\theta$  è l'angolo compreso tra tale vettore e la direzione preferenziale di orientamento.

Dall'equazione, si nota che se un singolo dominio magnetico è sufficientemente piccolo, l'energia di anisotropia diventa talmente piccola che semplici fluttuazioni energetiche, dovute al moto

particellare, sono sufficienti per superarla, il che si traduce in una spontanea rotazione del vettore magnetizzazione da una direzione all'altra, persino in assenza di un campo applicato. Le fluttuazioni termiche sono sempre presenti su scala microscopica e tendono ad ostacolare l'allineamento dei momenti da parte del campo esterno. Questo è analogo a quanto succede in un sistema paramagnetico con l'importante differenza che il momento magnetico per atomo in un paramagnete è dell'ordine di grandezza del magnetone di Bohr  $\mu_B$ , mentre il momento di una particella monodominio (che contiene circa  $10^5$  atomi accoppiati ferromagneticamente) è dell'ordine di  $10^5 \mu_B$ , da cui il termine superparamagnetismo introdotto per descrivere il comportamento magnetico dei materiali costituiti da particelle monodominio di piccole dimensioni.

Se  $k_B T \gg KV$  (dove  $k_B$  è la costante di Boltzmann e  $T$  la temperatura), il sistema si comporterà in maniera paramagnetica: la magnetizzazione è proporzionale al campo magnetico, svanisce non appena questo viene allontanato applicato e la direzione del vettore magnetizzazione segue la direzione del campo applicato.

Per particelle piccole, ad alte temperature, l'energia di anisotropia diventa più piccola dell'energia termica, così la magnetizzazione può fluttuare tra i due valori minimi. La frequenza di fluttuazione è espressa dal caratteristico tempo di rilassamento, che è dato dall'espressione di Neel-Brown.

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right)$$

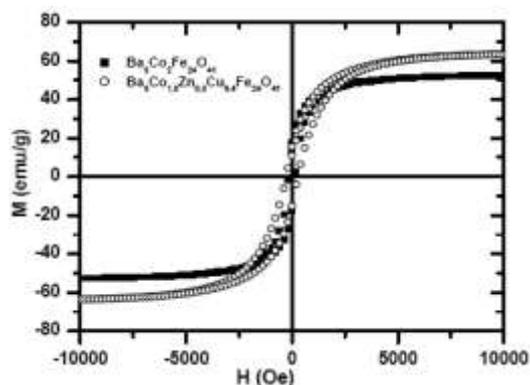
Dove  $\tau_0$  è una costante pari a  $10^{-10}$ . Come si evince dall'espressione di Neel Brown, il tempo di rilassamento è funzione esponenziale nel volume, questo spiega perché la probabilità di una spontanea fluttuazione della magnetizzazione in nanoparticelle grandi o nel materiale bulk, è molto bassa. In assenza di campi magnetici esterni, quando il tempo utilizzato per misurare la magnetizzazione delle nanoparticelle è più lungo della tempo di rilassamento di Neel, il valore di magnetizzazione tenderà a zero. In questo stato esse si comportano come delle sostanze paramagnetiche, ma sono dotate di una suscettività magnetica molto più grande.

Immaginiamo quindi che si stia misurando la magnetizzazione di una singola nanoparticella superparamagnetica e definiamo il tempo di misurazione  $\tau_m$ . Se  $\tau_m \gg \tau_N$  la magnetizzazione fluttuerà diverse volte durante l'esperimento, di conseguenza la magnetizzazione complessiva misurata tenderà a zero. Se  $\tau_m \ll \tau_N$  la magnetizzazione non fluttuerà durante l'esperimento, in questo caso la nanoparticella appare nel cosiddetto stato bloccato. Lo stato della nanoparticella (superparamagnetico o bloccato) dipende dal tempo di misurazione. Una transizione tra lo stato superparamagnetico e lo stato bloccato avviene quando  $\tau_m = \tau_N$ . La temperatura alla quale avviene questa transizione è detta temperatura di blocco ed è espressa da:

$$T_B = \frac{KV}{k_B \ln\left(\frac{T_m}{T_0}\right)}$$

Quando un campo esterno viene applicato, le nanoparticelle superparamagnetiche, tendono ad allineare i loro momenti magnetici lungo la direzione del campo applicato. La curva di magnetizzazione, contrariamente ai materiali ferro e ferrimagnetici, non presenta isteresi, ma adotta una classica forma a S (**Fig.1.6**). Ciò significa che la magnetizzazione è completamente reversibile e, una volta allontanato il campo magnetico esterno, non è presente magnetizzazione residua.

Il comportamento superparamagnetico costituisce un requisito chiave al fine del potenziale uso in campo biomedico: una dispersione delle nanoparticelle può essere iniettata nel corpo senza aggregare in quanto presenterà un momento magnetico solo quando verrà applicato il campo magnetico esterno; inoltre se le nanoparticelle sono sufficientemente piccole una volta rimosso il campo esterno, rilasceranno perdendo la magnetizzazione residua (**Fig.1.6**).



**Fig.1.6** Curva di magnetizzazione di alcuni campioni superparamagnetici. In ascissa è riportato il campo magnetico applicato, mentre in ordinata il valore di magnetizzazione.

### 1.3 Impieghi terapeutici e diagnostici<sup>[9]</sup>

Le nanoparticelle magnetiche hanno numerose applicazioni che attualmente sono limitate dalla disponibilità di metodi di sintesi adeguati e dalla possibilità di maneggiare tali particelle al fine di integrarle nella tecnologia esistente. Un contributo essenziale al potenziale sviluppo di tali nanocristalli è legato allo sviluppo di metodi di preparazione di nanoparticelle magnetiche di dimensioni controllate ed aventi un opportuno ricoprimento superficiale che ne migliori notevolmente la stabilità chimico-fisica. Le potenziali applicazioni biomediche delle nanoparticelle magnetiche coprono sia la diagnostica (NMR imaging, sensoristica) che l'azione terapeutica (veicolazione di farmaci guidata da campo magnetico, ipertermia). In entrambi i casi si sfrutta il targeting passivo, ossia la capacità del sistema di difesa dell'organismo di accumulare le nanoparticelle esclusivamente in fegato, milza e linfonodi. Con l'introduzione di ligandi biologici si avrà un targeting attivo ampliando la possibilità di diagnosi in siti specifici. La frontiera dello sviluppo

di nanoparticelle magnetiche prevede di racchiudere più di una funzionalità di interesse biomedico mediante opportuna preparazione e funzionalizzazione delle nanoparticelle.

### **1.3.1 Diagnostica di risonanza magnetica per immagini<sup>[10]</sup>**

Gli sviluppi recenti della tecnica diagnostica di risonanza magnetica ha portato alla necessità di sviluppare delle nuove classi di farmaci detti anche *magnetodrugs*. Questi farmaci possono essere somministrati al paziente sottoposto a risonanza magnetica al fine di migliorare il contrasto tra i tessuti sani e quelli malati oppure evidenziare il flusso sanguigno negli organi e verificare così la funzionalità di questi ultimi.

I nanocristalli magnetici hanno già trovato impiego commerciale come agenti di contrasto per diagnostica di risonanza magnetica per immagini, esempi commerciali sono i farmaci Endorem® e Resovit®. Attualmente vi sono due classi di nanoparticelle di ossido di ferro clinicamente approvate o in fase di approvazione:

- a) Le *SPION* (SuperParamagnetic Iron Oxide) che avendo dimensioni sopra i 50 nm vengono subito riconosciute dal sistema di difesa (MPS, Mononuclear Phagocyte System) e dopo qualche minuto si accumulano nel fegato (80%) e nella milza (5-10%). Vengono quindi usati per la diagnosi di tumori e metastasi a livello epatico.
- b) Le *USPION* (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide) che grazie alle loro dimensioni ridotte (inferiori a 50 nm) hanno un tempo di circolazione nel sangue nettamente superiore (tempo di emivita di circa 2 ore). Queste particelle poi vengono metabolizzate nei lisosomi ed entrano nel normale ciclo del ferro. Alcune particelle che fuoriescono dai vasi sanguigni vengono catturate dai macrofagi e si ritrovano nei linfonodi, favorendo la diagnosi di tumori in questi punti. Inoltre, poiché principalmente percorrono i vasi, mettono in evidenza un'alterata permeabilità dei vasi in corrispondenza dei tumori.

### **1.3.2 Ipertermia <sup>[11]</sup>**

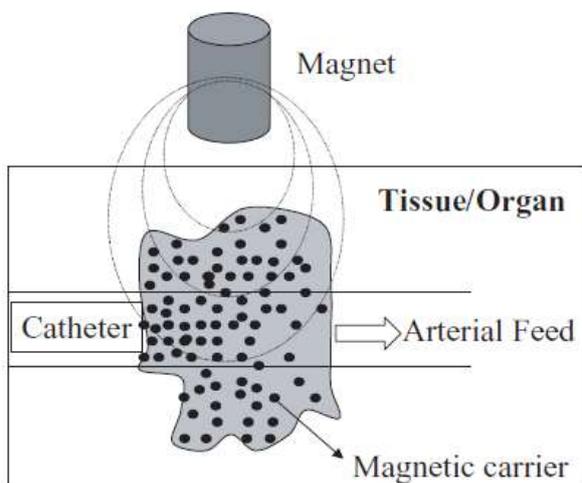
L'ipertermia si basa sulla capacità delle particelle magnetiche di dissipare calore e cederlo ai tessuti in cui si trovano in seguito all'applicazione di un campo magnetico alternato. Questo calore può quindi essere usato per riscaldare il tessuto fino a 42 °C per circa mezz'ora e distruggere così le cellule tumorali.

Per poter sperimentare questi materiali sull'uomo è necessario migliorare alcuni aspetti, tra cui rendere le nanoparticelle selettive verso tessuti interessati da tumori, accoppiandole, ad esempio, con anticorpi specifici. Di norma l'ipertermia è comunque considerata una terapia adiuvante alla

cura dei tumori, il principale vantaggio è dato dalla possibilità di dissipare il calore in una zona molto ristretta del tessuto corporeo.

### 1.3.3 Targeted drug delivery<sup>[1]</sup>

Una strategia che permette il targeting attivo dei farmaci consiste nell'immobilizzazione del principio attivo su una particella magnetica che possa essere specificamente indirizzata nella zona patologica mediante un campo magnetico esterno (**Fig.1.7**). Infatti la mancanza di specificità degli agenti antitumorali impiegati nella chemioterapia ha effetti deleteri su tutto l'organismo; l'uso di nanoparticelle magnetiche aumenterebbe la frazione di agente che arriva alla zona tumorale e contemporaneamente diminuirebbe la frazione che attacca cellule sane. Nella messa a punto di sistemi di questo tipo è necessario tenere conto di un grande numero di parametri, tra cui dimensioni, concentrazione, legame nanoparticella-principio attivo, ricoprimento. Oltre alle applicazioni in chemioterapia, è al vaglio la possibilità di impiegare la tecnica del targeted drug delivery per le terapie geniche. La terapia genica, che prevede l'introduzione di geni all'interno delle cellule per stimolare la produzione di particolari proteine in loco, è limitata dalla breve vita dei geni in vivo e la scarsa efficienza di trasferimento alla cellula. Quindi anche in questo caso il targeting magnetico potrebbe favorire lo sviluppo delle terapie geniche.

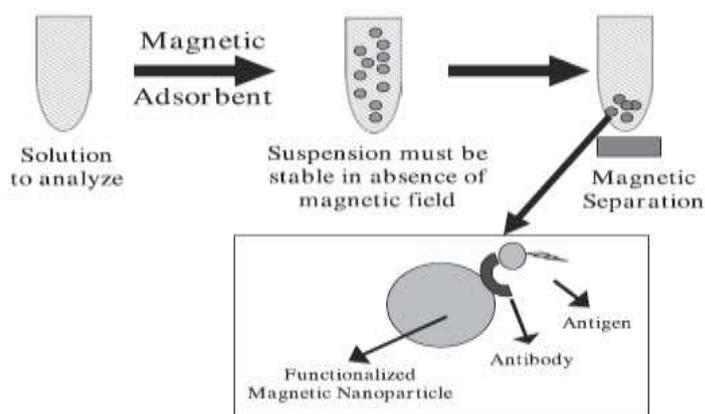


*Fig.1.7 Schema della veicolazione di farmaci ad un sito bersaglio guidata da un campo magnetico. In questo caso, un catetere è introdotto in un'arteria fino al tessuto affetto da tumore. Al di sopra del tessuto bersaglio è posizionato un potente magnete*

### 1.3.4 Separazione magnetica<sup>[1]</sup>

Anche nel caso degli utilizzi per la diagnostica in vitro le applicazioni sono numerose. La possibilità di funzionalizzare la superficie delle SPION in modo da legare selettivamente una vasta classe di molecole biologiche, permette di conferire a quest'ultime le caratteristiche magnetiche delle prime.

Una tecnica di diagnosi immediatamente applicabile è quella della separazione magnetica in cui le biomolecole di interesse una volta legate alle nanoparticelle magnetiche possono essere separate da matrici complesse attraverso semplici procedure di lavaggio per applicazione di un blando campo magnetico esterno, come schematizzato in **Fig.1.8**

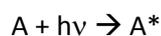


**Fig.1.8** Rappresentazione schematica della separazione magnetica di un analita da una miscela. In questo particolare caso è rappresentato una nanosfera sulla quale è ancorato un anticorpo, dispersa in un liquido contenente l'antigene (sostanza da analizzare)

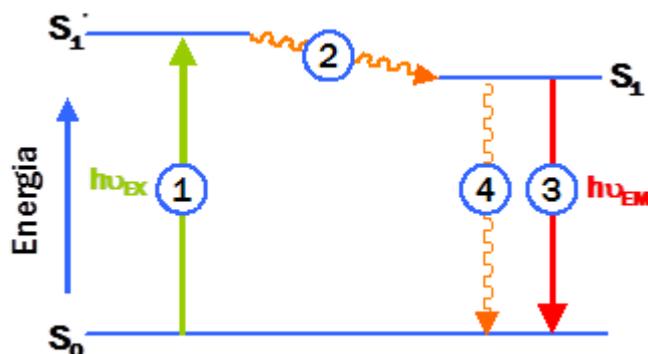
## 1.4 Fondamenti di fotochimica<sup>[11]</sup>

### 1.4.1 Luminescenza, resa quantica di luminescenza e tempo di vita dello stato eccitato

Alla base del fenomeno dell'emissione di luminescenza c'è l'assorbimento da parte di una specie chimica di un fotone di opportuna energia, che porta la molecola dallo stato elettronico fondamentale ad uno dei suoi stati eccitati:

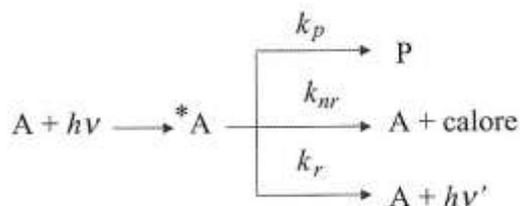


Lo stato elettronico eccitato differisce da quello fondamentale per la distribuzione elettronica e quindi per numerose altre proprietà chimico fisiche (geometria della molecola, proprietà magnetiche ecc.). Complessivamente lo stato eccitato  $A^*$  è una specie chimica con caratteristiche proprie, caratterizzata da un tempo di vita più o meno breve, e che può evolvere attraverso processi che non sono accessibili o permessi allo stato elettronico fondamentale.



**Fig. 1.9** Diagramma di Jablonski semplificato per molecole in cui avviene il processo di emissione di fluorescenza. 1) assorbimento e formazione di uno stato di singoletto eccitato  $S_1'$ ; 2) rilassamento vibrazionale ad  $S_1$ ; 3) emissione di fluorescenza; 4) decadimento non radiativo a  $S_0$

Una specie eccitata  $A^*$  si può disattivare in tre modi: reazione fotochimica, disattivazione non radioativa, disattivazione radioativa, processo per il quale si ha luminescenza (**Fig.1.9**)



**Fig.1.10** I tre principali modi di disattivazione di un generico stato eccitato  $*A$

L'efficienza che caratterizza il processo di luminescenza per una specie chimica viene espressa dal suo rendimento quantico di emissione che può essere definito come:

$$\Phi = \frac{n^\circ \text{ fotoni emessi}}{n^\circ \text{ fotoni assorbiti}}$$

Il modo più semplice per determinare il rendimento quantico di luminescenza di un fluoroforo è basato sul confronto con uno standard a rendimento quantico noto. I rendimenti quantici di emissione di questi composti di riferimento sono praticamente indipendenti dalla lunghezza d'onda d'eccitazione, per cui è possibile usarli in tutto il loro intervallo di assorbimento.

In pratica, il rendimento quantico è generalmente determinato confrontando lo spettro di emissione del fluoroforo in esame con quello di uno standard scelto opportunamente, registrati nelle stesse condizioni sperimentali ( $\lambda$  di eccitazione, fenditure di eccitazione e di emissione); questo confronto viene fatto paragonando le intensità di emissione dei due fluorofori integrate per tutto l'intervallo di lunghezze d'onda (aree sottese dagli spettri di emissione). In queste condizioni, usando la stessa  $\lambda$  d'eccitazione, il rendimento quantico incognito è calcolato usando la formula:

$$\Phi = \Phi_r \cdot \frac{I \cdot A_r \cdot n^2}{I_r \cdot A \cdot n_r^2}$$

Dove  $\Phi$  è il rendimento quantico di emissione,  $I$  è l'area sottesa dallo spettro in tutto l'intervallo delle  $\lambda$  di eccitazione e  $n$  è l'indice di rifrazione del solvente. L'indice  $r$  si riferisce al fluoroforo di riferimento, a rendimento quantico noto. Questa equazione è corretta solo se l'assorbanza alla  $\lambda$  di eccitazione è  $<$  di 0.1; questo limite di assorbanza serve anche a minimizzare effetti di riassorbimento della luce emessa, che devono essere considerati quando ci sia sovrapposizione tra la banda di assorbimento a più bassa energia e la banda di emissione. La presenza del rapporto degli indici di rifrazione dei solventi è dovuta alla considerazione che l'intensità emessa da una sorgente puntiforme in un mezzo di indice di rifrazione  $n_i$ , se osservata da un rivelatore posto in un mezzo di indice di rifrazione  $n_o$  è modificata dal rapporto  $(n_i / n_o)^2$

La luminescenza osservata si può caratterizzare con due tipi di misura: la più comune permette di definirne le caratteristiche energetiche attraverso gli spettri di emissione o eccitazione; l'altra permette di definire le caratteristiche temporali attraverso la misura dell'intensità di emissione in funzione del tempo.

Per ogni fenomeno di decadimento, si può identificare una costante cinetica per cui vale la relazione:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_p}$$

Si può vedere facilmente che il tempo di vita  $\tau$  è il tempo necessario affinché la concentrazione degli stati eccitati si riduca di un fattore  $1/e$ . Infatti, dal trattamento cinetico si ottiene:

$$\frac{d[A^*]}{dt} = -(k_r + k_{nr} + k_p)[A^*]$$

Dalla qui integrazione si ottiene:

$$[A^*] = [A^*]_0 e^{-\Sigma kt}$$

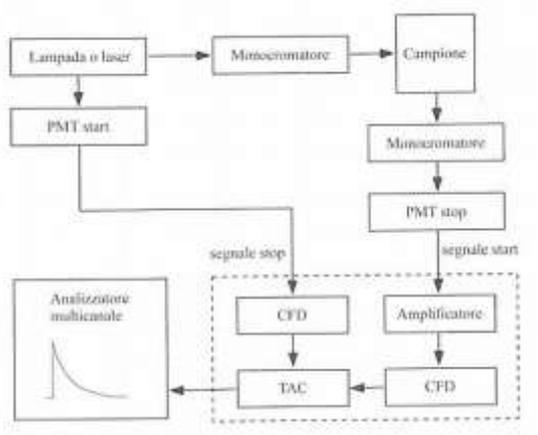
Da cui discende che:

$$[A^*]/[A^*]_0 = 1/e$$

Di conseguenza si può calcolare il tempo di vita di uno stato eccitato se si conosce l'andamento della sua concentrazione in funzione del tempo. La maggior parte delle tecniche che permettono di calcolare il tempo di vita di uno stato eccitato si basano sul rilevamento della curva della concentrazione di  $A^*$  in funzione del tempo sono definite "time domain measurements".

La tecnica cosiddetta a fotone singolo si basa sulla probabilità che un singolo fotone emesso da un campione fluorescente venga captato da un opportuno rivelatore ad alta sensibilità. Tale probabilità viene legata statisticamente alla variazione di concentrazione degli stati eccitati nel

tempo. Questa tecnica fa uso di un'apparecchiatura che è costituita da sorgente eccitatrice a cui è collegato un fotorivelatore, monocromatore di eccitazione, portacampione, monocromatore di emissione, un secondo fotorivelatore ed elettronica per il trattamento dei segnali (**Fig.1.11**). Le caratteristiche che la diversificano da una normale strumentazione per il rivelamento della luminescenza sono 1) la sorgente eccitatrice, 2) la presenza di un fotorivelatore di start, 3) le caratteristiche del secondo rivelatore 4) un inconsueto trattamento del segnale effettuato dalla parte elettronica.



**Fig.1.11.** Schema a blocchi della strumentazione cosiddetta a "fotone singolo"

La sorgente eccitatrice, che di solito è costituita da un piccolo laser, è pulsata (durata dell'impulso 1-5 ns), a bassa intensità e ad alta ripetitività.

Il fotorivelatore di start, è otticamente collegato alla sorgente e fornisce un segnale, elaborato poi dalla parte elettronica, ogni volta che la sorgente emette un flash. Il fotorivelatore di stop è un fotomoltiplicatore e fornisce un segnale quando è colpito dal primo e unico fotone per poi spegnersi e riaccendersi ad inizio di un nuovo ciclo. L'elettronica per il trattamento dati è fondamentalmente costituita da due "constant fraction discriminator" (CFD), un "time to amplitude converter" (TAC) e un analizzatore multicanale. I due CFD, uno per il segnale di start e uno per quello di stop, annullano il ciclo quando uno dei due segnali non raggiunge il rispettivo valore di soglia. Il TAC funziona come un sofisticato cronometro: elaborando i segnali che riceve dai due fotomoltiplicatori, misura la differenza di tempo che intercorre all'interno di un singolo ciclo emissione – eccitazione, fra i fotoni emessi dal campione (segnale dal fotomoltiplicatore di stop) e i fotoni emessi dalla sorgente, che contemporaneamente provocano sia l'eccitazione del campione che il segnale di corrente al fotomoltiplicatore di start. L'analizzatore multicanale raccoglie i segnali in arrivo dal TAC, li accumula e li organizza in un diagramma che fornisce il numero di fotoni visti dal fotomoltiplicatore di stop in funzione dei loro  $\Delta t$  rispetto al flash.

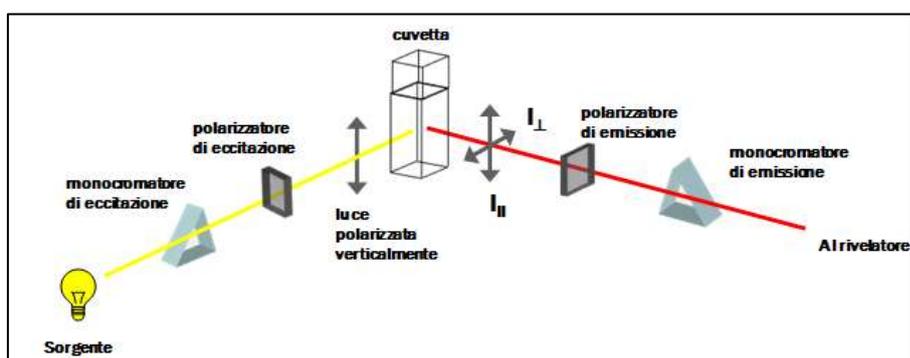
In definitiva l'apparecchiatura funziona così: quando la sorgente emette un flash, il fotomoltiplicatore di start lo vede e invia un segnale al TAC avviando un ciclo temporale di durata predeterminata. Nel

TAC, un apposito circuito genera una tensione che cresce linearmente nel tempo fino ad esaurimento del ciclo temporale predeterminato. Se durante questo tempo arriva un segnale dal fotomoltiplicatore di stop (dovuto alla captazione del singolo fotone emesso) si blocca l'aumento di tensione. A questo punto il TAC invia un segnale all'analizzatore multicanale che numericamente conteggia, accumulandolo in un canale temporalmente definito dal valore della tensione del TAC al momento dello stop. Un nuovo flash avvia poi un altro ciclo eccitazione – emissione finito il quale se ne avvia un altro e così via; in questo modo si ha la possibilità di accumulare un alto numero di conteggi dovuto all'elevata frequenza di lavoro della sorgente. L'accumulo di questi punti nei vari canali costruisce una curva di decadimento dello stato eccitato in funzione del tempo solo se c'è un rapporto segnale di stop/start < 0.02 cioè solo se 98 volte su 100 la differenza di potenziale crescente del TAC arriva a fine corsa senza essere bloccata dal segnale di stop. Si ha una fedele ricostruzione della curva di decadimento di  $A^*$  in funzione del tempo solo se i fotoni emessi in qualsiasi momento hanno una probabilità di essere monitorati legata unicamente alla concentrazione degli stati eccitati emittenti, cioè solo se statisticamente tutti i fotoni, indipendentemente dal momento di emissione, hanno una probabilità finita di essere visti.

Questa tecnica fornisce ricostruzioni della curva di decadimento molto precise, in fase di elaborazione è poi possibile, grazie alla "deconvoluzione", misurare tempi di vita inferiori al tempo di impulso della sorgente eccitatrice. La deconvoluzione è una tecnica software che permette di depurare la curva di decadimento globale dal contributo temporale della sorgente eccitatrice lasciando solo l'andamento temporale dell'emissione.

### 1.4.2 Anisotropia di fluorescenza

L'anisotropia di fluorescenza è una grandezza che permette di quantificare il grado di polarizzazione della fluorescenza proveniente da un campione eccitato con luce polarizzata. Per misurarla, il campione viene eccitato con luce polarizzata verticalmente, interponendo fra esso e la sorgente un polarizzatore detto di eccitazione. La fluorescenza viene invece misurata attraverso un altro polarizzatore detto polarizzatore di emissione.



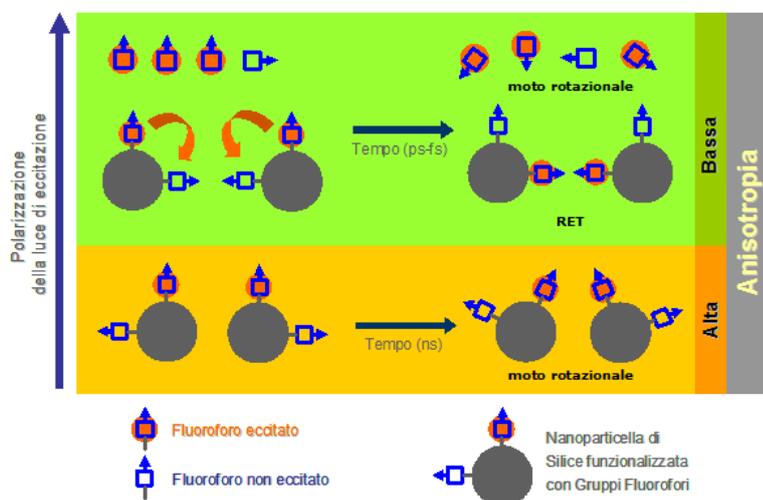
*Fig.1.12* Rappresentazione schematica dello strumento

Se si indica con  $I_v$  e  $I_o$  le intensità misurate rispettivamente quando il polarizzatore di emissione è verticale (parallelo a quello di eccitazione) ed orizzontale (perpendicolare a quello di eccitazione) l'anisotropia di fluorescenza  $r$  è definita come:

$$r = \frac{I_v - I_o}{I_v + 2I_o}$$

Per le misure di anisotropia di fluorescenza si utilizzano fluorimetri dotati di una coppia di polarizzatori inseriti tra i monocromatori.

L'origine dell'anisotropia di fluorescenza è legata alla polarizzazione delle transizioni elettroniche nelle molecole: ad ogni transizione è associato un vettore chiamato momento di transizione, che possiede una determinata orientazione rispetto alla struttura della molecola. In generale quando la disattivazione di uno stato eccitato avviene per via radiativa, il fotone emesso risulta essere polarizzato parallelamente al momento di transizione. Pertanto, se si osserva una sola molecola, la polarizzazione della luce emessa è parallela alla direzione individuata dalla transizione responsabile della fluorescenza. Tuttavia le misure di fluorescenza vengono effettuate su un grande numero di molecole simultaneamente, che per di più sono orientate in modo del tutto casuale e libere di ruotare. Dei vari fluorofori orientati in maniera casuale verranno eccitati prevalentemente quelli orientati in modo tale che il momento di transizione risulti parallelo al piano di polarizzazione della luce di eccitazione. L'emissione di luce a seguito dell'eccitazione avverrà pure in modo polarizzato. Più in generale però, le molecole sono libere di diffondere e di ruotare nello spazio, questo non impedisce una loro eccitazione selettiva con luce polarizzata, ma ha delle implicazioni notevoli sulla polarizzazione della luce emessa. Infatti, nel tempo che intercorre fra l'eccitazione e l'emissione (mediamente individuato dal tempo di vita) le molecole eccitate possono riorientarsi per effetto dei moti browniani. Il risultato sarà che la popolazione di molecole selettivamente eccitate in virtù della orientazione preferenziale tenderà a riorientarsi in modo casuale, generando un'emissione di luce complessivamente non polarizzata. Questo processo è rappresentato schematicamente in **Fig.1.12** per una popolazione di fluorofori in soluzione e per nanoparticelle contenenti delle molecole fluorescenti.



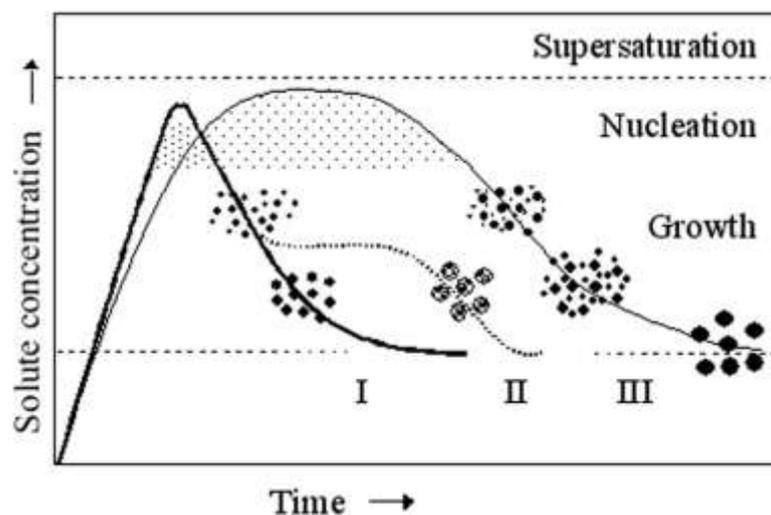
**Fig.1.12** Rappresentazione schematica durante una misura di polarizzazione per una soluzione di fluorofori isolati e di nanoparticelle di silice funzionalizzate con gruppi fluorescenti. I momenti di dipolo (in assorbimento) sono rappresentati dalle freccette. L'elevata depolarizzazione può essere conseguenza di moti rotazionali molto veloci (fluorofori isolati) o di RET (Resonance Energy Transfer) tra fluorofori nelle nanoparticelle.

Un altro importante meccanismo di depolarizzazione è il trasferimento di energia fra fluorofori uguali, un processo che non può essere rilevato mediante spettri di fluorescenza o misure di tempo di vita dello stato eccitato. Questo fenomeno molto importante consente la migrazione dell'energia di eccitazione da un fluoroforo all'altro.

## 1.5 Sintesi delle nanoparticelle magnetiche di $\text{Fe}_3\text{O}_4$ [2; 12]

I metodi di sintesi che prevedono la precipitazione delle nanoparticelle da una soluzione costituita dai loro precursori, offrono un buon controllo in termini di forma, dimensione e distribuzione dei diametri; di conseguenza sono estremamente appropriati per la sintesi di nanoparticelle magnetiche adoperabili in campi biomedici.

Una rappresentazione schematica di alcuni differenti meccanismi proposti per spiegare la formazione di una popolazione di nanoparticelle è riportata in **Fig.1.13**.



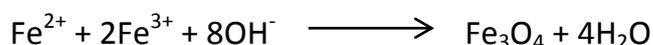
**Fig.13.** Meccanismo di formazione di una popolazione uniforme di nanoparticelle da una soluzione. Curva I: nucleazione e crescita uniforme attraverso processi diffusivi (modello LaMer e Dinegar); curva II: nucleazione, crescita e agragazione di subunità più piccole; curva III: nucleazioni multiple

Generalmente si assiste ad una rapida nucleazione delle nanoparticelle quando la concentrazione della specie che la costituisce raggiunge una concentrazione critica detta "di supersaturazione". Successivamente i nuclei così ottenuti possono crescere uniformemente per diffusione delle specie costituenti dalla soluzione alla superficie della nanoparticella, finché la dimensione finale è raggiunta (modello di LaMer e Dinegar). Per ottenere una popolazione monodispersa è necessario che lo stadio di nucleazione e lo stadio di crescita siano separati. Una separazione artificiale del processo di nucleazione dal processo di crescita può essere realizzata seminando nel mezzo di reazione una specie diversa, comunque al di sotto della concentrazione critica di supersaturazione.

I più comuni metodi di sintesi per ottenere nanoparticelle magnetiche di magnetite, a partire da una soluzione (processi sol-gel), sono riportati di seguito.

### 1.5.1 Coprecipitazione<sup>[13]</sup>

La tecnica di coprecipitazione è probabilmente il metodo di sintesi più semplice per ottenere nanoparticelle magnetiche. Gli ossidi di ferro (sia  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  che  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) sono preparati da una miscela stechiometrica di sali di Fe(II) e Fe(III) in ambiente acquoso, secondo la reazione:



La precipitazione completa della magnetite avviene a pH alcalini, con un rapporto stechiometrico Fe(III):Fe(II) pari a 2:1, in ambiente di reazione non ossidante, poiché la magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) è sensibile all'ossidazione in maghemite ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) presenza di ossigeno.

Il principale vantaggio del processo di coprecipitazione è costituito dal fatto che un elevata quantità di nanoparticelle può essere sintetizzata. Tuttavia il controllo della distribuzione delle dimensioni è limitato. Una grande varietà di parametri possono essere modificati durante la sintesi al fine di modificare le dimensioni finali, le caratteristiche magnetiche oppure le proprietà superficiali delle nanoparticelle. La forma e le dimensioni delle nanoparticelle possono essere controllate agendo sul pH, sulla forza ionica, sulla natura dei sali precursori (perclorati, cloruri, solfati e nitrati), oppure sul rapporto stechiometrico Fe(III):Fe(II).

### 1.5.2 Sintesi in ambiente confinato: microemulsioni<sup>[14]</sup>

Dato che la nanoparticelle ottenute per coprecipitazione possono andare incontro ad un'ampia distribuzione dei diametri, sono stati recentemente sviluppati nuovi metodi sintetici che conducono a una distribuzione più ristretta e ad un migliore controllo sui parametri operativi. In questo senso a partire dagli anni ottanta, sono stati effettuati numerosi tentativi di sintesi di nanoparticelle magnetiche in un ambiente confinato. Tipicamente vengono utilizzate delle micelle inverse o microemulsioni, sistemi in cui una molecola anfifilica (tensioattivo) consente la dispersione stabile di goccioline acquose all'interno di solventi lipofili. In questo caso le microemulsioni agiscono come microscopici reattori per la sintesi delle nanoparticelle (**Fig.1.17**). Il principale vantaggio di questa sintesi è dato dalla possibilità di controllare la dimensione finale delle nanoparticelle giocando su parametri come la quantità d'acqua. Questo tipo di sintesi, inoltre, consente di limitare fenomeni di aggragazione e crescita incontrollata, viene perciò considerato il più adeguato, versatile e semplice metodo per preparare nanoparticelle magnetiche da una soluzione, valido sia per applicazioni *in vivo* che per applicazioni *in vitro*.

In una tipica procedura sperimentale vengono preparate due microemulsioni utilizzando cicloesano come solvente organico e tensioattivi come Triton X-100 o Igepal CO-520 (**Fig.1.14**) come molecole anfifiliche. Nella componente acquosa della prima microemulsione vi è solubilizzato una certa quantità di sali di Fe(II) e Fe(III), tipicamente solfato ferroso e cloruro ferrico; invece la

componente acquosa della seconda microemulsione è resa alcalina per aggiunta di una base come NaOH. Le microemulsioni sono agitate vigorosamente in bagno a ultrasuoni e successivamente la seconda microemulsione è aggiunta goccia a goccia alla prima. Si potrà notare immediatamente la coalescenza delle goccioline d'acqua che consente il mescolamento dei reagenti e quindi la formazione delle nanoparticelle.

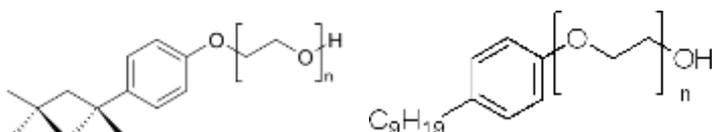


Fig.1.14. Da sinistra a destra: Triton X-100 e Igepal CO-520

### 1.5.3 Sintesi attraverso i polioli<sup>[15]</sup>

La sintesi attraverso i polioli sta diventando molto promettente poiché offre anch'essa la possibilità di ottenere una popolazione monodispersa di nanoparticelle, utilizzabili a scopi biomedico. Con questa tecnica le nanoparticelle sono ottenute per riduzione di sali metallici e precipitazione da una soluzione contenente un poliolo. Questo processo fu inizialmente utilizzato per preparare nanoparticelle di metalli nobili come Ru, Pd, Pt e Au e in seguito esteso per la sintesi di nanomateriali a base di ossidi di ferro.

In questo processo di sintesi, il poliolo agisce da solvente del precursore metallico, da agente riducente e in alcuni casi da chelante del catione metallico. La soluzione è agitata e riscaldata fino alla temperatura di ebollizione del poliolo, in questo modo vengono ridotti un gran numero di cationi metallici. Un miglior controllo delle dimensioni può essere ottenuto seminando l'ambiente di reazione con particelle esterne (nucleazione eterogenea). In questa maniera i processi di nucleazione e crescita sono separati e possono essere sintetizzate particelle molto uniformi.

Nanoparticelle di ferro possono essere ottenute per disproporzionamento dell'idrossido ferroso in ambiente organico. Il cloruro ferroso e l'idrossido di sodio reagiscono con glicole etilenico o polietilen glicole e la precipitazione avviene in un range di temperature compreso tra 80 e 100°C. Inoltre con questa tecnica si possono realizzare leghe di ferro attraverso la coprecipitazione di altri metalli come Ni o Co.

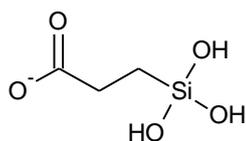
### 1.6 Coating delle nanoparticelle magnetiche<sup>[2]</sup>

La sintesi di nanoparticelle magnetiche sta diventando un target sempre più importante per vie delle vaste applicazioni biotecnologiche. Di conseguenza si deve necessariamente porre l'attenzione sulla sintesi di fluidi magnetici stabili, costituiti da nanoparticelle uniformemente distribuite in forma e dimensioni. Tuttavia le nanoparticelle magnetiche presentano alcuni svantaggi che ne limitano l'applicabilità pratica: tendono a formare aggregati, tendono ad degradarsi spontaneamente con

alterazione delle proprietà magnetiche e possono andare incontro a rapida biodegradazione quando sono poste in sistemi biologici. Per questi motivi occorre eseguire un coating delle nanoparticelle magnetiche, ovvero sintetizzare su di esse un rivestimento che ne preservi le caratteristiche senza alterarne sensibilmente le proprietà magnetiche che le rendono uniche.

La stabilizzazione delle particelle di ossidi di ferro è cruciale per ottenere ferrofluidi magnetici e colloidali, che risultino stabili sia nei mezzi biologici che durante l'applicazione di un campo magnetico. La stabilità è data dall'equilibrio tra forze attrattive e repulsive, la stabilizzazione delle nanoparticelle può essere aumentata aumentando l'entità di due forze repulsive: elettrostatica e sterica. Le repulsioni steriche si realizzano quando una nanoparticella viene rivestita da molecole pesanti e dense, come quelle di un polimero. Le repulsioni elettrostatiche possono essere seguite attraverso la conoscenza del cosiddetto potenziale zeta che rappresenta il potenziale generato in seguito alla formazione del doppio strato elettrico ed è responsabile della stabilità o instabilità delle sospensioni colloidali. Il potenziale zeta quindi, può essere inteso come la densità di carica elettrostatica che riveste le nanoparticelle; il punto isoelettrico (punto di carica zero) per le nanoparticelle magnetiche di magnetite è osservato a pH 6.8. Attorno a questo punto la densità di carica superficiale è talmente bassa che le nanoparticelle risultano instabili e tendono a formare flocculati.

Tra i materiali inorganici utilizzati per il coating di nanoparticelle magnetiche, la **silice** ( $\text{SiO}_2$ ) è sicuramente uno tra i più versatili ed efficienti. Il rivestimento con silice stabilizza le nanoparticelle in due modi: il primo è attraverso la schermatura dei dipoli magnetici, lo shell non magnetico attorno ad un core magnetico contribuisce ad abbassare il valore di magnetizzazione delle nanoparticelle e a prevenirne l'aggregazione; il secondo è costituito dal fatto che la silice conferisce alla nanoparticella una carica negativa che fornisce una repulsione elettrostatica tra le altre nanoparticelle e ne incrementa la stabilità. Un metodo per aumentare la repulsione elettrostatica e quindi la stabilità delle nanoparticelle consiste nell'introdurre in sede di sintesi una molecola che abbia contemporaneamente un gruppo silanico (che consente che venga polimerizzata) e un gruppo portatore di carica negativa come un carbossilato (che aumenta sensibilmente la repulsione elettrostatica). Una molecola adatta a questo scopo è il carbossi etil silan triolo<sup>[16]</sup> (CEST, **Fig.1.15**):

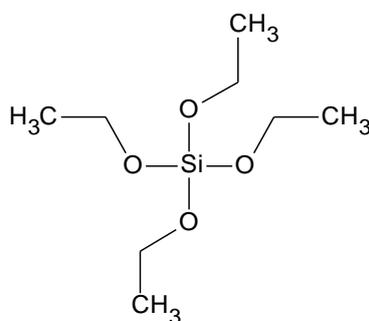


**Fig.1.15** Carbossi etil silan triolo (CEST)

Un'altra importante caratteristica di questo tipo di coating è data dalla natura stessa della silice: l'abbondanza di gruppi silanici consente, una volta costituito il rivestimento o addirittura durante la sintesi dello stesso, di funzionalizzare la particella attraverso coupling covalenti tra lo shell e molecole target come farmaci o coloranti fluorescenti. La silice inoltre è un substrato non tossico e

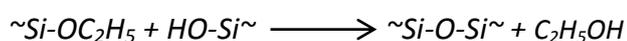
biocompatibile e abbassa sensibilmente la tossicità intrinseca degli ossidi di ferro. Tutto ciò consente la realizzazione di un fluido magnetico non tossico, veicolabile facilmente, attraverso l'applicazione di un campo magnetico esterno, all'interno dei tessuti biologici. Questo apre la strada ad applicazioni come il target drug delivery ovvero la veicolazione di antigeni legati alle nanoparticelle sino al recettore specifico in un determinato tessuto biologico. Se le nanoparticelle vengono poi funzionalizzate con fluorofori ad alta resa quantica, ecco che si può ottenere un efficace mezzo di contrasto che manifesta contemporaneamente buone proprietà ottiche e magnetiche.

Il primo metodo realizzato per eseguire il coating di silice è il processo Stöber<sup>[17]</sup> nel quale la silice è formata in situ attraverso l'idrolisi e la condensazione di un precursore come il tetraetil ortosilicato (TEOS, **Fig.1.16**) in ambiente di reazione costituito da una miscela di acqua, ammoniacca ed etanolo.



**Fig.1.16** TEOS

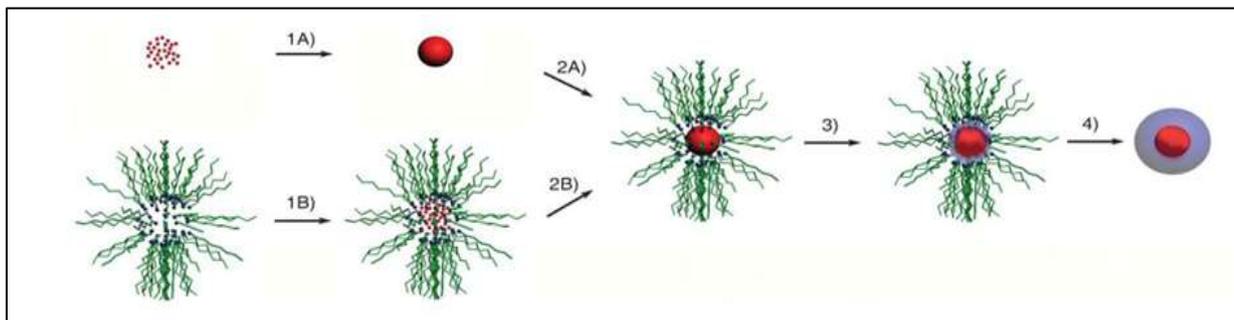
Durante la reazione di idrolisi, i gruppi etossi del TEOS reagiscono con le molecole d'acqua per formare la specie intermedia  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_{4-x}(\text{OH})_x$  nella quale uno o più gruppi idrossi subentrano a gruppi etossi. L'ammoniaca lavora come catalizzatore alcalino: la reazione di idrolisi è iniziata dall'attacco dell'anione  $\text{OH}^-$  alla molecola di TEOS. Dopo l'idrolisi, la condensazione avviene immediatamente: il gruppo idrossi dell'intermedio  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_{4-x}(\text{OH})_x$  reagisce con un gruppo etossi o con un gruppo idrossi di un'altra molecola di TEOS per formare legami a ponte Si-O-Si.



Le blande condizioni di reazione e il work up poco impegnativo fanno di questo metodo di coating il più semplice e veloce (la reazione giunge a completezza in 3 ore). Tuttavia questo metodo di coating presenta alcuni sostanziali svantaggi che fanno sì che non venga quasi mai adoperato. In primo luogo vi è la difficoltà nel controllo della nucleazione delle nanoparticelle, che conduce spesso alla formazione di grandi aggregati. In secondo luogo, questo metodo non fornisce un efficace controllo sulla polidispersità e inoltre risulta difficile eseguire un tuning dei precursori per verificare come si modificano le caratteristiche delle nanoparticelle.

A partire dagli anni novanta è stato sviluppato un nuovo metodo di “silica coating”: il metodo delle microemulsioni. La sintesi di nanoparticelle in microemulsione è stata a lungo studiata, dimostrandosi uno degli strumenti più potenti tra quelli attualmente disponibili. Le cosiddette water-in-oil microemulsions (W/O) sono state ampiamente utilizzate nella sintesi sia del core magnetico delle nanoparticelle, sia nella sintesi dello shell protettivo, ovvero del coating. Anche in questo metodo si assiste all'idrolisi e successiva condensazione di un precursore della silice, ma la reazione avviene esclusivamente all'interno di minuscole micelle inverse che determinano forma e dimensione delle nanoparticelle (**Fig.1.17**). Sono sistemi isotropici e termodinamicamente stabili, costituiti da tre elementi: l'acqua, il solvente organico (oil) e una molecola anfifilica, detta tensioattivo. Il tensioattivo abbassa la tensione interfacciale tra l'acqua e il componente organico e, superata la concentrazione micellare critica, si può assistere alla formazione di micelle di dimensioni submicrometriche, costituite da minuscole gocce di acqua (water pool) confinate attraverso il tensioattivo nel mezzo organico<sup>[18]</sup>.

Le minuscole micelle che si vengono a costituire nella realizzazione di una W/O microemulsion, si comportano come nanoreattori per la sintesi di nanoparticelle di diversi materiali. La sintesi in microemulsione consente la realizzazione di nanoparticelle perfettamente sferiche; inoltre le dimensioni nanoparticellari possono essere controllate variando il rapporto molare tra acqua e tensioattivo. Altri parametri che influenzano la dimensione finale sono: la concentrazione dei reagenti e la temperatura<sup>[2]</sup>.



**Fig.1.17** Illustrazione schematica di una W/O microemulsion per la sintesi di una NP core-shell. Nel primo percorso, il core è stato precedentemente sintetizzato (1A) e trasferito nella microemulsione preparata miscelando acqua, tensioattivo e solvente organico (2A). Nel secondo percorso il precursore del core della nanoparticella è solubilizzato nella micella inversa (1B) e successivamente avviene la sintesi del core dentro la micella (2B), seguita da idrolisi e condensazione in situ del TEOS, precursore dello shell (3). Dopo il work up si ottiene la nanoparticella core-shell (4).

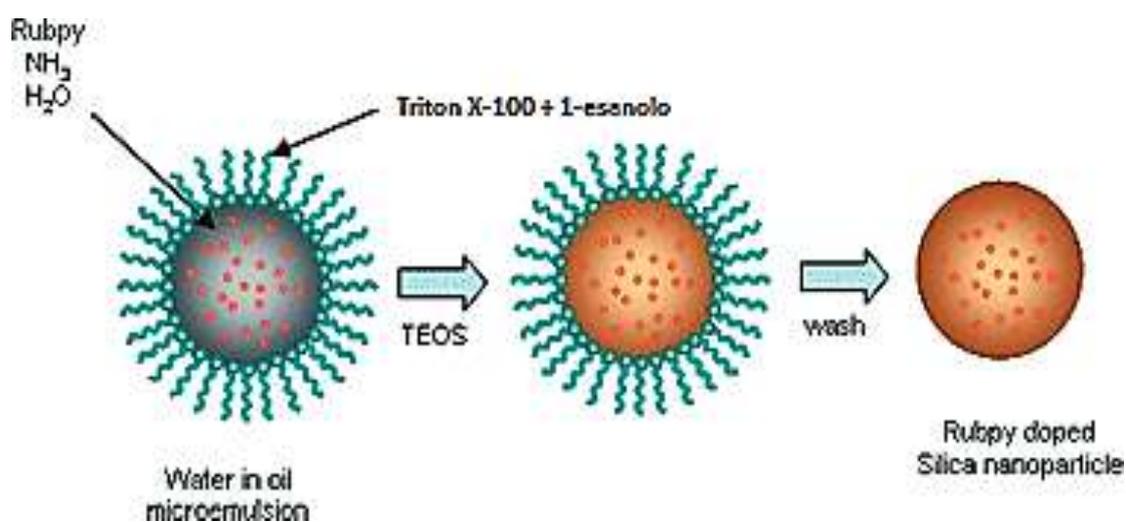
Esistono svariati metodi per rivestire nanoparticelle con silice che coinvolgono le microemulsioni, il più semplice consiste nel rivestire nanoparticelle, precedentemente sintetizzate, confinate nelle nanogocce che costituiscono la microemulsione. Questa tipologia di coating viene particolarmente sfruttata quando risulta impossibile rivestire le nanoparticelle con il classico metodo di Stöber. Comparato con il metodo di Stöber, il rivestimento in microemulsione, mostra molti vantaggi quali un

maggior controllo sulla nucleazione della silice che è limitata esclusivamente all'interno delle micelle e un'incrementata possibilità di funzionalizzare le nanoparticelle.

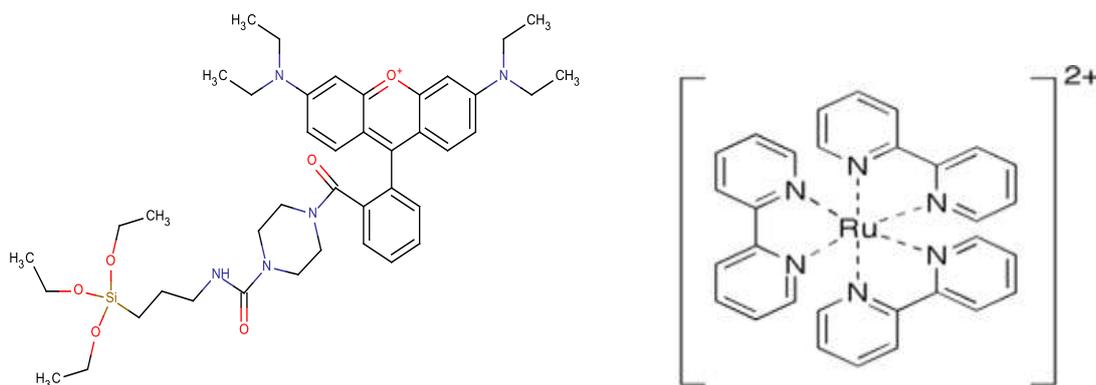
## 1.7 Funzionalizzazione dei coating con molecole fluorofore<sup>[19]</sup>

Allo scopo di creare delle specie emittive più robuste negli ultimi anni sono state sviluppate delle nanoparticelle ibride organiche/inorganiche costituite da un fluoroforo organico e uno strato di silice amorfa. Come matrice per il fluoroforo, la silice presenta una notevole stabilità chimica ed è in grado di proteggere dalle perturbazioni esterne il colorante che vi finisce incapsulato all'interno. In alcuni casi le proprietà fotochimiche del colorante incapsulato risultano incrementate, per esempio quando un colorante è incapsulato nella matrice di  $\text{SiO}_2$  la sua esposizione all'ossigeno atmosferico è sensibilmente ridotta, e questo si può tradurre in un aumento del tempo di vita.

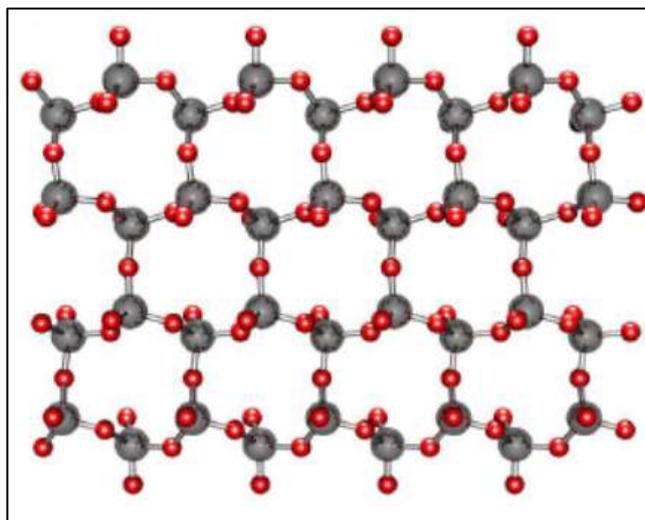
Le particelle di silice sono generalmente sintetizzate con buoni risultati attraverso la tecnica delle microemulsioni, che fornisce un ambiente confinato entro il quale le nanoparticelle crescono in maniera controllata senza la formazione di aggregati. I coloranti idrofili si legano allo strato di silice per interazioni dipolari con la superficie della nanoparticella ricca di gruppi  $-\text{OH}$  (è questo il caso del  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ) oppure possono rimanervi intrappolati all'interno sempre per via delle interazioni fluoroforo-silice (**Fig.1.18**) I fluorofori possono altresì legarsi alla nanoparticella attraverso la formazione di legami covalenti, come nel caso della RodB.Sil (**Figg.1.19 e 1.20**) In questo caso il colorante è funzionalizzato precedentemente con un gruppo silanico che viene idrolizzato come il TEOS per formare legami  $\text{O-Si-O}$  e quindi funge da ancora per la molecola di colorante.



**Fig.1.18** Rappresentazione schematica della sintesi di una nanoparticella di silice drogata con  $\text{Ru}(\text{BPy})_3^{2+}$  attraverso la tecnica delle microemulsioni



**Fig.1.19** A sinistra una molecola di Rodamina B silanizzata: si noti la presenza del gruppo silanico che funge da sito di ancoraggio evidenziato. A destra il complesso  $Ru(BPy)_3^{2+}$



**Fig. 1.20** Reticolo di SiO<sub>2</sub>, gli atomi di ossigeno sono indicati in rosso, mentre gli atomi di silicio sono indicati in grigio. Sugli atomi di ossigeno terminali vi è un'elevata presenza di gruppi -OH che consente successive funzionalizzazioni, tra cui l'adesione di coloranti idrofili

## 1.8 Scopo della Tesi

L'obiettivo principale di questo lavoro è stato la messa a punto di un processo semplice ed efficace per il rivestimento con silice di nanoparticelle di magnetite. A tale scopo si sono presi in esame due tipologie di nanomateriali: un nanosol commerciale di magnetite e una nanopolvere di magnetite da noi successivamente dispersa in fase acquosa. Il rivestimento è stato realizzato seguendo due metodi sintetici ricavati dalla letteratura e adattati allo scopo.

Il primo, che per comodità verrà chiamato **metodo di Stöber**, consiste nel coating delle nanoparticelle direttamente in ambiente idroalcolico attraverso l'idrolisi e la successiva condensazione di un precursore della silice come il tetraetil ortosilicato (TEOS).

Il secondo percorso sintetico, che verrà denominato **metodo delle microemulsioni**, si basa sempre sull'idrolisi e condensazione del TEOS, ma in questo caso, le nanoparticelle di magnetite sono

confinare all'interno di micelle inverse e la reazione di coating avviene all'interfaccia tra la fase acquosa e organica. Quest'ultimo metodo è stato quello principalmente sviluppato nel corso di questo lavoro di tesi.

Il lavoro si è concentrato sull'ottimizzazione dei parametri operativi che conducono alla sintesi di nanoparticelle perfettamente rivestite e quanto più omogenee in termini di dimensione e distribuzione dei diametri. Giocando sui parametri della sintesi, come la quantità di acqua nella microemulsione e la quantità di precursore di silice, si è studiato il controllo delle caratteristiche nanostrutturali quali il diametro delle nanoparticelle, lo spessore dello strato di silice che costituisce il rivestimento e la quantità di materiale magnetico contenuto in una nanoparticella.

Un secondo obiettivo è stato inglobare sulle nanoparticelle alcuni fluorofori e monitorare se questi hanno un'influenza sul rivestimento e sulla morfologia delle nanoparticelle.

Le caratteristiche nanostrutturali e funzionali delle particelle prodotte sono state investigate tramite microscopia TEM, DLS, caratterizzazione magnetica e ottica. La microscopia elettronica TEM e la relativa elaborazione software delle immagini hanno permesso di studiare la nanostruttura delle particelle evidenziando la natura core-shell e stimando la distribuzione dimensionale delle particelle e dei rivestimenti. La caratterizzazione magnetica ha avuto lo scopo di verificare come il coating di silice vada a influire sulle proprietà magnetiche delle nanoparticelle. Infine, la caratterizzazione fotochimica del sistema NP@Dye è stata effettuata attraverso la registrazione degli spettri d'emissione e assorbimento e la misurazione dei tempi di vita dei fluorofori legati alle nanoparticelle.

## Bibliografia

- [1] Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst L., Muller R.N, *Chem Rev*, 108, 2064, **2008**.
- [2] Martinez A., Peirez-Juste J., Liz-Marzà L.M., *Adv. Mat.*, 22, 1182, **2010**.
- [3] Pham L.H., Nguyen A.T., Do M.H., Le H.V., *Journal of Physics conference*, series 187, **2009**.
- [4] Im S.H., Herricks T., Lee Y.T., *Chem. Phys. Lett.*, 401, 19, **2005**.
- [5] Tartaj P., Serna C.J., *Chem. Mater.*, 14, 4396, **2002**.
- [6] Tartaj P., Serna C.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 15754, **2003**.
- [7] Lu Y., Yin Y., Mayers B., *Nano Lett*, 7, 149, **2007**.
- [8] Halliday R., Resnik R., Kenneth S., *Physics vol. 1 e 2*, Wiley Edition, Weinheim, Germania, **2003**.
- [9] Ping L., *Nanoscale materials and applications*, Springer, New York, USA, **2004**.
- [10] Burtea C., Laurent S., Roch A., Vander Elst L., Muller R.N., *J. Inorg. Biochem.*, 99 (5), 1135, **2005**
- [11] Moggi L., Juris A., Gandolfi M.T., *Manuale del fotochimico*, Bononia University Press, Bologna, Italia, **2005**.

- [12] Tartaj P., Serna C.J., Morales M., Veintemillas S., *J. Phys D: Appl Phys.* 36, 182-197, **2003**.
- [13] Jolivet J.P., Chaneac C., Tronc E., *Chem. Commun.*, 5, 481, **2004**.
- [14] Santra S., Tapeç R., Theodoropoulou N., Dobson J., Hebard A. and Tan W., *Langmuir*, 17, 2900, **2001**.
- [15] Tzitzios V.K., Petridis D., Zafiropoulou I., Hadjipanayis G., Niarchos D., *J. Magn. Magn. Mater.*, 294 (2), e95, **2005**.
- [16] Wang L., Lofton C., Popp M., Tan W., *Bioconjugate Chem.*, 18,610, **2007**.
- [17] Deng Y., Wang C.C., Hu J.H., Yang L.W., Fu S.K., *Colloids and Surfaces A*, 262, 87, **2005**.
- [18] Stjerndahl M., Andersson M., Hall E.H., Pajeroski M.D., Meisel M.W., Duran S.R., *Langmuir*, 24, 3532, **2008**.
- [19] Burns A., Ow H., Wiesner V., *Chem. Soc. Rev.*, 35, 1028, **2006**.

## 2. PARTE SPERIMENTALE

### 2.1 Procedure sperimentali

#### 2.1.1 Strumentazione

**Spettroscopia di fluorescenza:** I fluorimetri utilizzati per la registrazione degli spettri di fluorescenza sono stati dei Perkin Elmer LS-50B e LS-55, dotati di lampada allo xenon impulsata, filtri di polarizzazione e fotomoltiplicatore Hamamatsu R928. Le misure di decadimento della fluorescenza risolte nel tempo, sono state effettuate con un fluorimetro modulare Edinburgh equipaggiato con un laser a 410 nm della Picoquant, dotato di polarizzatori e di un modulo per la misura dei tempi di vita.

**Spettroscopia UV-VIS:** Gli spettrofotometri utilizzati per la registrazione di spettri UV-VIS sono strumenti a doppio raggio dotati di portacelle multiplo Perkin-Elmer, sono state utilizzate cuvette di quarzo con cammino ottico di un centimetro.

**DLS (dynamic light scattering):** La determinazione del diametro idrodinamico delle sospensioni di nanoparticelle è stata effettuata con uno strumento della Malvern NANO ZS, equipaggiato con un laser a diodo a 633 nm, utilizzando delle cuvette in polisterene usa e getta con cammino ottico di 1 cm. La larghezza della distribuzione del diametro idrodinamico delle particelle viene espressa tramite l'indice di polidispersione (PDI). Nel caso di una distribuzione monomodale (Gaussiana) ottenuta tramite analisi cumulativa,  $PDI = (\sigma/Z_{ave})^2$  dove  $\sigma$  è la deviazione standard della distribuzione e  $Z_{ave}$  è il diametro medio della popolazione di particelle.

**Esperimenti ed Immagini TEM:** Gli esperimenti di Microscopia Elettronica in Trasmissione sono stati effettuati dalla Dott.ssa Roberta Randi del Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale dell'Università di Bologna. Le immagini TEM sono state ottenute con un microscopio elettronico a trasmissione Philips EM 208 operante a 800 KeV. I campioni per le misure sono stati preparati depositando una goccia di soluzione di nanoparticelle in acqua o etanolo su una griglia standard di rame ricoperta di grafite (400 mesh); i campioni depositati sulle griglie sono stati poi essiccati in pompa da vuoto per due ore.

Le immagini TEM sono state elaborate con il software di analisi ed elaborazione delle immagini ImageJ, sviluppato dalla Research Services Branch (RSB) del National Institute of Mental Health (NIMH), USA.

**Caratterizzazione magnetica:** Le curve di magnetizzazione a temperatura ambiente sono state registrate tramite un magnetometro a gradiente alternato di campo (AGFM), dalla Dott.ssa Francesca Casoli presso l'Istituto Materiali per l'Elettronica e il Magnetismo (*IMEM*) di Parma. Un'aliquota di sospensione alcolica di nanoparticelle è stata depositata su una sottile lastra di silicio di dimensioni 3x3 mm, precedentemente pesata con bilancia analitica con precisione pari al centesimo di milligrammo. Si è quindi lasciato evaporare il solvente (etanolo) lasciando i campioni per 15' sotto l'azione di una lampada riscaldante a raggi IR. Le lastre contenenti i campioni depositati sono state pesate e successivamente si è depositato sopra di esse una goccia di colla ciano-acrilica. Ogni singola lastra è stata montata all'estremità inferiore di un'asta disposta perpendicolarmente rispetto al campo magnetico applicato, incollandola con del grasso da vuoto al supporto di quarzo dell'asta.

### 2.1.2 Solventi e prodotti commerciali

I reagenti ed i solventi chimici che sono stati impiegati in questo lavoro di tesi, sono stati usati senza ulteriore purificazione; quando necessaria. Le soluzioni per le misure spettrofotometriche vengono preparate utilizzando acqua deionizzata ( $R > 18 \text{ M}\Omega$ ) filtrata con sistema MILLI-Q della *Millipore* ( $\text{H}_2\text{O}$  MQ).

### 2.1.3 Soluzioni

**Magnetite NPs:** La soluzione di nanoparticelle di magnetite disperse in acqua è stata fornita dalla ditta Colorobbia S.p.A. . La concentrazione delle nanoparticelle è stata determinata per via gravimetrica e risulta pari a 7,301 g/L . L'esatta composizione della dispersione non è nota, si tratta comunque di particelle magnetiche dal diametro medio di 19 nm, probabilmente stabilizzate per mezzo di tensioattivi anionici (pot. Zeta = -63.1 mV)

## 2.2 Tecniche di caratterizzazione delle nanoparticelle

### 2.2.1 Misure magnetiche

Le curve di magnetizzazione a temperatura ambiente sono state registrate tramite un magnetometro a gradiente alternato di campo (AGFM; **Fig.2.1**). La tecnica utilizza un gradiente di campo alternato per stabilire una forza periodica su di un campione posto in un campo magnetico uniforme.

Il campione viene montato all'estremità di inferiore di un'asta disposta perpendicolarmente rispetto al campo. In presenza di campo magnetico uniforme prodotto da un elettromagnete, il campione acquista un momento magnetico. Il gradiente di campo viene generato nella stessa direzione del campo magnetizzante da una coppia di bobine che producono campi magnetici diretti in versi opposti. A causa della forza esercitata dal gradiente si ha una deflessione del campione

trasmessa attraverso il supporto ad un sensore piezoelettrico che genera una tensione proporzionale alla forza e quindi all'intensità del gradiente e al momento magnetico del campione. Il segnale del piezoelettrico viene prelevato in fase con l'oscillazione del gradiente: in questo modo si eliminano i segnali di frequenza spuria e quindi la maggior parte del rumore. Lavorando in prossimità della frequenza di risonanza meccanica dell'apparato, si amplifica notevolmente il segnale prodotto dal piezoelettrico; perciò prima di ogni misura il software determina la frequenza di lavoro ottimale. Il magnetometro permette di applicare campi magnetici fino a 20 kOe misurando il momento su fondoscala diversi.

La magnetizzazione a saturazione è una grandezza estensiva, per cui prima di effettuare le misurazioni occorre pesare con estrema accuratezza il campione da sottoporre ad analisi.



*Fig.2.1 Magnetometro a gradiente alternato di campo*

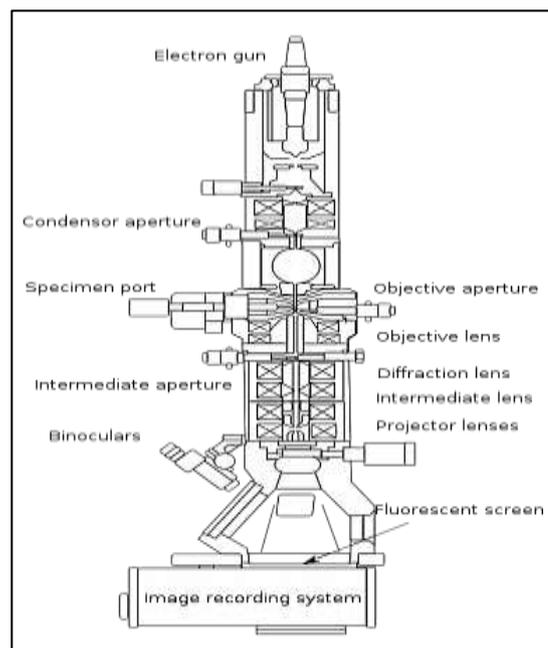
## 2.2.2 Microscopia a trasmissione di elettroni TEM

Il microscopio elettronico (rappresentato schematicamente in **Fig.2.2**) utilizza un fascio di elettroni e non di fotoni, come un microscopio ottico, in quanto i fotoni che compongono un raggio di luce possiedono una lunghezza d'onda di gran lunga maggiore rispetto a quella degli elettroni: dato che il potere di risoluzione di un microscopio è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda della radiazione che utilizza, usando elettroni si raggiunge una risoluzione parecchi ordini di grandezza superiore.

In un TEM, gli elettroni che costituiscono il fascio, attraversano una sezione dove è stato creato precedentemente il *vuoto*, per poi passare completamente attraverso il campione che deve avere uno spessore estremamente ridotto. Il potere di risoluzione è di circa 0.2 nm, cioè circa 500.000 volte maggiore di quello dell'occhio umano. Questo tipo di microscopio è fornito, lungo l'asse elettro-ottico, di complessi sistemi che utilizzando la modificazione di campi elettrici e

magnetici, sono in grado di pilotare gli elettroni attraverso "lenti" magnetiche necessarie ad allargare considerevolmente il fascio di elettroni già passati attraverso il campione per far sì che l'immagine risulti ingrandita. Il campione viene depositato su di una piccola griglia conduttrice (generalmente in rame o nichel, del diametro di pochi millimetri).

Il fascio di elettroni colpisce uno schermo fluorescente proiettando su di esso un'immagine reale e fortemente ingrandita della porzione di campione precedentemente attraversata. Questo microscopio fornisce le immagini in bianco e nero, però molte volte si trovano immagini ottenute dallo stesso che sono state successivamente elaborate digitalmente migliorando l'immagine.



*Fig.2.2 Rappresentazione schematica di un microscopio elettronico a scansione*

### 2.2.3 Dynamic light scattering (DLS)

Il DLS è una tecnica non invasiva, ormai affermata, chiamata anche PCS (Photon Correlation Spectroscopy) o QELS (Quasi-Elastic Light Scattering) per la misura della dimensione di soluzioni di macromolecole, o dispersioni di nanoparticelle o colloidali tipicamente sub-micrometrici.

Nelle misure DLS il campione viene illuminato da un raggio laser, e le variazioni d'intensità della luce diffusa vengono misurate in funzione del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono generate dal movimento browniano delle particelle interno del disperdente. A parità di temperatura e di viscosità le particelle 'piccole' si muovono rapidamente – creando delle variazioni rapide dell'intensità di scattering – mentre le particelle 'grosse' si muovono più lentamente – creando delle variazioni d'intensità più lente. Grazie ad un autocorrelatore, dalle variazioni d'intensità di scattering viene ottenuta una funzione di correlazione dalla quale è possibile calcolare il coefficiente di

diffusione della particella e quindi il corrispondente diametro idrodinamico tramite l'equazione di Stokes Einstein.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Dove:

$d(H)$ : il diametro idrodinamico;  $k$ : la costante di Boltzmann;  $T$ : la temperatura assoluta;  $\eta(T)$ : la viscosità del disperdente;  $D$ : il coefficiente di diffusione

Il diametro idrodinamico è il diametro di una sfera che presenta lo stesso coefficiente di diffusione della particella. È evidente dunque che il diametro idrodinamico ricavato dalle misure DLS sarà diverso da quello ricavato dall'elaborazione statistica delle micrografie TEM, perché può comprendere ad esempio effetti legati all'interazione del disperdente con la superficie della nanoparticella. In quest'ultimo caso infatti, quello che viene misurato è l'effettivo diametro della nanoparticella. L'analisi di campioni molto concentrati può falsare i risultati per via di fenomeni di scattering multiplo che possono verificarsi. Per questo motivo i moderni DLS hanno una configurazione tale per cui la luce scatterata viene inviata al detector con un'angolazione maggiore di 90°. In generale quando si analizzano campioni di nanoparticelle che presentano più di una popolazione, le nanoparticelle di diametro maggiore scatterano la luce molto di più di quelle a diametro minore, perché secondo l'approssimazione di Rayleigh l'intensità della luce scatterata è proporzionale al diametro della nanoparticella elevato alla potenza di sei ( $I \propto d^6$ ). Questo significa che se una popolazione di nanoparticelle è contaminata da una piccola popolazione di nanoparticelle con diametro maggiore, il segnale che ne deriva sarà spostato a diametri maggiori. Questo significa che due popolazioni di nanoparticelle, con la stessa numerosità, che differiscono nelle dimensioni di un ordine di grandezza vengono rivelate con una differenza di sensibilità di  $10^6$  in favore della popolazione a diametro maggiore.

## **2.3 Prove di ricopertura con SiO<sub>2</sub> di nanoparticelle di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanosol**

### **2.3.1 Sintesi del rivestimento di SiO<sub>2</sub> mediante metodo delle microemulsioni<sup>[1]</sup>**

#### **2.3.1.1 Studi sulla stabilità delle microemulsioni.**

Per stabilire le concentrazioni dei componenti della microemulsione entro le quali il sistema è stabile, è stato condotto uno studio di fase che prevede la costruzione di un diagramma pseudo ternario. In

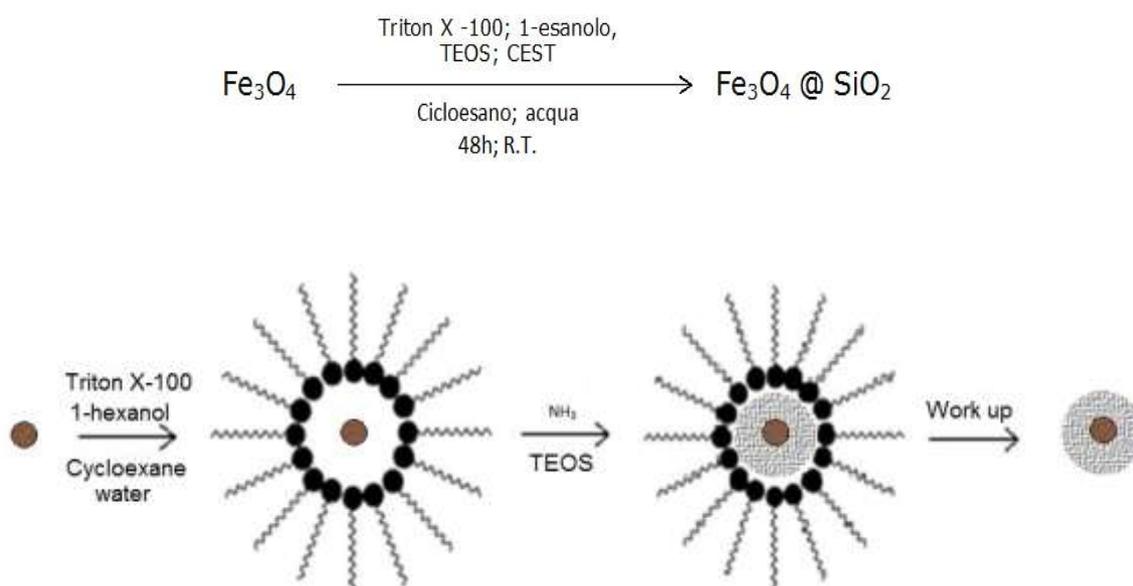
primo luogo è stata preparata una soluzione di surfattante (Triton X-100) e co-surfattante (1-esanolo) rispettivamente al 56% e 44% w/w; ai soli fini della costruzione del diagramma questa soluzione è considerata un monocomponente. Successivamente vengono preparati tre campioni binari contenenti cicloesano e tensioattivi (Triton X-100 e 1-esanolo, dalla soluzione precedentemente preparata) le cui composizioni sono riportate in **Tab.2.1**

	Campione 1		Campione 2		Campione 3	
	g	% w/w	g	% w/w	g	% w/w
<b>Cicloesano</b>	6,67	72,50	5,85	63,60	5,06g	55,10
<b>Tensioattivi (Triton X-100 e 1-esanolo)</b>	2,53	27,50	3,34	36,40	4,14g	44,90

*Tab.2.1* Composizione dei campioni preparati durante lo studio di fase

Ogni singolo campione è titolato con 270 mg di acqua, dopo l'aggiunta la miscela è sottoposta a forte agitazione magnetica per 20 minuti e successivamente lasciata a riposo per altri 10 minuti. Dopo questi 30 minuti, se il campione osservato ad occhio nudo appare perfettamente trasparente, allora il sistema è considerato monofasico e la microemulsione è ritenuta stabile; in questo caso si continua la titolazione. Al contrario se il campione appare opaco, viene nuovamente sottoposto ad agitazione magnetica per 20 minuti e lasciato a riposo per una notte, se l'opacità persiste il sistema è considerato bifasico e la microemulsione è ritenuta instabile. Tutte le prove sono state condotte a temperatura ambiente.

### 2.3.1.2 Sintesi del rivestimento di SiO<sub>2</sub> mediante microemulsioni



*Fig.2.3* Rappresentazione schematica della sintesi del coating mediante microemulsioni

**Effetto della quantità di TEOS***Tab.2.2 Composizione del batch di reazione*

	MW	uL	mg	mmol
Cicloesano	84.16	667.0		
Triton X-100	625	160.0	171	0.274
1-esanolo	102,18	163.0	131	1.289
Acqua	18.01	20.0	20	1.1
Sosp. NPs		30.0	0.218	
Ammoniaca 30% w (d=0.904 g/mL)	17.03	5.0	1.5	0.088
TEOS (1 <sup>a</sup> aggiunta)	208.31	38.5	6.02	0.0289
TEOS (2 <sup>a</sup> aggiunta)	208.31	19.3	3.01	0.0144

In una vials da 2mL si sono introdotti 677 uL di cicloesano, 160 uL di Triton X – 100 (171 mg; 0.274 mmol) e 163 uL di 1-esanolo (131 mg; 1.29 mmol); il sistema è omogenizzato attraverso agitazione orbitale. Dopo 15' si introducono 30 uL (0.218 mg) di sospensione acquosa di NPs, 20.00 uL di acqua (20 mg; 1.1 mmol) e 5 uL (1.5 mg; 0.088 mmol) di ammoniaca acquosa al 30% w/w. L'emulsione risultante viene agitata vigorosamente, sonicata per cinque minuti e mantenuta sotto agitazione orbitale per 20'. Successivamente vengono introdotti 38.5 uL (6.02mg; 0.0289 mmol) di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v; dopodiché il sistema è lasciato in agitazione per 24 ore. Successivamente si introducono 19.3 uL di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v e 5.00 uL di CEST (carbossietilsilantriolo, 25% in acqua) e si lascia agitare per altre 24 ore. Alla sospensione viene aggiunto 1 mL di acetone per precipitare le NPs, la vials è centrifugata a 5000 rpm per 10' in modo da precipitare le NPs. Il surnatante è eliminato, le NPs sono lavate due volte con acetone, due volte con etanolo e infine disperse in 1 mL di acqua.

Altri tre campioni sono stati sintetizzati seguendo la procedura sopra riportata, ma variando l'ammontare di TEOS introdotto, secondo lo schema in **Tab2.3**.

**Tab.2.3** Composizione dei batch di reazione per campione

Nome Campione	Cicloesano (uL)	Triton X-100 (uL)	1-esanolo (uL)	Acqua (uL)	NPs (uL)	Ammoniaca (uL)	1.agg. TEOS	2.agg. TEOS	CEST (uL)
A	667	160	163	30	20	5	51.4	25.7	5
C	667	160	163	30	20	5	25.7	12.8	5
D	667	160	163	30	20	5	12.8	6.42	5

**Effetto della quantità di acqua****Tab.2.4** Composizione del batch di reazione

	MW	uL	mg	mmol
Cicloesano	84.16	667.0		
Triton X-100	625	160.0	171	0.274
1-esanolo	102.18	163.0	131	1.29
Acqua	18.01	50.0	50	2.75
Sosp. NPs		30.0	0.218	
Ammoniaca 30% w (d=0.904 g/mL)	17.03	5.0	1.5	0.088
TEOS (1 <sup>a</sup> aggiunta)	208.31	51.4	8.03	0.0385
TEOS (2 <sup>a</sup> aggiunta)	208.31	25.7	4.02	0.0192

In una vials da 2mL si sono introdotti 677 uL di cicloesano, 160 uL di Triton X-100 (171 mg; 0.274 mmol) e 163 uL di 1-esanolo (131 mg; 1.29 mmol); il sistema è omogenizzato attraverso agitazione orbitale. Dopo 15' si introducono 30 uL (0.218 mg) di sospensione acquosa di NPs, 50 uL di acqua (50 mg; 2.75 mmol) e 5.00 uL (1.5 mg; 0.088 mmol) di ammoniaca acquosa al 30% w/w. L'emulsione risultante viene agitata vigorosamente, sonicata per cinque minuti e mantenuta sotto agitazione orbitale per 20'. Successivamente vengono introdotti 51.4 uL (8.03mg; 0.0385 mmol) di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v; dopodiché il sistema è lasciato in agitazione per 24 ore. Successivamente si introducono 25.7 uL di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v e 5.00 uL di CEST (carbossietilsilantriolo, 25% in acqua) e si lascia agitare per altre 24 ore. Alla sospensione viene aggiunto 1 mL di acetone per precipitare le NPs, la vials è centrifugata a 5000 rpm per 10' in modo da precipitare le NPs. Il surnatante è eliminato, le NPs sono lavate due volte con acetone, due volte con etanolo e infine disperse in 1 mL di acqua.

Altri tre campioni sono stati sintetizzati seguendo la procedura sopra riportata, ma variando l'ammontare di acqua e nanoparticelle introdotte, secondo lo schema in **Tab2.5**.

**Tab.2.5** Composizione dei batch di reazione per campione

Nome Campione	Cicloesano (uL)	Triton X-100 (uL)	1-esanolo (uL)	Acqua (uL)	NPs (uL)	Ammoniaca (uL)	1.agg. TEOS	2.agg. TEOS	CEST (uL)
G	667	160	163	40	30	5	51.4	25.7	5
F	667	160	163	30	30	5	51.4	25.7	5
E	667	160	163	20	30	5	51.4	25.7	5

**Effetto della quantità di nanoparticelle di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>***Tab.2.6 Composizione del batch di reazione*

	MW	uL	mg	mmol
Cicloesano	84.16	667.0		
Triton X-100	625	160.0	171	0.274
1-esanolo	102.18	163.0	131	1.289
Acqua	18.01	10.0	10	0.55
Sosp. NPs		35.0	0.254	
Ammoniaca 30% w/w (d=0.904 g/mL)	17.03	5.0	1.5	0.088
TEOS (1.aggiunta)	208.31	51.4	8.03	0.0385
TEOS (2.aggiunta)	208.31	25.7	4.02	0.0192

In una vials da 2mL si sono introdotti 677 uL di cicloesano, 160 uL di Triton X-100 (171 mg; 0.274 mmol) e 163 uL di 1-esanolo (131 mg; 1.29 mmol); il sistema è omogenizzato attraverso agitazione orbitale. Dopo 15' si introducono 35 uL (0.254 mg) di sospensione acquosa di NPs, 10 uL di acqua (10 mg; 0.55 mmol) e 5.00 uL (1.5 mg; 0.088 mmol) di ammoniaca acquosa al 30% w/w. L'emulsione risultante viene agitata vigorosamente, sonicata per cinque minuti e mantenuta sotto agitazione orbitale per 20'. Successivamente vengono introdotti 51.4 uL (8.03mg; 0.0385 mmol) di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v; dopodiché il sistema è lasciato in agitazione per 24 ore. Successivamente si introducono 25.7 uL di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v e 5.00 uL di CEST (carbossietilsilantriolo) e si lascia agitare per altre 24 ore. Alla sospensione viene aggiunto 1 mL di acetone per precipitare le NPs, la vials è centrifugata a 5000 rpm per 10' in modo da precipitare le NPs. Il surnatante è eliminato, le NPs sono lavate due volte con acetone, due volte con etanolo e infine disperse in 1 mL di acqua. Parallelamente si prepara un altro campione di reazione seguendo la procedura sopra riportata, ma variando l'ammontare di acqua e nanoparticelle introdotte, secondo lo schema in **Tab 2.7**.

**Tab.2.7** Composizione dei batch di reazione per campione

Nome Campione	Cicloesano (uL)	Triton X-100 (uL)	1-esanolo (uL)	Acqua (uL)	NPs (uL)	Ammoniaca (uL)	1.agg. TEOS	2.agg. TEOS	CEST (uL)
L	667	160	163	35	10	5	51.4	25.7	5

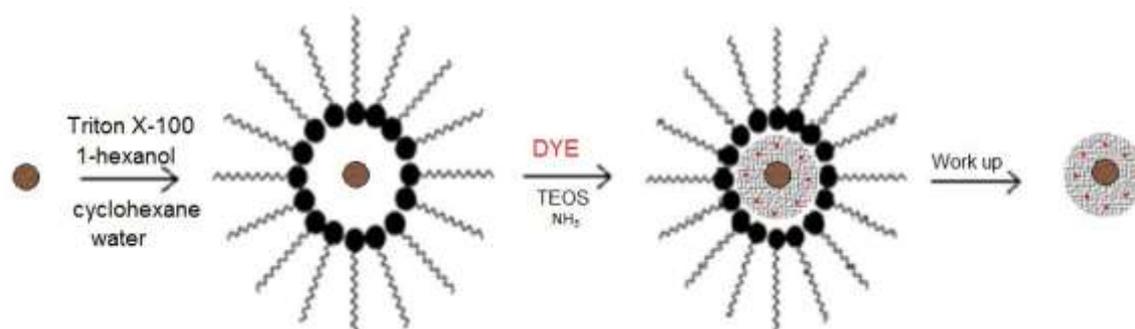
## Scale up delle microemulsioni

*Tab.2.8* Composizione del batch di reazione

	MW	uL	mg	mmol
Cicloesano	84.16	3330		
Triton X-100	625	800	855	1.371
1-esanolo	102.18	815	655	6.445
Acqua	18.01	100	100	55.5
Sosp. NPs		150	1.09	
Ammoniaca 30% w	17.03	25	7.5	0.440
TEOS (1 <sup>a</sup> aggiunta)	208.31	257	40.18	0.193
TEOS (2 <sup>a</sup> aggiunta)	208.31	128	20.08	0.0960

In una vials da 10mL si sono introdotti 3.30 mL di cicloesano, 800 uL di Triton X-100 (855 mg; 1.371 mmol) e 815 uL di 1-esanolo (655 mg; 6.445 mmol); il sistema è omogenizzato attraverso agitazione orbitale. Dopo 15' si introducono 150 uL (1.09 mg) di sospensione acquosa di NPs, 100 uL di acqua (200 mg; 11.1 mmol) e 25 uL (7.5 mg; 0.440 mmol) di ammoniaca acquosa al 30% w/w. L'emulsione risultante viene agitata vigorosamente, sonicata per cinque minuti e mantenuta sotto agitazione orbitale per 20'. Successivamente vengono introdotti 257 uL (40.18mg; 0.193 mmol) di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v; dopodiché il sistema è lasciato in agitazione per 24 ore. Successivamente si introducono 128 uL di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v e 25 uL di CEST (carbossietilsilantriolo, 25% in acqua) e si lascia agitare per altre 24 ore. Alla sospensione vengono aggiunti 5 mL di acetone per precipitare le NPs, la vials è centrifugata a 5000 rpm per 10' in modo da precipitare le NPs. Il surnatante è eliminato, le NPs sono lavate due volte con acetone, due volte con etanolo e infine disperse in 5 mL di acqua.

### 2.3.1.3 Incapsulamento di fluorofori nella matrice di SiO<sub>2</sub><sup>[2]</sup>



*Fig.2.4* Rappresentazione schematica dell'incapsulamento di fluorofori nella matrice di SiO<sub>2</sub>

**Rodamina B***Tab.2.9 Composizione del batch di reazione*

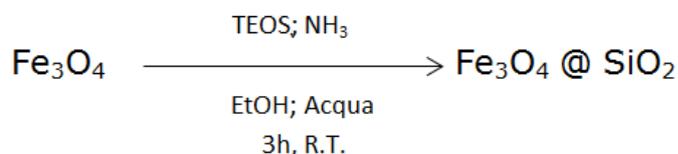
	<b>MW</b>	<b>uL</b>	<b>mg</b>	<b>mmol</b>
<b>Cicloesano</b>	84,16	3330		
<b>Triton X-100</b>	625	800	855	1.371
<b>1-esanolo</b>	102.18	815	655	6.445
<b>Acqua</b>	18.01	100	100	55,5
<b>Rodamina B</b>	472.03	-	0,10	1.93E-04
<b>Sosp. NPs</b>		150	1,09	
<b>Ammoniaca 30% w (d = 0.904 g/mL)</b>	17.03	25	7.5	0.440
<b>TEOS (1<sup>a</sup> aggiunta)</b>	208.31	257	40.18	0.193
<b>TEOS (2<sup>a</sup> aggiunta)</b>	208.31	128	20.08	0.0960

In una vials da 10mL si sono introdotti 3.30 mL di cicloesano, 800 uL di Triton X-100 (855 mg; 1.371 mmol) e 815 uL di 1-esanolo (655 mg; 6.445 mmol); il sistema è omogenizzato attraverso agitazione orbitale. Dopo 15' si introducono 150 uL (1.09 mg) di sospensione acquosa di NPs, 100 uL di acqua (200 mg; 11.1 mmol) nella quale sono solubilizzati 0.11 mg di Rodamina 101 (1.93E-4 mmol) e 25 uL (7.5 mg; 0.440 mmol) di ammoniaca acquosa al 30% w/w. L'emulsione risultante viene agitata vigorosamente, sonicata per cinque minuti e mantenuta sotto agitazione orbitale per 20'. Successivamente vengono introdotti 257 uL (40.18mg; 0.193 mmol) di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v; dopodiché il sistema è lasciato in agitazione per 24 ore. Successivamente si introducono 128 uL di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v e 25 uL di CEST (carbossietilsilantriolo, 25% in acqua) e si lascia agitare per altre 24 ore. Alla sospensione vengono aggiunti 5 mL di acetone per precipitare le NPs, la vials è centrifugata a 5000 rpm per 10' in modo da precipitare le NPs. Il surnatante è eliminato, le NPs sono lavate due volte con acetone, due volte con etanolo e infine disperse in 5 mL di acqua.

**Ru(Bpy)<sub>3</sub>****Tab.2.10** Composizione del batch di reazione

	MW	uL	mg	mmol
Cicloesano	84.16	3330		
Triton X-100	625	800	855	1.371
1-esanolo	102.18	815	655	6.445
Acqua	18.01	100	100	55.5
Ru(Bpy) <sub>3</sub>	748.67	-	3,50	4.68E-03
Sosp. NPs		150	1,09	
Ammoniaca 30% w/w (d=0.904 g/mL)	17.03	25	7.5	0.440
TEOS (1 <sup>a</sup> aggiunta)	208.31	257	40.18	0.193
TEOS (2 <sup>a</sup> aggiunta)	208.31	128	20.08	0.0960

In una vials da 10mL si sono introdotti 3.30 mL di cicloesano, 800 uL di Triton X-100 (855 mg; 1.371 mmol) e 815 uL di 1-esanolo (655 mg; 6.445 mmol); il sistema è omogenizzato attraverso agitazione orbitale. Dopo 15' si introducono 150 uL (1.09 mg, 4,72E-03 mmol) di sospensione acquosa di NPs, 100 uL di acqua (200 mg; 11.1 mmol) nella quale sono solubilizzati 3.5 mg di Ru(Bpy)<sub>3</sub> (4.68E-3 mmol) e 25 uL (7.5 mg; 0.440 mmol) di ammoniaca acquosa al 30% w/w. L'emulsione risultante viene agitata vigorosamente, sonicata per cinque minuti e mantenuta sotto agitazione orbitale per 20'. Successivamente vengono introdotti 257 uL (40.18mg; 0.193 mmol) di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v; dopodiché il sistema è lasciato in agitazione per 24 ore. Successivamente si introducono 128 uL di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v e 25 uL di CEST (carbossietilsilantriolo, 25% in acqua) e si lascia agitare per altre 24 ore, al termine delle quali si procede al work up. Alla sospensione vengono aggiunti 5 mL di acetone per precipitare le NPs, la vials è centrifugata a 5000 rpm per 10' in modo da precipitare le NPs. Il surnatante è eliminato, le NPs sono lavate due volte con acetone, due volte con etanolo e infine disperse in 5 mL di acqua.

**2.3.2 Sintesi del rivestimento di SiO<sub>2</sub> mediante metodo di Stöber<sup>[3]</sup>**

**Tab.2.13** Composizione del batch di reazione

	MW	mL	mg	mmol
<b>Etanolo</b>	46.06	4.00	3156	68.6
<b>Acqua</b>	18.01	1.00	1000	55.5
<b>Sosp. NPs</b>		0.500	3.65	
<b>Ammoniaca 30% w</b>	17.03	0.125	37.50	2.21
<b>TEOS</b>	208.31	0.200	188.0	0.904

In una vials da 20 mL vengono posti 0.50 mL di soluzione acquosa di nanoparticelle di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  alla quale sono aggiunti 4mL di etanolo. La sospensione è agitata meccanicamente e sottoposta a bagno in ultrasuoni per 10 minuti. Successivamente sono aggiunti 1mL di acqua, 125 uL di ammoniaca acquosa al 30% w/w e 200 uL di TEOS. La sospensione è lasciata in agitazione orbitale per 3h, al termine delle quali la magnetite è separata dalla sospensione grazie all'ausilio di un potete magnete permanente. Il surnatante è eliminato e le polveri sono lavate due volte con acetone e due volte con etanolo. Infine si è aggiunto 1 mL di acqua e le nanoparticelle sono state disperse in bagno a ultrasuoni per 30 minuti. La reazione è stata condotta a temperatura ambiente in bagno d'acqua termostatato a 25°C.

## **2.4 Prove di ricopertura con $\text{SiO}_2$ delle nanoparticelle di $\text{Fe}_3\text{O}_4$ in polvere nanometrica**

### **2.4.1 Stabilizzazione delle polveri nanometriche di $\text{Fe}_3\text{O}_4$**

Viene preparata una soluzione acquosa di polietilenimina (PEI) al 5% w/w, solubilizzando 5g di polimero in 100 mL di acqua; parallelamente si prepara una soluzione di polietilenglicole (PEG) al 1% w/w solubilizzando 1g di polimero in 100mL di acqua. Le due soluzioni sono lasciate sotto agitazione per alcuni minuti. Parallelamente in una beuta vengono depositati 1g di polvere di magnetite, 2g di soluzione acquosa di PEG precedentemente preparata e 2g di soluzione acquosa di PEI precedentemente preparata. La sospensione è quindi posta in un bagno ad ultrasuoni per almeno un'ora. Successivamente la sospensione viene filtrata con un filtro in lana di vetro dal cut-off di 1600 nm, la concentrazione di magnetite sul filtrato viene determinata per via gravimetrica essicandone e portando a peso costante un volume noto di filtrato. Ne risulta una concentrazione in nanoparticelle pari 1,035 g/L.

## 2.4.2 Sintesi del rivestimento di SiO<sub>2</sub> mediante microemulsione<sup>[1]</sup>

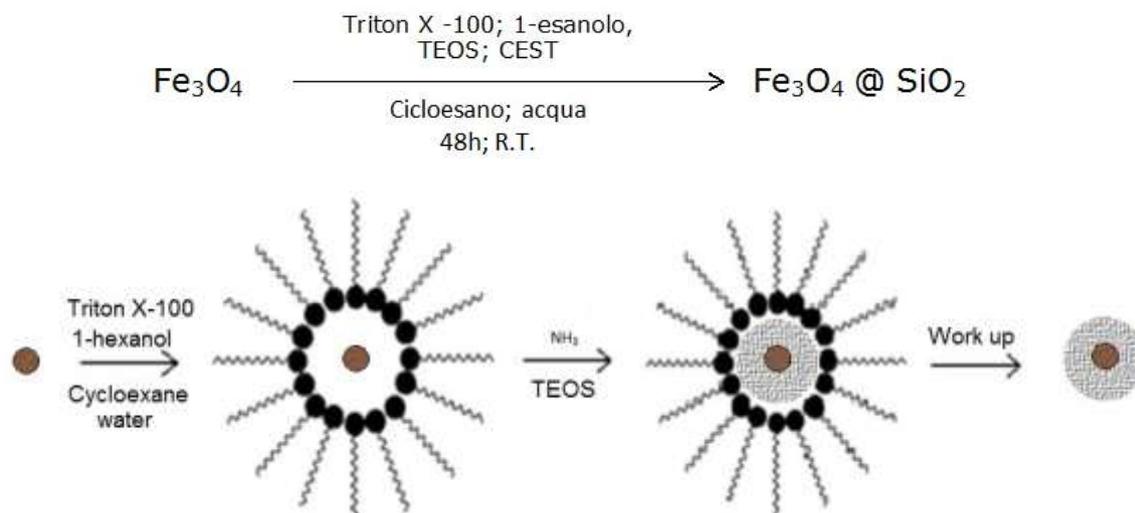


Fig.2.6 Rappresentazione schematica della reazione di coating via microemulsione inversa

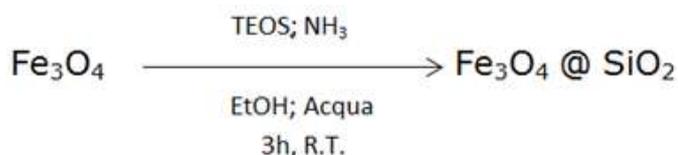
Tab.2.14 Composizione del batch di reazione

	MW	uL	mg	mmol
<b>Cicloesano</b>	84.16	667.0		
<b>Triton X-100</b>	625	160.0	171	0.274
<b>1-esanolo</b>	102.18	163.0	131	1.289
<b>Sosp. NPs</b>		70.0	0.072	
<b>Ammoniaca 30% w/w (d=0.904 g/mL)</b>	17.03	5.0	1.5	0.088
<b>TEOS (1<sup>a</sup> aggiunta)</b>	208.31	17.0	2.49	0.0119
<b>TEOS (2<sup>a</sup> aggiunta)</b>	208.31	8.50	1.33	0.00638

In una vials da 2mL si sono introdotti 677 uL di cicloesano, 160 uL di Triton X-100 (171 mg; 0.274 mmol) e 163.0 uL di 1-esanolo (131 mg; 1.289 mmol); il sistema è omogenizzato attraverso agitazione orbitale. Dopo 15' si introducono 70.00 uL (0.072 mg) di sospensione acquosa di NPs, e 5.00 uL (1.5 mg; 0.088 mmol) di ammoniaca acquosa al 30% w/w. L'emulsione risultante viene agitata vigorosamente, sonicata per cinque minuti e mantenuta sotto agitazione orbitale per 20'. Successivamente vengono introdotti 17.4 uL (2.49mg; 0.0119 mmol) di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v; dopodiché il sistema è lasciato in agitazione per 24 ore. Successivamente si introducono 8.50 uL di soluzione di TEOS in cicloesano al 16.7 % v/v e 5.00 uL di CEST (carbossietilsilantriolo, 25% in acqua) e si lascia agitare per altre 24 ore. Alla sospensione viene aggiunto 1 mL di acetone per precipitare le NPs, la vials è centrifugata a 5000 rpm per 10' in modo da

separare le NPs dal liquido. Il surnatante è eliminato, le NPs sono lavate due volte con acetone, due volte con etanolo e infine disperse in 1 mL di acqua.

### 2.4.3 Sintesi del rivestimento di SiO<sub>2</sub> mediante metodo di Stöber<sup>[3]</sup>



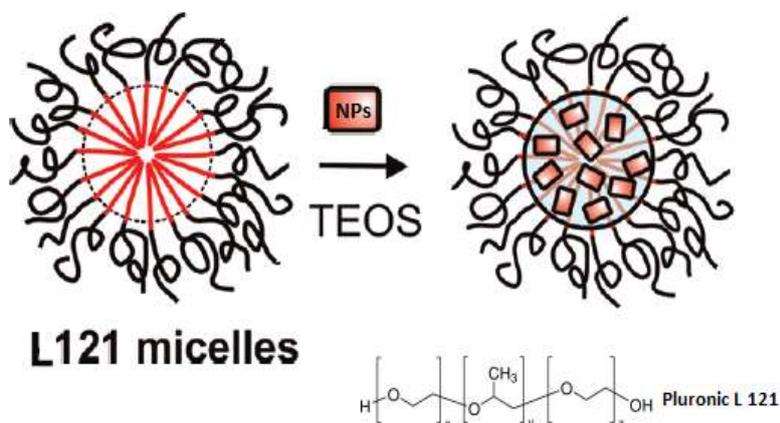
#### Primo tentativo di coating

In una pallone da 20 mL con due colli, vengono posti 1 mL di sospensione di polvere nanometrica di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> alla quale sono aggiunti 4 mL di etanolo. La sospensione è agitata meccanicamente e sottoposta a bagno in ultrasuoni per 10 minuti. Successivamente sono aggiunti 1 mL di acqua, 125 µL di ammoniaca acquosa al 30% w/w. 2 mL di una soluzione al 10% v/v di TEOS in etanolo sono stati introdotti con una pompa a siringa in un tempo di due ore (11.1 µL/h) Terminata l'aggiunta di TEOS, la sospensione è lasciata in agitazione orbitale per 3h, al termine delle quali la magnetite è separata dalla sospensione grazie all'ausilio di un potete magnete permanente. Il surnatante è eliminato e le polveri sono lavate una volta con acetone e due volte con etanolo. Infine sono stati aggiunti 5 mL di acqua e le nanoparticelle disperse in bagno a ultrasuoni per 30 minuti. La reazione è condotta a temperatura ambiente in bagno d'acqua termostatato a 25°C

#### Secondo tentativo di coating

In una vials da 20 mL vengono posti 1 mL di sospensione di polvere nanometrica di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> alla quale sono aggiunti 4 mL di etanolo. La sospensione è agitata meccanicamente e sottoposta a bagno in ultrasuoni per 10 minuti. Successivamente sono aggiunti 1 mL di acqua, 125 µL di ammoniaca acquosa al 30% w/w e 2 mL di una soluzione al 10% v/v di TEOS in etanolo. La sospensione è lasciata in agitazione orbitale per 3h, al termine delle quali la magnetite è separata dalla sospensione grazie all'ausilio di un potete magnete permanente. Il surnatante è eliminato e le polveri sono lavate una volta con acetone e due volte con etanolo. Infine sono stati aggiunti 5 mL di acqua e le nanoparticelle disperse in bagno a ultrasuoni per 30 minuti. La reazione è interamente condotta in bagno a ultrasuoni, a temperatura ambiente in bagno d'acqua termostatato a 25°C.

### 2.4.3.1 Sintesi di un rivestimento composito di SiO<sub>2</sub> / Pluronic L121<sup>[4]</sup>



*Fig.2.7 Rappresentazione schematica della reazione di coating via Pluronic L121*

*Tab.2.15 Composizione del batch di reazione*

	MW	mL	mg	mmol
<b>Etanolo</b>	46.06	8.00	6312	137.2
<b>Acqua</b>	18.01	2.00	2000	111
<b>Sosp. NPs</b>		-	1.00	
<b>Pluronic L121</b>	4400 (medio)	-	700	0.159
<b>Ammoniaca 30% w</b>	17.03	0.250	75	4.42
<b>TEOS</b>	208.31	100	94	0.452

#### Primo tentativo di coating

In una beuta sufficientemente capiente vengono miscelati 2 g di Pluronic L121, 8 mL di etanolo, 2 mL di acqua e 250 uL di ammoniaca acquosa al 30% w/w e si lascia sotto agitazione magnetica per 15 minuti. Parallelamente in un pallone vengono posti 1 mL di sospensione di polvere di magnetite nanometrica e si introduce la soluzione precedentemente preparata. La sospensione è sottoposta a bagno in ultrasuoni per almeno 15', dopodiché vengono introdotti 100 uL di TEOS e il sistema è lasciato in agitazione per 3h. Successivamente le nanoparticelle sono precipitate con 10 mL di acetone, lavate due volte con etanolo e disperse in acqua.

**Secondo tentativo di coating**

In una beuta sufficientemente capiente vengono miscelati 2 g di Pluronic L121, 8 mL di etanolo, 2 mL di acqua e 250 uL di ammoniaca acquosa al 30% w/w e si lascia sotto agitazione magnetica per 15 minuti. Parallelamente in un pallone vengono posti 1 mL di sospensione di polvere di magnetite nanometrica e si introduce la soluzione precedentemente preparata. La sospensione è sottoposta a bagno in ultrasuoni per almeno 15 minuti, dopodiché vengono introdotti 100 uL di TEOS e il sistema è lasciato in agitazione nel bagno a ultrasuoni per 3h. Successivamente le nanoparticelle sono precipitate con 10 mL di acetone, lavate due volte con etanolo e disperse in acqua.

**Bibliografia**

- [1] Stjerndahl M., Andersson M., Hall E.H., Pajerowski M.D., Meisel M.W., Duran S.R., *Langmuir*, 24, 3532, **2008**.
- [2] Lu Y., Yin Y., Mayers B., *Nano Lett*, 7, 149, **2007**.
- [3] Souza D.M., Andrade A.L., Fabris J.D., Valério P., Gões A.M., Leite M.F., Domingues R.Z., *Journal of Non-Crystalline Solids*, 354, 4894, **2008**.
- [4] Liu Z., Ding J., Xue J., *New J. Chem.*, 33, 88, **2009**.



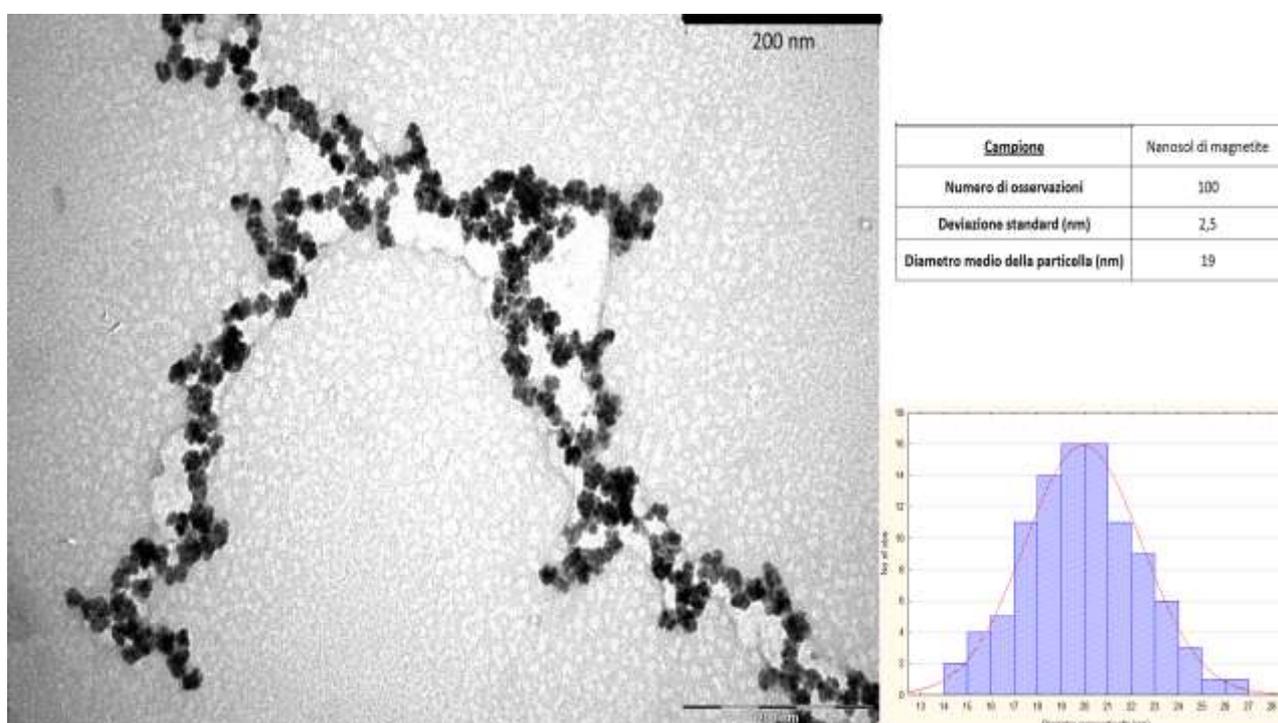
## **3. RISULTATI E DISCUSSIONI**

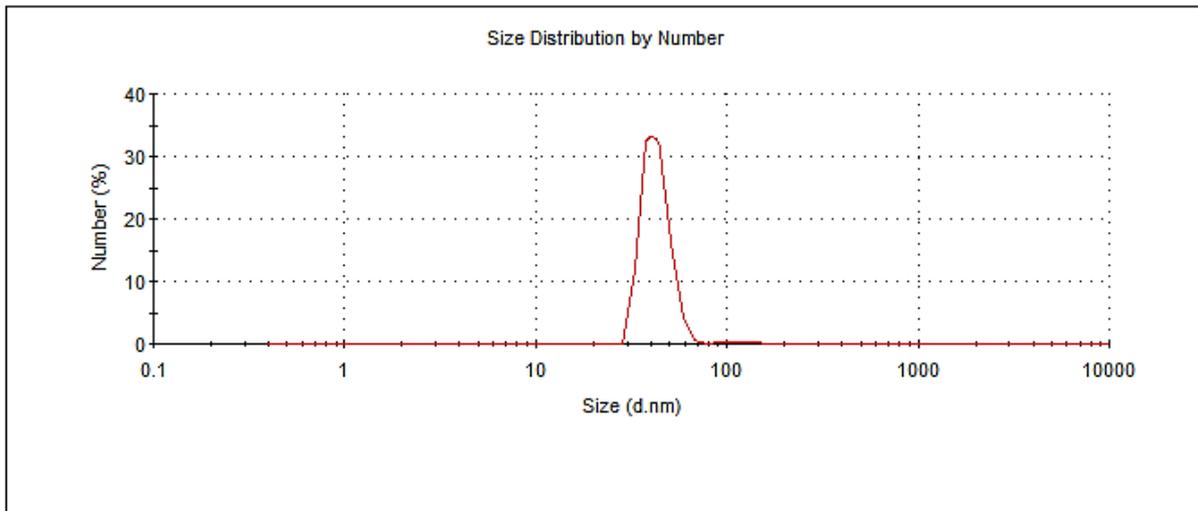
### **3.1 Ricopertura con SiO<sub>2</sub> di nanoparticelle di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanosol**

#### **3.1.1 Caratterizzazione del nanosol di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>**

Il nanosol di particelle magnetiche è stato caratterizzato tramite microscopia TEM e misure DLS. La concentrazione delle nanoparticelle nella sospensione è stata determinata per via gravimetrica: un campione di volume noto di sospensione è stato essiccato a 120 °C e portato a peso costante in pompa da vuoto. Questa analisi ha permesso di valutare la concentrazione delle nanoparticelle, stimata in 7.301 g/L.

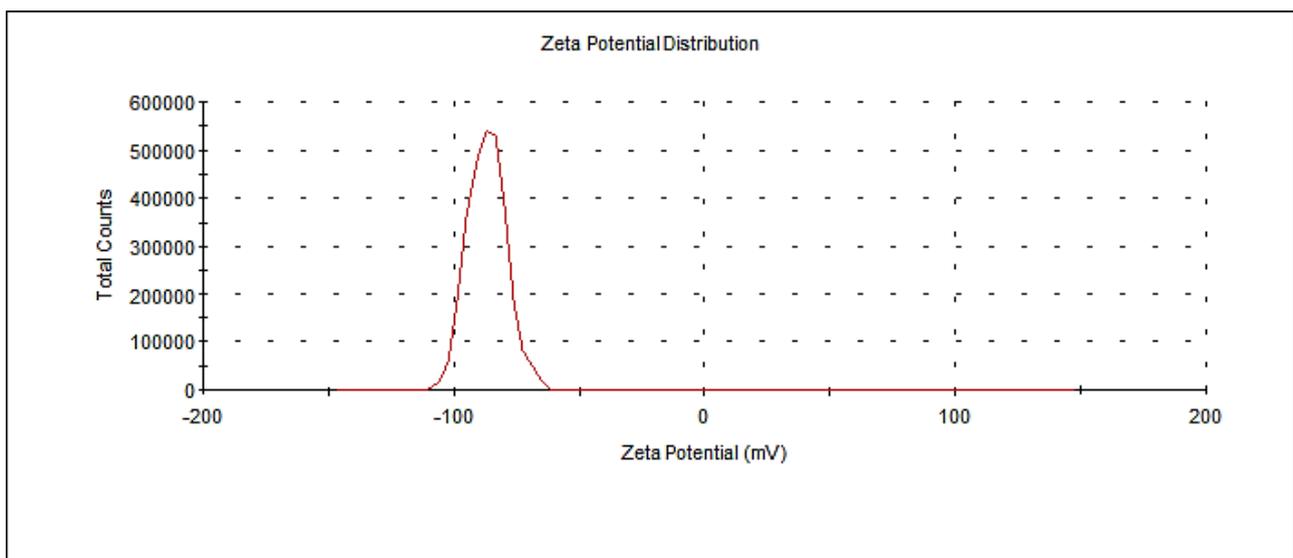
Le immagini TEM mostrano nanoparticelle di forma non perfettamente sferica, con un diametro medio di 19 nm (**Fig. 3.1**). Le misure DLS evidenziano la presenza di un contributo maggioritario a 40 nm (**Fig.3.2**), questa discordanza rispetto ai valori ricavati dall'analisi TEM può essere attribuibile al fatto che il DLS misura un diametro idrodinamico ed è quindi sensibile anche alle molecole di stabilizzante che si adsorbono sulle nanoparticelle.





**Fig.3.2** Distribuzione DLS del campione nanosol di magnetite

Il nanosol di magnetite è stato caratterizzato anche da un punto di vista del potenziale zeta sviluppato dalle nanoparticelle disperse in fase acquosa. La curva di distribuzione del potenziale zeta (**Fig.3.3**) presenta il massimo a -63.1 mV ad un pH di circa 10. Considerato il carattere basico della magnetite e l'atteso potenziale positivo fino a pH basici, la presenza di un potenziale negativo è imputabile alle molecole di stabilizzante che sono adsorbite sulle particelle. Nonostante l'esatta composizione della sospensione non sia nota, è quindi presumibile che le nanoparticelle magnetiche siano stabilizzate per mezzo di tensioattivi anionici.

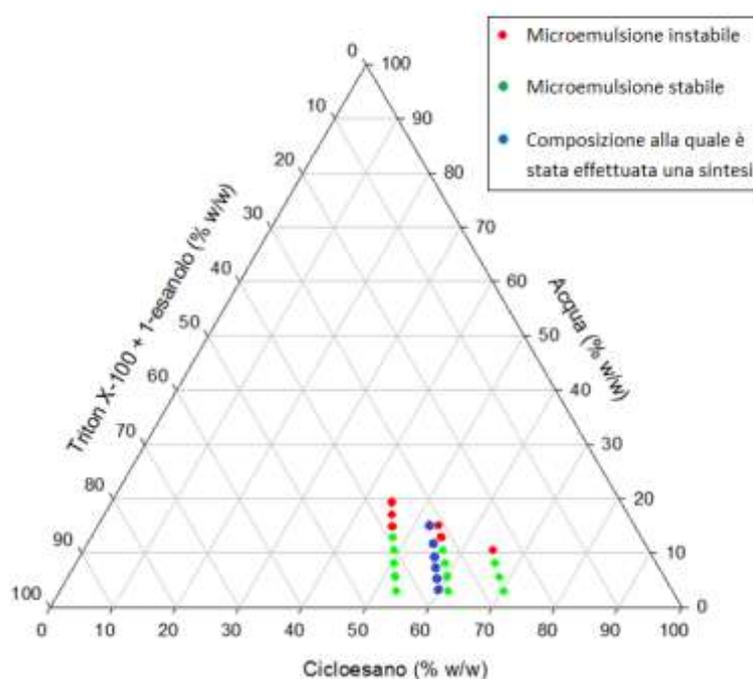


**Fig.3.3** Distribuzione della curva del potenziale zeta nel campione nanosol di magnetite

### 3.1.2 Metodo delle microemulsioni<sup>[1]</sup>

#### 3.1.2.1 Studi sulla stabilità delle microemulsioni

Lo studio della stabilità delle microemulsioni è risultato preliminare alla messa a punto dei parametri di sintesi secondo la procedura di coating via microemulsione. Il punto di partenza è stato la determinazione dell'intervallo di concentrazioni dei componenti che permettono la formazione di microemulsioni inverse termodinamicamente stabili; le successive sintesi sono state effettuate tenendo in considerazione le informazioni ricavate da questi risultati. Con i dati raccolti è stato costruito un diagramma di fase pseudo ternario relativo alla miscela Triton X-100 + 1-esanolo/cicloesano/acqua (**Fig.3.4** punti indicati in rosso e verde).



**Fig.3.4** Diagramma pseudo ternario relativo alla miscela cicloesano, acqua, Triton X-100 e 1-esanolo. Ai fini della sua costruzione, si è considerato che la miscela Triton X-100 e 1-esanolo, fosse monocomponente.

Le microemulsioni che si sono rivelate otticamente trasparenti e isotrope sono state considerate stabili; viceversa i campioni che apparivano opachi, sono stati considerati bifasici e non isotropi e le microemulsioni ritenute instabili perché evolvevano verso un sistema in cui c'era una separazione di fasi macroscopica. Nei casi di microemulsioni nelle regioni di confine tra un sistema monofasico e un sistema bifasico, i campioni sono apparsi traslucidi e si è manifestata una leggerissima colorazione blu. Questo è probabilmente dovuto all'incremento delle dimensioni dei nuclei "acquosi" della microemulsione inversa. Le sintesi effettuate per valutare l'influenza della quantità di acqua sulle dimensioni delle nanoparticelle, sono state condotte all'interno della regione di stabilità tenendo costante il rapporto cicloesano/Triton X-100/1-esanolo e variando, quando necessario, la quantità di acqua introdotta. Questo approccio ha consentito di effettuare un discreto numero di sintesi sempre

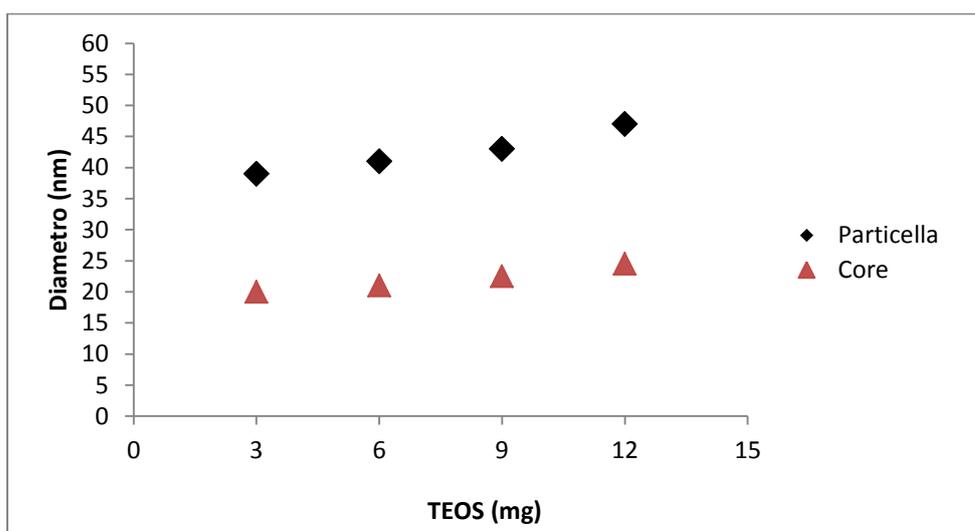
all'interno della regione di stabilità, in modo che le microemulsioni non si rompessero. È stata poi eseguita una prova in una zona "border line" e una prova nella regione di instabilità per valutare le conseguenze che si ripercuotono sulla morfologia e sulla dimensione delle nanoparticelle (**Fig.3.1** Punti indicati in blu).

### 3.1.2.2 Effetto della quantità di TEOS

Per studiare come l'effetto di diversi quantitativi di TEOS si ripercuota sulle nanoparticelle, queste sono analizzate attraverso la microscopia TEM e misure DLS. Mediante elaborazione software delle immagini e analisi statistica, si è valutato il diametro delle nanoparticelle, il diametro del core magnetico e lo spessore medio del rivestimento. I risultati sono riepilogati nella tabella sottostante.

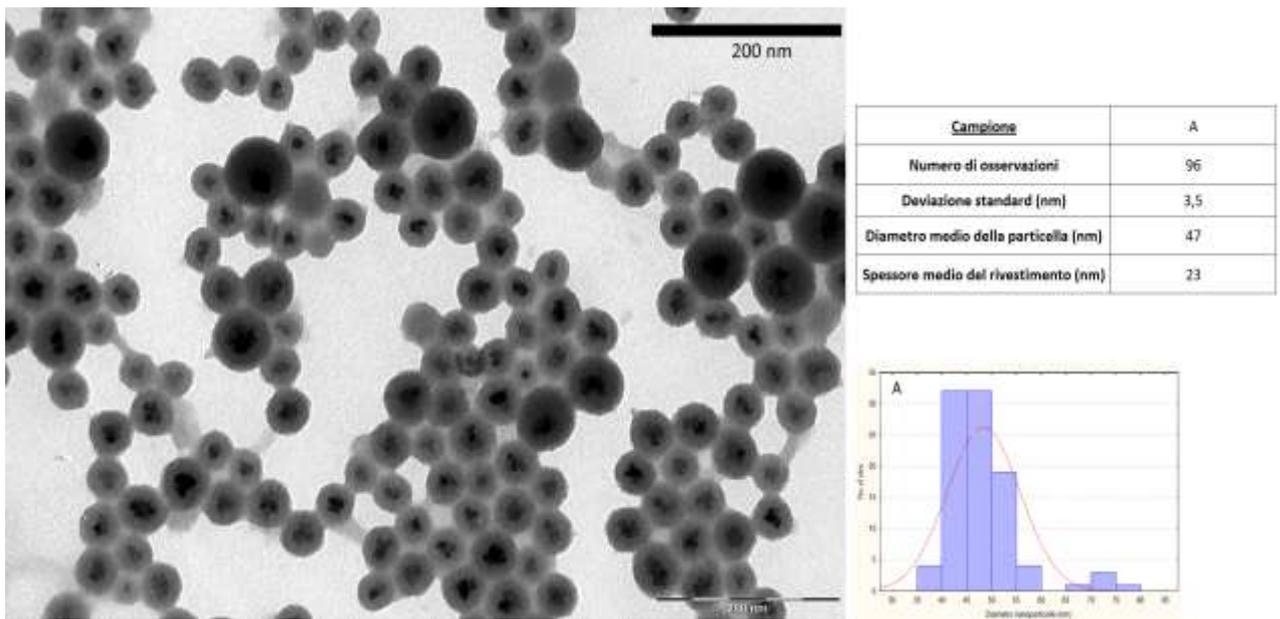
**Tab.3.1** Riepilogo dei risultati ottenuti attraverso elaborazione statistica delle immagini TEM. Gli intervalli di fiducia sono stati calcolati considerando una distribuzione normale al 95% di fiducia.

Campione	A	B	C	D
<b>TEOS (mg)</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>3</b>
<b>Rapporto molare Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> : TEOS</b>	<b>1 : 70</b>	<b>1 : 53</b>	<b>1 : 35</b>	<b>1 : 18</b>
<b>Diametro particella (nm)</b>	<b>47 ± 1</b>	<b>43 ± 1</b>	<b>41 ± 1</b>	<b>39 ± 1</b>
<b>Diametro core (nm)</b>	<b>24 ± 1</b>	<b>21 ± 1</b>	<b>21 ± 1</b>	<b>20 ± 1</b>
<b>Spessore medio (nm)</b>	<b>23</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>19</b>

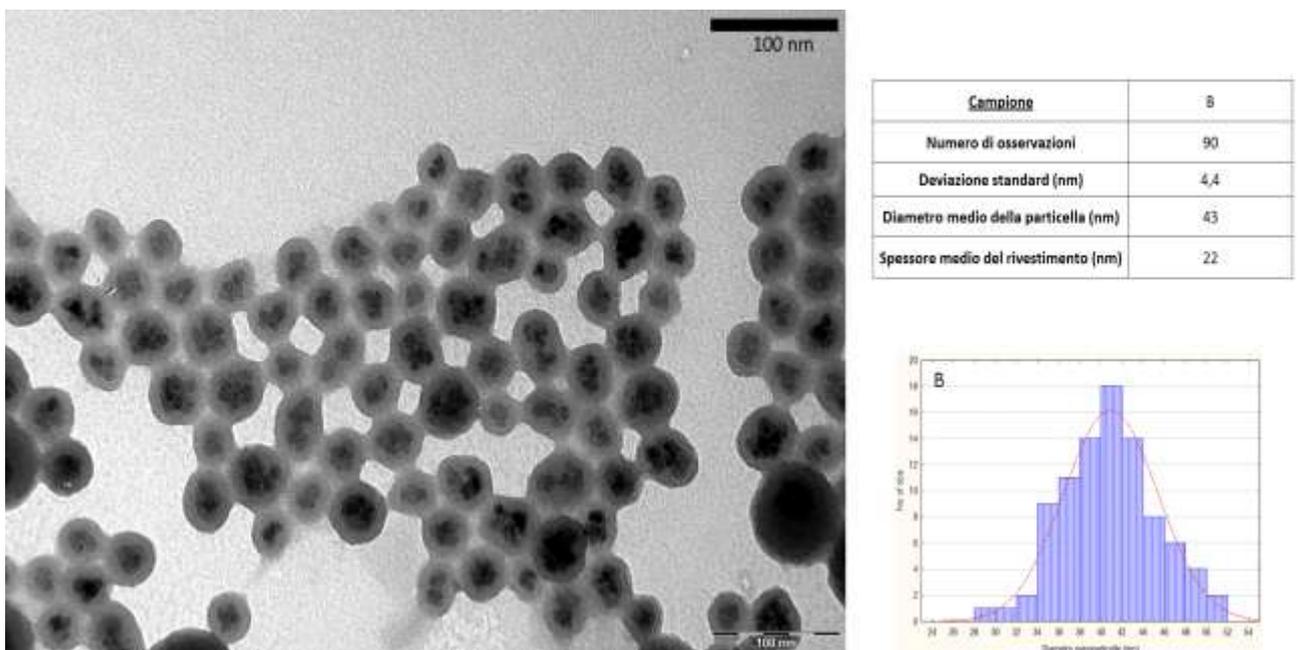


**Fig.3.5.** Andamento dei diametri delle NPs e del core magnetico rispetto alla quantità di TEOS introdotto nel sistema.

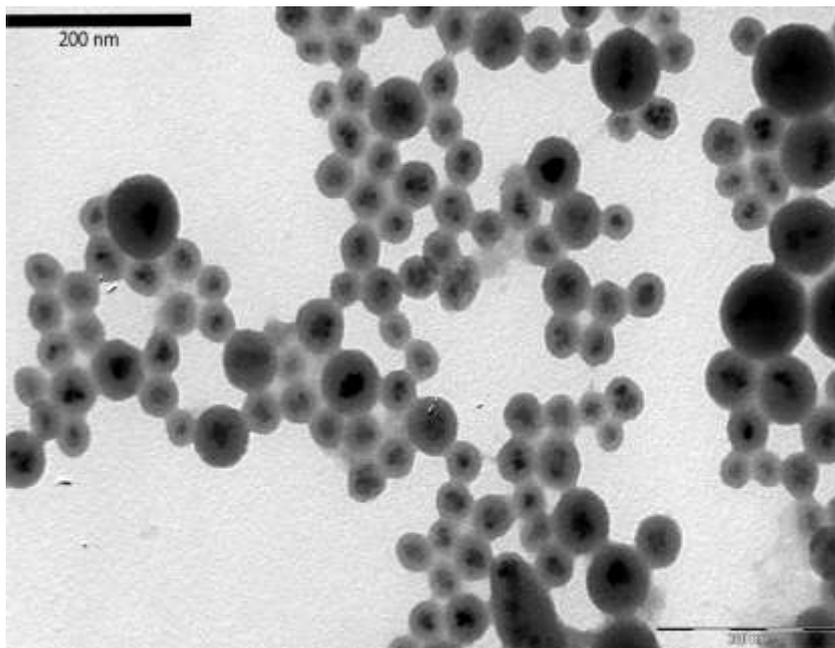
## Analisi TEM



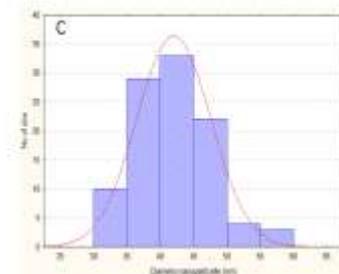
*Fig.3.6* Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione A.



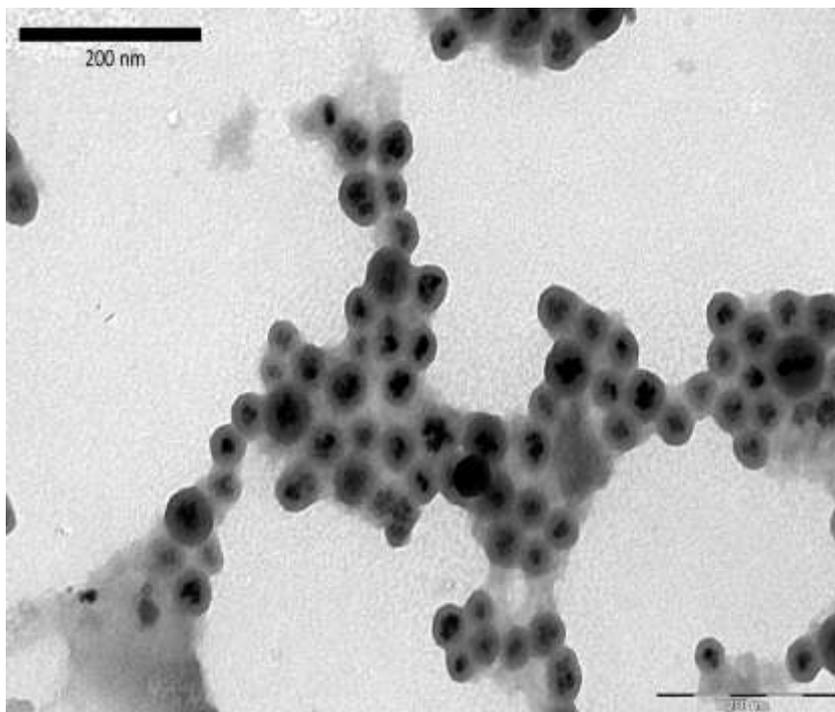
*Fig.3.7* Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione B.



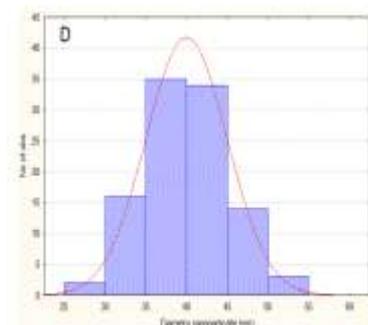
Campione	C
Numero di osservazioni	101
Deviazione standard (nm)	5,5
Diametro medio della particella (nm)	41
Spessore medio del rivestimento (nm)	20



**Fig.3.8** Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione C.

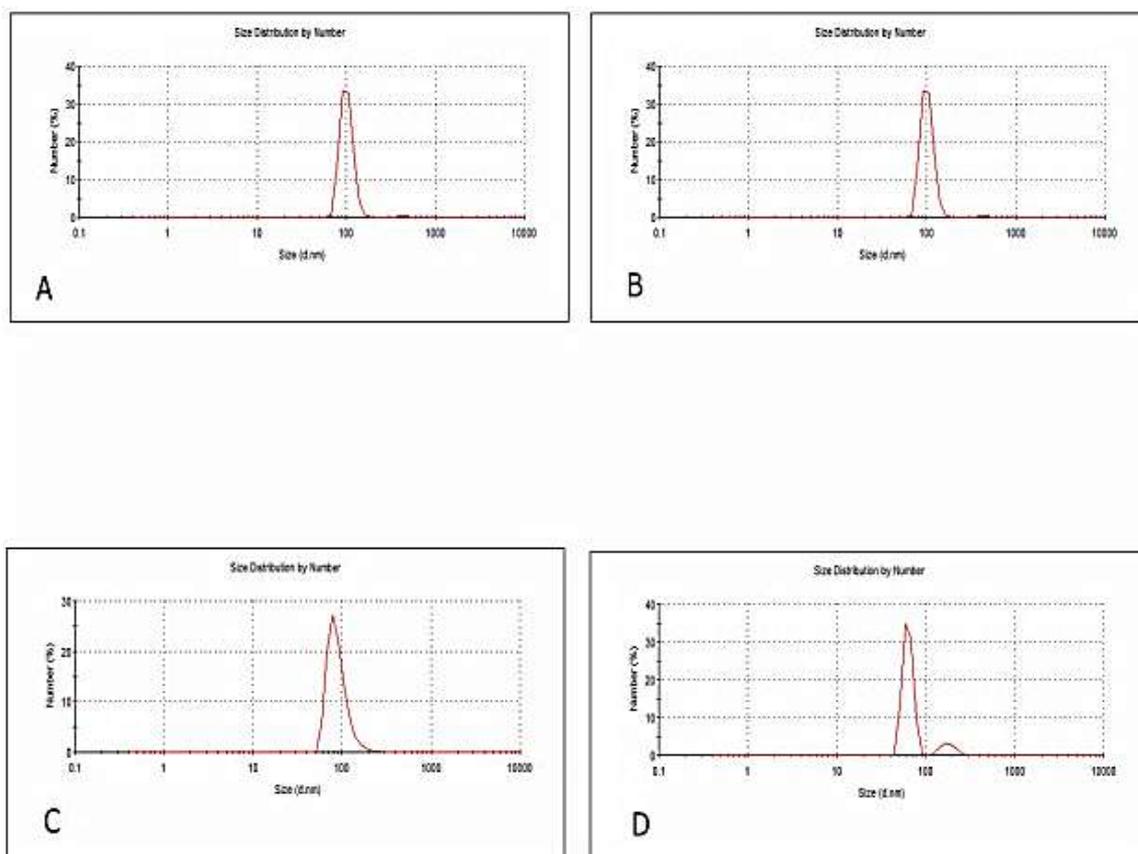


Campione	D
Numero di osservazioni	104
Deviazione standard (nm)	4,5
Diametro medio della particella (nm)	39
Spessore medio del rivestimento (nm)	19



**Fig.3.9** Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione D.

## Analisi DLS



**Fig.3.10** Distribuzioni DLS dei campioni A – D.

La dipendenza delle dimensioni delle particelle dalla quantità di TEOS introdotta nel sistema è riportata in **Fig.3.5**. Man mano che la quantità di precursore aumenta, si assiste ad un incremento dei diametri delle particelle e dello spessore del rivestimento. La morfologia delle nanoparticelle è evidenziata dalle micrografie TEM in **Figg.3.6-3.9**. Le particelle risultano uniformemente formate da una struttura core-shell evidenziata da un gradiente cromatico che riflette le diverse densità di fase tra interno (core) ed esterno (shell). Sulla base dei dati riportati in letteratura<sup>[1]</sup> si attribuisce al core interno la fase magnetite e al guscio esterno la fase silice. Le nanoparticelle appaiono leggermente aggregate, ma comunque sono discrete e si riesce ad individuarne il contorno. Questa morfologia può essere imputata al fatto che in sede di caratterizzazione TEM, il campione viene essiccato sottovuoto e ciò può far aggregare le nanoparticelle, dato che sono disperse in un solvente con un'elevata tensione superficiale come l'acqua. Da un'osservazione qualitativa della sospensione colloidale, infatti, essa risultava stabile e non presentava processi di agglutinazione e precipitazione.

Nel campione A (**Fig.3.6**), corrispondente alla massima quantità di TEOS introdotta nel sistema, si può notare la presenza di nanoparticelle di SiO<sub>2</sub> non contenenti il core magnetico. Questo fenomeno è tanto più marcato quanto elevata è la concentrazione di TEOS nel sistema. In generale la

formazione di particelle di silice prive del core magnetico può essere evitata aggiustando il rapporto  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TEOS}$  in modo da ridurre nel sistema il numero di micelle inverse prive di un core magnetico al loro interno. Inoltre, per evitare la nucleazione separata di silice e per consentire l'aggiunta del silano funzionalizzato e carico (CEST), si è agito introducendo il TEOS in due aliquote a distanza di 24 ore l'una dall'altra e utilizzando TEOS diluito cinque volte in cicloesano.

Il confronto della distribuzione dimensionale ricavata dall'analisi TEM con le distribuzioni DLS (**Fig.3.10**) non è stato di particolare utilità: per tutti i campioni si è notata la presenza di un contributo maggioritario intorno ai 100 nm. Tale discrepanza tra i valori del DLS con i valori determinati dalle micrografie TEM, può essere spiegata considerando il fatto che il DLS misura un diametro idrodinamico delle nanoparticelle ed è molto più sensibile alle particelle grandi: l'intensità del segnale è proporzionale al  $d^6$  della particella.

Le variazioni eseguite sulla quantità di TEOS hanno permesso di modificare in maniera controllata le dimensioni delle nanoparticelle. Lo spessore di silice che costituisce il rivestimento aumenta gradualmente con l'aumentare della concentrazione di TEOS nel sistema, ma contrariamente ai risultati che si sono ottenuti variando la quantità d'acqua nel sistema, in questo caso la variazione dello spessore è molto contenuta e le dimensioni del core magnetico sono praticamente costanti.

### 3.1.2.3 Effetto della quantità di acqua

Per studiare come la quantità di acqua che costituisce la microemulsione si ripercuote sulle nanoparticelle, queste sono analizzate attraverso microscopia TEM e DLS. Mediante elaborazione software delle immagini e analisi statistica, si è valutato il diametro particellare, il diametro del core magnetico e lo spessore medio del rivestimento. I risultati sono riepilogati nella tabella sottostante.

**Tab.3.2** Riepilogo dei risultati ottenuti attraverso elaborazione statistica delle immagini TEM. Gli intervalli di fiducia sono stati calcolati considerando una distribuzione normale al 95% di fiducia.

Campione	E	F	G	H
<b><math>H_2O</math> (mg)</b>	<b>38</b>	<b>48</b>	<b>58</b>	<b>68</b>
<b>% <math>H_2O</math> (w/w)</b>	<b>4.5 %</b>	<b>5.7 %</b>	<b>6.9 %</b>	<b>8.1 %</b>
<b>Diametro particella (nm)</b>	<b><math>93 \pm 1</math></b>	<b><math>62 \pm 1</math></b>	<b><math>47 \pm 1</math></b>	<b><math>39 \pm 1</math></b>
<b>Diametro core (nm)</b>	<b><math>30 \pm 1</math></b>	<b><math>25 \pm 1</math></b>	<b><math>22 \pm 1</math></b>	<b><math>19 \pm 1</math></b>
<b>Spessore medio (nm)</b>	<b>63</b>	<b>37</b>	<b>25</b>	<b>20</b>

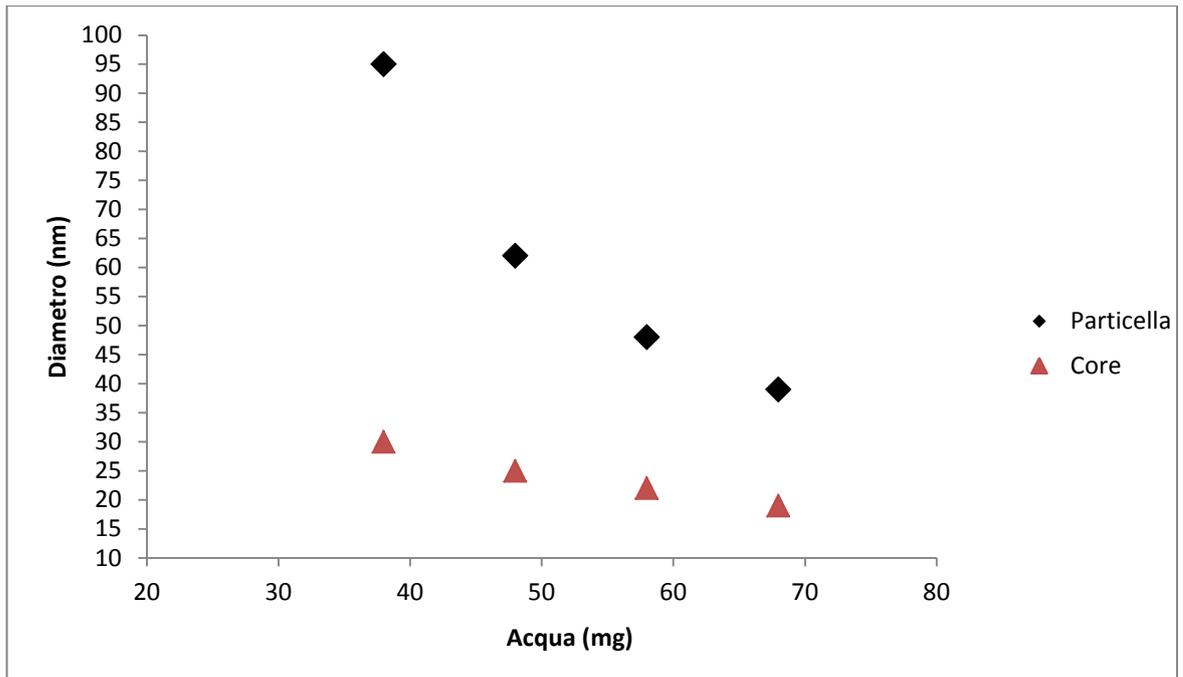
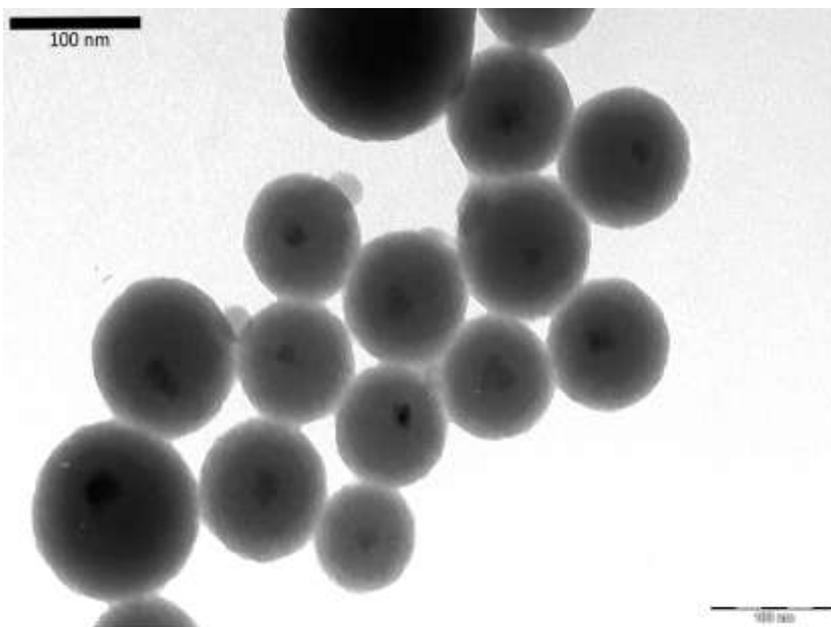


Fig.3.11 Andamento dei diametri delle NPs e del core magnetico rispetto alla quantità di acqua introdotta nel sistema.

### Analisi TEM



Campione	E
Numero di osservazioni	104
Deviazione standard (nm)	5,3
Diametro medio della particella (nm)	93
Spessore medio del rivestimento (nm)	53

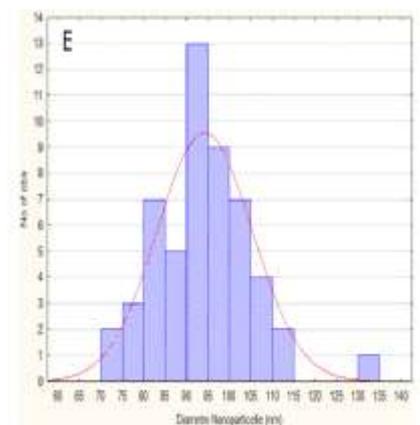
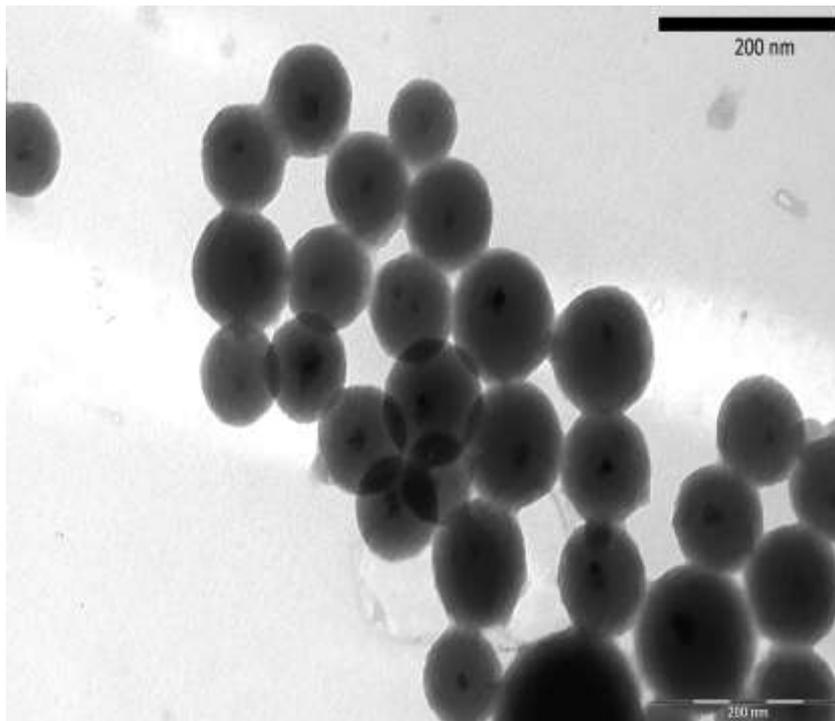
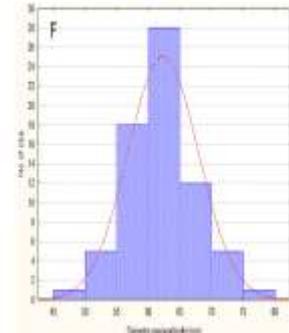


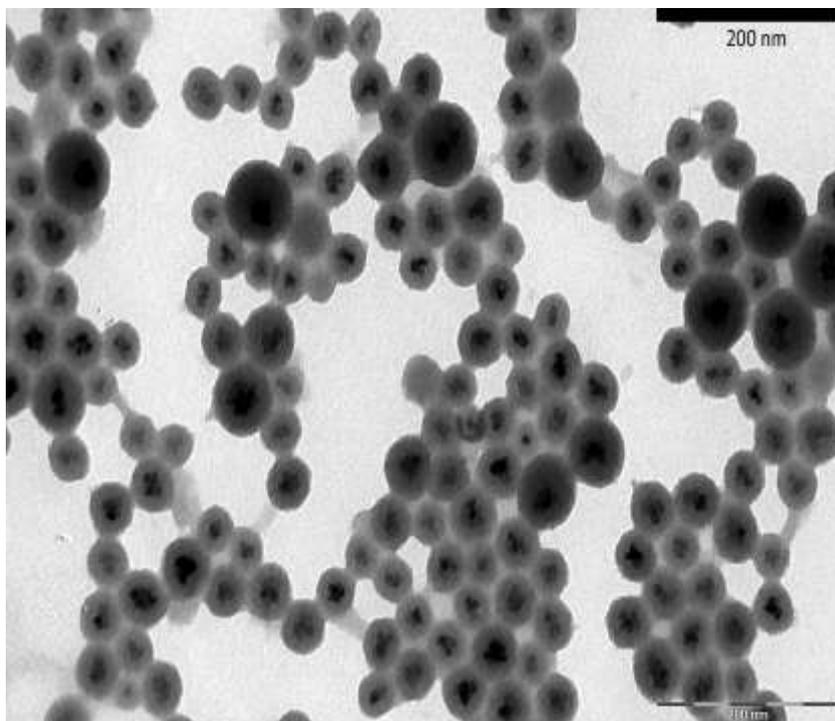
Fig.3.12 Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione E.



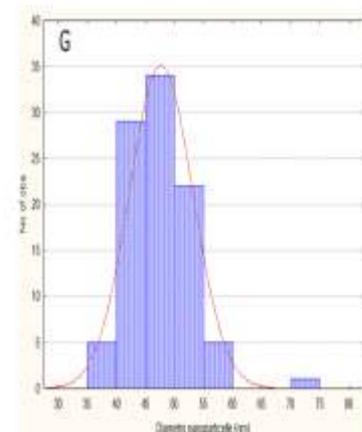
Campione	F
Numero di osservazioni	70
Deviazione standard (nm)	5,6
Diametro medio della particella (nm)	62
Spessore medio del rivestimento (nm)	37



**Fig.3.13** Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione F.



Campione	G
Numero di osservazioni	96
Deviazione standard (nm)	5,1
Diametro medio della particella (nm)	47
Spessore medio del rivestimento (nm)	25



**Fig.3.14** Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione G.

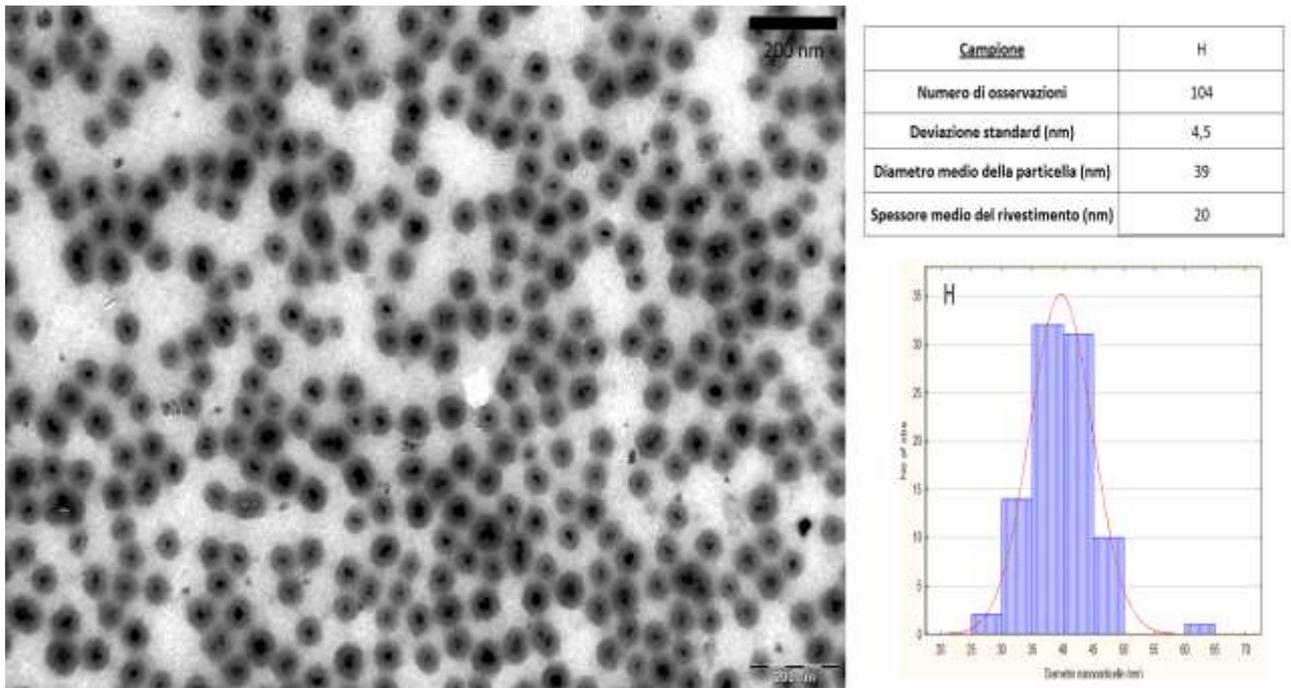


Fig.3.15 Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione H.

### Analisi DLS

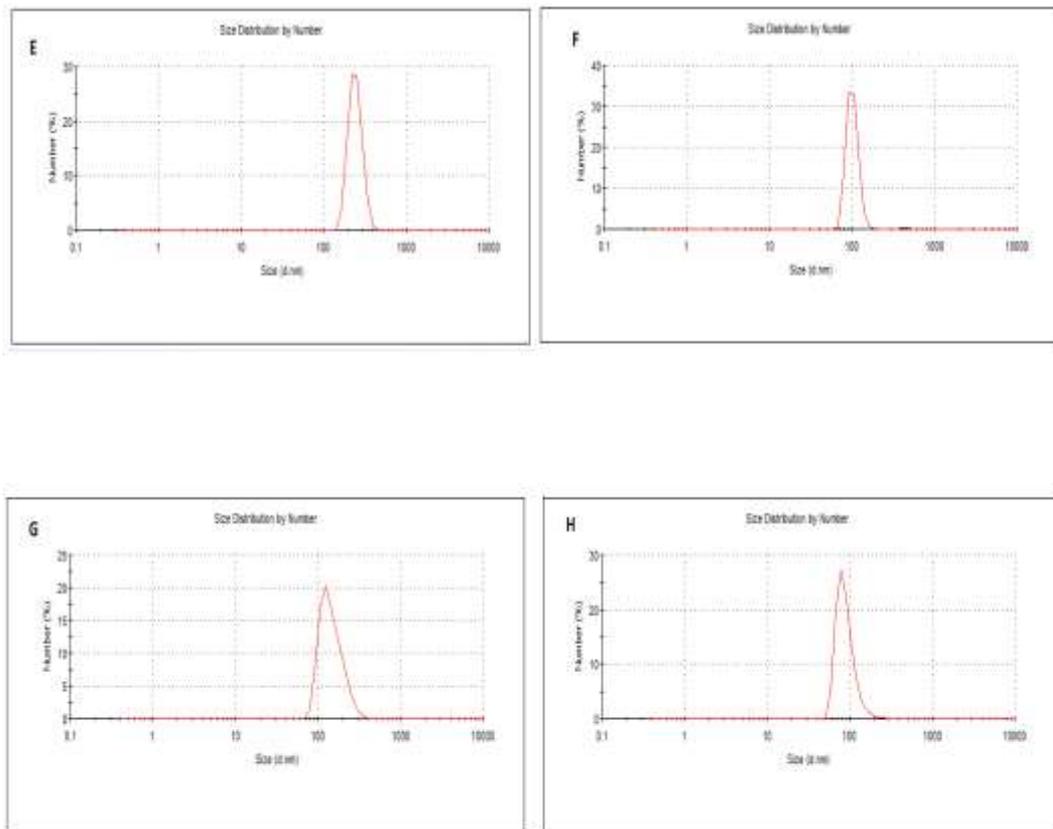


Fig.3.16 Distribuzioni DLS dei campioni E-H.

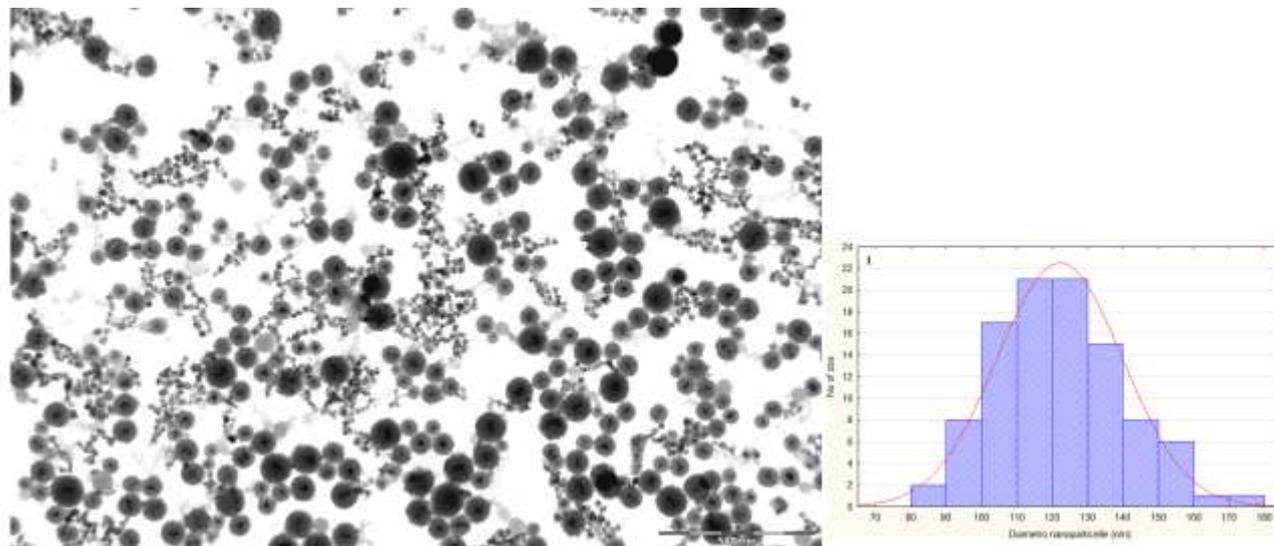
### Prove nelle regioni di instabilità del sistema

Per valutare il comportamento delle microemulsioni oltre la zona di stabilità, sono state condotte alcune prove nelle quali la quantità di acqua introdotta è tale che il sistema non possa essere considerato monofasico. In particolare è stata eseguita una prova in una zona “border line” e una prova nella regione di instabilità vera e propria (si veda il diagramma di fase pseudo ternario a pag. **Fig.3.4**). I risultati ottenuti sono riepilogati in **Tab.3.3**.

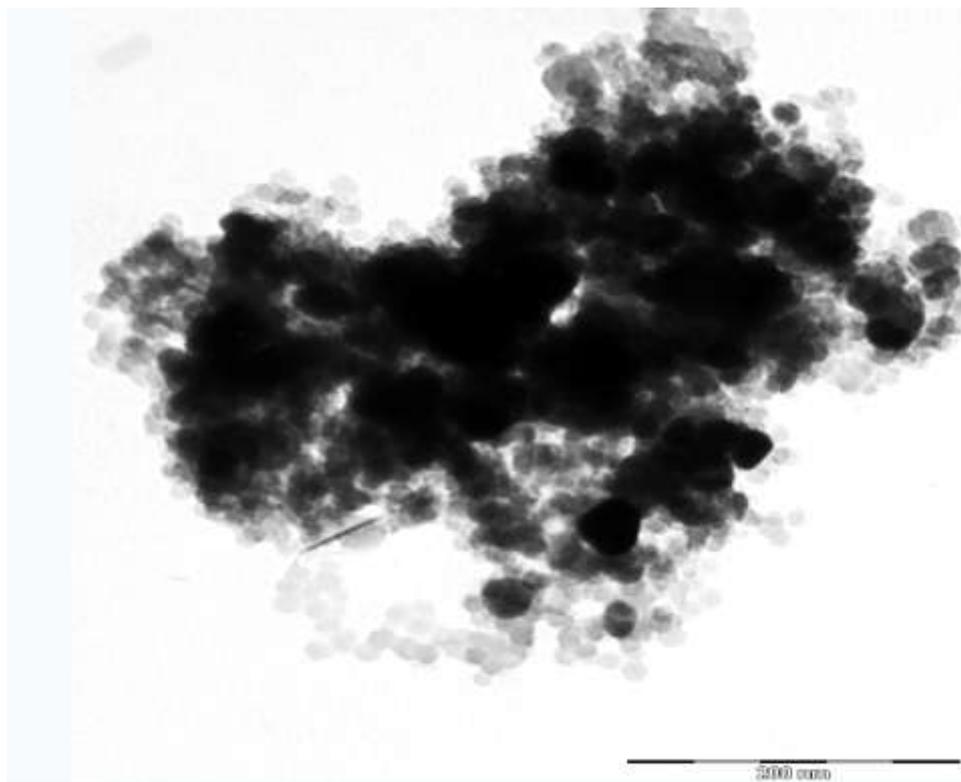
**Tab.3.3** Riepilogo dei risultati ottenuti attraverso elaborazione statistica delle immagini TEM. Il simbolo (-) sta a significare che non sono state ottenute particelle discrete e non è stato possibile eseguire l'elaborazione statistica.

Campione	I	J
<b>H<sub>2</sub>O (mg)</b>	<b>88</b>	<b>108</b>
<b>Diametro particella (nm)</b>	<b>122 ± 3</b>	-
Numero di osservazioni	100	-
Deviazione standard	17.0	-
<b>NOTE</b>	<b>magnetite libera</b>	<b>aggregati</b>

### Analisi TEM



**Fig.3.17** Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione I.



**Fig.3.18** Micrografia TEM del campione J.

Il contenuto di acqua nel sistema di reazione è stato variato allo scopo di studiare la sua influenza sulle dimensioni finali delle nanoparticelle. Nel diagramma ternario in **Fig.3.4** sono riportate le composizioni alle quali sono state effettuate le prove sperimentali; la maggior parte delle sintesi sono state eseguite nella zona di stabilità delle microemulsioni (**Fig.3.4** punti blu affiancati ai punti verdi), ma è stata condotta anche una prova nella regione border line e una prova nella regione di instabilità (**Fig.3.4** punti blu affiancati ai punti rossi). Le **Figg. 3.12-3.15** rappresentano micrografie TEM dei campioni E-H, sintetizzati nella regione di stabilità della microemulsione. Tutte le nanoparticelle magnetiche risultano ricoperte di silice e perfettamente sferiche, la **Tab.3.2** e la **Fig.3.11** mostrano come le dimensioni finali delle nanoparticelle dipendano fortemente dalla quantità di acqua che costituisce la microemulsione. Complessivamente le nanoparticelle che costituiscono questi campioni appaiono monodisperse. Si nota come all'aumentare della quantità d'acqua il diametro complessivo delle nanoparticelle diminuisce e si assiste anche ad una leggera diminuzione del diametro del core magnetico.

La diminuzione dei diametri all'aumentare della quantità di acqua può essere spiegato considerando il fatto che all'aumentare della quantità di acqua nel sistema si vengano a creare un numero maggiore di micelle inverse, ma di diametro più piccolo; ogni micella costituisce un centro di nucleazione per le nanoparticelle che possono crescere limitatamente al diametro della micella. Tenendo costante la quantità di TEOS introdotta nel sistema, è ragionevole pensare che

all'aumentare della quantità delle micelle inverse più piccole, si venga a creare una maggiore quantità di nanoparticelle con un diametro minore. Lo spessore del coating è ragionevole che diminuisca e questo è confermato dalle micrografie TEM che mostrano come lo spessore passa da 63 nm a 20 nm. Il confinamento dell'ambiente di reazione in uno spazio minore, potrebbe giustificare anche la leggera diminuzione del diametro del core magnetico dovuta ad una perdita delle nanoparticelle con dimensioni maggiori che rimangono fuori dal sistema micellare.

Le nanoparticelle di magnetite, presenti nella microemulsione agiscono da semi di nucleazione, favorendo la formazione dello strato di silice. Poiché le nanoparticelle magnetiche presentano un'elevata area superficiale (dovuta al loro piccolo diametro), si assiste ad una rapida e istantanea nucleazione della silice seguita dallo stadio di crescita; in questo modo non si verifica la nucleazione di nuova silice sulla magnetite, gli stadi di nucleazione e di crescita possono ritenersi separati e le nanoparticelle core shell che ne derivano sono monodisperse. La crescita di queste nanoparticelle core shell è limitata dalla grandezza delle microemulsioni nel quale sono confinate le nanoparticelle di magnetite.

Quando la sintesi è stata condotta in una regione di confine tra la zona di stabilità e quella di instabilità delle microemulsioni (campione *I*, **Fig.3.17** e **Tab.3.3**) si è assistito ad un risultato anomalo. Le micrografie TEM hanno evidenziato una discreta popolazione di nanoparticelle rivestite, ma ad esse si associa la presenza di nanoparticelle di magnetite non rivestite; le nanoparticelle core-shell appaiono largamente distribuite con un diametro superiore al previsto. Si può pensare che in questa regione il sistema non sia perfettamente monofasico ma vi sia uno stato intermedio tra il bifasico e il monofasico. In queste condizioni alcune micelle sono regolarmente formate e in esse avviene la sintesi delle nanoparticelle core-shell; contemporaneamente alcune micelle sono distrutte e le nanoparticelle magnetiche di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  non confinate in una microemulsione non vengono rivestite adeguatamente.

Quando la sintesi è stata effettuata con un largo eccesso di acqua, completamente nella zona bifasica, si sono formate sistemi particellari non discreti, costituiti da aggregati di dimensioni superiori ai 200 nm, nei quali non si riesce a distinguere la magnetite dalla silice (campione *J*, **Fig.3.18**). Questo risultato conferma l'importanza di effettuare il rivestimento di silice via sol-gel in un sistema costituito da microemulsioni termodinamicamente stabili.

Anche in questo caso le distribuzioni DLS (**Fig.3.16**) presentano un contributo maggioritario che indica una popolazione relativamente dispersa intorno ai 100 nm.

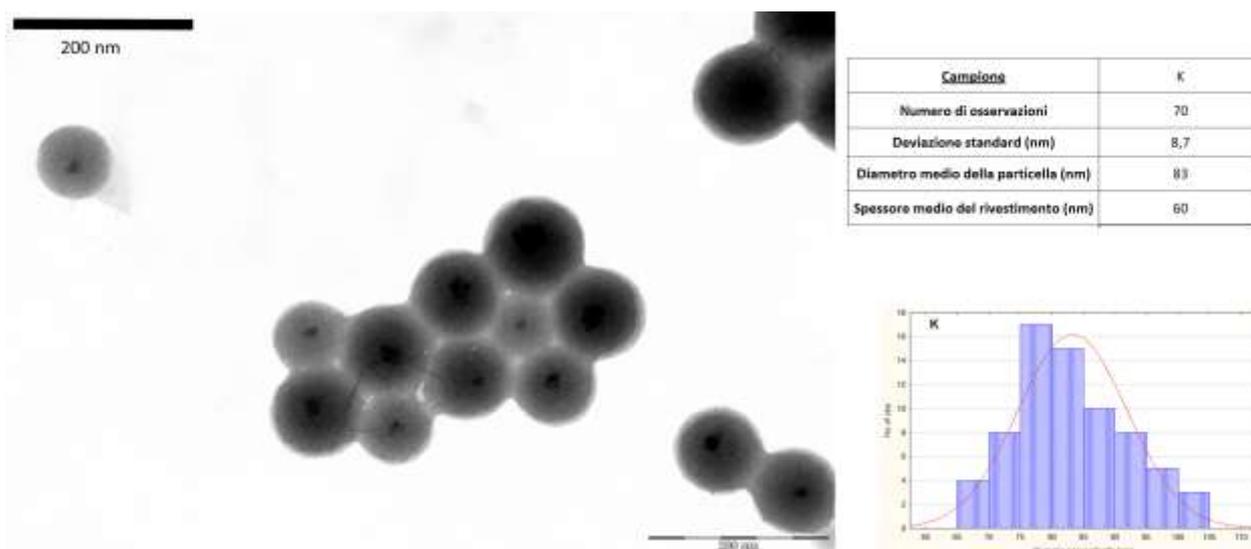
### 3.1.2.4 Effetto della percentuale di nanoparticelle di $\text{Fe}_3\text{O}_4$ nel sistema

Per variare la concentrazione di magnetite, si varia il volume di sospensione acquosa prelevato, mantenendo costante il volume di fase acquosa previsto per il sistema microemulsione (**Tab.3.4**). Anche la fase acquosa in cui sono disperse le nanoparticelle magnetiche, infatti, contribuisce alla formazione delle microemulsioni. Per studiare come la percentuale di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  si ripercuote sulla struttura finale, le particelle ricoperte sono analizzate attraverso microscopia TEM; mediante elaborazione software delle immagini e analisi statistica, si è valutato il diametro particellare, il diametro del core magnetico e lo spessore medio del rivestimento. I risultati sono riepilogati nella tabella sottostante.

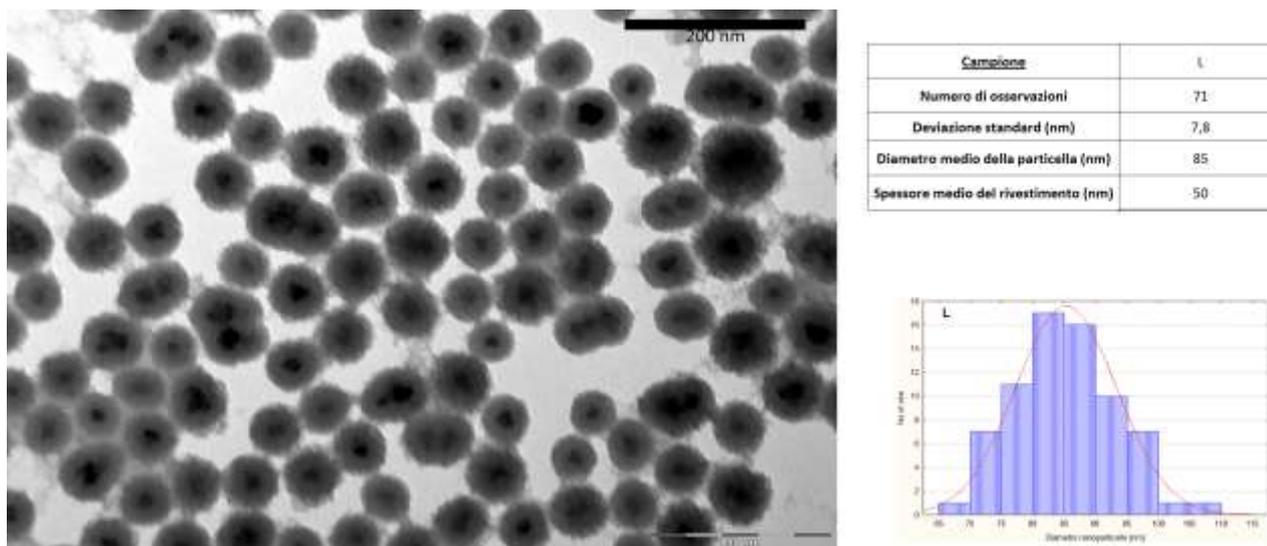
**Tab.3.4** Riepilogo dei risultati ottenuti attraverso elaborazione statistica delle immagini TEM. Gli intervalli di fiducia sono stati calcolati considerando una distribuzione normale al 95% di fiducia.

Campione	K	L
$\text{H}_2\text{O}$ (uL)	35	10
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ sz.acquosa (uL)	10	35
% $\text{Fe}_3\text{O}_4$ w/w	0.03 %	0.009 %
Diametro particella (nm)	$83 \pm 2$	$85 \pm 2$
Diametro core (nm)	$23 \pm 1$	$35 \pm 1$
Spessore medio (nm)	60	50

### Analisi TEM



**Fig.3.19** Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione K



**Fig.3.20** Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione L.

Come visto precedentemente, nella formazione delle microemulsioni la quantità di acqua gioca un ruolo fondamentale. Le nanoparticelle di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  utilizzate nella sintesi sono in una sospensione acquosa e di conseguenza anche queste hanno un effetto sulla formazione delle microemulsioni che si ripercuote poi sulla struttura delle nanoparticelle core shell. Nelle due prove eseguite si sono dosate le quantità di acqua e di sol nanoparticelle in sz. acquosa in modo tale che la quantità complessiva di acqua nei due campioni fosse la stessa e il sistema fosse nella zona di stabilità delle microemulsioni. Come si può vedere dalla **Tab.3.4** le dimensioni complessive delle nanoparticelle core shell rimangono pressoché invariate nelle due prove sintetiche, ciò che cambia in maniera rilevante è il diametro delle particelle di magnetite che formano il core. Il campione K (**Fig.3.19**) presenta un core con un diametro medio di 23 nm, prossimo a quello delle nanoparticelle non rivestite; mentre il campione L (**Fig.3.20**) presenta un core magnetico con un diametro medio di 35 nm, probabilmente dovuto alla presenza di più unità di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Attraverso il controllo della percentuale di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  si è riusciti a variare lo spessore di silice senza modificare la quantità di TEOS nel sistema. Il diametro complessivo delle nanoparticelle è rimasto pressoché invariato poiché la quantità di acqua nel sistema è rimasto costante e le microemulsioni che si formano presentano lo stesso diametro.

### 3.1.2.5 Caratterizzazione magnetica.

Sono sottoposti a caratterizzazione magnetica i seguenti campioni:

#### Campione M

Preparato dalla sospensione acquosa di NPs di magnetite con concentrazione pari a 7.301 g/L. Essiccato sottovuoto e portato a peso costante.

Il campione è disperso in una piccola quantità di EtOH e depositato secondo procedura su una lastra di Si in quantità pari a 0.32mg.

#### Campione 01

Preparato attraverso l'evaporazione della miscela acquosa di NPs rivestite con Silice (campione A) con uno spessore stimato di 23.4 nm.

Il campione è essiccato e portato a peso costante, pari a 2.28mg

Il contenuto di magnetite è pari a 1.09mg ovvero il 47.8%

Il campione è disperso in una piccola quantità di EtOH e depositato secondo procedura su una lastra di Si in quantità pari a 0.30mg corrispondenti a 0.143mg di magnetite.

#### Campione 02

Preparato attraverso l'evaporazione della miscela acquosa di NPs rivestite con Silice (campione D) con uno spessore stimato di 19.4 nm

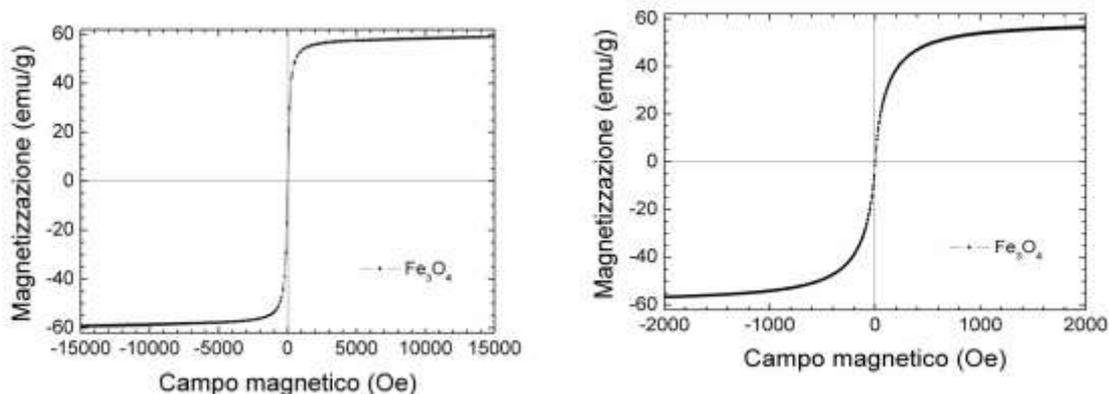
Il campione è essiccato e portato a peso costante, pari a 1.97mg

Il contenuto di magnetite è pari a 1.09mg ovvero il 55.3%

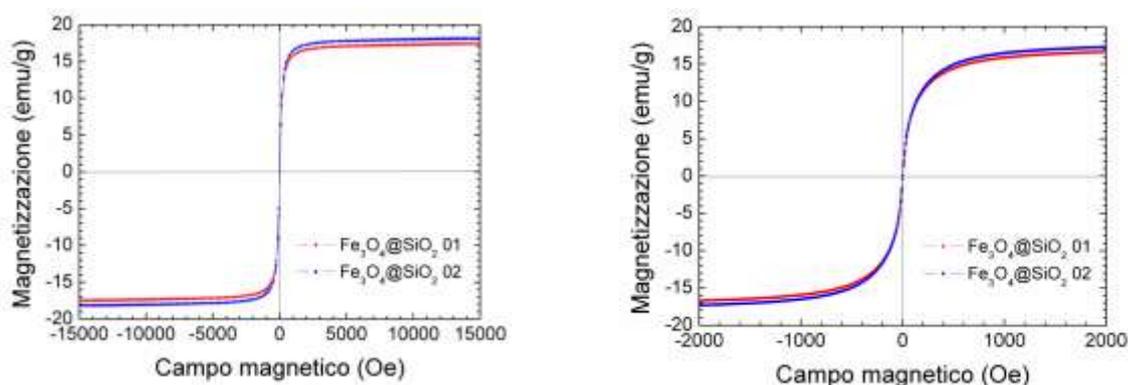
Il campione è disperso in una piccola quantità di EtOH e depositato secondo procedura su una lastra di Si in quantità pari a 0.12mg corrispondenti a 0.0682mg di magnetite.

#### Procedura operativa

Un'aliquota di sospensione alcolica di nanoparticelle è stata depositata su una sottile lastra di silicio di dimensioni 3 x 3 mm, precedentemente pesata con bilancia analitica con precisione pari al centesimo di milligrammo. Si è quindi lasciato evaporare il solvente (etanolo) lasciando i campioni per 15' sotto l'azione di una lampada riscaldante a raggi IR. Le lastre contenenti i campioni depositati sono state pesate e successivamente si è depositato sopra di esse una goccia di colla ciano-acrilica. Ogni singola lastra è stata montata all'estremità inferiore di un'asta disposta perpendicolarmente rispetto al campo magnetico applicato, incollandola con del grasso da vuoto al supporto di quarzo dell'asta.



**Fig.3.21** Cicli di isteresi del campione M, con fondoscala rispettivamente a 15 kOe e 2 kOe



**Fig.3.22** Cicli di isteresi dei campioni 01 e 02, con fondoscala rispettivamente a 15 kOe e 2 kOe

La quantità di magnetite presente nei campioni è stata calcolata supponendo che la totalità della magnetite introdotta nel sistema di reazione (1.09 mg) vada a costituire le nanoparticelle core shell. Dopo la sintesi le nanoparticelle sono state precipitate totalmente ed essicate, successivamente se ne è determinato il peso e si è risaliti alla percentuale di magnetite costituente il campione. Questo dato è di fondamentale importanza per la taratura e il settaggio dello strumento, poiché la magnetizzazione a saturazione è una grandezza estensiva.

Poiché si è avuta la possibilità di scegliere soltanto tre campioni da sottoporre a caratterizzazione magnetica, la scelta è ricaduta sul campione costituito da magnetite non rivestita (campione M) e su due campioni (01 e 02) preparati introducendo nel sistema di reazione due quantità differenti di TEOS (rispettivamente 12 mg e 3 mg). Le prove magnetiche hanno dimostrato chiaramente come il coating di silice influenza le proprietà magnetiche delle nanoparticelle. I grafici ottenuti dalle analisi delle nanoparticelle rivestite evidenziano l'assenza di loop di isteresi, la magnetizzazione a saturazione è pari a 56 emu/g per il campione M (**Fig.3.21**). I grafici relativi alle nanoparticelle core shell evidenziano una sensibile diminuzione della magnetizzazione a saturazione rispetto al campione non rivestito, inoltre la magnetizzazione a saturazione diminuisce leggermente

con lo spessore dello strato di silice (**Fig.3.22**). La magnetizzazione a saturazione risulta pari a 16 emu/g per il campione 01 e 18 emu/g per il campione 02. Tutte le curve appaiono completamente reversibili e senza la presenza di isteresi; ciò significa che quando il campo magnetico è rimosso le nanoparticelle non esibiscono magnetizzazione residua e sono pertanto superparamagnetiche.

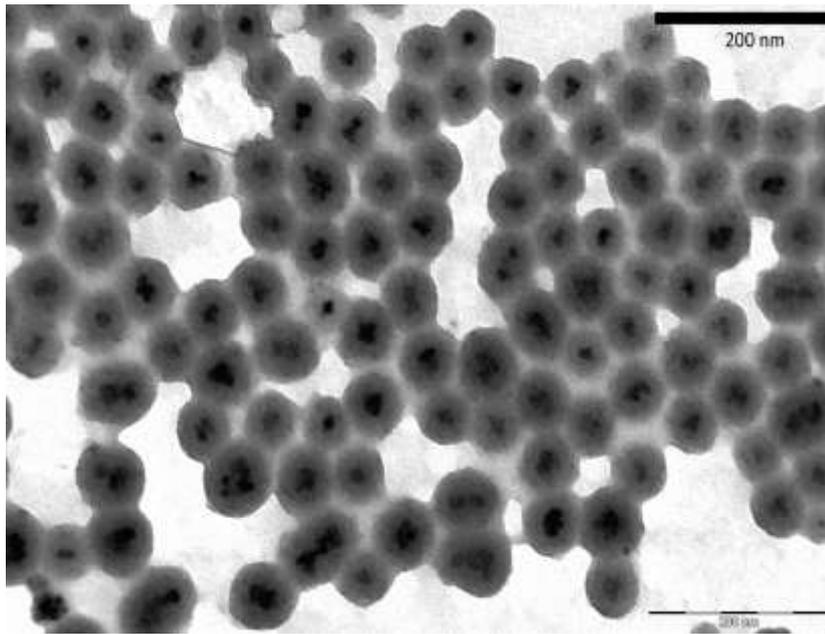
### 3.1.2.6 Caratterizzazione delle nanoparticelle funzionalizzate con Fluorofori<sup>[2]</sup>

Le proprietà fotochimiche delle nanoparticelle core shell funzionalizzate con molecole fluorescenti, sono state caratterizzate per determinare gli effetti dell'incapsulamento sulla luminescenza e sulla stabilità del fluoroforo. Per verificare se i fluorofori incapsulati hanno modificano la morfologia delle nanoparticelle, queste sono analizzate attraverso microscopia TEM e misure DLS. Mediante elaborazione software delle immagini e analisi statistica, si è valutato il diametro particellare, il diametro del core magnetico e lo spessore medio del rivestimento. I risultati sono riepilogati in **Tab.3.5** il campione funzionalizzato con il  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  è chiamato Rut@NP, mentre il campione funzionalizzato con la Rodamina B è chiamato RodB@NP.

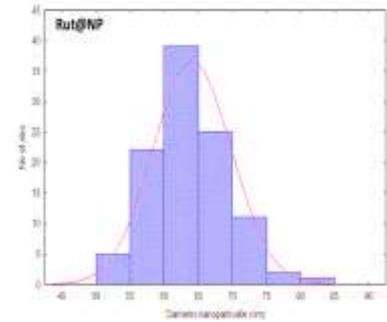
**Tab.3.5** Riepilogo dei risultati ottenuti attraverso elaborazione statistica delle immagini TEM

Campione	Rut@NP	RodB@NP
<b>Diametro particella (nm)</b>	<b>64 ± 1</b>	<b>63 ± 1</b>
<b>Diametro core (nm)</b>	<b>25 ± 1</b>	<b>24 ± 1</b>
<b>Spessore medio (nm)</b>	<b>39</b>	<b>39</b>

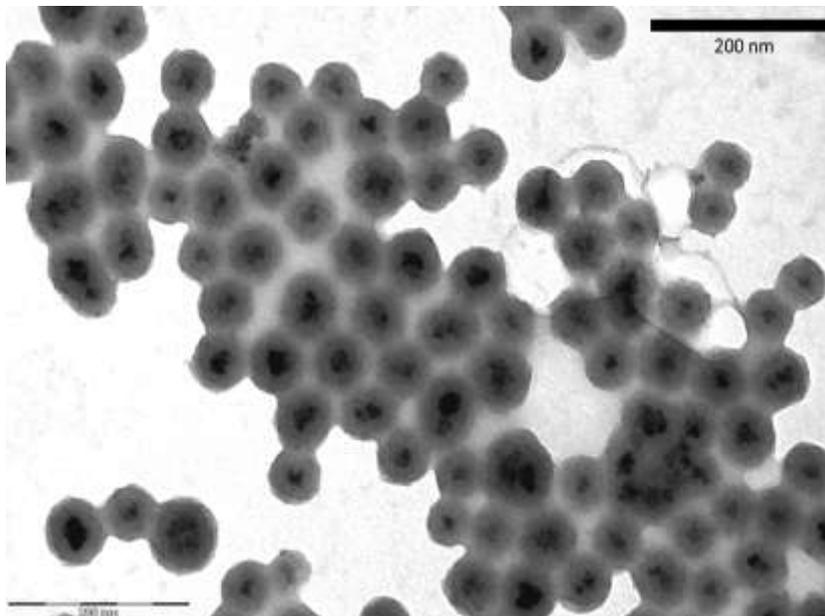
## Analisi TEM



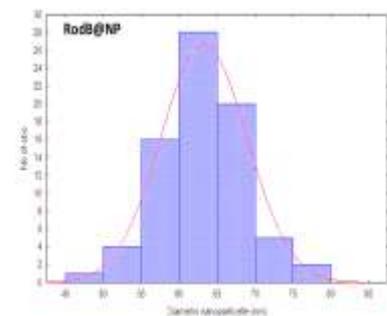
Campione	Rut@NP
Numero di osservazioni	105
Deviazione standard (nm)	5,7
Diametro medio della particella (nm)	64
Spessore medio del rivestimento (nm)	39



*Fig.3.23* Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione Rut@NP.

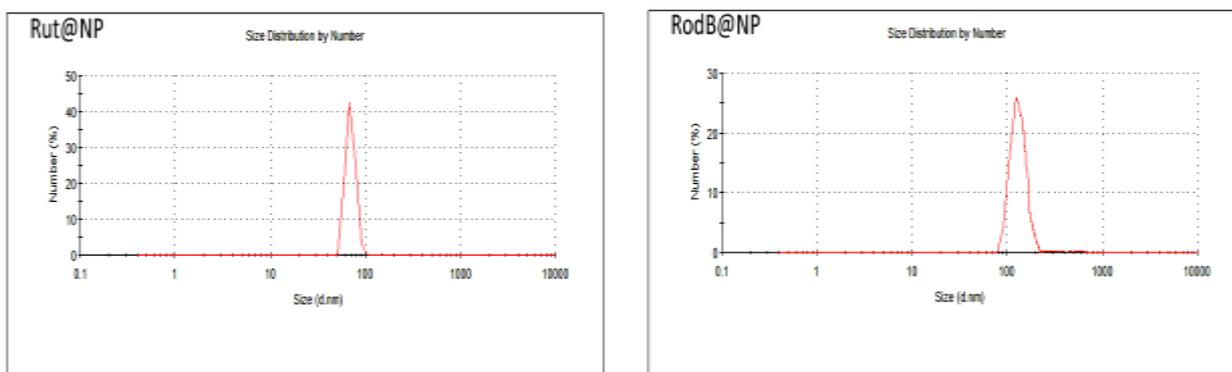


Campione	RodB@NP
Numero di osservazioni	76
Deviazione standard (nm)	5,4
Diametro medio della particella (nm)	63
Spessore medio del rivestimento (nm)	39



*Fig.3.24* Micrografia TEM e distribuzione statistica dei diametri delle particelle nel campione RodB@NP.

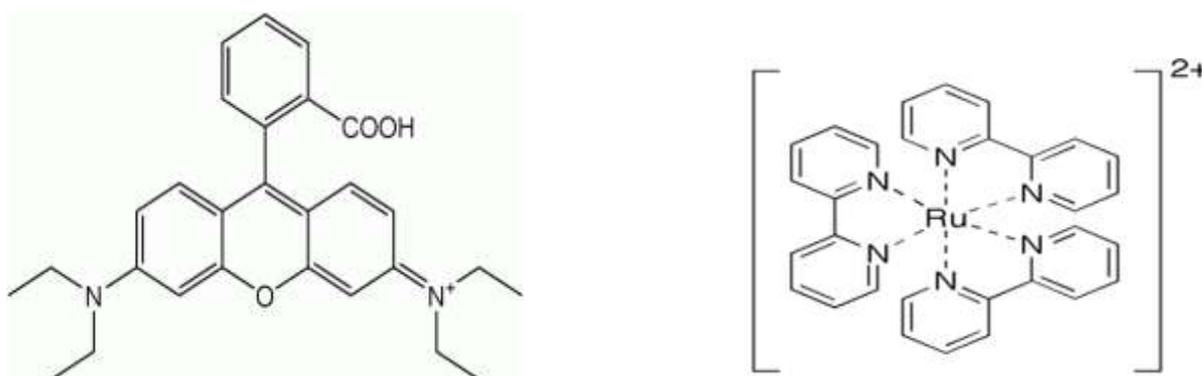
## Analisi DLS



**Fig.3.25** Distributions DLS dei campioni funzionalizzati con fluorofori.

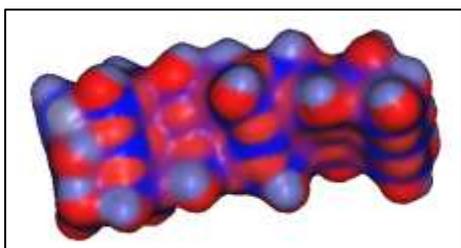
## Caratterizzazione fotochimica

I coloranti utilizzati in queste prove sono stati Rodamina B e  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  (**Fig.3.33**)



**Fig.3.33** Da sinistra a destra Rodamina B e  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$

La Rodamina B è una molecola planare, la carica positiva presente sul gruppo amminico è delocalizzata lungo tutto lo scheletro aromatico. A seguito della sua particolare conformazione riesce a intercalarsi negli strati di  $\text{SiO}_2$ ; gli atomi di ossigeno presenti nel reticolo di silice infatti presentano un dipolo negativo, come rappresentato dalla **Fig.3.34**



**Fig.3.34** Rappresentazione tridimensionale di una sezione del reticolo di  $\text{SiO}_2$ . In rosso sono indicati i dipoli negativi, mentre in blu sono indicati quelli positivi.

La carica positiva delocalizzata su tutto lo scheletro aromatico fa in modo che la molecola di fluoroforo possa rimanere coordinata allo scheletro di silice. Dal momento in cui la rodamina B è introdotta sin dall'inizio, questa comincia a coordinarsi alla  $\text{SiO}_2$  man mano che questa si forma, rimanendo effettivamente intrappolata nella matrice.

Il  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  è un complesso  $d^6$  a basso spin, il suo legante, la bipyridina, contribuisce a dare transizioni di trasferimento di carica del tipo  $d_\pi - \pi^*$ . Presenta una carica positiva netta, per cui si immagina che il processo per il quale rimanga incapsulato nello scheletro di silice sia del tutto simile alla rodamina, ma si pensa che il coupling fluoroforo@silice sia più robusto, vista appunto la presenza di carica positiva netta.

La composizione finale dei fluorofori nelle sospensioni nanoparticellari sono riportate in

### Tab.3.6

*Tab.3.6 Concentrazione dei fluorofori nella sospensione nanoparticellare e relativi coefficiente di estinzione molare*

Campione	Concentrazione	$\epsilon$ (alla $\lambda$ d'assorbimento max)
$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	0,934 mM	$11500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Rodamina B	0,0459 mM	$70310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Dall'interpretazione delle micrografie TEM si evince che le nanoparticelle non presentano alterazioni in dimensioni e morfologia imputabili alla presenza del colorante nello shell. Il diametro complessivo è in linea con la quantità di acqua e di TEOS introdotti nella microemulsione per entrambi i campioni. (Figg. 3.23; 3.24).

### Caratterizzazione ottica del sistema $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{NP}$

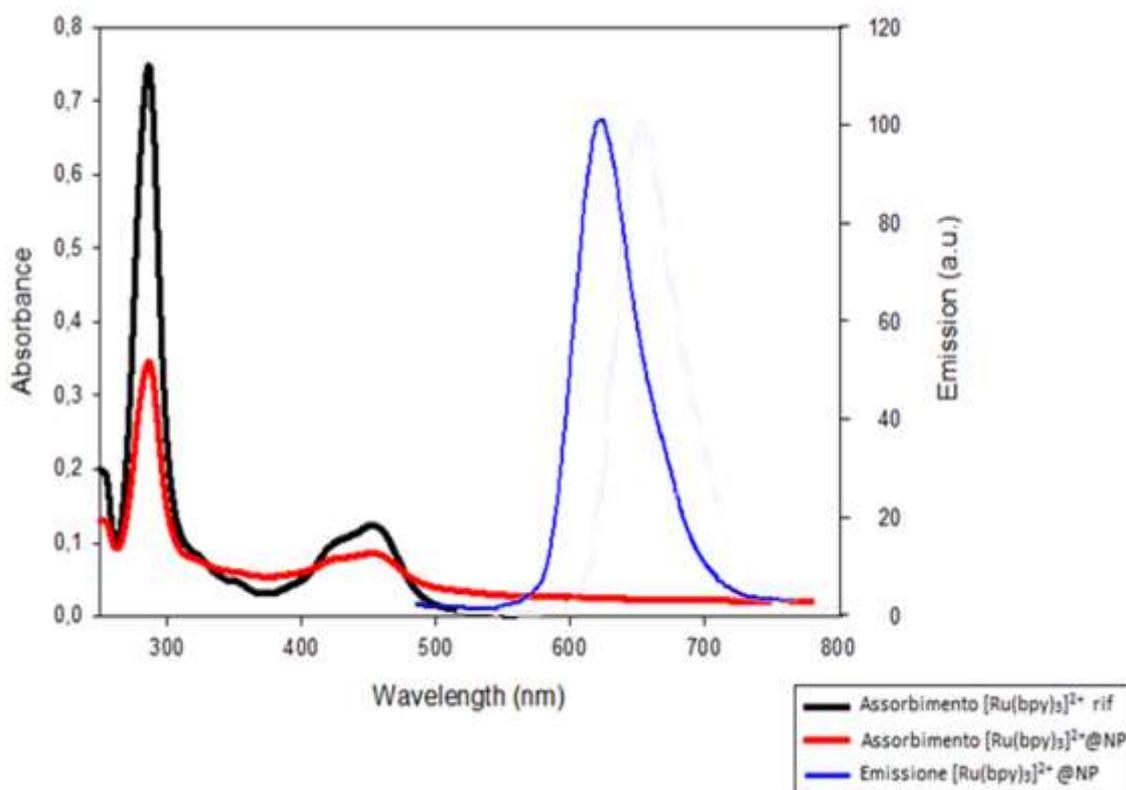


Fig. 3.26 Spettri d'assorbimento ed emissione del campione funzionalizzato con rutenio

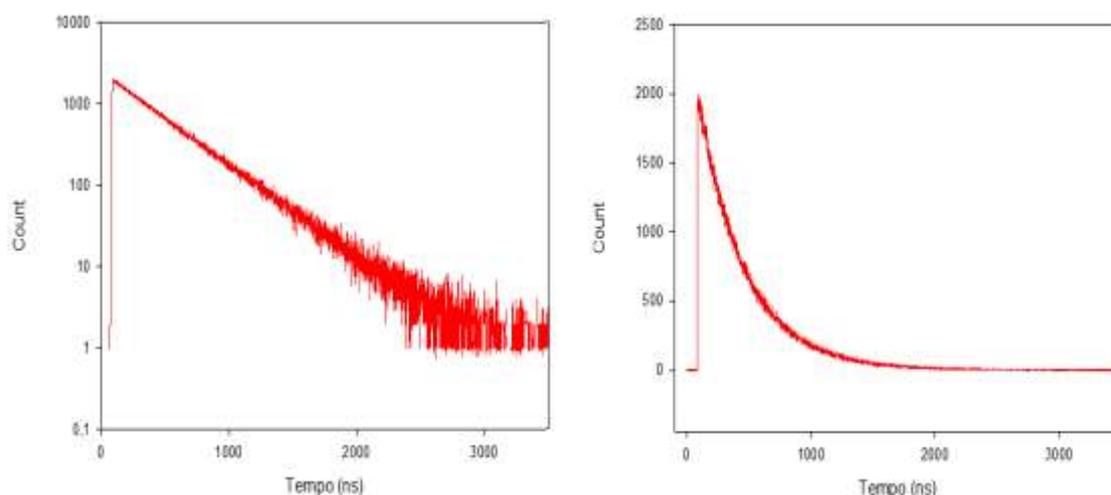


Fig. 3.27 Tempo di vita del sistema  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{NP}$ . A sinistra il grafico è in scala logaritmica, a destra in scala lineare

La soluzione acquosa del complesso di rutenio assorbe nel visibile a 454 nm con un coefficiente di estinzione molare pari a  $11500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Le misure effettuate con la tecnica del "fotone singolo" hanno rivelato un tempo di vita molto lungo, pari a 590 ns. Lo stato eccitato decade allo stato fondamentale emettendo un fotone a una lunghezza d'onda di 608 nm (Fig.3.26). Il lungo

tempo di vita è attribuibile al fatto che lo stato eccitato del complesso è un tripletto, mentre lo stato fondamentale è di singoletto e al fatto che la geometria della molecola permette separazione e trasferimento di carica. In questo caso il processo luminescente è la fosforescenza (**Fig.3.27**).

Le misurazioni delle rese quantiche di luminescenza sono state effettuate in soluzioni ed a 25°C. Il rendimento quantico è stato determinato confrontando lo spettro di emissione del fluoroforo in esame con quello di uno standard di riferimento, registrati nelle stesse condizioni sperimentali ( $\lambda$  di eccitazione, fenditure di eccitazione e di emissione); questo confronto viene fatto paragonando le intensità di emissione dei due fluorofori integrate per tutto l'intervallo di lunghezze d'onda (aree sottese dagli spettri di emissione). La resa quantica è data dalla relazione:

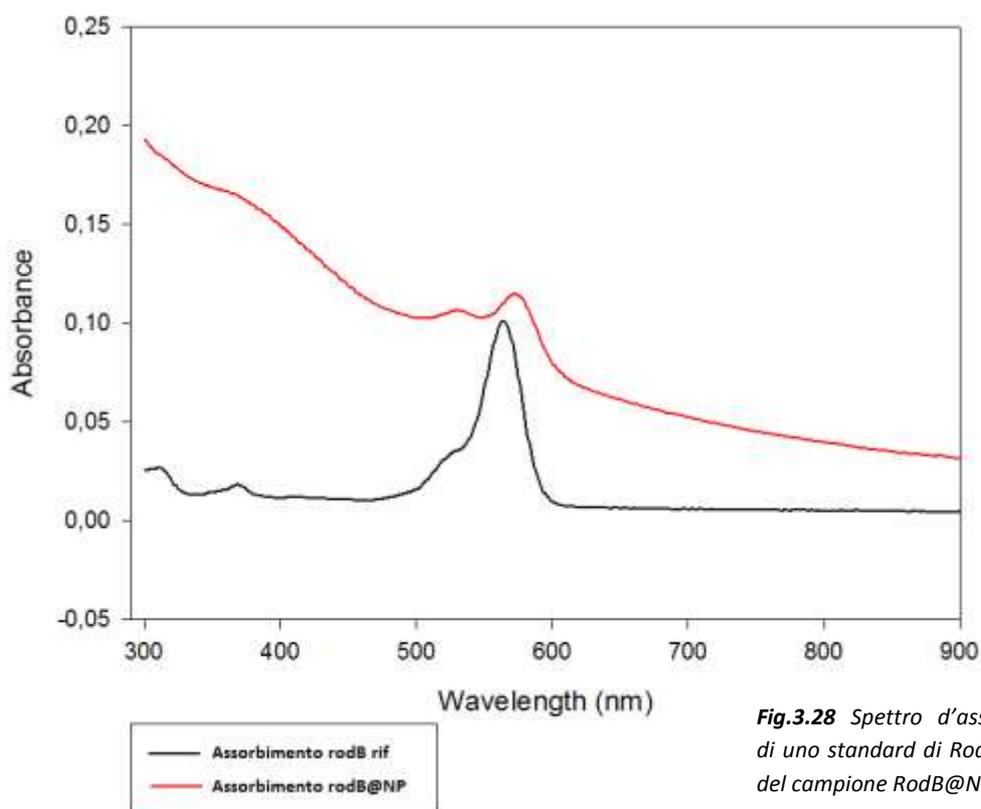
$$\Phi_S = \Phi_R \left( \frac{A_S}{A_R} \right) \left( \frac{n_S}{n_R} \right)^2$$

dove  $\Phi$  è la resa quantica,  $A$  l'area sottesa alla banda di missione ed  $n$  l'indice di rifrazione del solvente utilizzato per preparare i campioni di misura. I suffissi  $S$  e  $R$  indicano il campione di misura ed il riferimento utilizzato. Come standard di riferimento si è utilizzato una soluzione di  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ . Il rendimento quantico di fluorescenza è risultato essere pari a 0,032. I risultati sono riepilogati nella **Tab.3.7**.

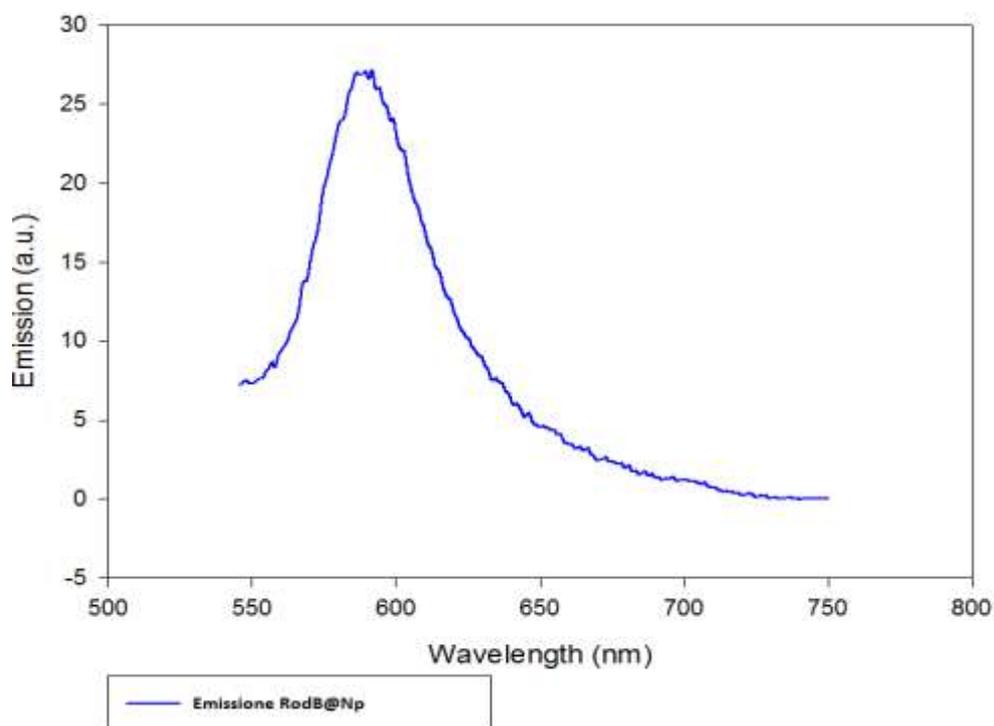
**Tab. 3.7** Riepilogo dei risultati ottenuti dalla caratterizzazione fotochimica del campione Rut@NP

$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+} @\text{NP}$			
$\lambda$ max abs (nm)	$\lambda$ max em (nm)	$\Phi$	$\tau$ (ns)
454	608	0.032	590

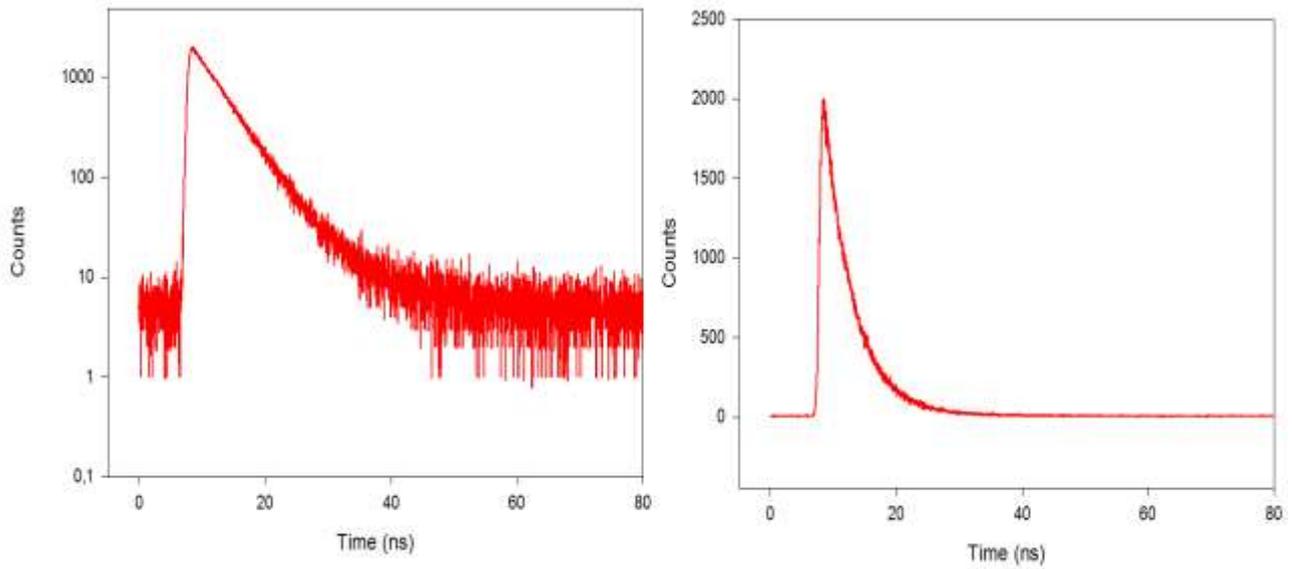
Il rendimento quantico di un fluoroforo è indipendente dalla sua concentrazione, per il complesso di rutenio risulta dalla letteratura essere pari a 0.025. A seguito dell'immobilizzazione del fluoroforo nell'architettura core-shell si assiste ad un miglioramento della resa quantica. L'incremento del valore di  $\Phi$  ricavato sperimentalmente rispetto a quello tabulato in letteratura è dovuto al fatto che il fluoroforo incapsulato nello shell di silice viene preservato da fenomeni ossidativi da parte dell' $\text{O}_2$  presente nella soluzione, riducendo il fenomeno del quenching del fluoroforo. Le misure dei tempi di vita mostrano come questo fenomeno possa essere attribuito a un incremento del decadimento radioattivo e a una diminuzione del decadimento non radioattivo.

**Caratterizzazione ottica del sistema RodaminaB@NP**

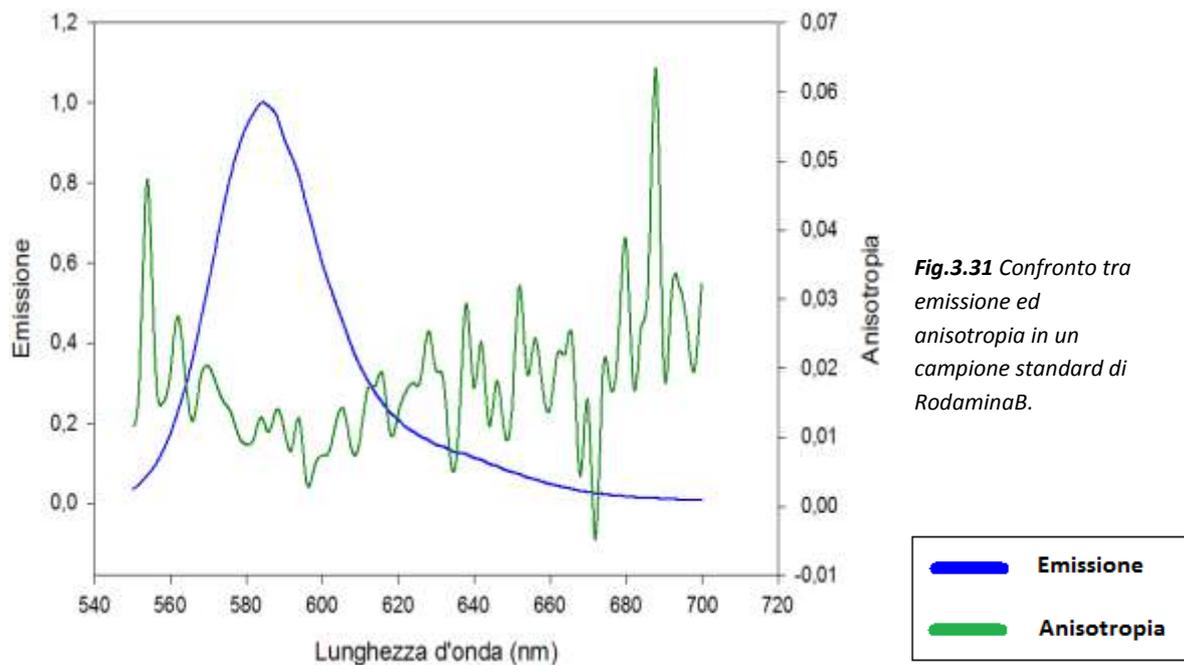
**Fig.3.28** Spettro d'assorbimento di uno standard di Rodamina B e del campione RodB@NP.



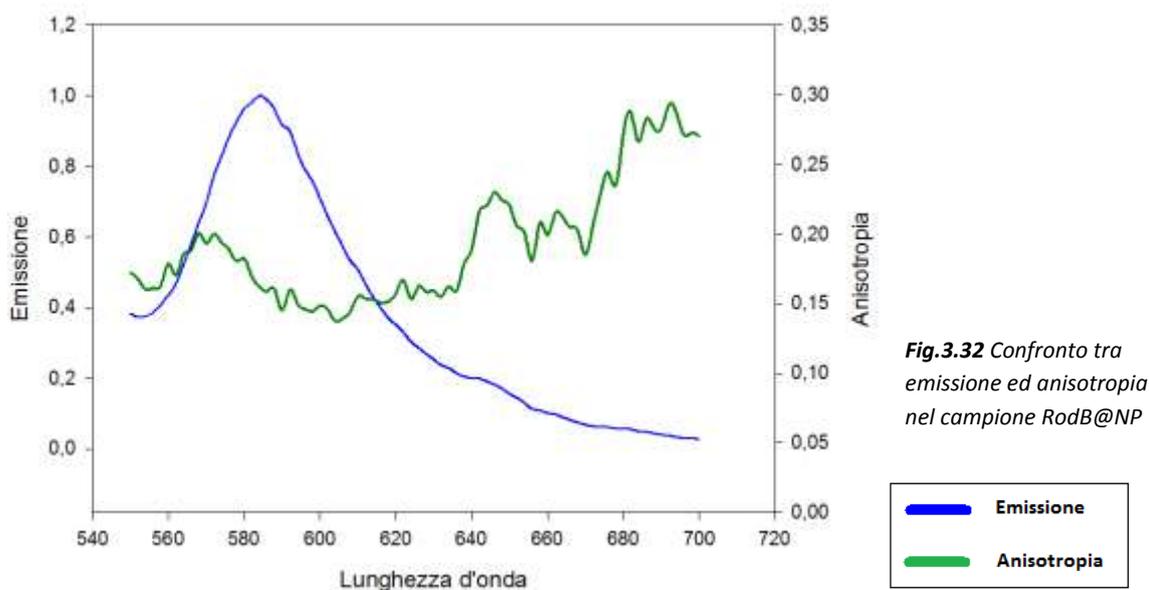
**Fig.3.29** Spettro d'emissione del campione RodB@NP.



**Fig. 3.30** Tempo di vita del sistema RodB@NP. A sinistra il grafico è in scala logaritmica, a destra in scala lineare.



**Fig.3.31** Confronto tra emissione ed anisotropia in un campione standard di RodaminaB.



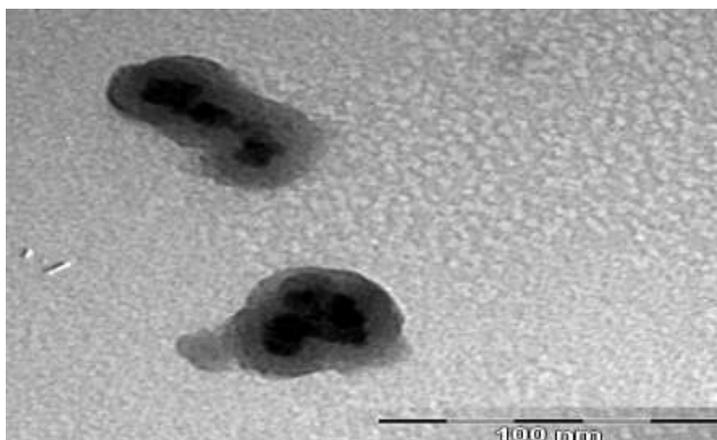
La soluzione acquosa di Rodamina B assorbe nel visibile a 562 nm, con un coefficiente di estinzione molare di  $70310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Lo stato eccitato decade emettendo un fotone ad una lunghezza d'onda pari a 584 nm (**Fig. 3.28; 3.29**); il tempo di vita è risultato 1.79 ns (**Fig. 3.30**) considerevolmente più breve rispetto al valore del complesso di rutenio. In questo caso il processo luminescente è la fluorescenza. Dalle misurazioni di resa quantica risulta un valore di  $\Phi$  pari a 0.40, il valore ricavato sperimentalmente è inferiore al valore riportato in letteratura, ciò è dovuto a fenomeni di auto-quenching ai quali va incontro la rodamina quando la sua concentrazione nel sistema è troppo elevata. Le misure di anisotropia, effettuate su una soluzione di rodamina standard e sul campione di nanoparticelle funzionalizzate con rodamina, mostrano come il fluoroforo sia effettivamente adsorbito sullo shell di silice della nanoparticella. L'anisotropia valutata nel massimo d'emissione è più elevata di un ordine di grandezza nel campione dove i fluorofori sono adsorbiti sulle particelle (**Fig. 3.31; 3.32**). Quando i fluorofori sono in soluzione questi si muovono con velocità elevata e riorientano i momenti di dipolo in tempi comparabili al tempo di vita, si assiste ad una rapida depolarizzazione che si traduce in un basso valore di anisotropia; viceversa quando i fluorofori sono adsorbiti sulla nanoparticella, essi sono immobilizzati e si muovono in maniera solidale con la particella, il tempo di riorientamento dei dipoli è più lungo, in questo caso, se non sono presenti fenomeni di Resonance Energy Transfer, i valori di anisotropia sono più elevati. I dati sono riepilogati in **Tab. 3.8**

**Tab. 3.8** Riepilogo dei risultati ottenuti dalla caratterizzazione fotochimica del campione RodB@NP

RodB@Np				
$\lambda$ max abs (nm)	$\lambda$ max em (nm)	$\Phi$	$\tau$ (ns)	Anisotropia
562	684	0,40	1,79	0,16
				0,012 (nel rif.)

### 3.1.3 Metodo di Stöber

Si riportano di seguito i risultati ottenuti con il metodo di Stöber per la nucleazione del rivestimento di silice. La reazione di Stöber prevede idrolisi e condensazione del TEOS in solvente idroalcolico e ambiente alcalino. Nella **Fig.3.33** si può notare un dettaglio di alcune nanoparticelle



**Fig.3.33** Dettaglio di due nanoparticelle core-shell sintetizzate col metodo di Stober.

Da un'analisi di questa micrografia TEM si ipotizza che il coating delle nanoparticelle magnetiche sia avvenuto. Le particelle core-shell, tuttavia mostrano una morfologia irregolare. Tale risultato si spiega considerando che in questo tipo di sintesi non sono presenti agenti templanti (come le micelle inverse nel caso di sintesi attraverso le microemulsioni) di conseguenza la forma finale delle particelle non è perfettamente sferica.

Anche se dall'analisi della micrografia si notano sistemi particellari discreti, bisogna sottolineare che la maggior parte delle nanoparticelle si presenta sottoforma di aggregati di dimensioni superiori ai 200 nm. Questo è chiaramente visibile dalla **Fig.3.34**



*Fig.3.34 Nanoparticelle aggregate, sintetizzate con metodo di Stöber*

Il metodo di coating di Stöber è sicuramente il più semplice da eseguire dal punto di vista sperimentale, a partire dagli anni '60, quando fu sviluppato, un gran numero di nanoparticelle è stato rivestito con silice seguendo questa strada. Tuttavia, un confronto con il metodo delle microemulsioni sottolinea la difficoltà delle nanoparticelle magnetiche di rimanere stabilmente sospese durante la nucleazione e la formazione del rivestimento di silice. Nel nostro caso, infatti, le nanoparticelle magnetiche si sono aggregate e ciò è stato evidenziato dal fatto che esse sono precipitate e il sistema è apparso anisotropo. La spiegazione di questo fatto è da cercare nel meccanismo che conduce alla formazione del coating; secondo il modello di LaMer e Dinegar (§ 1.5) per ottenere una popolazione di nanoparticelle disperse e uniformi è necessario che avvenga una rapida nucleazione, seguita da una crescita attorno alle nanoparticelle formate. Se la nucleazione avviene dilazionata nel tempo e contemporaneamente all'accrescimento dei primi nuclei formati, si ha la formazione di una popolazione polidispersa con la possibilità dei nuclei più grandi di essere instabili e precipitare a seguito di un'aggregazione incontrollata. Il metodo di Stöber prevede che il TEOS venga introdotto in un'unica aliquota in un sistema costituito da nanoparticelle di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  presintetizzate che agiscono da centri di nucleazione. L'assenza di micelle inverse che operano da templanti fa sì che una volta introdotto il precursore della silice questo si idrolizzi e condensi in maniera incontrollata. Contrariamente alla sintesi in microemulsione, dove l'equilibrio tra l'interno e l'esterno delle micelle regola la diffusione del TEOS e quindi la formazione dello strato di silice, nella sintesi di Stöber intervengono soltanto fattori termodinamici come la concentrazione del precursore o quella delle nanoparticelle magnetiche. In queste condizioni è molto improbabile che sulle nanoparticelle di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  la silice riesca a nucleare istantaneamente e in maniera uniforme, il risultato sarà quindi quello mostrato in **Fig.3.34** ovvero la formazione di aggregati.

Questo tipo di comportamento era già stato anticipato dall'analisi DLS (**Fig.3.35**) che mostra la presenza di una popolazione dispersa con dimensioni superiori ai 100 nm ( $Z_{\text{ave}}$  505nm).

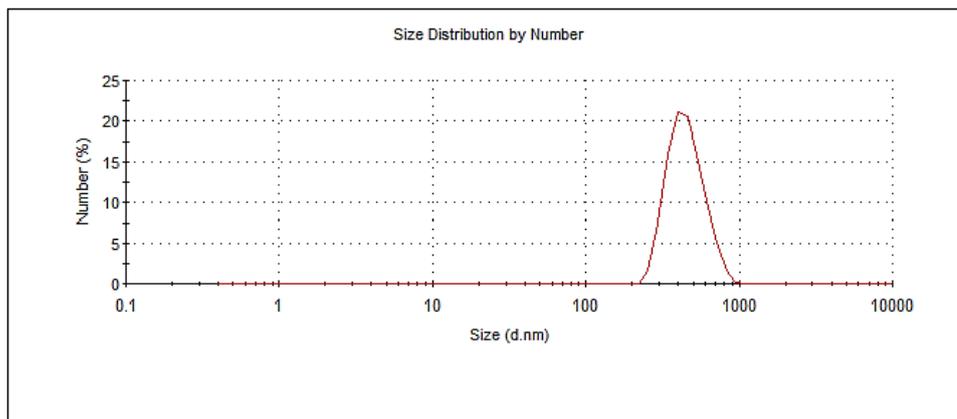


Fig.3.35 Spettro DLS delle nanoparticelle sintetizzate attraverso il metodo di Stöber

Si è quindi provato a trattare la sospensione in questa maniera: dapprima è stata sonicata per almeno 15 minuti, successivamente è stata filtrata con un filtro in lana di vetro con un cut off di 1600 nm, la soluzione è stata nuovamente sottoposta a filtrazione con un filtro con un cut off di 400 nm. Il DLS della soluzione filtrata è riportato in Fig. 3.36

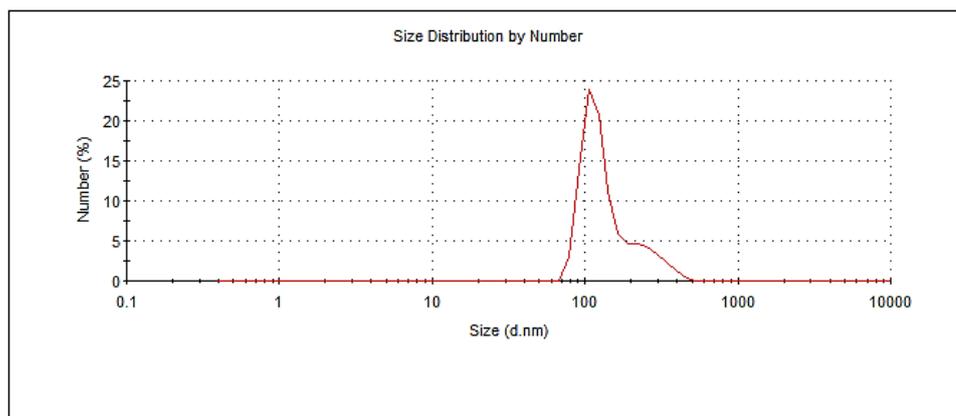


Fig.3.36 Spettro DLS delle nanoparticelle sintetizzate attraverso il metodo di Stöber dopo la filtrazione.

La filtrazione ha esaltato le popolazioni di nanoparticelle aventi diametro più piccolo e anche il TEM ha evidenziato la presenza di nanoparticelle core shell ben disperse aventi dimensioni di 60nm circa. Tuttavia anche la soluzione filtrata risulta instabile poiché nel giro di poche ore le nanoparticelle appaiono precipitate.

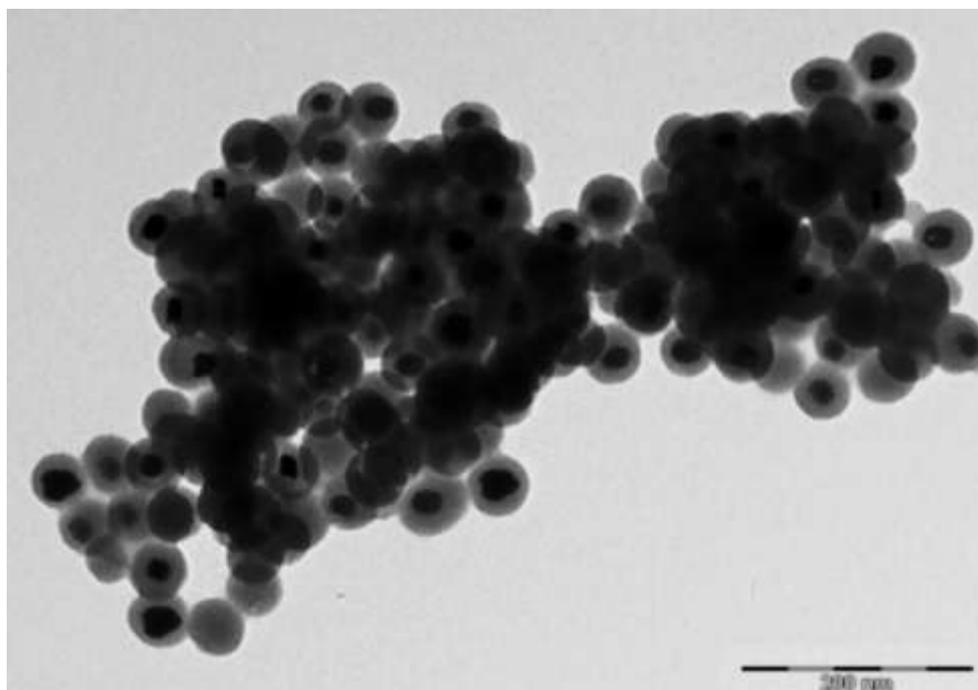
## 3.2 Ricopertura con SiO<sub>2</sub> di nanoparticelle di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> in polvere Nanometrica<sup>[3]</sup>

### 3.2.1 Metodo delle microemulsioni

Il metodo delle microemulsioni è stato applicato anche sulle polveri nanometriche di magnetite. Affinché questo metodo di sintesi risulti efficace e il ricoprimento sia uniforme è necessario che il

sistema di partenza sia perfettamente isotropo. Le polveri di magnetite sono state, quindi, disperse in acqua secondo la procedura indicata nel §2.3.2 e successivamente filtrate. Questa sospensione è stata la fonte di nanoparticelle per questo tipo di sintesi.

Come si può vedere dalla micrografia in **Fig.3.37** le nanoparticelle presentano, complessivamente, una struttura di tipo core-shell. Il diametro del core è valutato 47 nm ragionevolmente con quanto dichiarato dal fornitore; tuttavia, in generale, le particelle appaiono aggregate e sovrapposte. Questo può essere spiegato considerando la natura della magnetite utilizzata: le polveri nanometriche sono state stabilizzate attraverso una soluzione di PEI e PEG; questi due polimeri si legano alle particelle di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  secondo un meccanismo del tipo acido/base di Lewis e forniscono una stabilizzazione elettrosterica alle nanoparticelle. Tuttavia la presenza di queste catene sulla superficie della magnetite possono comportarsi da centri di nucleazione della silice, per cui questa nuclea in maniera incontrollata dando luogo a nanostrutture core-shell, ma aggregate. Si nota infine, la presenza di silice libera e questo può essere spiegato considerando la minor concentrazione di magnetite utilizzata rispetto alle prove con il nanosol di magnetite commerciale. Nonostante la maggior difficoltà a controllare il sistema polveri, rispetto a quello nanosol, va comunque sottolineato l'ottenimento di un sistema nanoparticellare di tipo core-shell, discretamente omogeneo, monodisperso e di morfologia sferica, anche partendo dalla polvere di magnetite che risulta sicuramente più economica e facilmente reperibile rispetto al nanosol.



**Fig.3.37** Nanoparticelle core shell ottenute col metodo delle microemulsioni, partendo da magnetite in polvere stabilizzata.

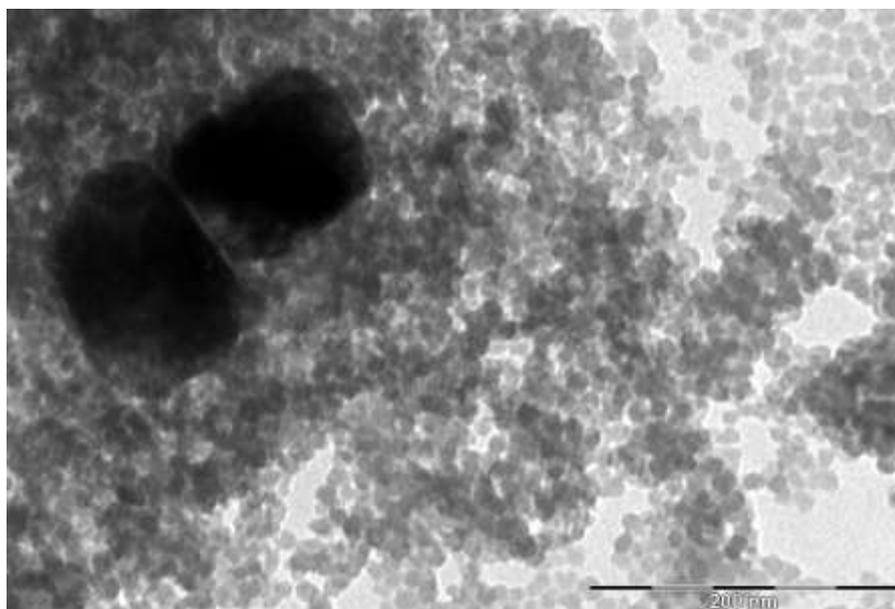
### 3.2.2 Metodo di Stöber<sup>[4]</sup>

Il metodo di Stöber è stato applicato anche sulla magnetite nanometrica in polvere; per valutare se ci fosse una differenza rispetto all'uso di magnetite in soluzione acquosa, si sono preparati due campioni con composizione indicata in **Tab.3.9**

*Tab.3.9 Riepilogo delle sintesi effettuate mediante metodo di Stöber*

NOME CAMPIONE	COMPOSIZIONE	NOTE
ST_1	EtOH (8mL); Acqua (2mL); Ammoniaca (150mg), TEOS (100uL)	
ST_2	EtOH (8mL); Acqua (2mL); Ammoniaca (75mg); TEOS (100uL)	Reazione condotta con pompa siringa

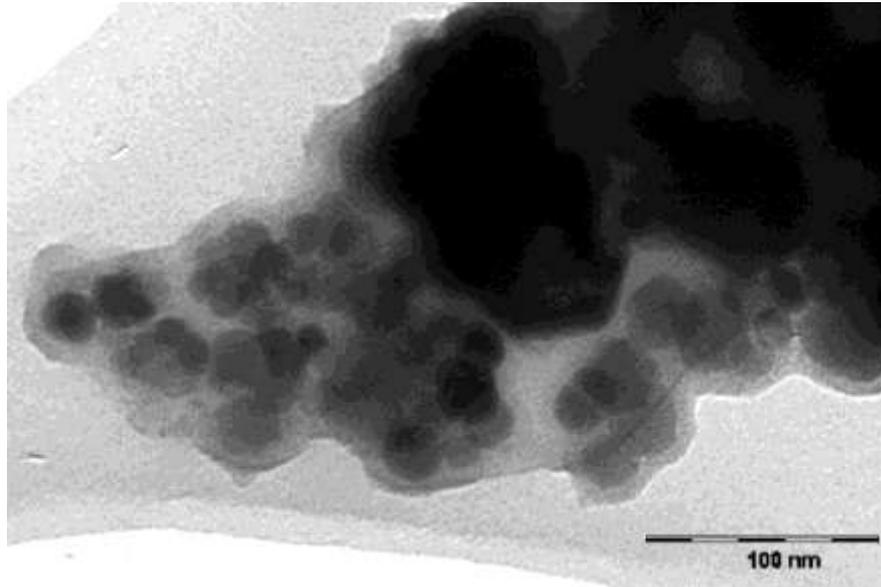
Dalla micrografia in **Fig.3.38** relativa al campione *ST\_1* si nota la presenza di un'elevata quantità di silice libera dal diametro estremamente piccolo (circa 2 nm). Questo è dovuto al fatto che in questo campione la quantità di TEOS è stata introdotta in un'unica aliquota: il sistema conteneva una quantità di ammoniaca eccessiva e una volta introdotto il TEOS questo si è idrolizzato istantaneamente formando nanoparticelle di SiO<sub>2</sub> molto piccole; inoltre la presenza di un agitatore magnetico può aver contribuito a favorire una segregazione della magnetite.



**Fig.3.38** Micrografia TEM del campione *ST\_1*

Poiché la presenza di silice di dimensioni piccole nel campione *ST\_1* può essere imputata all'eccessiva quantità di ammoniaca e all'introduzione del TEOS in un'unica aliquota, nel campione *ST\_2* si è

utilizzata una pompa a siringa per introdurre il precursore della silice e si è dimezzata la quantità di ammoniaca. La micrografia TEM è riportata in **Fig.3.39**



**Fig.3.39** Micrografia TEM del campione ST\_2

Come si può notare dall'immagine TEM adottando questi accorgimenti le nanoparticelle di silice libera spariscono e ciò che si ottiene è una struttura di tipo core-shell. Anche in questo caso non si sono ottenute nanoparticelle discrete, piuttosto una nanostruttura dove la matrice di silice ingloba totalmente le nanoparticelle di magnetite.

### 3.2.2.1 Sintesi di un rivestimento composito SiO<sub>2</sub> / Pluronic L121<sup>[5]</sup>

Numerosi polimeri, sia naturali che sintetici, sono stati sperimentati nel rivestimento di nanoparticelle magnetiche, questi polimeri includono PEG, PEO, PVP e così via. Tutti questi polimeri sono conosciuti per essere biocompatibili e in grado di favorire la dispersione delle particelle in ambienti acquosi. Tuttavia i rivestimenti con polimeri non sono particolarmente robusti e possono essere distaccati dalla nanoparticella facilmente, soprattutto in condizioni fisiologiche. Per migliorare la stabilità di questo tipo di rivestimento, si è cercato di accoppiare a questo coating un rivestimento con silice che si era già dimostrato essere un ricoprente ottimale soprattutto per le nanoparticelle magnetiche.

Il Pluronic L121 è il nome commerciale di un copolimero, detto anche poloxamero, a blocchi ABA costituito da una sezione idrofobica di polipropilene ossido (PPO) e una sezione idrofila di polietilene ossido (PEO). La struttura è riportata in **Fig.3.40** i polimeri della serie Pluronic si differenziano l'uno dall'altro per la quantità di PPO e PEO che lo costituiscono.

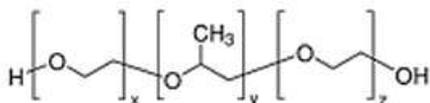


Fig.3.40 Copolimero a blocchi della serie Pluronic

Ogni polimero della serie Pluronic è caratterizzato da una sigla costituita da una lettera che indica lo stato fisico (*L* per liquid, *P* per paste, *F* per flake) e un numero costituito da tre cifre dove le prime due moltiplicate per 100 indicano il peso molecolare complessivo delle unità di PPO, mentre l'ultima cifra moltiplicata per 10 indica la percentuale di PEO. Una rappresentazione grafica di ciò è fornito dalla cosiddetta Pluronic Grid (Fig.3.41).

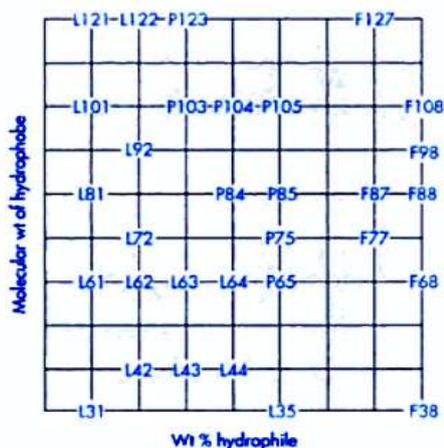


Fig.3.41 "Pluronic Grid"

Il Pluronic agisce come agente templante: i blocchi di PPO presentano affinità per le nanoparticelle magnetiche, mentre i blocchi di PPE per l'ambiente circostante. Il risultato è la formazione di un sistema nel quale le catene idrofobe stabilizzano le nanoparticelle, mentre quelle idrofile contribuiscono alla loro dispersione in solventi polari. Lo schema di reazione è esemplificato in Fig.3.42

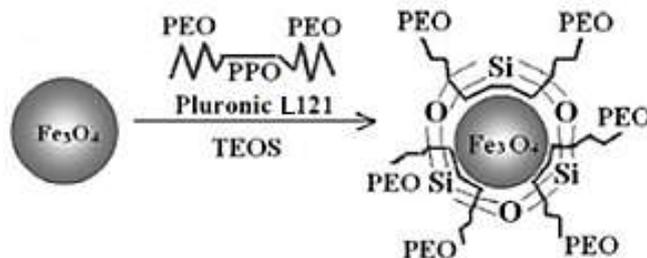


Fig.3.42 Schema di coating mediante Pluronic come agente templante

Per la scelta del poloxamero, per prima cosa si è valutato quale dei polimeri della serie Pluronic fosse solubile nell'ambiente di reazione che è costituito da una soluzione idroalcolica all'80% v/v in EtOH. Dalle prove di solubilità effettuate risulta che il Pluronic L121 risulta solubile in una soluzione

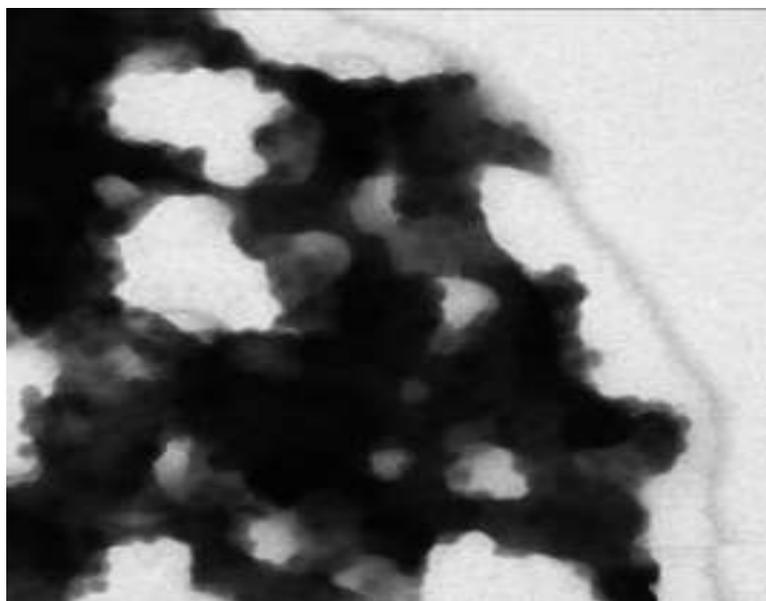
idroalcolica fino a una concentrazione di acqua inferiore al 50% v/v pertanto la scelta è ricaduta su questo polimero.

Con questo metodo sintetico sono state predisposte due prove, sintetizzate in **Tab.3.10**.

**Tab.3.10** Riepilogo delle sintesi effettuate mediante Pluronic L121

NOME CAMPIONE	COMPOSIZIONE	NOTE
PL_1	EtOH (8mL); Acqua (2mL); Pluronic L121 (700mg); Ammoniaca (75mg), TEOS (100uL)	
PL_2	EtOH (8mL); Acqua (2mL); Pluronic L121 (700mg); Ammoniaca (75mg), TEOS (100uL)	Reazione condotta nel sonificatore

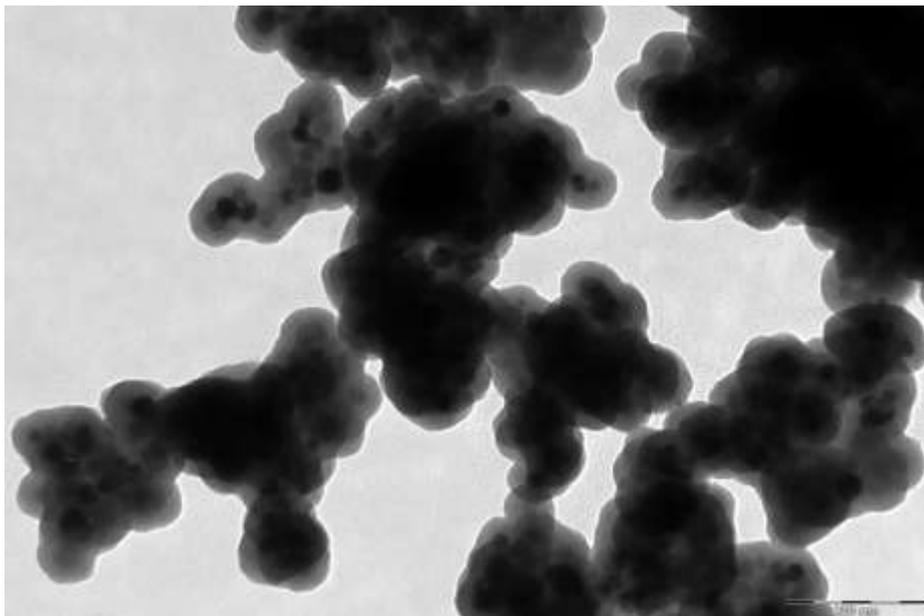
Una micrografia TEM delle sintesi effettuate secondo questa procedura è riportata in **Fig.3.43**



**Fig.3.43** Micrografia TEM del campione PL\_1

L'analisi al TEM ha evidenziato la presenza di macro aggregati, non sono presenti particelle isolate. Si riesce però a riscontrare la presenza di strutture core shell: la silice è nucleata in maniera incontrollata sulle nanoparticelle di magnetite, andando a costituire una matrice unica.

Al fine di migliorare la dispersione delle nanoparticelle nel mezzo di sintesi, questa è stata condotta nel sonificatore. Al termine della sintesi la sospensione appariva isotropa, ma entro poco tempo le nanoparticelle apparivano segregate. La micrografia TEM del campione è riportata in **Fig.3.44**



**Fig.3.44** Micrografia TEM del campione PL\_2

Complessivamente questo metodo di sintesi si è rivelato in grado di ricoprire in maniera omogenea le nanoparticelle magnetiche. Tuttavia, anche se era presente un templante, le nanoparticelle di magnetite rivestite di silice tendono ad aggregarsi, ad indicazione di una nucleazione della silice meno controllata rispetto al sistema microemulsioni. Risultati migliori si potrebbero ottenere cambiando il polimero utilizzato come templante, ovvero, optando per un poloxamero con una maggiore quantità di blocchi idrofili, si potrebbe indurre una migliore dispersione in mezzi acquosi o comunque polari.

### **Bibliografia**

- [1] Stjerndahl M., Andersson M., Hall E.H., Pajerowski D.M., Meisel M.W., Duran S.R., *Langmuir*, 24, 3532, **2008**.
- [2] Burns A., Ow H., Wiesner V., *Chem. Soc. Rev.*, 35, 1028, **2006**.
- [3] Santra S., Tapeç R., Theodoropoulou N., Dobson J., Hebard A. and Tan W., *Langmuir*, 17, 2900, **2001**.
- [4] Souza D.M., Andrade A.L., Fabris J.D., Valerio P., Leite M.F., Domingues R.Z., *Journal of Non-crystalline Solids* 354, 4894, **2008**.
- [5] Liu Z., Ding J., Xue J., *New J. Chem.*, 33, 88, **2009**.

## **4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE**

Con questo lavoro di tesi è stato possibile sintetizzare nanoparticelle core-shell di  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ .

Il rivestimento di nanoparticelle di **magnetite** ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) con **silice** ( $\text{SiO}_2$ ) sta diventando un promettente e importante approccio in campo biomedico. La magnetite è un candidato per numerose applicazioni biomediche tra le quali: la bioseparazione magnetica, la rilevazione di bio-analiti, la diagnosi e la terapia clinica, la somministrazione di medicinali specifici<sup>[1]</sup>

La formazione di un rivestimento omogeneo di silice assicura una promettente applicabilità di questi sistemi in quanto, non solo contribuisce a diminuire la tossicità della magnetite, ma rende le nanoparticelle un'interessante e versatile piattaforma sulla quale effettuare successive funzionalizzazioni. Al fine di realizzare un rivestimento di silice nanometrico sulle nanoparticelle di magnetite sono state prese in considerazione due strategie sintetiche: il **metodo delle microemulsioni inverse** ed il **metodo di Stöber**. La magnetite è stata impiegata sia sottoforma di sospensione acquosa (**nanosol** commerciale), sia sottoforma di **polvere** di dimensioni nanometriche. Il metodo delle microemulsioni applicato al sistema nanosol è risultato essere il più versatile e riproducibile; la caratterizzazione morfologica TEM ha evidenziato come le dimensioni dei nanocompositi core-shell possano essere modulate con precisione, variando parametri della sintesi quali la quantità di acqua e la quantità di TEOS introdotta. La caratterizzazione magnetica ha permesso di stabilire come il rivestimento di silice diminuisca complessivamente la magnetizzazione delle particelle pur, tuttavia, conservando un comportamento superparamagnetico, requisito fondamentale per l'applicazione di questi nanocomposti in applicazioni biomediche.

Una volta messo a punto il processo di ricoprimento, gli shell di silice sono stati funzionalizzati con alcuni fluorofori allo scopo di generare delle nanoparticelle multifunzionali che esibiscono una combinazione unica di proprietà ottiche e magnetiche che le rendono candidate ideali per molte tecniche diagnostiche e di imaging. Si è dimostrato come sia stato possibile incapsulare coloranti sulle nanoparticelle senza deprimere le proprietà fotochimiche di questi ultimi che, in alcuni casi, risultano addirittura aumentate.

I risultati promettenti di questo lavoro di tesi incoraggiano futuri sviluppi nella direzione di:

- Valutare la resa del processo di coating attraverso tecniche NMR. Misure al  $^{29}\text{Si}$  NMR permetterebbero, infatti, di discriminare gli atomi di silicio nel reticolo di  $\text{SiO}_2$ , da quelli appartenenti a composti organo-silano precursori<sup>[2]</sup>.
- Verificare la biocompatibilità di questi nanocompositi attraverso test di tossicità *in vitro*<sup>[3]</sup>.

- Sintetizzare direttamente *in situ* anche la magnetite nanometrica, con la concreta possibilità di raggiungere un controllo completo delle dimensioni e della morfologia del core e del rivestimento<sup>[4]</sup>.
- Applicare questo processo di rivestimento sol-gel anche ad altri ossidi metallici al fine di produrre nanoparticelle core-shell con diverse proprietà per ampliare le applicazioni possibili<sup>[5]</sup>.

### **Bibliografia**

- [1] Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst L., Muller R.N, *Chem Rev*, 108, 2064, **2008**.
- [2] Liu Z., Ding J., Xue J., *New J. Chem.*, 33, 88, **2009**.
- [3] Souza D.M., Andrade A.L., Fabris J.D., Valerio P., Leite M.F., Domingues R.Z., *Journal of Non-crystalline Solids* 354, 4894, **2008**.
- [4] Santra S., Tapeç R., Theodoropoulou N., Dobson J., Hebard A. and Tan W., *Langmuir*, 17, 2900, **2001**.
- [5] Sharrock M.P., *MRS Bull.*, 53, **1990**.

## Ringraziamenti

*A conclusione di questo lavoro di tesi, è doveroso porre i miei più sentiti ringraziamenti alle persone che ho avuto modo di conoscere in questo importante periodo della mia vita e che mi hanno aiutato a crescere sia dal punto di vista intellettuale sia dal punto di vista umano. E' difficile in poche righe ricordare tutte le persone che, a vario titolo, hanno contribuito a rendere migliore questo periodo.*

*Desidero ringraziare tutte le persone che hanno offerto un contributo fondamentale alla realizzazione e stesura di questo elaborato, in particolar modo il Dott. Enrico Rampazzo che con pazienza e spirito critico ha fornito una preziosa assistenza durante il lavoro presso il Dip di chimica G.Ciamician. Vorrei inoltre ringraziare la Dott.ssa Anna Costa dell' ISTECCNR di Faenza, il cui entusiasmo, la straordinaria competenza e la completa disponibilità hanno permesso l'ideazione e la realizzazione di questo progetto. Infine un sentito ringraziamento per la guida competente e solerte va alla mia relatrice, Prof.ssa Maria Cristina Cassani. La mia stima per lei è dovuta oltre che alla sua profonda esperienza, alla grande umanità con la quale ha saputo incoraggiarmi. A tutti voi sono grato per l'entusiasmo per la ricerca che mi avete trasmesso.*

*Un ringraziamento va anche ai compagni della facoltà di Chimica Industriale, con cui ho condiviso sia i momenti felici, che le preoccupazioni durante questi cinque anni. In particolare Alessio, Mattia, Daniele, Matteo, Simone, Iacopo, Filippo, Corinna, Ylea, Silvia e Alessandro sono stati per me veri amici oltre che semplici compagni e il ricordo di questi magnifici anni passati assieme rimarrà scolpito nella mia memoria. Vorrei inoltre ricordare con affetto la nostra compagna Anna, tragicamente scomparsa quest'estate.*

*Non ci sono abbastanza parole per esprimere l'enorme gratitudine verso i miei genitori e tutta la mia famiglia, ma vorrei che questo mio traguardo raggiunto, per quanto possibile, fosse un premio anche per loro e per i sacrifici che hanno fatto.*