



Università degli Studi di Genova  
Scuola di Scienze MFN

Tesi di Laurea Magistrale in Scienza e Ingegneria dei  
Materiali

Trasporto e accumulo di farmaci per applicazioni  
biomedicali: messa punto di un sistema dinamico di  
accumulo di nanoparticelle magnetiche. Simulazioni *in  
vitro* di possibili sperimentazioni *in vivo*

Relatori:

Prof. Fabio Michele Canepa

Prof. Gianrico Lamura

Candidato:

Giuseppe Sormani

Correlatore:

Prof. Davide Peddis

Anno Accademico 2021-2022

<b>1</b>	
1	INTRODUZIONE.....3
1.1	Riferimenti bibliografici del capitolo 1 .....7
<b>2</b>	
2	PARTE TEORICA.....9
2.1	Cenni di Magnetismo .....9
2.1.1	Momento magnetico orbitale .....9
2.1.2	Momento magnetico di spin.....9
2.1.3	Proprietà magnetiche della materia.....10
2.1.4	Ferromagnetismo .....12
2.1.5	Nanomagnetismo .....13
2.1.6	Cenni sulla teoria del Superparamagnetismo .....14
2.1.7	Riferimenti bibliografici del sottocapitolo 2.1 .....16
2.2	Il magnetismo in nanomedicina: <i>magnetic drug delivery</i> .....17
2.2.1	Magneti utilizzati per accumulo.....18
2.2.1.1	magneti permanenti.....18
2.2.1.2	elettromagneti.....18
2.2.1.3	magneti superconduttori.....19
2.2.2	Sintesi e funzionalizzazione degli SPIONs.....20
2.2.2.1	Co-precipitazione .....21
2.2.2.2	Funzionalizzazione.....23
2.2.3	Riferimenti bibliografici del sottocapitolo 2.2 .....24
<b>3</b>	
3	MISURE SPERIMENTALI.....26
3.1	Determinazione della configurazione ottimale di magneti da utilizzare nei test .....26
3.1.1	Risultati magneti <i>over skin</i> .....28
3.1.2	Discussione .....38
3.1.3	Risultati magneti <i>under skin</i> .....38
3.1.4	Discussione .....41
3.2	Determinazione di una procedura per ricavare la concentrazione di soluzioni di SPIONs .....42
3.3	Assemblaggio del circuito di simulazione .....49
3.3.1	Taratura flussimetro .....51
3.4	Misure del profilo di concentrazione nel tempo delle nanoparticelle nel circuito .....52
3.4.1	Configurazione di magneti <i>over skin</i> .....52
3.4.2	Risultati .....53
3.4.3	Discussione .....53
3.4.4	Coppia di magneti per applicazione <i>under skin</i> .....54
3.4.5	Risultati .....54
3.4.6	Discussione .....57
3.5	Riferimenti bibliografici del capitolo 3 .....58
<b>4</b>	
4	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....59
	APPENDICE.....60
A.1	Interazioni di scambio e ferromagnetismo .....60
A.2	Domini magnetici.....62
A.3	Nanomagnetismo.....65
A.4	Riferimenti bibliografici dell'appendice .....67

## 1 INTRODUZIONE

L'attività sperimentale relativa a questa tesi è stata svolta presso la sezione di Chimica Fisica del Dipartimento di Chimica e Chimica industriale dell'Università di Genova ed è inserita nell'ottica dello sviluppo di nanosistemi per il trasporto localizzato di farmaci.

Nell'ambito di una terapia medica particolarmente invasiva, la possibilità di circoscrivere il trattamento unicamente alle zone colpite dalla malattia offre il vantaggio di ridurre l'impatto che la terapia stessa ha sui tessuti sani: infatti molto spesso i farmaci utilizzati sono caratterizzati da un'elevata tossicità anche per le cellule normali e per questo essi inducono molteplici effetti collaterali sull'intero organismo [1].

Un esempio emblematico è costituito dalle terapie antitumorali. Nel 2020 sono state stimate 19 milioni di diagnosi e 10 milioni di morti nel mondo a causa del cancro [1]. Questa patologia, che presenta dei fattori di predisposizione genetica, consiste nella proliferazione fuori controllo di cellule all'interno di un organo o di un tessuto.

Attualmente le terapie disponibili per contrastare la patologia sono molteplici, ma sono tutte piuttosto invasive, in quanto incidono negativamente sui tessuti sani.

Alcuni esempi sono [1,2]:

### **-radioterapia**

Esposizione dell'organismo (o di una parte di esso) ad elevate dosi di radiazioni X in grado di uccidere le cellule tumorali o di rallentarne la crescita. Esiste una dose limite di radiazione alla quale una determinata area del corpo può essere sottoposta, considerando un intero ciclo vitale: ciò significa che una volta raggiunta quella soglia, non è più possibile esporre la stessa zona del corpo alle radiazioni.

Gli effetti collaterali sulle cellule sane comprendono la disgregazione del DNA cellulare, lo sviluppo di radicali liberi e un conseguente possibile sviluppo di tumori secondari.

### **-chemioterapia**

Utilizzo di farmaci in grado di attaccare cellule caratterizzate da un'alta velocità di replicazione, inibendone la moltiplicazione ed uccidendole (si parla di azione citotossica). Le cellule tumorali, infatti, sono caratterizzate da un'anormale processo riproduttivo, che porta nel tempo allo sviluppo di masse cancerose molto consistenti. Questa terapia, tuttavia, ha effetto anche su cellule sane la cui riproduzione è comunque rapida, come ad esempio le cellule dei bulbi piliferi o quelle che rivestono le mucose dell'apparato digerente. Tipici effetti collaterali riscontrati sono infatti nausea, spossatezza e perdita di capelli.

### **-immunoterapia**

Induzione di un incremento dell'attività del sistema immunitario nei confronti delle cellule tumorali, sfruttando cellule immunitarie del paziente stesso che vengono prelevate, rese in grado di riconoscere ed attaccare il tumore e reinserte nell'organismo (terapia cellulare) oppure utilizzando anticorpi monoclonali specifici per un dato antigene correlato alle cellule tumorali (terapia anticorpale).

L'immunoterapia è un esempio di terapia biologica, che sfrutta cioè sostanze ricavate da organismi viventi per contrastare una patologia.

In questo caso gli effetti collaterali comprendono un'iperattività del sistema immunitario che può sfociare in un'aggressività anche nei confronti di cellule sane, con la possibilità di manifestare ad esempio febbre, vomito o risposte infiammatorie generalizzate.

Per quanto riguarda l'asportazione chirurgica della massa tumorale, nei casi in cui sia possibile effettuarla (e questo dipende da molteplici fattori quali ad esempio la sua posizione ed estensione nell'organismo), non costituisce di per sé una garanzia di guarigione, in quanto la patologia può ripresentarsi negli anni seguenti e il paziente deve essere tenuto sotto stretta sorveglianza attraverso periodici controlli.

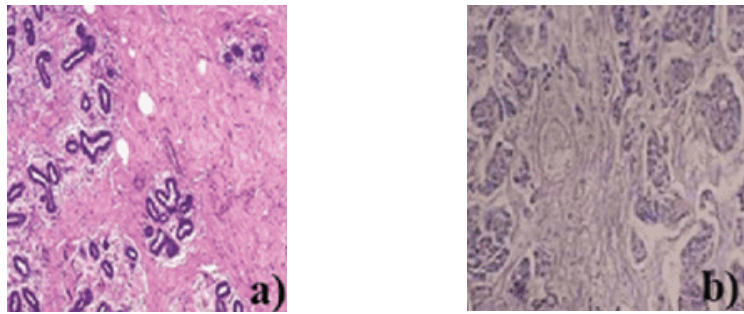


Fig. 1: Immagine istologica che mostra tessuto normale (a) e tessuto tumorale (b) prelevati da un seno umano tramite biopsia; le diverse colorazioni si ottengono utilizzando coloranti specifici che variano a seconda del pH del tessuto [3].

Alla luce di queste considerazioni, non stupisce il fatto che il *modus operandi* nella lotta al cancro negli anni si sia focalizzato sulla localizzazione sempre più spinta dei trattamenti medici, per ridurre il più possibile se non addirittura annullare effetti indesiderati su tessuti sani e, allo stesso tempo, massimizzare la resa della terapia in termini di tempo.

Questo paradigma vide i suoi albori attorno agli anni '60 [4]; Yuichi Higuchi, farmacologo, fu il primo scienziato a studiare sistemi di trasporto localizzato di farmaci utilizzando i principi chimico-fisici. In uno studio del 1961 [5] egli ricavò un'equazione, in seguito più volte rielaborata per casi specifici ed utilizzata per almeno un ventennio, analizzando il rilascio di un farmaco da parte di un unguento applicato su una superficie assorbente:

$$Q(t) = A[D(2c_0 - c_s)c_s t]^{\frac{1}{2}} \quad (1.1)$$

L'espressione, molto semplice, mostra che la quantità di farmaco rilasciata nel tempo è correlata all'area di contatto tra l'unguento e la superficie assorbente ( $A$ ), al coefficiente di diffusione del farmaco nella matrice ( $D$ ), alla concentrazione iniziale di farmaco ( $c_0$ ) e alla solubilità del farmaco nella matrice ( $c_s$ ).

Ebbe inizio da quel momento un notevole lavoro collettivo di scienziati, operanti in diverse discipline come farmacologia, medicina, ingegneria, chimica e fisica, volto allo studio dettagliato e all'applicazione di tale principio raggiungendo la maturità attorno agli anni '80, quando la punta di diamante dell'attività di ricerca e sviluppo erano dei sistemi di rilascio di farmaci transdermici a velocità controllata [4].

La vera rivoluzione per lo sviluppo di questo settore è giunta recentemente con l'avvento dei nanomateriali. Si tratta di strutture con dimensioni comprese tra 1 e 100 nm, caratterizzate da proprietà chimico-fisiche fortemente dipendenti dalle dimensioni e opportunamente modificabili [6]. Date le loro dimensioni, comprese tra 1 e 100 nm e quindi inferiori a quelle cellulari (fig.2), possono essere utilizzati come vettori per un farmaco (o per una proteina), permettendo una veicolazione più efficiente all'interno dell'organismo fino al sito d'interesse, per poi poter svolgere la loro opera di distruzione delle cellule tumorali attraverso il rilascio controllato del farmaco trasportato (*drug delivery*), attraverso un aumento di temperatura locale (*hyperthermia*) tramite l'esposizione a radiofrequenze oppure in risposta alle diverse condizioni di pH che caratterizzano la zona circoscritta dal tessuto tumorale (pH=5 contro un valore medio di 7.4 nel resto dell'organismo) [7].

In una terapia non localizzata, infatti, un farmaco viene introdotto nell'organismo sfruttando una particolare via d'ingresso, scelta a seconda della zona in cui si trova la massa tumorale: ad esempio, può essere iniettato nel flusso sanguigno, inalato, ingerito o assorbito dal derma.

In ciascuno di questi casi il farmaco, una volta all'interno del corpo, incontra degli ostacoli nel raggiungimento del sito bersaglio, come la filtrazione da parte dei reni o l'eliminazione attraverso il

sistema fagocitario mononucleare (facente parte del sistema immunitario); una volta raggiunto il tessuto di destinazione, deve essere in grado di passare attraverso la membrana cellulare e sopravvivere all'ambiente acido associato ai lisosomi, delle vescicole costituenti l'apparato digerente di una cellula.

L'utilizzo di nanomateriali all'interno di terapie localizzate consente di migliorare i vari 'colli di bottiglia' presenti: considerando, ad esempio, farmaci inseriti tramite iniezione, normalmente si sfrutta l'apparato circolatorio sanguigno come mezzo di trasporto per raggiungere il sito bersaglio, per cui è fondamentale aumentare il tempo di vita del farmaco o della proteina utilizzati per la terapia all'interno del flusso sanguigno. È stato osservato [8] che molecole dotate di un raggio idrodinamico più grande sono filtrate più lentamente dal sistema renale e riescono a 'celarsi' meglio al sistema immunitario: l'applicazione di un rivestimento superficiale in poli-etilenglicole (PEG), consente di aumentare il raggio idrodinamico fino a circa 10 nm consentendo di aumentare il tempo di sopravvivenza del farmaco nel sangue.

Inoltre, poiché il farmaco viene rilasciato unicamente in corrispondenza del sito bersaglio, se ne possono utilizzare quantità inferiori rispetto ad una terapia ordinaria, in quanto vengono evitate le varie perdite durante il tragitto per arrivare a destinazione.

In aggiunta, è possibile sfruttare i nanomateriali per ottenere un aumento locale della temperatura cellulare uccidendo le cellule tumorali (*magnetic hyperthermia*) [9]; è noto, infatti, che un aumento locale di temperatura oltre i 45°C porta alla distruzione cellulare.

Vi sono anche altri vantaggi: trasportare farmaci non idrosolubili, incapsulandoli all'interno di strutture organiche come i liposomi, il cui interno costituisce un ambiente idrofobo [10], o sviluppare una terapia in cui vi sia un rilascio combinato di due o più farmaci [11,14].

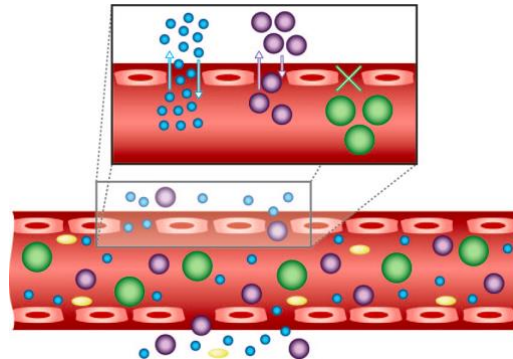


Fig. 1 – illustrazione schematica dell'importanza delle dimensioni delle particelle nel passaggio attraverso le pareti di un vaso sanguigno; le particelle di dimensioni eccessive (in verde) non sono in grado di attraversare tale barriera [11].

Le nanoparticelle magnetiche, in particolare, negli ultimi anni si sono imposte come una valida alternativa per il trasporto localizzato all'interno dell'organismo non solo di farmaci, ma anche di geni o proteine [13].

L'enorme vantaggio che offrono è dovuto al fatto che è possibile utilizzare un campo magnetico, applicato dall'esterno del corpo, per pilotare le particelle verso un bersaglio, inducendo successivamente il rilascio del farmaco tramite innalzamento locale di temperatura o utilizzo di radiofrequenze [14].

Le nanoparticelle magnetiche, sempre in ambito biomedicale, possono essere sfruttate anche nella diagnostica, come agenti di contrasto nella risonanza magnetica nucleare (NMR) [12,15], oltre alla già citata ipertermia.

Considerando l'evidente multifunzionalità di questi materiali, è stata teorizzata l'integrazione di un metodo diagnostico e terapeutico: è possibile cioè concepire un unico trattamento nel quale le nanoparticelle, una volta giunte al bersaglio, rilasciano il farmaco e contemporaneamente inducono un aumento della temperatura, con la possibilità di monitoraggio attraverso MRI (*Magnetic Resonance Imaging*).

Ci si riferisce a questo approccio con il termine "teranostica", un neologismo sincratico derivante dalle parole terapia e diagnostica.

Tra tutte le nanoparticelle magnetiche, quelle a base di ossidi di ferro sono ad oggi fra le più studiate [19]. Sono costituite da ossidi di  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  che possono essere presenti principalmente in tre forme, ovvero magnetite ( $Fe_3O_4$ ), maghemite ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) and ematite ( $\alpha-Fe_2O_3$ ) (Fig.3) e presentano le più promettenti caratteristiche magnetiche unite a una elevata biocompatibilità. Il termine con il quale comunemente questi ossidi vengono definiti in ambito biomedicale è SPIONs (SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles).

Per realizzare un nanovettore, viene applicato un rivestimento alle particelle, tipicamente di natura polimerica (e.g. PEG [16], derivati del chitosano [17]), che ha molteplici funzioni: incremento della biocompatibilità, diminuzione della tendenza delle particelle all'aggregazione e possibilità di complesse funzionalizzazioni [18, 19] utili per trasportare un determinato farmaco.

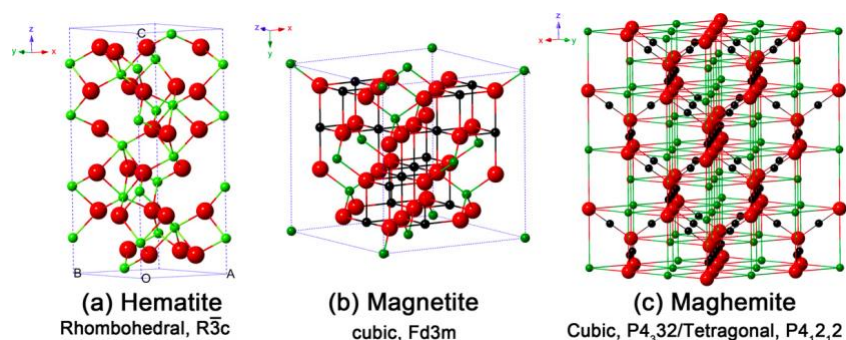


Fig.3 -Ossidi ferro alla base degli SPIONs [22].

Attualmente, gli studi su nanovettori nelle terapie localizzate sono ad un livello di sperimentazione in vivo su cavie.

Per ottenere l'approvazione per l'utilizzo di un trattamento a livello clinico, infatti, occorre valutare un ampio insieme di parametri, come la biocompatibilità e/o tossicità dei vettori, il livello di localizzazione del trattamento, l'efficienza del rilascio del farmaco (percentuale di farmaco rilasciato rispetto alla quantità totale trasportata), le reazioni del sistema immunitario e lo smaltimento post-trattamento delle particelle da parte dell'organismo.

I dati degli studi in vitro vengono inviati dal produttore ad un gruppo multidisciplinare di esperti, scelto dall'organismo incaricato della valutazione, che li analizza e verifica che i benefici derivanti dal trattamento siano ben più significativi degli eventuali rischi.

Se vengono giudicati adeguati, il produttore è autorizzato a procedere nell'effettuare studi in vivo su cavie da laboratorio, per valutare la risposta di un organismo vivente al trattamento e, in seguito ad ulteriori giudizi da parte degli organi competenti, come ad esempio l'Agenzia Europea del Farmaco oppure la *Food and Drugs Administration* in America, si vaglia la possibilità di effettuare test su esseri umani. Infine, se anche questi ultimi test forniscono risultati positivi, viene autorizzata la vendita all'azienda produttrice e la somministrazione a pazienti [20].

Lo scopo di questa attività di tesi magistrale è stato quello di realizzare un apparato in grado di simulare un semplice sistema circolatorio, attraverso il quale studiare l'effetto di un campo magnetico

localizzato sull'accumulo di nanoparticelle magnetiche a base di ossidi di ferro in una particolare zona, fornendo una base di partenza per successivi studi in vivo.

In particolare, sono stati studiati i profili temporali di accumulo delle nanoparticelle in soluzione in corrispondenza di un 'organo' simulato valutando l'effetto di una configurazione di magneti posta nelle sue vicinanze, relativamente a due valori di flusso della soluzione diversi. Sono state effettuate misure a 25 ml/min, valore scelto considerando sia l'intervallo di flussi ottenibile con il *set-up* utilizzato, sia tenendo conto di un ordine di grandezza per il flusso sanguigno all'interno dei ratti, utilizzati come cavie negli studi in vivo. In particolare, ci si è riferiti al valore medio del flusso sanguigno attraverso le vene epatiche del fegato di un ratto con massa corporea attorno ai 200 g, corrispondente a circa 20 ml/min [21]. Si è scelto poi di effettuare una serie di misure anche a 55 ml/min per ottenere un primo risultato indicativo circa l'influenza del flusso sull'effetto del campo magnetico sulle nanoparticelle.

### 1.1 Riferimenti bibliografici del capitolo 1

[1] <https://www.airc.it/cancro/affronta-la-malattia/guida-alle-terapie/chemioterapia>

[2] <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>

[3] F. Ghasemi, I. Parvin, I. Reif, S. Abachi, M. Mohebbifar, M. Razzaghi, "Laser induced breakdown spectroscopy for the diagnosis of several malignant tissue samples", *Journal of Laser Applications* 29, 042005 (2017).

[4] N. Peppas, "Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature", *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 5–9, (2013).

[5] T. Higuchi, "Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension", *Journal of Pharmaceutical Sciences* 50, 10, (1961).

[6] J.A. Hubbell, A. Chilkoti, "Nanomaterials for Drug Delivery", *Science* 337 (2012).

[7] F. Muhammad, M. Guo, W. Qi, F. Sun, A. Wang, Y. Guo, G. Zhu, "pH-Triggered Controlled Drug Release from Mesoporous Silica Nanoparticles via Intracellular Dissolution of ZnO Nanolids", *J. Am. Chem. Soc.* 133, 8778–8781 (2011).

[8] W. Gao, W. Liu, T. Christensen, M. R. Zalutsky, A. Chilkoti, "In situ growth of a PEG-like polymer from the C terminus of an intein fusion protein improves pharmacokinetics and tumor accumulation", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16432 (2010).

[9] X. Liu, Y. Zhang, Y. Wang, W. Zhu, G. Li, X. Ma, Y. Zhang, S. Chen, S. Tiwari, K. Shi, S. Zhang, H. Fan, Y. Zhao, X. Liang, "Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy", *Theranostics* 10, 3793–3815 (2020).

[10] J. Chen, W. Lu, W. Gu, S. Lu, Z. Chen, B. Cai, X. Yang, "Drug-in-cyclodextrin-in-liposomes: a promising delivery system for hydrophobic drugs", *Expert Opinion on Drug Delivery* 11:4, 565-577 (2014).

[11] O. Farokhzad, R. Langer, "Impact of Nanotechnology on Drug Delivery", *American Chemical Society* 3, 1 (2009).

[12] J. Rosen, L. Chana, D. Shieh, F. Gu, "Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8, 275–290 (2012).

- [13] M. Yu, J. Wu, J. Dhi, O. Farokhzad, “Nanotechnology for Protein Delivery: Overview and Perspectives”, *J Control Release* 240, 24–37 (2016).
- [14] S. Malekar, A. Sarode, A. Bach 2<sup>nd</sup>, A. Bose, G. Bothun, D. Worthen, “Radio Frequency-Activated Nanoliposomes for Controlled Combination Drug Delivery”, *AAPS PharmSciTech* 16, 1335-43 (2015).
- [15] S. Kenouchea, J. Larionovac, N. Bezzib, Y. Guaric, N. Bertind, M. Zancaa, L. Lartiguec, M. Cieslakf, C. Godinf, G. Morrota, C. Goze-Bac, “NMR investigation of functionalized magnetic nanoparticles Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> as T1–T2 contrast agents”, *Powder Technology* 255, 60-65 (2014).
- [16] M. Yallapu, S. Foy, T. Jain, V. Labhassetwar, “PEG-functionalized magnetic nanoparticles for drug delivery and magnetic resonance imaging applications”, *Pharm Res* 27, 2283-95 (2010)
- [17] X. Pham, T. Nguyen, T. Pham, T. Tran, T. Tran, “Synthesis and characterization of chitosan-coated magnetite nanoparticles and their application in curcumin drug delivery”, *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* 7, 045010 (2016)
- [18] M. Talelli, C. Rijcken, T. Lammers, P. Seevinck, G. Storm, C van Nostrum, W. Hennik, “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in biodegradable thermosensitive polymeric micelles: toward a targeted nanomedicine suitable for image-guided drug delivery”, *Langmuir* 25, 2060-7 (2009).
- [19] H. Mok, M. Zhang, “Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle-Based Delivery Systems for Biotherapeutics”, *Expert Opin Drug Deliv.* 10, 73–87 (2013).
- [20] <https://www.fda.gov/drugs/development-approval-process-drugs>
- [21] W. Stott, M. Dryzga, J. Ramsey, “Blood-Flow Distribution in the Mouse”, *Journal of Applied Toxicology* 3, 6 (1983)
- [22] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, W. Kim, “Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications”, *Science and Technology of Advanced Materials* 16, 2 (2015).



## 2 PARTE TEORICA

### 2.1 Cenni di Magnetismo

La grandezza fondamentale nella descrizione delle proprietà magnetiche della materia è il momento magnetico  $\mu$  (S.I.  $\text{Am}^2$ ).

Gli elettroni all'interno degli atomi sono dotati di un momento magnetico uguale a [23]:

$$\mu = -\frac{e\hbar}{2m_e} = 9.274 \times 10^{-24} \text{Am}^2 \equiv \mu_B \quad (2.1)$$

dove  $\mu_B$  prende il nome di magnetone di Bohr ed è l'unità di misura del momento magnetico elettronico.

Il momento magnetico degli elettroni è correlato al loro momento angolare totale; quest'ultimo è determinato da due fattori.

#### 2.1.1 Momento magnetico orbitale

L'elettrone è una particella in movimento rispetto al nucleo e presenta un momento angolare orbitale  $\vec{L}$  e un momento magnetico orbitale  $\vec{\mu}_L$  legati dalla relazione  $\vec{L} = -\frac{e}{2m_e}\vec{\mu}_L$ ;  $\vec{L}$  è correlato ad  $l$ , il numero quantico orbitale e  $m_l$ , il numero quantico magnetico.

Il modulo del momento magnetico orbitale è dato da:

$$|\vec{\mu}_L| = \sqrt{l(l+1)}\mu_B \quad (2.2)$$

e la proiezione di  $\vec{\mu}_L$  lungo un asse fissato ( $z$ ) corrisponde a:

$$\mu_{Lz} = -m_l\mu_B \quad (2.3)$$

#### 2.1.2 Momento magnetico di spin

Gli elettroni possiedono un momento angolare intrinseco denominato spin  $\vec{S}$  legato al momento magnetico di spin dalla relazione  $\vec{S} = -g_s\frac{e}{2m_e}\vec{\mu}_S$ , dove  $g_s$  è il fattore giromagnetico ( $=2.00229$ ).  $\vec{S}$  è correlato al numero quantico di spin  $s$  ( $=\frac{1}{2}$ ) e al numero quantico magnetico di spin  $m_s$  ( $=\pm\frac{1}{2}$ ).

Il modulo del momento magnetico di spin vale:

$$\mu_S = \sqrt{s(s+1)}g_s\mu_B \quad (2.4)$$

La componente lungo  $z$  è pari a:

$$\mu_{Sz} = -g_s m_s \mu_B \quad (2.5)$$

Il momento magnetico totale  $\mu$  è quindi associato al momento angolare totale, dato dalla somma della componente orbitale e di spin:

$$\vec{J} = \vec{L} + \vec{S} \quad (2.6)$$

L'energia globale di un elettrone in un campo magnetico  $\vec{H}$  corrisponde a:

$$E = -\mu_0 \vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad (2.7)$$

Dove  $\mu_0$  è la permeabilità magnetica del vuoto. Il più basso valore in energia è raggiunto quando  $\vec{\mu}$  e  $\vec{H}$  sono paralleli fra loro.

Siccome un solido è costituito da un elevato numero di atomi e, di conseguenza, di momenti magnetici, per poterne descrivere il comportamento magnetico occorre definire un parametro che tenga conto dell'effetto complessivo dei singoli momenti magnetici atomici: la grandezza in questione è la magnetizzazione, indicata con  $\vec{M}$  (S.I.  $\text{Am}^{-1}$ ), ed è il momento magnetico per unità di volume.

$\vec{M}$  definisce la risposta magnetica di un materiale ad un campo magnetico applicato: nel vuoto è nulla e l'induzione magnetica  $\vec{B}$  e il campo magnetico  $\vec{H}$  sono linearmente correlati tra loro attraverso  $\mu_0$ .

$$\vec{B} = \mu_0 \vec{H} \quad (2.8)$$

In un solido  $\vec{M} \neq 0$ , per cui vale la seguente relazione:

$$\vec{B} = \mu_0 (\vec{H} + \vec{M}) \quad (2.9)$$

$\vec{B}$  e  $\vec{H}$ , quindi, possono essere estremamente diversi tra loro, sia in termini di intensità che di direzione. Nei materiali cosiddetti lineari,  $\vec{M}$  e  $\vec{H}$  sono direttamente proporzionali:

$$\vec{M} = \chi \vec{H} \quad (2.10)$$

Dove  $\chi$  è una grandezza adimensionale denominata *suscettività magnetica*. La relazione si può esprimere anche come:

$$\vec{B} = \mu_0 \mu_r \vec{H} \quad (2.11)$$

con  $\mu_r$  permeabilità magnetica.

$$\mu_r = 1 + \chi \quad (2.12)$$

In base al valore di  $\chi$  si possono distinguere diversi comportamenti nella materia.

### 2.1.3 Proprietà magnetiche della materia

Per analizzare la risposta magnetica di un materiale è utile fare riferimento all'espressione dell'Hamiltoniana di un atomo sottoposto ad un campo magnetico [23]:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \mu_0 \mu_B (\vec{L} + g\vec{S}) \cdot \vec{H} + \frac{\mu_0 e^2}{8m_e} \sum_i (\vec{H} \times \vec{r}_i)^2 \quad (2.13)$$

Dove  $\hat{H}_0$  è l'Hamiltoniana del sistema in assenza di campo, il secondo termine è l'interazione dell'accoppiamento spin-orbita con il campo magnetico (paramagnetismo) e il terzo termine rappresenta l'effetto del campo magnetico  $H$  sulle orbite elettroniche (diamagnetismo).

La suscettività magnetica di massa di un materiale paramagnetico, pari al rapporto tra la suscettibilità e la densità, vale circa:

$$\chi_g^{pm} = \chi^{pm} / \rho \approx 10^{-7} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1} \quad (2.14)$$

Il secondo termine è relativo invece ad una risposta diamagnetica della materia: l'applicazione di un campo magnetico induce la formazione di momenti magnetici che si allineano opponendosi al campo stesso. In questo caso la suscettività di massa è dell'ordine di:

$$\chi_g^{dm} = \chi^{dm} / \rho \approx -10^{-8} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1} \quad (2.15)$$

La risposta paramagnetica, quando è presente, è dominante e i materiali che la manifestano sono detti paramagneti.

Nei casi in cui i momenti magnetici interagiscono fortemente tra loro, si possono osservare ordinamenti magnetici come ferromagnetismo, ferrimagnetismo e antiferromagnetismo.

All'interno di un solido cristallino, la disposizione degli atomi a formare una struttura regolare determina il modo in cui essi interagiscono: i livelli elettronici isolati tipici dei sistemi atomici diventano bande di orbitali ibridi e le interazioni tra di essi risultano fortemente dipendenti dal tipo di struttura e dalla natura chimica degli atomi coinvolti.

Per quanto riguarda ossidi, quali  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , si considera l'effetto dell'ordinamento attraverso la definizione del **campo cristallino**, ovvero un campo elettrostatico generato dagli atomi all'interno di una struttura, che determina le interazioni interatomiche.

Considerando solidi cristallini che presentano elettroni  $d$ , come gli ossidi di ferro, si osserva che le energie dei cinque orbitali  $d$  non sono equivalenti: si manifesta infatti una separazione energetica, che dipende dall'orientazione spaziale degli orbitali rispetto alla geometria della struttura.

Innanzitutto, gli orbitali  $d$  possono essere suddivisi in due gruppi:

- $t_{2g}$ : la densità elettronica è nulla lungo la direzione degli assi cartesiani. In questo gruppo sono presenti gli orbitali  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$  e  $d_{yz}$ .

- $e_g$ : gli orbitali puntano in direzione degli assi; sono compresi in questa famiglia i  $d_{z^2}$  e  $d_{x^2-y^2}$

Lo splitting energetico si manifesta tra queste due categorie di orbitali e dipende dalla loro orientazione relativa rispetto agli orbitali degli atomi circostanti; gli ossidi di metalli di transizione, ad esempio, presentano strutture caratterizzate da due tipi diversi di siti occupati dagli atomi metallici: ottaedrici e tetraedrici.

Il campo cristallino si ipotizza sia generato dagli orbitali  $p$  dell'ossigeno, quindi è l'orientazione relativa tra questi ultimi e gli orbitali  $e_g$  e  $t_{2g}$  che determina l'energia relativa tra le due famiglie di orbitali  $d$ .

Nei siti ottaedrici, gli orbitali  $p$  sono orientati lungo gli assi cartesiani, quindi vi è una forte sovrapposizione con gli orbitali  $e_g$ , determinandone un aumento energetico.

Nei siti tetraedrici avviene l'inverso, infatti la densità elettronica degli orbitali  $p$  è nulla lungo le direzioni degli assi, per cui in questo caso  $E(t_{2g}) > E(e_g)$ .

Gli ossidi di ferro, di cui sono composti gli SPIONs (**S**uper**P**aramagnetic **I**ron **O**xide **N**anoparticles), principalmente magnetite e maghemite, sono un esempio di sistemi che possiedono proprietà ferromagnetiche. Più precisamente, la magnetite è ferrimagnetica, mostra cioè un comportamento globalmente ferromagnetico ma causato dalla presenza di due sottoreticoli non equivalenti di spin orientati in direzioni opposte l'uno dall'altro; di fatto, si tratta di un caso particolare di ordinamento antiferromagnetico.

In particolare, vi sono in gioco un'interazione detta di *superscambio* e una di *doppio scambio*, quest'ultima presente generalmente in ossidi che nella loro struttura ospitano ioni con valenza mista. Entrambe sono mediate dagli atomi di ossigeno che "passano" le informazioni sulle orientazioni degli spin  $3d$  da un atomo di Fe all'altro.

La struttura della magnetite comprende siti ottaedrici, occupati da un ugual numero di ioni  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  e siti tetraedrici, contenenti unicamente ioni  $\text{Fe}^{3+}$ , in numero uguale a quello degli stessi ioni presenti nei siti ottaedrici (fig. 4).

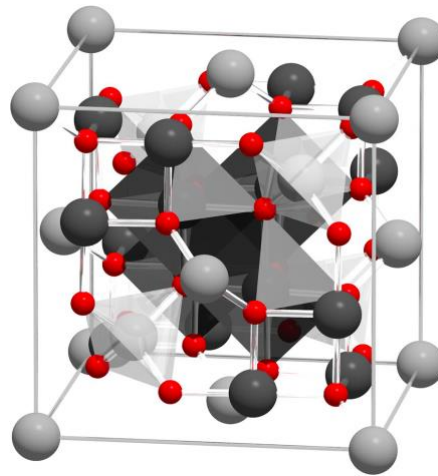


Fig. 4: Struttura della magnetite, con evidenziati i due diversi tipi di sito degli ioni Fe [24].

L'interazione di doppio scambio induce un accoppiamento ferromagnetico tra gli ioni  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  nei siti ottaedrici, mentre gli ioni  $\text{Fe}^{3+}$  che occupano i siti tetraedrici sono coinvolti in un accoppiamento antiferromagnetico (interazione di superscambio) con gli ioni  $\text{Fe}^{3+}$  nei siti ottaedrici.

Il risultato complessivo di questa combinazione di fenomeni è che, essendo gli ioni  $\text{Fe}^{3+}$  presenti in pari quantità nei due siti, la magnetizzazione risultante dalla loro interazione è nulla e l'effetto ferromagnetico globale è dovuto ai momenti magnetici degli ioni  $\text{Fe}^{2+}$ . Il valore di momento magnetico per unità di formula misurato nella magnetite, infatti, è molto vicino al valore attribuibile alla presenza di soli ioni  $\text{Fe}^{2+}$  ( $4\mu_B$ ).

#### 2.1.4 Ferromagnetismo

Gli ordinamenti magnetici a lungo raggio, come il ferromagnetismo, hanno origine dalle interazioni di scambio che, a seconda delle caratteristiche del materiale considerato, inducono un ordinamento degli spin elettronici.

Un materiale ferromagnetico è composto da domini, zone all'interno delle quali i momenti magnetici atomici sono orientati verso un'unica direzione [23]. Quando non vi è un campo esterno applicato, generalmente la magnetizzazione globale è nulla in quanto i diversi domini, separati tra loro da bordi (pareti di Bloch), sono caratterizzati da una direzione preferenziale differente da quella degli altri, in modo da minimizzare l'energia magnetostatica. In risposta ad un campo esterno, i domini si orientano progressivamente nella sua direzione e, se il campo è sufficientemente intenso, il sistema può arrivare ad un valore massimo di magnetizzazione (la magnetizzazione di saturazione  $\mathbf{M}_s$ ), corrispondente all'allineamento di tutti i domini in un'unica direzione. Quando si rimuove il campo, il materiale rimane parzialmente magnetizzato, con una magnetizzazione cosiddetta residua ( $\mathbf{M}_r$ ) e per smagnetizzare totalmente il sistema è necessario applicare un campo magnetico detto coercitivo.

Queste caratteristiche sono evidenti se si considerano delle curve di magnetizzazione in funzione del campo applicato: esse sono isteretiche (fig. 5). Quindi, partendo da un materiale inizialmente smagnetizzato, se si applica un campo tale da saturare il sistema e poi lo si rimuove, non si osserva un ritorno alla situazione iniziale. La  $\mathbf{M}_r$  mostra la parte di irreversibilità del sistema, mentre la differenza  $\mathbf{M}_s - \mathbf{M}_r$  fornisce indicazioni sulla parte reversibile del sistema.

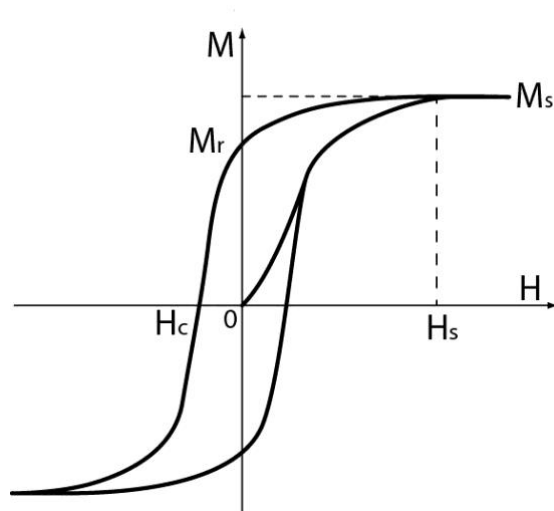


Fig 5: illustrazione schematica della curva di magnetizzazione di un materiale ferromagnetico [28].

La creazione di domini magnetici (Domini di Weiss) in un materiale magneticamente ordinato è dovuta alla minimizzazione dell'energia magnetostatica che cerca di contenere le linee di flusso magnetiche all'interno dello stesso; si rimanda all'appendice per una descrizione più dettagliata.

### 2.1.5 Nanomagnetismo

Quando si considera un nanosistema, le proprietà magnetiche possono mutare anche drasticamente poiché risultano dipendenti dalle dimensioni; al diminuire delle dimensioni fisiche, infatti, aumenta il rapporto tra superficie e volume in un materiale. Poiché il numero di coordinazione degli atomi sulla superficie è più basso e cambia la simmetria cristallina, questa caratteristica, in sistemi nanostrutturati, inizia a controllare il bilancio tra i diversi contributi energetici e quindi anche le proprietà magnetiche.

Per quanto riguarda nanoparticelle magnetiche (MNPs), al di sotto di un raggio critico  $r_c$ , che dipende dal tipo di materiale, il costo energetico per la formazione di domini magnetici diventa talmente elevato che ciascuna particella diventa un unico dominio magnetico.

Le nanoparticelle che si trovano in un regime di singolo dominio si comportano come un ferromagnete; per dimensioni ancora inferiori, in particolare minori di un secondo valore critico  $r_0$  (fig. 6), dipendente dal materiale e dalla cosiddetta temperatura di *blocking*  $T_B$  in corrispondenza della quale l'energia associata alle fluttuazioni termiche diventa confrontabile con l'energia necessaria per modificare l'orientazione degli spin all'interno del sistema. Per temperature maggiori di  $T_B$  i singoli momenti magnetici risultano in continua rotazione. La frequenza di questo processo è relativa alla differenza tra la finestra di osservazione del sistema  $\tau_{oss}$ , e il tempo di rilassamento caratteristico del sistema  $\tau$ . Se  $\tau_{oss} \ll \tau$ , il sistema si trova in uno stato ferromagnetico detto 'bloccato': è possibile quindi osservare un allineamento dei momenti magnetici, mentre se  $\tau_{oss} \gg \tau$  il sistema si trova nello stato superparamagnetico.

In quest'ultimo caso, la magnetizzazione è mediamente nulla poiché i momenti, rispetto al tempo di misura, sono in rapida rotazione e le nanoparticelle mostrano a campo nullo un comportamento analogo ad un sistema paramagnetico; la risposta ad un campo magnetico applicato, tuttavia, è molto più rapida rispetto ad un paramagnete, anzi è simile a quella di un sistema caratterizzato da proprietà ferromagnetiche.

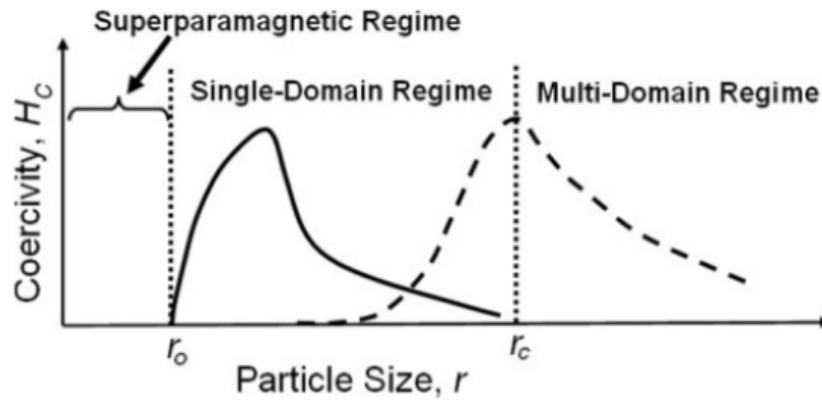


Fig.6: grafico del campo coercitivo in funzione della dimensione delle particelle, in cui sono evidenziati i diversi regimi e le relative dimensioni critiche associate [27].

Una conseguenza di queste proprietà, di fondamentale importanza per nanosistemi da adoperare in terapie mediche localizzate, è l'assenza di isteresi nel grafico della magnetizzazione in funzione del campo applicato (fig. 7), il che implica assenza completa di irreversibilità nel sistema e quindi una coercività pari a 0: l'andamento è nel complesso simile a quello di un ferromagnete, ovvero la magnetizzazione aumenta con il campo fino a saturare, tuttavia una volta che il campo viene rimosso il sistema si smagnetizza completamente.

La necessità di avere nanoparticelle superparamagnetiche, in campo biomedico, è dovuta al fatto che nanoparticelle ferromagnetiche, veicolate all'interno del sistema di circolazione del sangue, darebbero origine a interazioni dipolo-dipolo che porterebbero alla formazione di agglomerazioni, con conseguente ostruzione della vena (o arteria) e conseguente rischio di trombosi.

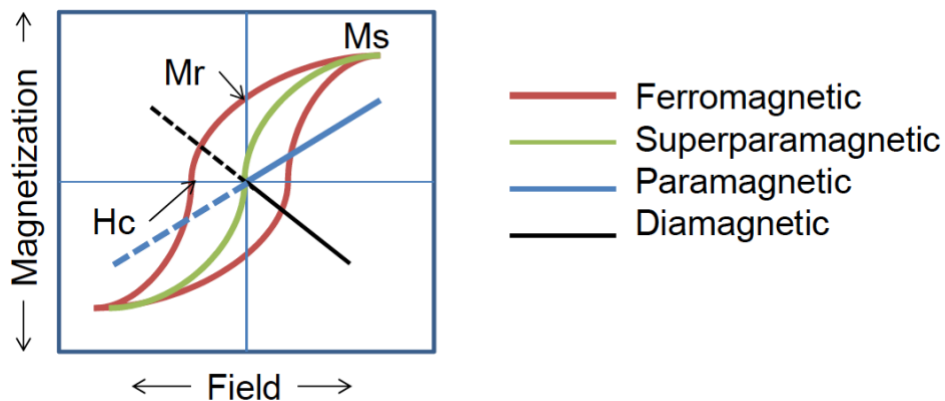


Fig.7: Curve d'isteresi relative a vari comportamenti magnetici riscontrati nelle MNPs [27].

### 2.1.6 Cenni sulla teoria del Superparamagnetismo

Questo modello teorico parte da alcune assunzioni:

1) i momenti magnetici all'interno di una singola nanoparticella ruotano coerentemente tra loro.

Questo significa che il momento magnetico globale di ciascuna nanoparticella può essere espresso come [26]:

$$\mu = N\mu_{at} \quad (2.16)$$

Dove  $N$  è il numero di atomi magnetici che compongono la particella.

2) si considera un'anisotropia uniassiale, caratterizzata dalla costante  $K$ .

L'energia di una particella con anisotropia uniassiale a singolo dominio sottoposta ad un campo magnetico  $H$  vale [26]:

$$E_B = KV \sin^2 \theta - \mu H \cos(\alpha - \theta) \quad (2.17)$$

dove  $\alpha$  e  $\theta$  sono gli angoli, rispettivamente del campo magnetico e del momento magnetico della nanoparticella, formati con l'asse di facile magnetizzazione della particella.

Il prodotto  $KV$  è l'energia che separa i due stati a minore energia,  $\theta = 0$  e  $\theta = \pi$ , quando  $H = 0$ : in altre parole, affinché il momento magnetico di una particella possa ruotare da una conformazione ad un'altra, è necessario che essa assorba un'energia pari ad almeno  $KV$  (fig. 8).

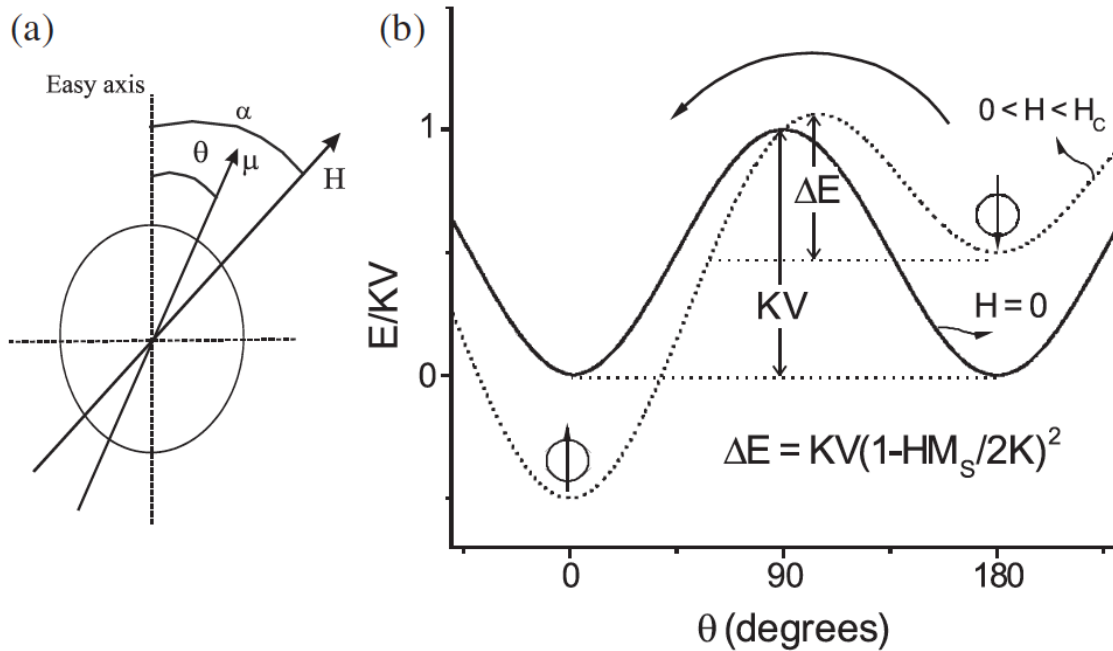


Fig. 8: (a) definizione degli angoli del momento magnetico di una nanoparticella e del campo applicato rispetto all'asse di facile magnetizzazione; (b) energia in funzione dell'angolo formato dal momento di una nanoparticella rispetto all'asse di facile magnetizzazione a campo nullo (linea continua) e non nullo (linea tratteggiata) [26].

Ci si aspetta quindi che, se l'energia termica è comparabile a  $KV$ , una particella sia in grado di assorbire l'energia sufficiente per effettuare la rotazione. In altre parole, il fenomeno di rilassamento della magnetizzazione delle particelle, caratterizzato dal tempo  $\tau$ , può essere descritto da una legge di tipo Arrhenius:

$$M(t) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.18)$$

dove  $M_0$  è la magnetizzazione iniziale.

A sua volta,  $\tau$  dipende dalla temperatura e dalla barriera energetica tra le diverse orientazioni:

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{E_B}{k_B T}\right) \quad \text{con } \tau_0 = 10^{-9}-10^{-10} \text{ s} \quad (2.19)$$

$\tau_0$  è inversamente proporzionale alla frequenza di rotazione del momento di una particella tra le due direzioni di facile magnetizzazione.

Le proprietà magnetiche di un sistema di nanoparticelle dipendono dalla lunghezza relativa tra il tempo di rilassamento  $\tau$  associato alle rotazioni e il tempo  $\tau_{\text{oss}}$  entro il quale queste proprietà vengono misurate;  $\tau_{\text{oss}}$  dipende dalla tecnica sperimentale considerata: esso è generalmente compreso tra  $10^{-8}$  s (Spettroscopia Mossbauer) e  $10^2$  s (Magnetometria SQUID).

Si distinguono due regimi diversi:

$\tau_{\text{oss}} \gg \tau$ : il sistema raggiunge l'equilibrio nella finestra di tempo considerata, e si trova nello stato denominato superparamagnetico.

$\tau_{\text{oss}} \ll \tau$ : il sistema mostra proprietà quasi statiche, simili a quelle possedute da sistemi magneticamente ordinati. Si parla in questo caso di regime ferromagnetico 'bloccato'.

Questi due stati sono separati in temperatura da  $T_B$ , temperatura di *blocking*, che a sua volta dipende dalla barriera energetica  $E_B$  e dal tempo di misura  $\tau_{\text{oss}}$ .

Considerando il volume della particella costante e ponendo  $\tau_{\text{oss}} = \tau$  in corrispondenza di  $T_B$ :

$$\ln \tau = \ln \tau_0 + \frac{KV_0}{k_B T_B} \quad (2.20)$$

Se  $\tau = 10^2$  s e  $\tau_0 = 10^{-9}$  s:

$$T_B \approx \frac{KV_0}{25k_B} = \frac{K\left(\frac{4}{3}\pi r_0^3\right)}{25k_B} \quad (2.21)$$

Queste relazioni determinano una correlazione tra le dimensioni della particella ( $V_0$ ),  $T_B$ , l'anisotropia ( $K$ ) e i tempi  $\tau_{\text{oss}}$  e  $\tau$ .

Ad esempio, è possibile concludere che all'aumentare della temperatura, il volume critico  $V_0$  che una particella deve possedere per essere superparamagnetica aumenta.

Immaginando un insieme di particelle caratterizzate da una distribuzione dimensionale statistica all'aumentare di  $T$  aumenta il numero di particelle in stato superparamagnetico.

### 2.1.7 Riferimenti bibliografici del sottocapitolo 2.1

[23] S. Blundell, "Magnetism in condensed matter", Oxford Master Series in Condensed Matter Physics (2001).

[24] R. Moreno, S. Poyser, D. Meilak, A. Meo, S. Jenkins, V. Lazarov, G. Vallejo-Fernandez, S. Majetich, R. F. L. Evans, "The role of faceting and elongation on the magnetic anisotropy of magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocrystals", Scientific Reports, 10:2722 (2020).

[25] C. Dennis, R. Borges, L. Buda, U. Ebels, J. Gregg, M. Hehn, E. Jouguelet, K. Ounadjela, I. Petej, I. Prejbeanu, M. Thornton, "The defining length scales of mesomagnetism: a review", J. Phys.: Condens. Matter 14, R1175–R1262PII (2002).

[26] M. Knobel, W. C. Nunes, L. M. Socolovsky, E. De Biasi, J. M. Vargas and J. C. Denardin; "Superparamagnetism and Other Magnetic Features in Granular Materials: A Review on Ideal and Real Systems, Journal of Nanoscience and Nanotechnology", Vol. 8, 2836–2857 (2008).



[27] A. Kolhatkar, A. C. Jamison, D. Litvinov, R. C. Willson, T. Randall Lee, “Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles”, *Int. J. Mol. Sci.* 14, 15977-16009 (2013).

[28] Y. Labaye, O. Crisan, L. Berger, J. M. Greneche, J. M. D. Coey, “Surface anisotropy in ferromagnetic nanoparticles”, *Journal of Applied Physics* 91, 8715 (2002).

## 2.2 Il magnetismo in nanomedicina: *magnetic drug delivery*

Con il termine *magnetic drug delivery* si intende una terapia medica, allo stadio di sperimentazione, con la quale è possibile veicolare un farmaco, un principio attivo o una cellula staminale verso un organo malato o malfunzionante, utilizzando la circolazione sanguigna e concentrando l’effetto del farmaco sull’organo senza effetti destabilizzanti o nocivi sul resto dell’organismo.

L’accumulo nell’organo *target* avviene utilizzando delle particelle magnetiche, di dimensioni sufficientemente piccole (qualche nanometro) e opportunamente funzionalizzate per poter trasportare il farmaco, e un campo magnetico esterno che raccoglie le particelle evitando la dispersione nell’intero organismo.

Il vantaggio nell’utilizzare gli SPIONs in una terapia medica localizzata, come particelle magnetiche da veicolare, è relativo alla possibilità di concentrarli in una determinata zona del corpo, in seguito alla loro introduzione nel sistema vascolare, attraverso l’applicazione di un campo magnetico statico tramite, ad esempio, l’utilizzo di magneti permanenti.

Dal momento che le nanoparticelle in circolo sono trasportate dal flusso sanguigno, è necessario valutare la forza magnetica che deve essere applicata tramite un magnete per fermarle in un determinato punto/organo.

La forza magnetica che agisce per unità di volume su un insieme di nanoparticelle sottoposto ad un campo magnetico è pari a:

$$F_M = C \frac{4\pi a^3}{3} \frac{\mu_0 \chi}{(1+\frac{\chi}{3})} \left[ \frac{d\vec{H}}{d\vec{x}} \right]_{T=const} \vec{H} \quad (2.22)$$

dove C indica la concentrazione, espressa come numero di particelle per unità di volume.

La forza dipende quindi dall’intensità del campo magnetico applicato  $\mathbf{H}$ , dal gradiente del campo  $\left[ \frac{d\vec{H}}{d\vec{x}} \right]_T$ , dal volume delle particelle  $\left( \frac{4\pi a^3}{3} \right)$  e dalla tipologia della particella attraverso la suscettività  $\chi$ .

Per poter valutare la forza magnetica necessaria per concentrare le nanoparticelle in un punto occorre considerare vari fattori: la velocità di flusso del sangue, il profilo del flusso nell’intera sezione del vaso sanguigno (vena, capillare), la diffusione delle particelle, che avviene per moto Browniano ( $\mathbf{D}_B \approx 6 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ ) o a causa delle collisioni con le cellule del sangue ( $\mathbf{D}_S \approx 10^{-11} - 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ).

La concentrazione nel tempo delle nanoparticelle in un dato punto si può esprimere come [40]:

$$\frac{dC(x,y,t)}{dt} = -\vec{\nabla} \cdot \left[ -D_{tot} \vec{\nabla} \cdot C + C \vec{V}_B(y) + C k \vec{\nabla} \cdot (|\vec{H}(x,y)|^2) \right] \quad (2.23)$$

Il primo termine è relativo alla diffusione totale, il secondo alla convezione del sangue ed il terzo al campo magnetico.

Vi sono sostanzialmente tre tipologie di magneti che vengono utilizzate per produrre il campo magnetico nell’ambito di terapie mediche localizzate: elettromagneti, magneti superconduttori e magneti permanenti (singoli o in varie configurazioni) e la scelta migliore dipende dai costi complessivi, dalle dimensioni e dai profili ottenibili per il campo magnetico ed il suo gradiente.

## 2.2.1 Magneti utilizzati per accumulo

### 2.2.1.1 magneti permanenti

Si tratta in generale di composti/leghe ferromagnetiche magnetizzate costituiti, ad esempio, da neodimio, ferro e boro ( $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ ), ricoperto da uno strato di nichel o zinco per impedirne l'ossidazione.

Esistono diversi "gradi" della lega, il cui numero identificativo definisce l'intensità del campo magnetico prodotto. Il campo coercitivo è sempre molto alto (dell'ordine di  $10^6$  A/m) al fine di impedire una smagnetizzazione del magnete.

Il vantaggio nell'usare magneti permanenti risiede nelle loro dimensioni ridotte (anche pochi mm), che li rendono molto pratici da usare soprattutto per misure *in vivo* su cavie (fig. 9): il magnete viene posto in corrispondenza del sito di rilascio e le particelle, una volta in circolo nell'organismo si accumulano in corrispondenza alla forza magnetica massima generata al campo magnetico prodotto dal magnete. Essendo magneti permanenti, non c'è bisogno di utilizzare corrente elettrica per generare il campo magnetico, per cui il costo è ulteriormente ridotto. È inoltre possibile costruire con facilità configurazioni di più magneti in modo da incrementare il campo magnetico e il gradiente del campo [30].

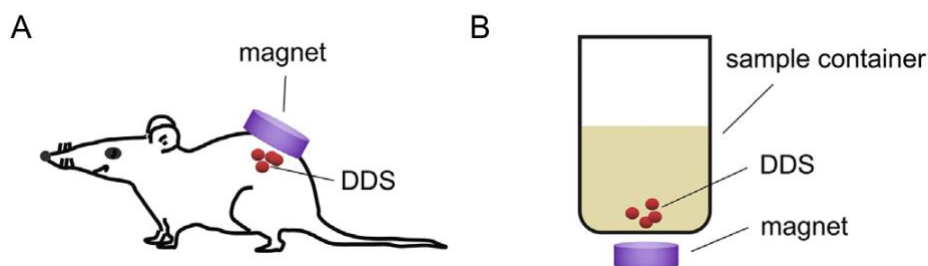


Fig 9.: schema esemplificativo dell'uso di un magnete permanente in esperimenti di cattura *in vivo* (A) e *in vitro* (B) per lo studio di un DDS (drug delivery system) [30].

### 2.2.1.2 elettromagneti

Il campo magnetico in questo caso si ottiene facendo scorrere una corrente elettrica attraverso un filo metallico avvolto a bobina attorno ad un nucleo costituito da un materiale ferromagnetico "dolce", caratterizzato cioè da una bassa coercitività, in modo che si arrivi a saturazione dei domini con intensità di corrente non eccessive e che una volta interrotto il passaggio di corrente il materiale si smagnetizzi [30].

Le dimensioni di questi magneti possono variare, ma sono più ingombranti dei magneti permanenti o delle configurazioni di magneti permanenti per sperimentazioni *in vivo*; inoltre, vi è un limite al campo magnetico ottenibile e il costo complessivo è più elevato in quanto include anche il costo dell'energia elettrica necessaria per generare il campo magnetico e, talvolta, anche del sistema di raffreddamento del magnete stesso.

Tuttavia, se invece di fornire una corrente continua si fa passare nella bobina una corrente oscillante, è possibile produrre campi magnetici alternati: questo può essere un vantaggio in quanto essi permettono il rilascio di un farmaco dagli SPIONs oppure il riscaldamento degli stessi SPIONs generando il rilascio di potenza termica localizzata (ipertermia). In letteratura vi sono esempi di tali elettromagneti, sia usati singolarmente che in combinazione (fig. 10) [41];

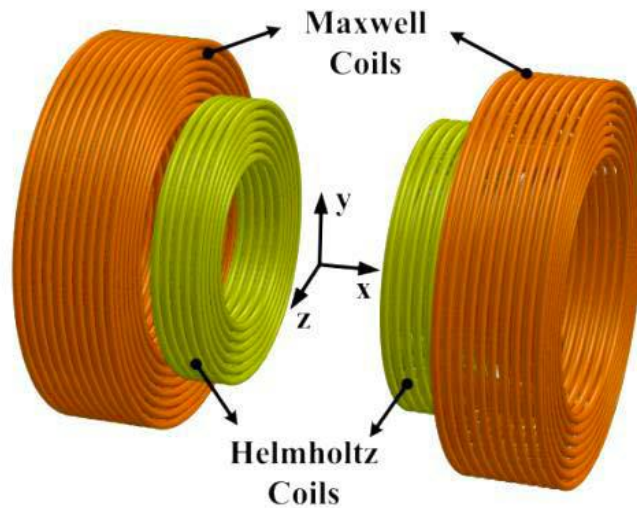


Fig. 10: modello di un sistema di bobine di Helmholtz e di Maxwell utilizzato in un esperimento di magnetic drug delivery [41].

Vi sono principalmente due tipi di elettromagneti, basati su bobine di Helmholtz e di Maxwell; in entrambi i casi vi è una coppia di avvolgimenti di fili conduttori che sono posti faccia a faccia. Negli Helmholtz, la distanza tra i due avvolgimenti è pari al raggio dell'avvolgimento stesso e la corrente scorre nello stesso verso, mentre negli elettromagneti di Maxwell la distanza tra i due avvolgimenti è pari al triplo del raggio degli avvolgimenti e la corrente scorre in direzioni opposte. Gli elettromagneti di Helmholtz sono in grado di produrre un campo magnetico spazialmente omogeneo, mentre utilizzando gli altri si possono ottenere elevati gradienti di campo; utilizzando diverse combinazioni si possono ottenere profili di campo magnetico molto vari.

### 2.2.1.3) magneti superconduttori

Si tratta di un caso particolare di elettromagneti, prodotti utilizzando materiali superconduttori. Al di sotto di una temperatura critica  $T_c$ , un superconduttore è in grado di condurre una corrente elettrica senza dissipare energia: è quindi possibile raggiungere campi magnetici più intensi rispetto ad un normale elettromagnete. Si tratta però di magneti più ingombranti, per via della necessità di mantenerli a temperature molto basse (elio liquido) tramite un sistema di refrigerazione (fig. 11) che comporta anche un aumento dei costi complessivi [31].

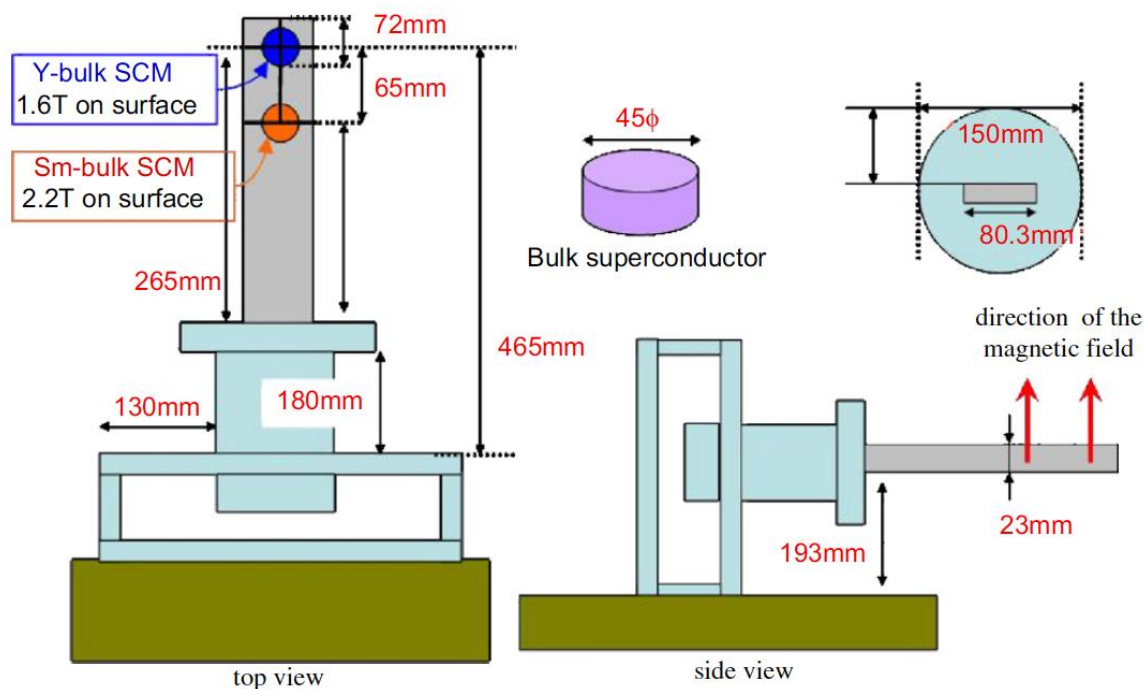


Fig. 11: sistema di due magneti superconduttori utilizzato in un esperimento di cattura di nanoparticelle [31].

### 2.2.2 Sintesi e funzionalizzazione degli SPIONs

Vi sono tre principali famiglie di processi utilizzati per la sintesi delle nanoparticelle (fig. 12) [34]: chimici, fisici e biologici.

La scelta di un particolare metodo di sintesi si basa su molteplici considerazioni, come il costo globale e le caratteristiche chimico-fisiche delle particelle che si ottengono (forma, dimensioni e loro distribuzione statistica, tendenza all'aggregazione), valutate nell'ottica dell'applicazione per la quale sono destinate.

Considerando gli SPIONs per applicazioni di *drug delivery*, sono fondamentali, come già accennato, le proprietà superparamagnetiche, che assicurano una riduzione della tendenza all'aggregazione e una rapida risposta magnetica, che le rende facilmente controllabili tramite un campo magnetico. Poiché le proprietà magnetiche dipendono anche dalla forma e dalle dimensioni delle nanoparticelle, questi sono dei fattori determinanti per discriminare tra i vari metodi di sintesi disponibili. È necessario che le dimensioni siano al di sotto del valore critico  $r_0$ , in modo che mostrino comportamento superparamagnetico e che la distribuzione delle dimensioni non sia eccessivamente larga, in modo da evitare una coda della distribuzione che comprenda valori per i quali  $r > r_0$  e quindi la presenza di una percentuale di particelle che non possiedono le proprietà volute.

Inoltre, gli SPIONs devono essere disperdibili in un solvente acquoso e biocompatibili.

Le sintesi chimiche in assoluto sono le più utilizzate e tra queste spiccano la co-precipitazione, la sintesi in microemulsione e quella idrotermale.

Le nanoparticelle utilizzate nel presente lavoro di tesi sono state ottenute all'interno del gruppo mediante la tecnica di coprecipitazione: pertanto solo tale tecnica sarà qui di seguito brevemente descritta.

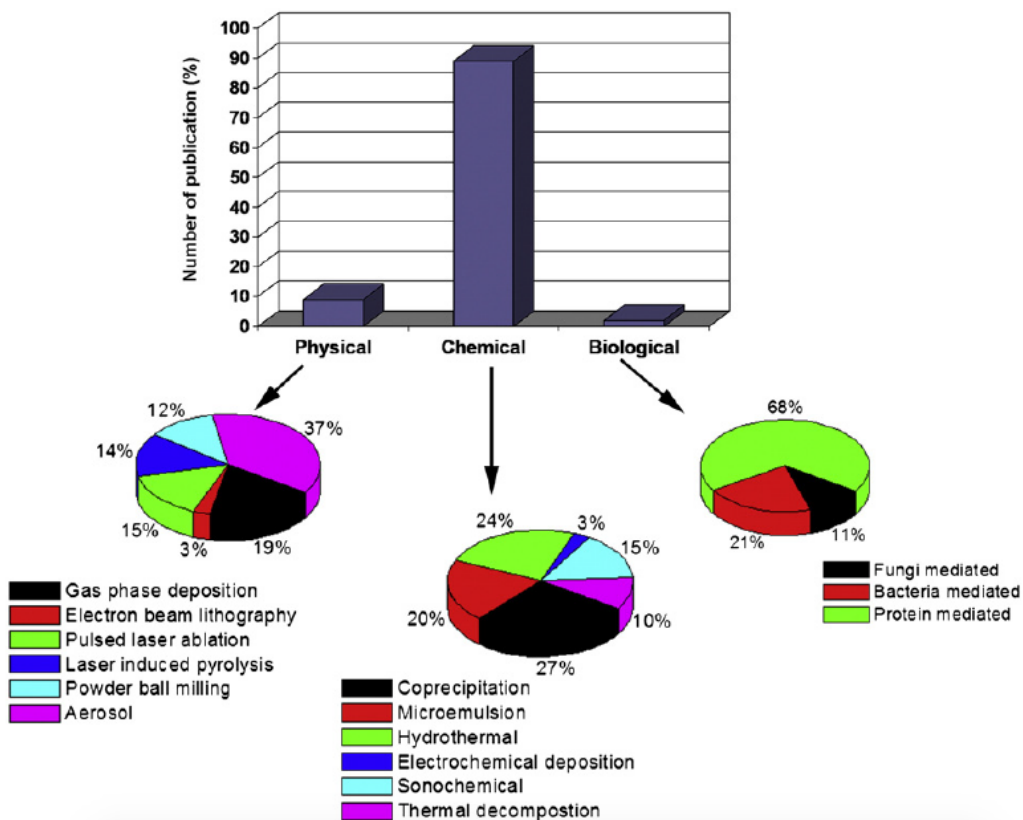
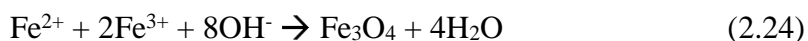


Fig.12: Metodi di sintesi delle SPIONs [34].

### 2.2.2.1 Co-precipitazione

La co-precipitazione consiste nell'idrolisi di una miscela di sali (spesso cloruri) contenenti ioni  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , in rapporto 2:1 [35]: essi vengono portati in soluzione acquosa e, in seguito a mescolamento di circa 30 minuti, viene aggiunta una soluzione basica, tipicamente idrossido di ammonio o idrossido di sodio.

La reazione globale può essere scritta nel seguente modo:



Tramite riscaldamento a temperature di circa  $80^\circ C$  si ottiene un precipitato, che viene poi lavato con acetone e acqua deionizzata diverse volte ed infine asciugato sottovuoto per 12h a  $100^\circ C$  (fig. 13); l'intero processo viene spesso condotto in atmosfera inerte ( $N_2$  o  $Ar$ ) per evitare un'eccessiva ossidazione di  $Fe^{2+}$  in  $Fe^{3+}$ .

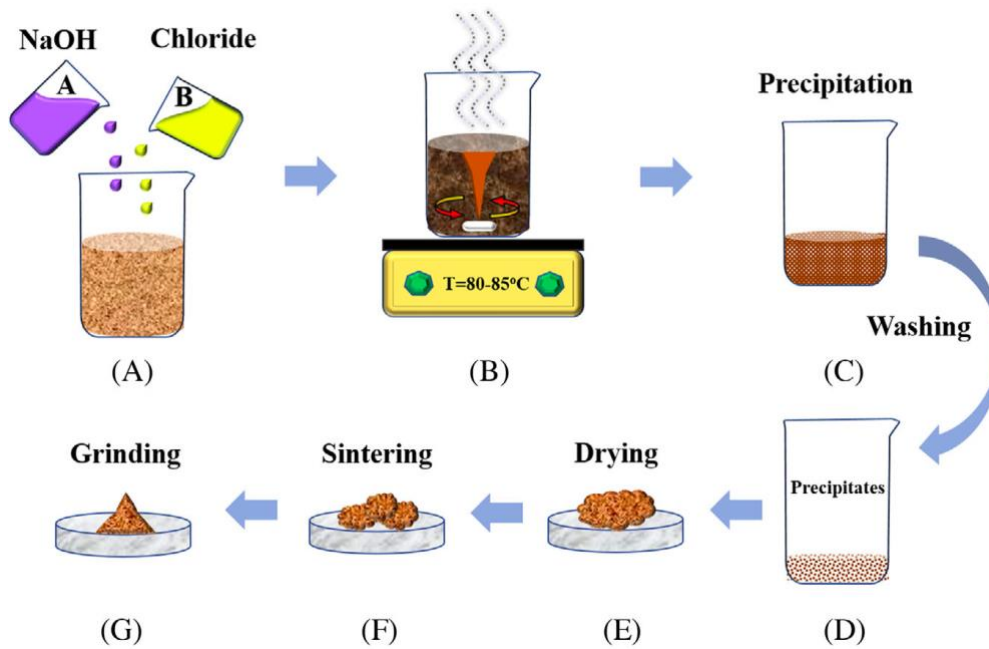


Fig. 13: Schema esemplificativo della sintesi per co-precipitazione [35]

I principali parametri che influiscono sulle dimensioni finali delle particelle e, di riflesso, sulle proprietà magnetiche, sono [36]:

**- Concentrazione relativa  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ :**

All'aumentare di questo rapporto, la crescita di cristalli già nucleati viene favorita, permettendo la formazione di particelle con dimensioni maggiori; lo stesso effetto si osserva se ad aumentare è la concentrazione globale di ferro.

**- Temperatura**

L'influenza di questo parametro sul processo di formazione dei germi e di crescita dei nanocristalli è molto complesso: da un lato, all'aumentare della temperatura ci si aspetta un incremento delle dimensioni delle particelle, in quanto il *processo di maturazione di Ostwald* (1896), ovvero la crescita di particelle di grandi dimensioni a scapito di quelle più piccole, è dipendente da T; dall'altro, una temperatura maggiore induce una più elevata velocità di nucleazione e quindi la nascita di germi più numerosi che si accrescono in misura minore.

**- Velocità di mescolamento**

Un aumento della velocità di mescolamento si traduce in una maggiore dissipazione di energia da parte del sistema, in quanto induce un meccanismo di nucleazione a spese della normale crescita, portando quindi alla generazione di cristalli con dimensioni minori.

I vantaggi più significativi nell'utilizzare la sintesi per co-precipitazione sono il basso costo del processo e la non pericolosità dei reagenti, tuttavia si ottengono particelle con un'ampia polidispersità e con una tendenza all'agglomerazione.

Il passaggio successivo (non presente nelle particelle qui adoperate) è la funzionalizzazione, *i.e.* la ricopertura con rivestimento biocompatibile (organico o polimerico) legato possibilmente in modo covalente alla nanoparticella, che abbia dei gruppi funzionali adatti a legarsi al farmaco in modo da poterlo veicolare e trasportare all'organo di interesse.

### 2.2.2.2 Funzionalizzazione

Le nanoparticelle magnetiche tendono, nel lungo periodo, ad aggregarsi per formare particelle più grandi, riducendo in questo modo l'energia superficiale, vanno incontro ad ossidazione a contatto con l'aria, con conseguente perdita progressiva delle proprietà magnetiche. Nel caso di applicazioni per *drug delivery*, si aggiunge il fatto che esse devono trasportare un farmaco/proteina e rilasciarlo solo una volta giunte a destinazione, senza essere individuate e neutralizzate dal sistema immunitario mentre sono in circolo. Per queste ragioni, è necessario funzionalizzare la superficie delle nanoparticelle: è possibile effettuare questa operazione incorporandola nel processo di sintesi (in situ) oppure successivamente (post-sintesi); sono molto varie le strutture che si possono ottenere in seguito a funzionalizzazione (fig. 14) [36]. Per quanto riguarda gli SPIONs spesso si utilizzano *coating* organici (molecole, polimeri) o inorganici (silice), a seconda della sostanza da trasportare.

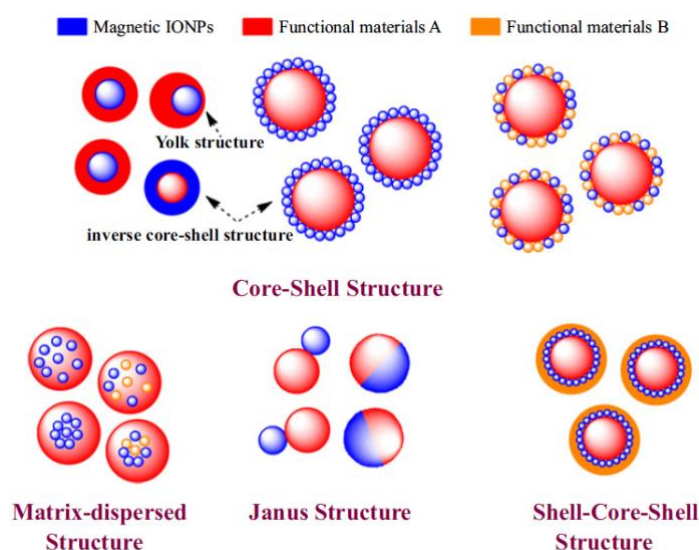


Fig.14: Schema che mostra le diverse strutture ottenibili tramite funzionalizzazione degli SPIONs [37]

Ad esempio, per trasportare cisplatino, un chemioterapico a base di platino, è stato studiato un sistema in cui le nanoparticelle magnetiche a base di maghemite sono state funzionalizzate superficialmente con oro, al quale è stato poi aggiunto un legante costituito da PEG tiolato, in grado di coordinare il farmaco (fig. 15); questo vettore ha dimostrato un notevole incremento della citotossicità nei confronti di cellule cancerose [38]. Per quanto riguarda il rilascio del farmaco, esso può avvenire in funzione di uno stimolo impartito dall'esterno oppure automaticamente, in risposta alle condizioni fisiologiche differenti che caratterizzano l'ambiente tumorale (tipico esempio è il pH, che è più basso rispetto alle altre zone del corpo [39]). Se si utilizzano nanoparticelle magnetiche, la scelta più vantaggiosa è avvalersi di un campo magnetico alternato per indurre il rilascio del farmaco: l'effetto di tale campo è un aumento di temperatura locale, che può essere sfruttato per condurre in contemporanea un trattamento di ipertermia [40].

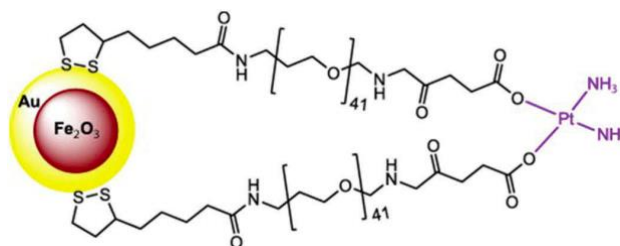


Fig. 15: Nanoparticella a base di maghemite funzionalizzata per trasportare cisplatino [38]

### 2.2.3 Riferimenti bibliografici del sottocapitolo 2.2

- [27] A. Kolhatkar, A. C. Jamison, D. Litvinov, R. C. Willson, T. Randall Lee, “Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles”, *Int. J. Mol. Sci.* 14, 15977-16009 (2013).
- [28] Y. Labaye, O. Crisan, L. Berger, J. M. Greneche, J. M. D. Coey, “Surface anisotropy in ferromagnetic nanoparticles”, *Journal of Applied Physics* 91, 8715 (2002).
- [29] A. Arora, “Optical and electric field control of Magnetism”, Dr. rer. nat. thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Institut für Physik und Astronomie der Universität Potsdam und Helmholtz Zentrum Berlin, Prof. Dr. Oliver Rader (2018).
- [30] Y. Liu, D. Chen, P. Shang, D. Yin, “A review of magnet systems for targeted drug delivery”, *Journal of Controlled Release* 302, 90–104 (2019).
- [31] S. Takeda, F. Mishima, S. Fujimoto, Y. Izumi, S. Nishijima, “Development of magnetically targeted drug delivery system using superconducting magnet”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311, 367–371 (2007).
- [32] S. Nishijima \*, F. Mishima, T. Terada, S. Takeda, “A study on magnetically targeted drug delivery system using superconducting magnet”, *Physica C* 463–465, 1311–1314 (2007).
- [33] M. Babincová, P. Babinec, “Magnetic drug delivery and targeting: Principles and applications”, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 153, 243–250 (2009).
- [34] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen, “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy”, *Advanced Drug Delivery Reviews* 63, 24–46 (2011).
- [35] S. Schwaminger, C. Syhr, S. Berensmeier, “Controlled Synthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Magnetite or Maghemite?”, *Crystals*, 10, 214 (2020).
- [36] D. Forge, A. Roch, S. Laurent, H. Tellez, Y. Gossuin, F. Renaux, L. Elst, R. Muller, “Optimization of the Synthesis of Superparamagnetic Contrast Agents by the Design of Experiments Method”, *J. Phys. Chem. C*, 112, 19178–19185 (2008).
- [37] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, W. Kim, “Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications”, *Science and Technology of Advanced Materials* 16, 2 (2015).
- [38] T. Vangijzegem, D. Stanicki, S. Laurent, “Magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery: applications and characteristics”, *Expert Opinion on Drug Delivery* 16, 69–78 (2019).
- [39] A. Pershina, O. Brikunova, A. Demin, M. Abakumov, A. Vaneev, V. Naumenko, A. Erofeev, P. Gorelkin, T. Nizamov, A. Muslimov, A. Timin, D. Malkeyeva, E. Kiseleva, S. Vtorushin, I. Larionova, E. Gereng, A. Minin, A. Murzakaev, V. Krasnov, A. Majouga, L. Ogorodova, “Variation in tumor pH affects pH-triggered delivery of peptide-modified magnetic nanoparticles”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 32, 102317 (2021).



[40] A. Nacev, C.Beni, O.Bruno, B.Shapiro, “The behaviors of ferromagnetic nanoparticles in and around blood vessels under applied magnetic fields”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 323, 51-668 (2011).

[41] M. Tehrani, M. Kim, and J. Yoon, “A Novel Electromagnetic Actuation System for Magnetic Nanoparticle Guidance in Blood Vessels”, *IEEE Transactions on Magnetics* 50, 7 (2014).

### 3 MISURE SPERIMENTALI

Il fulcro dell'attività sperimentale è consistito nella messa a punto di un apparato di simulazione di un sistema circolatorio, in modo da poter studiare l'accumulo di nanoparticelle superparamagnetiche in un punto specifico, sotto l'influenza di un campo magnetico generato da una configurazione di magneti permanenti; lo sviluppo di tale apparato serve da punto di partenza per la costruzione di un solido sistema di analisi *in vitro* che faccia da supporto ai test *in vivo* condotti per valutare l'efficacia di nanomateriali in applicazioni biomedicali, come ad esempio *drug delivery* e *ipertermia magnetica*. L'intero procedimento di misura è suddivisibile in quattro stadi:

- 1) Determinazione della configurazione ottimale di magneti da utilizzare nei test
- 2) Determinazione di una procedura per ricavare la concentrazione di soluzioni di SPIONs
- 3) Assemblaggio del circuito di simulazione
- 4) Misure del profilo di concentrazione nel tempo delle nanoparticelle nel circuito.

#### Valutazione delle incertezze

Le incertezze sui singoli dati sperimentali sono state attribuite all'accuratezza degli strumenti utilizzati e saranno specificate di volta in volta, mentre la propagazione delle incertezze, in seguito a calcoli, è stata valutata attraverso le seguenti formule, valide per errori indipendenti e casuali.

Date  $q \pm \delta q$  e  $u \pm \delta u$  grandezze con i relativi errori [41]:

$$z = q + (-)u \rightarrow \delta z = \sqrt{(\delta q)^2 + (\delta u)^2} \quad (3.1)$$

$$z = q \times (\div) u \rightarrow \frac{\delta z}{z} = \sqrt{\left(\frac{\delta q}{q}\right)^2 + \left(\frac{\delta u}{u}\right)^2} \quad (3.2)$$

**Nota:** le figure che mostrano i risultati di misure o calcoli seguono una numerazione differente, in particolare la lettera *S* segue il numero della figura (es. *fig. 1S*).

#### 3.1 Determinazione della configurazione ottimale di magneti da utilizzare nei test

Nel capitolo 3, è stato dimostrato che la forza magnetica esercitata sugli SPIONs da un magnete (o una configurazione di più magneti) dipende anche dal prodotto tra il campo magnetico ed il suo gradiente e che quindi è necessario massimizzare questo termine per ottenere un maggior controllo sulle nanoparticelle. Per questo motivo, per prima cosa è stato necessario determinare le configurazioni migliori da utilizzare in un secondo momento per le misure di accumulo sul circuito. Sono stati considerati due sistemi di magneti, che vengono utilizzati in modi diversi negli esperimenti *in vivo*:

- configurazione di quattro magneti da applicare *over skin*
- configurazione di due magneti *under skin*

La prima configurazione viene posizionata all'esterno dell'organismo ed è caratterizzata per questo dall'essere poco invasiva, per cui un test *in vivo* che sfrutta tale soluzione può avere una durata temporale estesa; la seconda configurazione, invece, viene impiantata sottopelle e quindi necessita di una piccola operazione chirurgica per essere introdotta e, a causa di un rischio di infezione, può rimanere in loco per un periodo di tempo limitato.

Sono state studiate per prime le configurazioni *over skin*: sono state effettuate delle misure di campo magnetico su tre configurazioni di quattro magneti, denominate NNNN, SNNN e SNNS, dove N ed S indicano rispettivamente Nord e Sud, i.e. le due possibili orientazioni della magnetizzazione assiale dei magneti permanenti; inizialmente sono stati analizzati dei magneti cubici (4 mm × 4 mm × 4mm) e successivamente dei magneti a sezione esagonale (4 mm di distanza tra gli spigoli opposti più

vicini); i singoli magneti sono stati inseriti in un supporto in bakelite di forma quadrata, di dimensioni 20 mm × 20 mm e dello stesso spessore dei magneti.

Le misure sono state eseguite con un Gaussmetro (LakeShore 475 DSP), al quale è collegata una sonda in grado di misurare la componente assiale ( $B_z$ ) del flusso di campo magnetico; prima di effettuare una serie di misure, la sonda, collegata allo strumento, viene inserita all'interno della camera di "flusso magnetico zero" e calibrata (fig. 16). La configurazione di magneti è stata posta su un banco di lavoro la cui posizione è regolabile nelle tre direzioni rispetto alla sonda; quest'ultima è mantenuta fissa da un supporto e posta perpendicolarmente rispetto alla superficie dei magneti (piano  $xy$ ). Utilizzando questo *setup*, sono state eseguite manualmente delle scansioni spaziali, effettuando una lettura con il Gaussmetro ogni 2 mm in direzione  $x$  per l'intera lunghezza del supporto e ripetendo lo stesso procedimento dopo essere avanzati di 2 mm in direzione  $y$  (fig. 17); le scansioni sono state effettuate a due diverse quote ( $z$ ) rispetto alla superficie dei magneti, ovvero 0 mm e 4 mm.



Fig. 16: Gaussmetro e sonda utilizzati per le misure; la sonda è in fase di calibrazione, all'interno dell'apposita camera.

Tra il supporto e la superficie del banco di lavoro è stato posto un foglio di carta millimetrata, rispetto al quale è stata allineata la configurazione di magneti, in modo da poterne controllare con precisione millimetrica gli spostamenti durante le scansioni.

Utilizzando il software Matlab<sup>®</sup> sono stati calcolati, a partire dai dati ottenuti col Gaussmetro, il gradiente del flusso magnetico e il prodotto tra il flusso ed il gradiente tramite le seguenti formule:

$$\vec{\nabla}(B_z) = \left( \frac{\Delta B_z(x)}{\Delta x}, \frac{\Delta B_z(y)}{\Delta y} \right); \quad (3.3)$$

$$|\vec{\nabla}(B_z)| = \sqrt{\left( \frac{\Delta B_z(x)}{\Delta x} \right)^2 + \left( \frac{\Delta B_z(y)}{\Delta y} \right)^2}; \quad (3.4)$$

$$B_z \cdot |\vec{\nabla}(B_z)| = B_z \cdot \sqrt{\left( \frac{\Delta B_z(x)}{\Delta x} \right)^2 + \left( \frac{\Delta B_z(y)}{\Delta y} \right)^2} \quad (3.5)$$

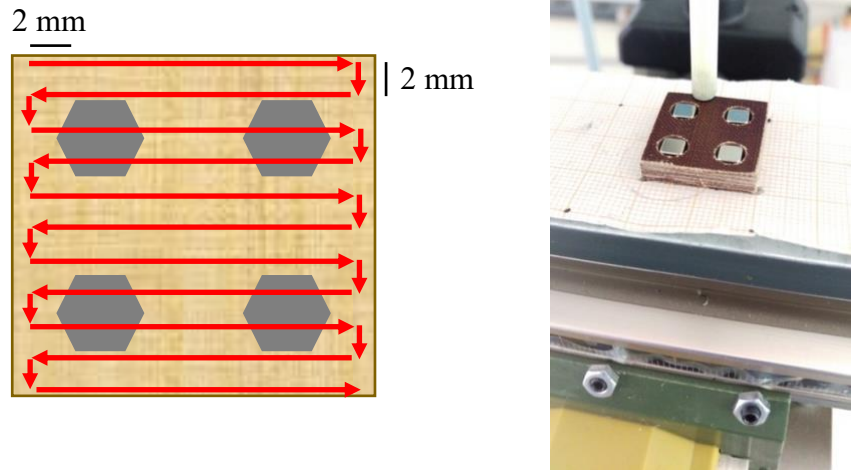


Fig. 17: schema esemplificativo di una scansione eseguita su una configurazione di magneti (sinistra); immagine di una scansione in corso (destra).

Successivamente, sono state eseguite le misure sulle configurazioni di due magneti per applicazione *under skin*; la procedura è concettualmente simile a quella appena mostrata, tuttavia vi sono alcune differenze:

- le scansioni sono state eseguite automaticamente utilizzando il braccio mobile di una stampante 3D per spostare la sonda del Gaussmetro;
- l'area totale di scansione è 30 mm × 30 mm;
- il passo di scansione utilizzato in entrambe le direzioni del piano  $xy$  è pari a 1 mm.

### 3.1.1 Risultati magneti *over skin*

Di seguito sono riportati i grafici di  $B_z$ ,  $|\vec{V}(B_z)|$  e  $B_z \cdot |\vec{V}(B_z)|$  per ciascuna configurazione di quattro magneti; i risultati per i magneti cubici si trovano a sinistra, sulla destra invece vi sono quelli per i magneti esagonali.

#### 1) Configurazione NNNN

$z = 0$  mm

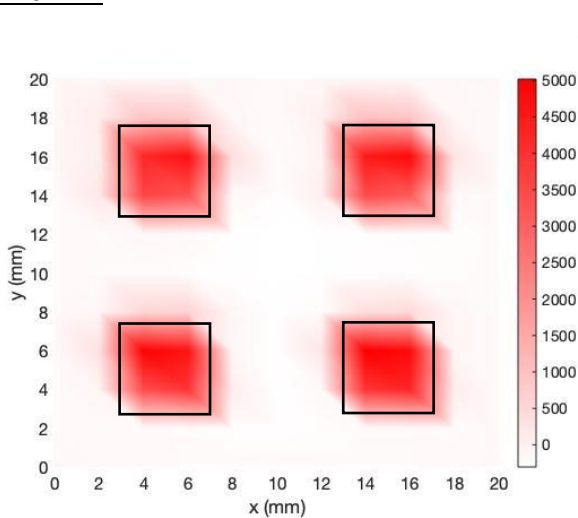


Fig. 1S

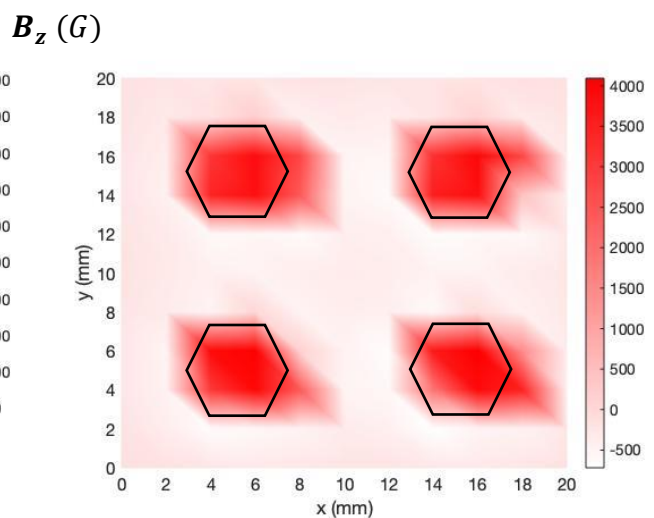


Fig. 2S

$$\sqrt{\left(\frac{\Delta B_z(x)}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B_z(y)}{\Delta y}\right)^2} \left(\frac{G}{mm}\right)$$

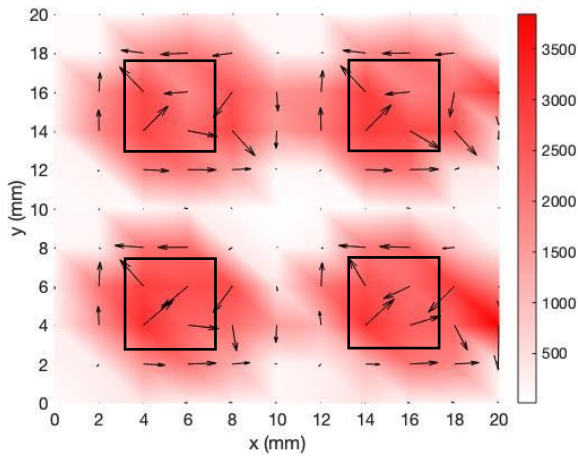


Fig. 3S

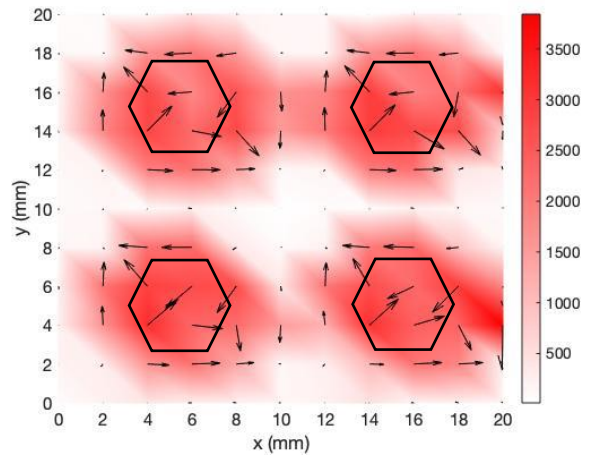


Fig. 4S

$$B_z \cdot \text{grad}(B_z) \left(\frac{G^2}{mm}\right)$$

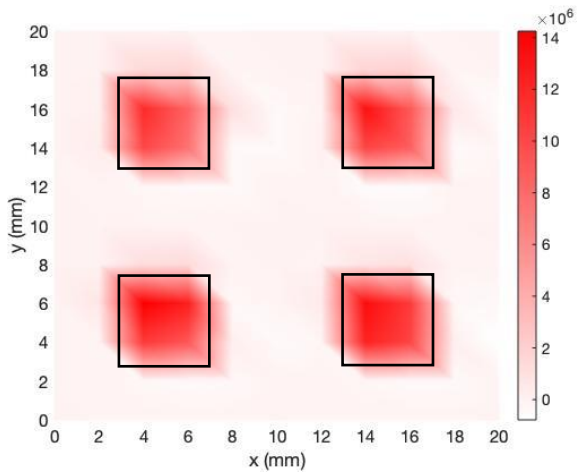


Fig. 5S

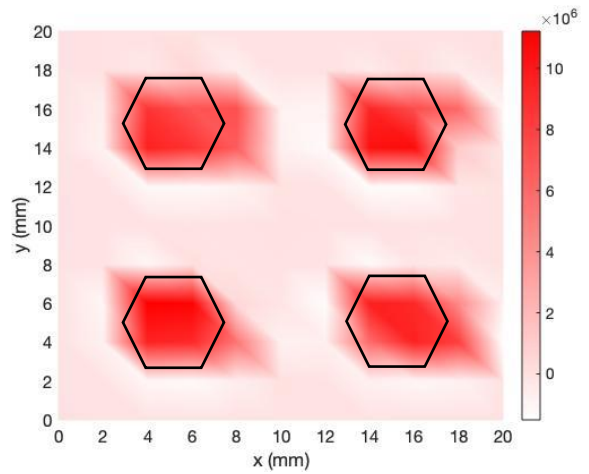


Fig. 6S

$z = 4\text{mm}$

$B_z$  (G)

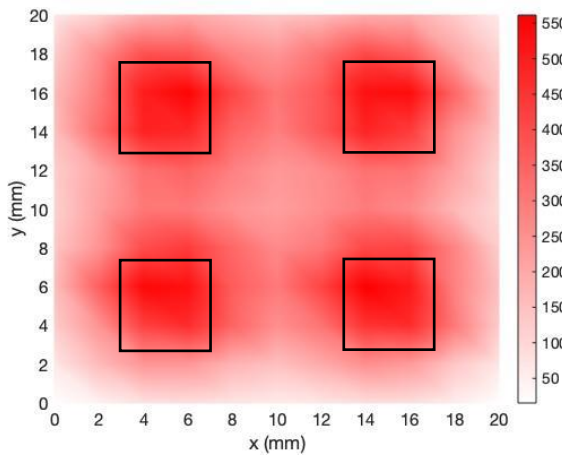


Fig. 7S

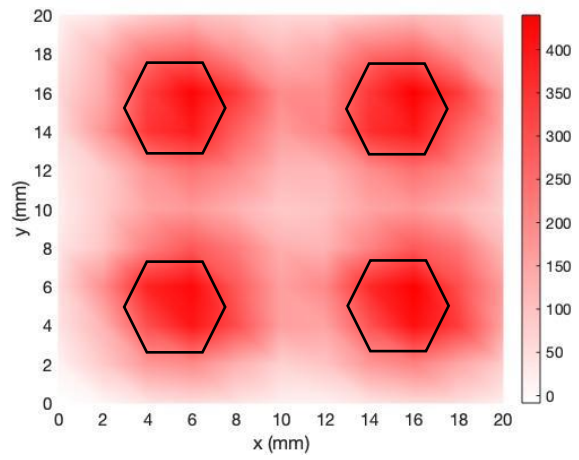


Fig. 8S

$$\sqrt{\left(\frac{\Delta B_z(x)}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B_z(y)}{\Delta y}\right)^2} \left(\frac{G}{mm}\right)$$

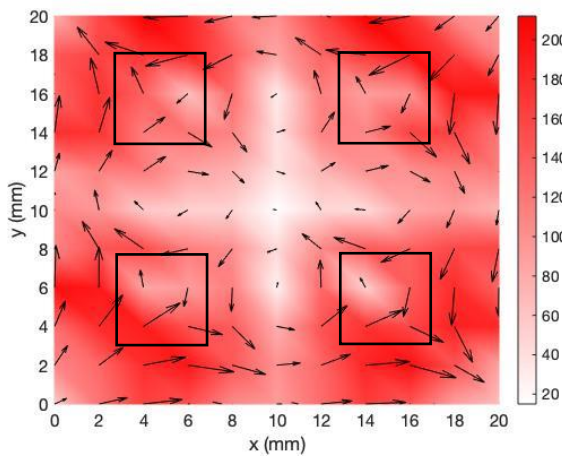


Fig. 9S

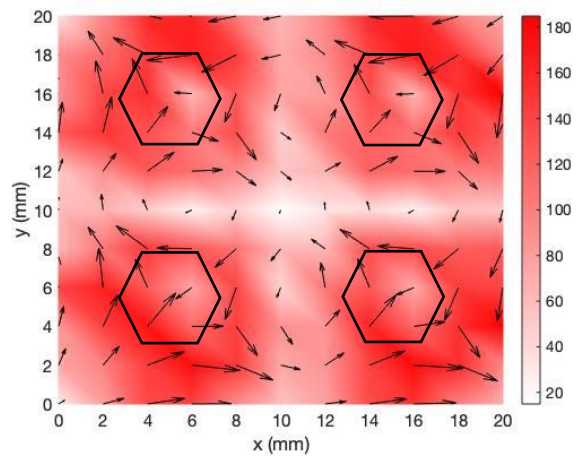


Fig. 10S

$$\mathbf{B}_z \cdot \mathbf{grad}(\mathbf{B}_z) \left( \frac{G^2}{mm} \right)$$

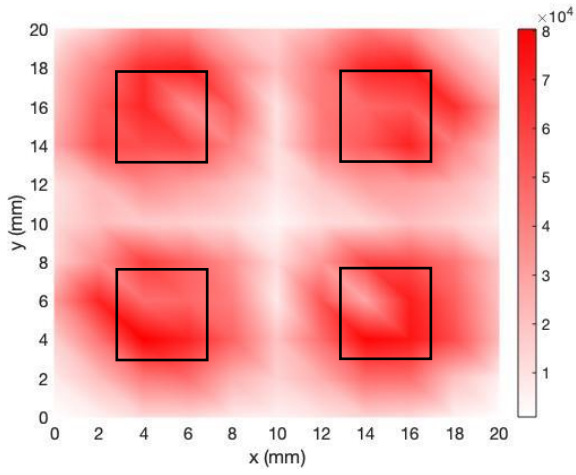


Fig. 11S

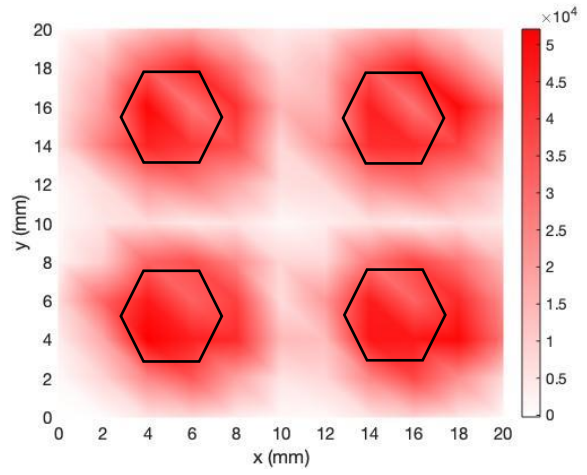


Fig. 12S

### 1) Configurazione SNNN

$z = 0$  mm

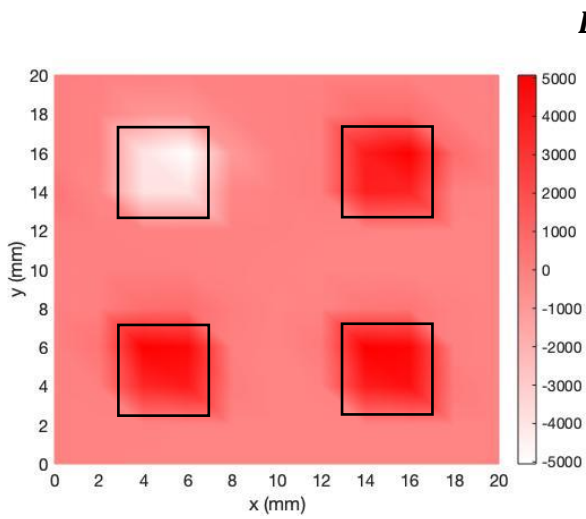


Fig. 13S

$$\mathbf{B}_z \text{ (G)}$$

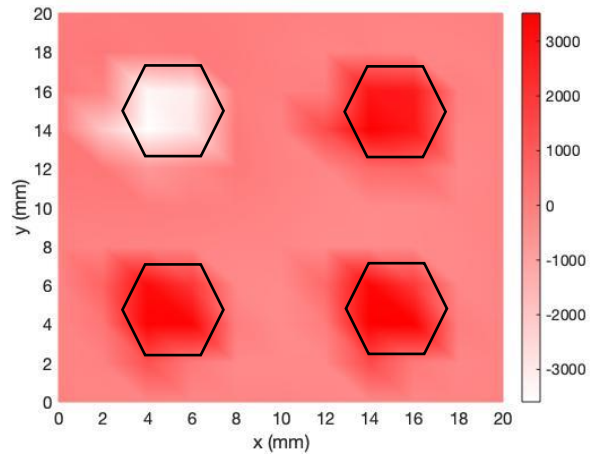


Fig. 14S

$$\sqrt{\left(\frac{\Delta B_z(x)}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B_z(y)}{\Delta y}\right)^2} \left(\frac{G}{mm}\right)$$

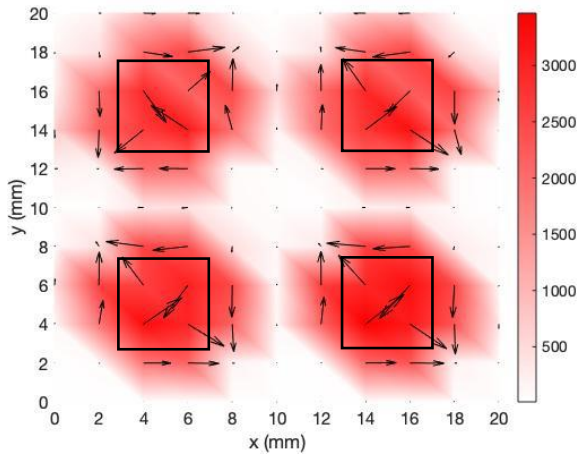


Fig. 15S

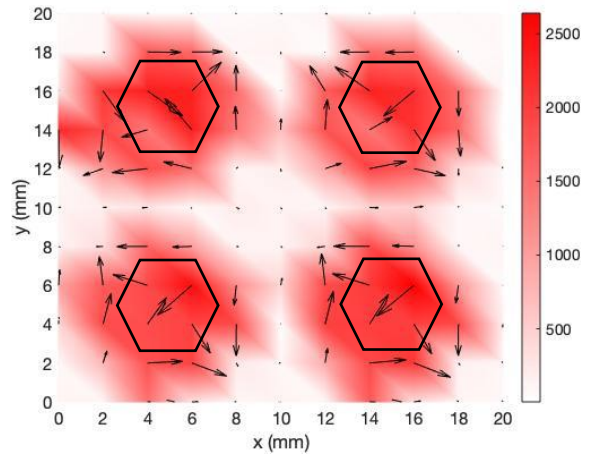


Fig. 16S

$$B_z \cdot \text{grad}(B_z) \left(\frac{G^2}{mm}\right)$$

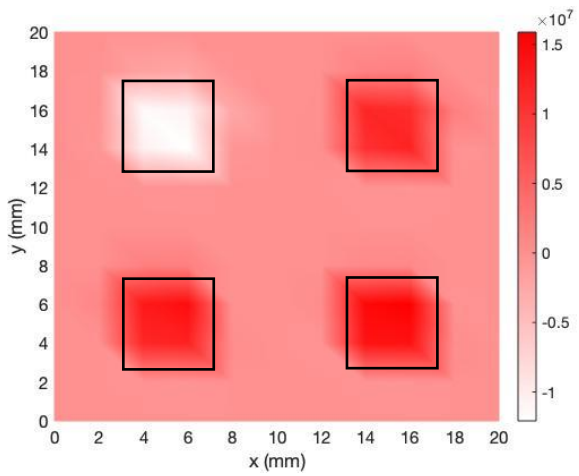


Fig. 17S

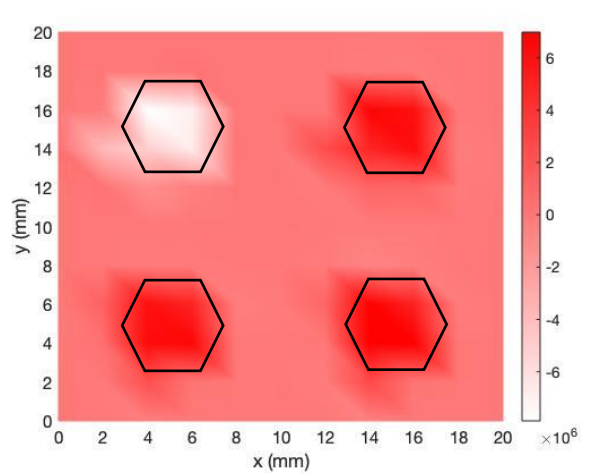


Fig. 18S



$z = 4\text{mm}$

$B_z$  (G)

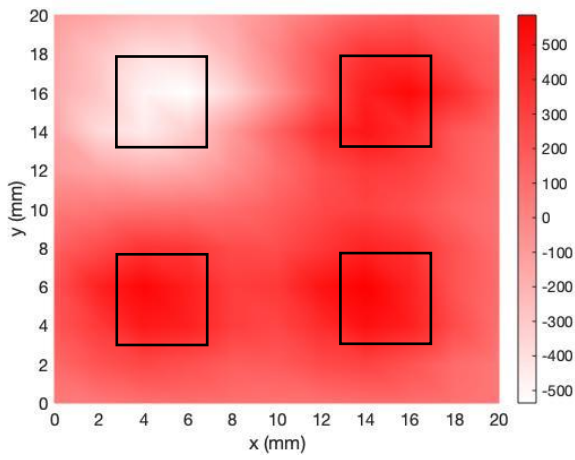


Fig. 19S

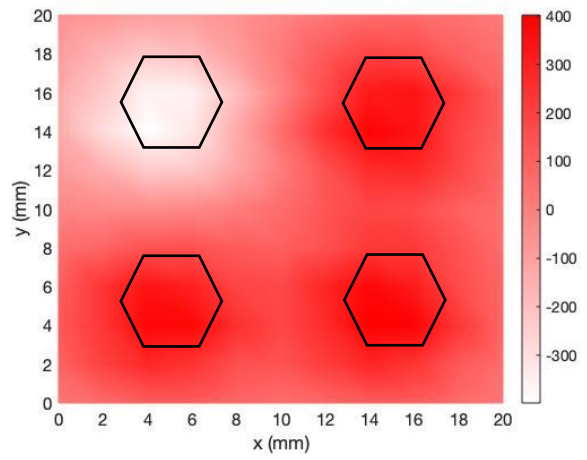


Fig. 20S

$$\sqrt{\left(\frac{\Delta B_z(x)}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B_z(y)}{\Delta y}\right)^2} \left(\frac{G}{mm}\right)$$

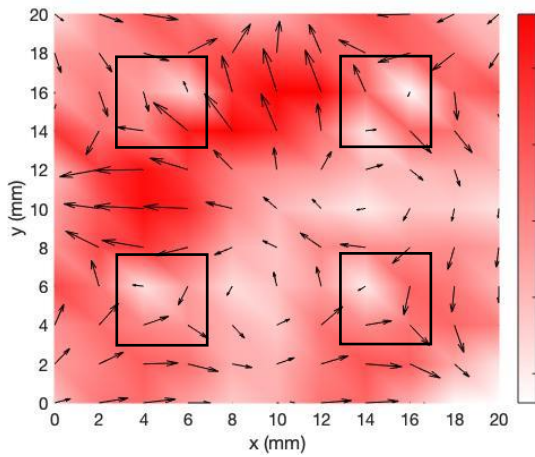


Fig. 21S

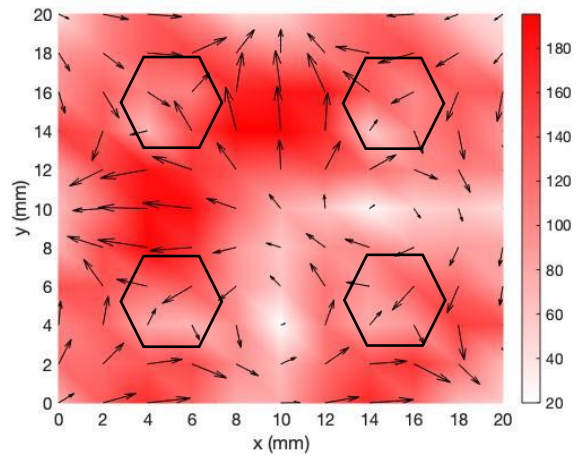


Fig. 22S

$$B_z \cdot \text{grad}(B_z) \left( \frac{G^2}{\text{mm}} \right)$$

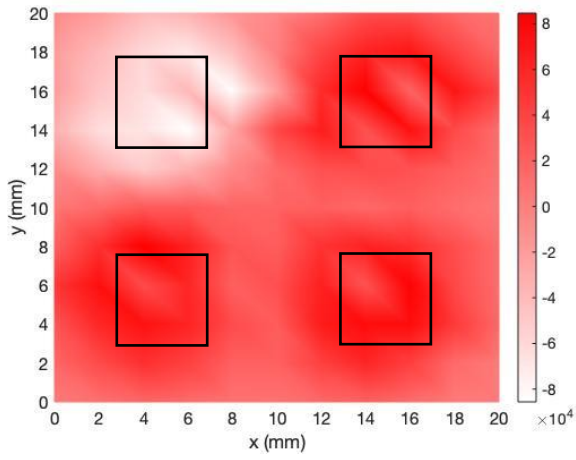


Fig. 23S

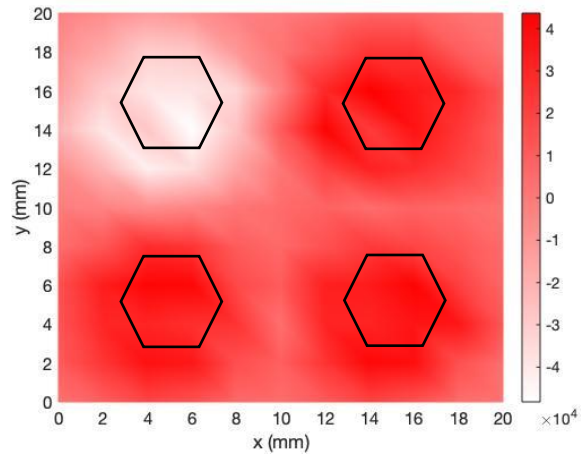


Fig. 24S

### 1) Configurazione SNNS

$z = 0\text{mm}$

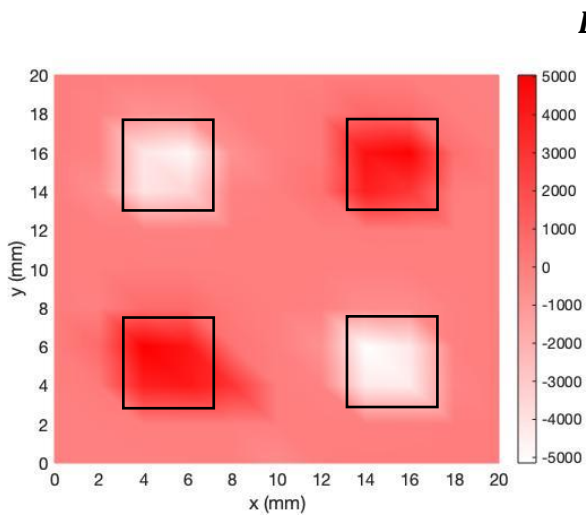


Fig. 25S

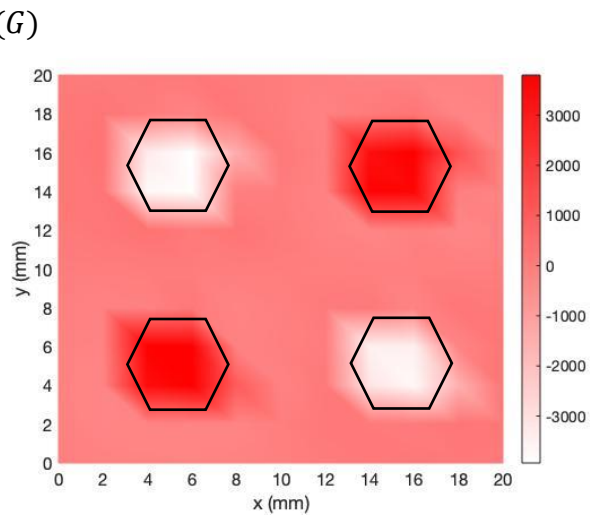


Fig. 26S

$$\sqrt{\left(\frac{\Delta B_z(x)}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B_z(y)}{\Delta y}\right)^2} \left(\frac{G}{mm}\right)$$

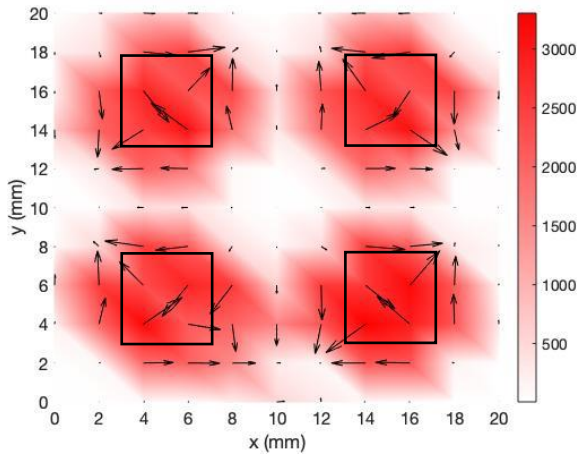


Fig. 27S

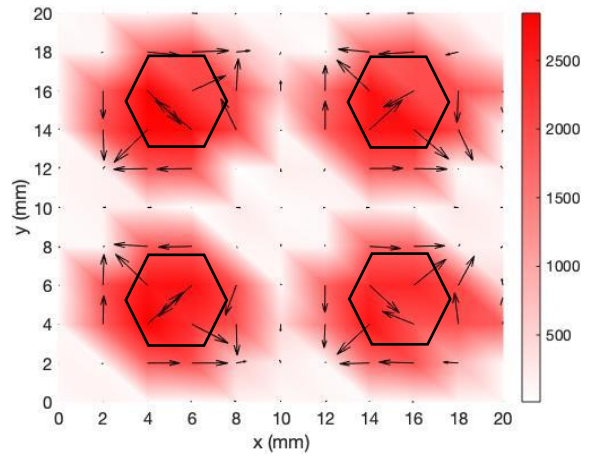


Fig. 28S

$$B_z \cdot \text{grad}(B_z) \left(\frac{G^2}{mm}\right)$$

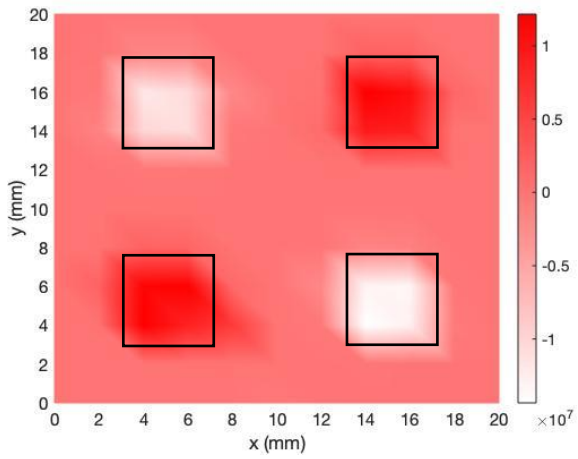


Fig. 29S

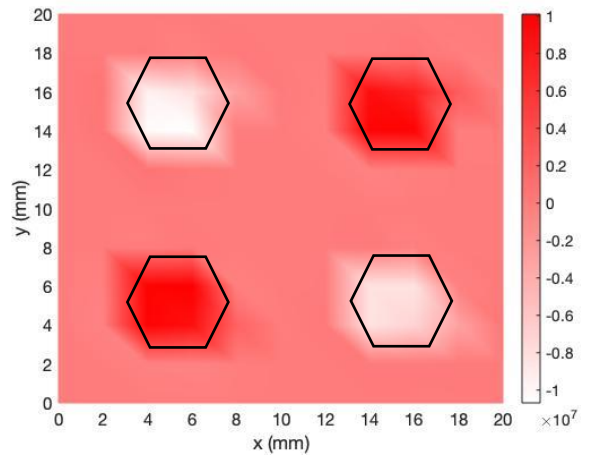


Fig. 30S

$z = 4\text{mm}$

$B_z$  (G)

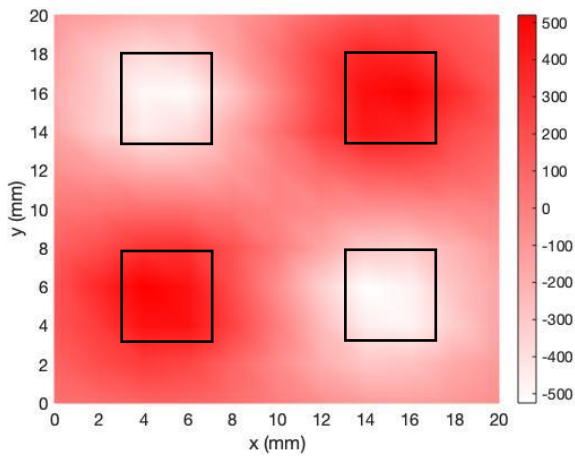


Fig. 31S

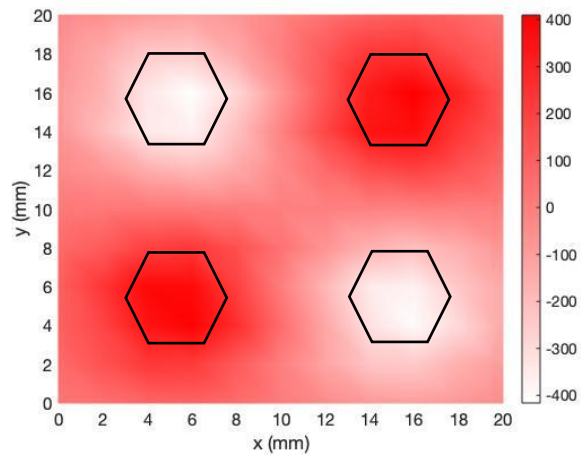


Fig. 32S

$$\sqrt{\left(\frac{\Delta B_z(x)}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B_z(y)}{\Delta y}\right)^2} \left(\frac{G}{mm}\right)$$

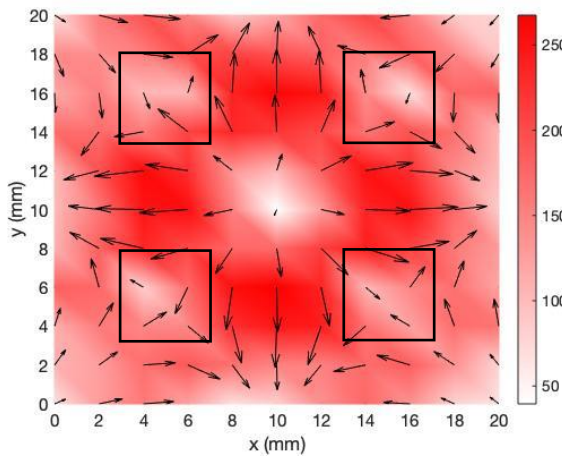


Fig. 33S

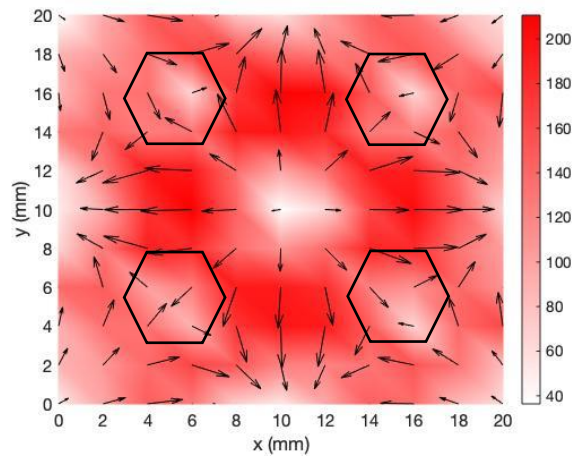


Fig. 34S

$$B_z \cdot \text{grad}(B_z) \left( \frac{G^2}{\text{mm}} \right)$$

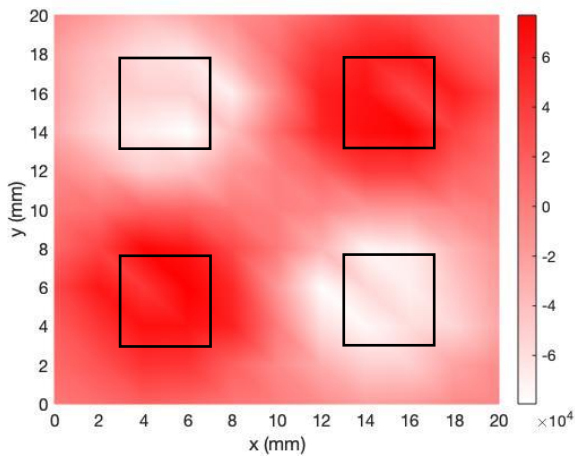


Fig. 35S

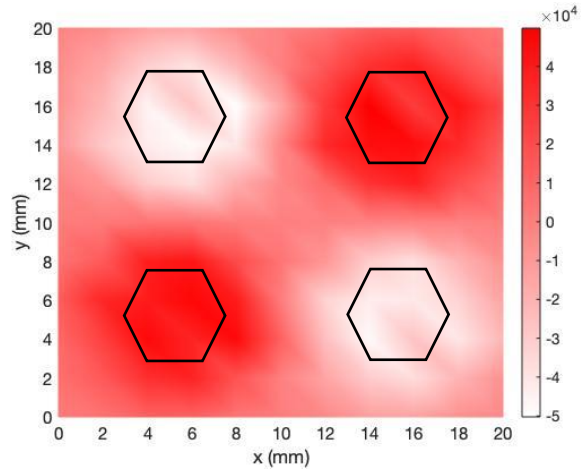


Fig. 36S

Fig. 1S-36S: scansioni del flusso di campo magnetico, gradiente di campo e prodotto tra flusso e gradiente (lungo z) eseguite su configurazioni di 4 magneti cubici o esagonali a due diverse quote ( $z=0$  mm e  $z=4$  mm).

Nelle tabelle sottostanti sono riportati i valori massimi ( $\max(|B_z \cdot \text{grad}(B_z)|)$ ) e i valori medi ( $\overline{|B_z \cdot \text{grad}(B_z)|}$ ), questi ultimi calcolati considerando un'area di  $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ , di  $B_z \cdot \text{grad}(B_z)$  per ciascuna configurazione:

Esagonali	$\max( B_z \cdot \text{grad}(B_z) )$ $\pm 0.1 \times 10^4 \text{ (G}^2/\text{mm)}$	$\max( B_z \cdot \text{grad}(B_z) )$ $\pm 0.1 \times 10^4 \text{ (G}^2/\text{mm)}$	$\overline{ B_z \cdot \text{grad}(B_z) }$ $\pm 0.1 \times 10^4$ $\text{(G}^2/\text{mm)}$	$\overline{ B_z \cdot \text{grad}(B_z) }$ $\pm 0.1 \times 10^4$ $\text{(G}^2/\text{mm)}$
	$z = 0 \text{ mm}$	$z = 4 \text{ mm}$	$z = 0 \text{ mm}$	$z = 4 \text{ mm}$
NNNN	$1.1 \times 10^7$	$5.2 \times 10^4$	$2.8 \times 10^6$	$2.4 \times 10^4$
SNNN	$7.9 \times 10^6$	$4.8 \times 10^4$	$1.0 \times 10^6$	$1.2 \times 10^4$
SNNS	$1.1 \times 10^7$	$5.0 \times 10^4$	$2.9 \times 10^5$	$6.4 \times 10^1$

Cubici	$\max( B_z \cdot \text{grad}(B_z) )$ $\pm 0.1 \times 10^4 \text{ (G}^2/\text{mm)}$	$\max( B_z \cdot \text{grad}(B_z) )$ $\pm 0.1 \times 10^4 \text{ (G}^2/\text{mm)}$	$\overline{ B_z \cdot \text{grad}(B_z) }$ $\pm 0.1 \times 10^4$ $\text{(G}^2/\text{mm)}$	$\overline{ B_z \cdot \text{grad}(B_z) }$ $\pm 0.1 \times 10^4$ $\text{(G}^2/\text{mm)}$
	$z = 0 \text{ mm}$	$z = 4 \text{ mm}$	$z = 0 \text{ mm}$	$z = 4 \text{ mm}$
NNNN	$1.5 \times 10^7$	$8.0 \times 10^4$	$3.4 \times 10^6$	$3.7 \times 10^4$
SNNN	$1.6 \times 10^7$	$8.5 \times 10^4$	$2.0 \times 10^6$	$2.7 \times 10^4$
SNNS	$1.4 \times 10^7$	$8.0 \times 10^4$	$4.2 \times 10^5$	$1.7 \times 10^3$

### 3.1.2 Discussione

I risultati mostrano che i magneti a geometria cubica generano valori massimi di  $\mathbf{B} \cdot \mathbf{grad}(\mathbf{B})$  più elevati rispetto ai magneti esagonali; in media la differenza tra di essi è pari a:

$$0.5 \times 10^7 (\pm 0.1 \times 10^4) \frac{G^2}{mm} \quad \text{per } z = 0 \text{ mm}$$

$$(3.2 \pm 0.1) \times 10^4 \frac{G^2}{mm} \quad \text{per } z = 4 \text{ mm}$$

Da questi dati si può ipotizzare quindi che la forma dei magneti influenza l'intensità del flusso: tuttavia osservando le scansioni non sono evidenti differenze tra le due geometrie testate per quanto riguarda la distribuzione spaziale del campo magnetico; l'orientazione dei singoli magneti, al contrario, influenza il profilo globale del campo magnetico ma non ha un effetto marcato sui valori massimi di  $\mathbf{B}_z \cdot \mathbf{grad}(\mathbf{B}_z)$ . È possibile che il passo utilizzato, ovvero 2 mm, non sia sufficiente per mettere in risalto le differenze topologiche del campo magnetico correlate alla forma del magnete. La conclusione che si trae da queste misure è che, siccome i magneti cubici mostrano valori di  $\mathbf{B}_z \cdot \mathbf{grad}(\mathbf{B}_z)$  più elevati di quelli ottenuti per magneti a geometria esagonale, sono più idonei ad essere utilizzati negli esperimenti sulle nanoparticelle magnetiche, in quanto la forza magnetica percepita dagli SPIONs risulta più intensa.

### 3.1.3 Risultati magneti *under skin*

Di seguito sono mostrati i risultati delle misure sulle configurazioni di due magneti; sono stati testati unicamente magneti di forma esagonale avendo tenuto conto dei risultati ottenuti dalle precedenti scansioni. A sinistra sono mostrati i grafici relativi alla configurazione SS mentre a destra quelli della configurazione NS; in sequenza, vi sono le mappature di  $\mathbf{B}_z$ ,  $|\vec{\nabla}(\mathbf{B}_z)|$  e  $\mathbf{B}_z \cdot |\vec{\nabla}(\mathbf{B}_z)|$  per  $z=0\text{mm}$  e  $z=4\text{mm}$ .

#### 1) $z=0\text{mm}$

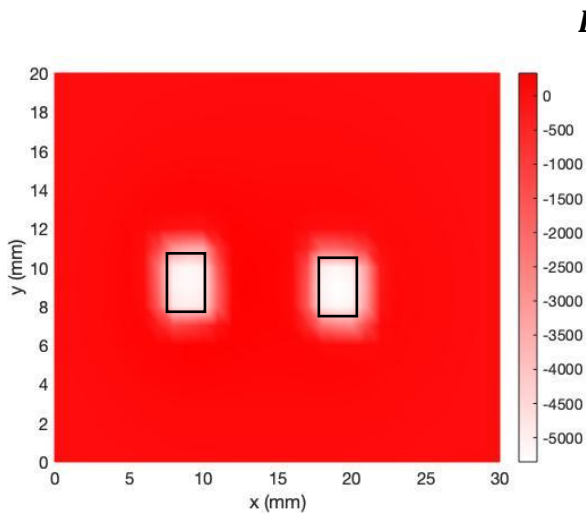


Fig. 37S

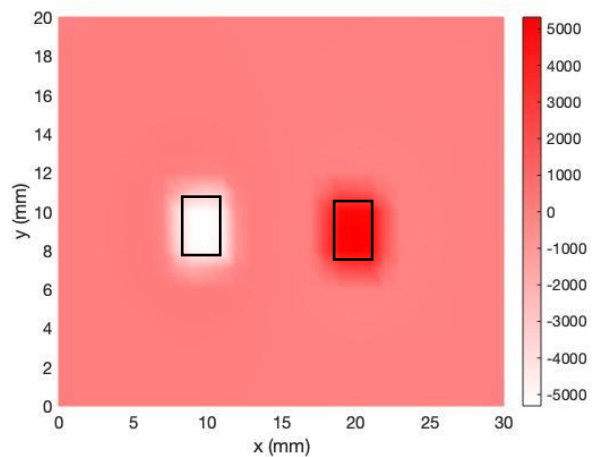


Fig. 38S

$$\sqrt{\left(\frac{\Delta B_z(x)}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B_z(y)}{\Delta y}\right)^2} \left(\frac{G}{mm}\right)$$

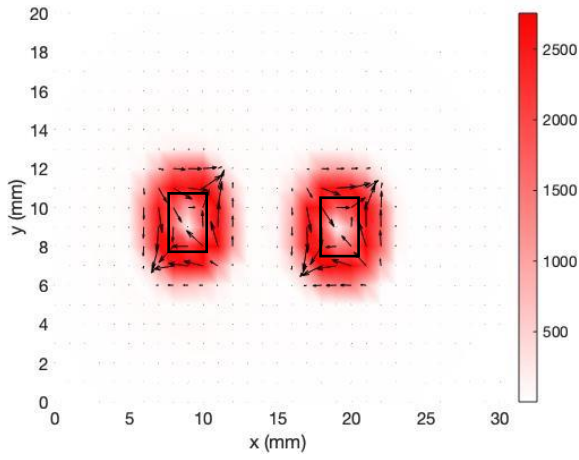


Fig. 39S

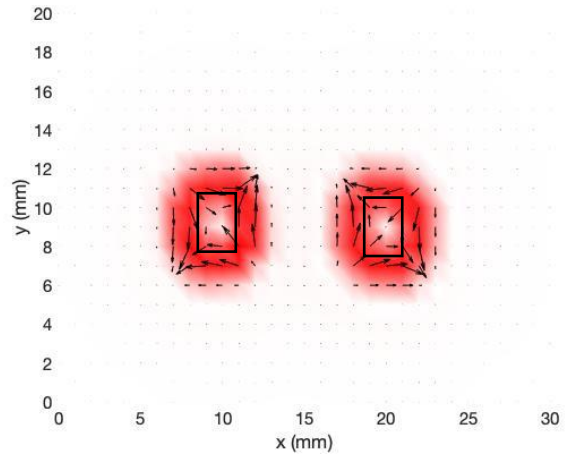


Fig. 40S

$$B_z \cdot \text{grad}(B_z) \left(\frac{G^2}{mm}\right)$$

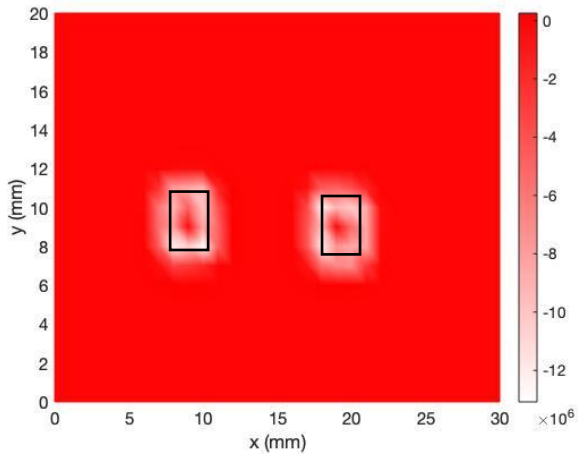


Fig. 41S

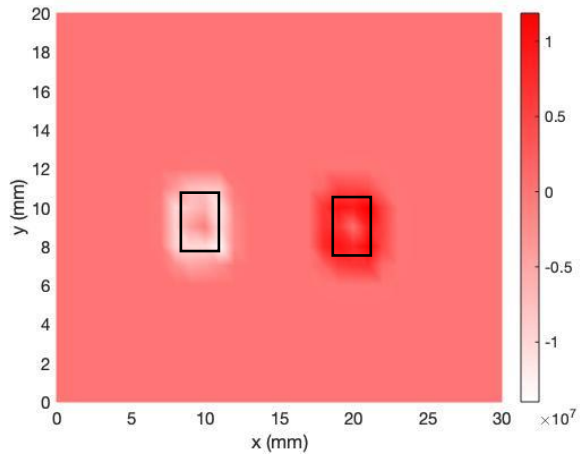


Fig. 42S

2)  $z=4\text{mm}$

$B_z$  (G)

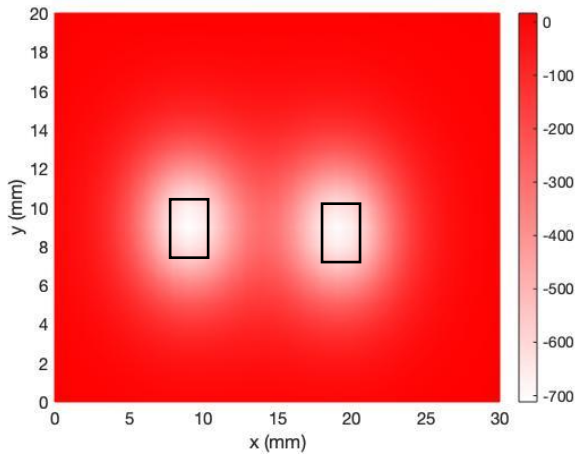


Fig. 43S

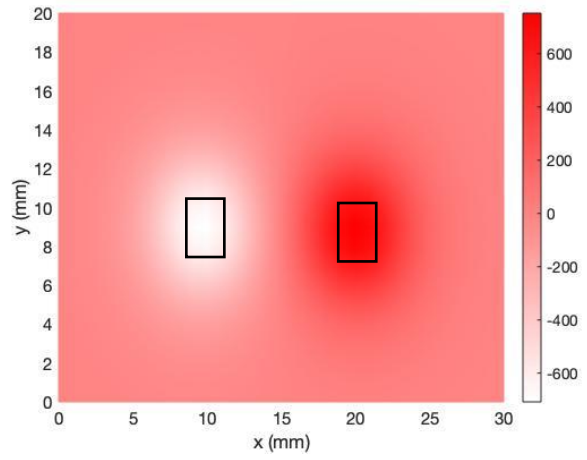


Fig. 44S

$$\sqrt{\left(\frac{\Delta B_z(x)}{\Delta x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta B_z(y)}{\Delta y}\right)^2} \left(\frac{G}{mm}\right)$$

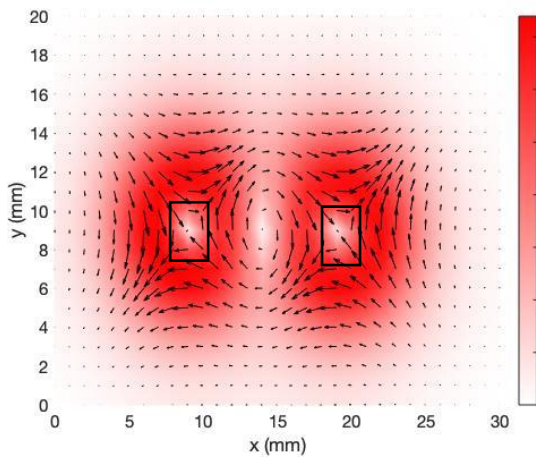


Fig. 45S

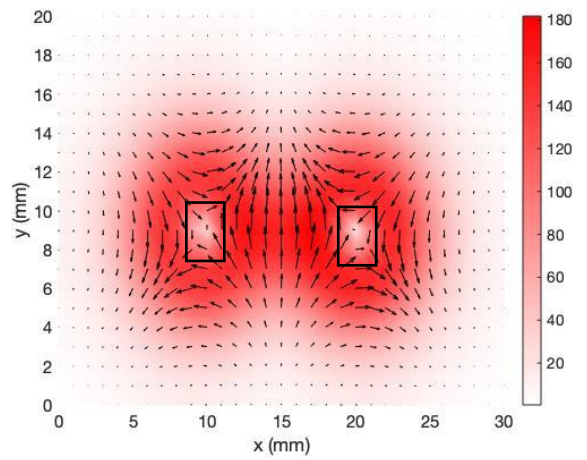


Fig. 46S



$$\mathbf{B}_z \cdot \mathbf{grad}(\mathbf{B}_z) \left( \frac{G^2}{mm} \right)$$

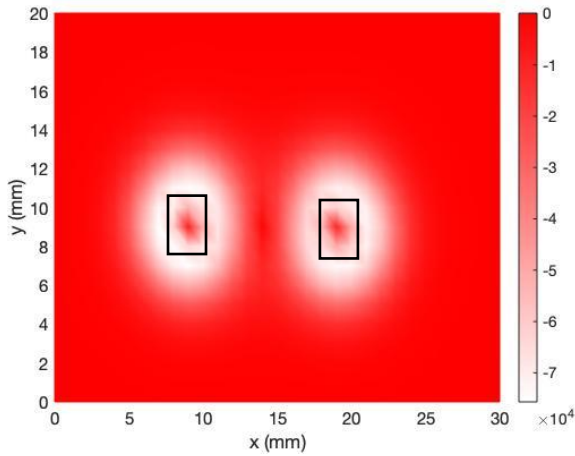


Fig. 47S

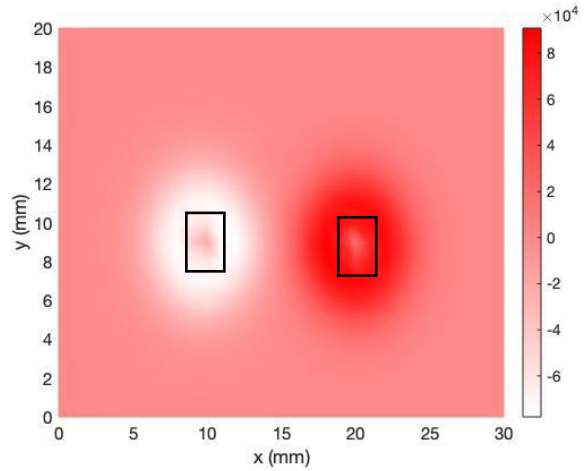


Fig. 48S

Fig. 37S-48S: scansioni del flusso di campo magnetico, gradiente di campo e prodotto tra flusso e gradiente (lungo z) eseguite su una coppia di magneti cubici a due diverse quote ( $z=0$  mm e  $z=4$  mm).

Nella tabella seguente sono riportati i valori massimi di  $|\mathbf{B}_z \cdot \mathbf{grad}(\mathbf{B}_z)|$  per le due configurazioni:

	$\max( \mathbf{B}_z \cdot \mathbf{grad}(\mathbf{B}_z) ) \pm 0.1 \times 10^4 \text{ (G}^2/\text{mm)}$ $z = 0 \text{ mm}$	$\max( \mathbf{B}_z \cdot \mathbf{grad}(\mathbf{B}_z) ) \pm 0.1 \times 10^4 \text{ (G}^2/\text{mm)}$ $z = 4 \text{ mm}$
SS	$1.3 \times 10^7$	$7.6 \times 10^4$
NS	$1.4 \times 10^7$	$9.1 \times 10^4$

### 3.1.4 Discussione

La configurazione NS è quella che mostra i valori massimi di  $\mathbf{B}_z \cdot \mathbf{grad}(\mathbf{B}_z)$  più elevati, la differenza tra questi è pari a:

$$0.1 \times 10^7 (\pm 0.1 \times 10^4) \frac{G^2}{mm} \quad \text{per } z = 0 \text{ mm}$$

$$(1.5 \pm 0.1) \times 10^4 \frac{G^2}{mm} \quad \text{per } z = 4 \text{ mm}$$

Le scansioni sono in generale caratterizzate da una migliore definizione, in quanto il passo utilizzato è la metà di quello usato nelle misure sulle configurazioni di quattro magneti; le sezioni dei singoli magneti appaiono rettangolari invece che quadrate a causa della differenza di scala tra gli assi x e y. Da questi risultati emerge che, in vista delle misure sul circuito, la configurazione NS è in grado di esercitare una forza magnetica più elevata sugli SPIONs rispetto alla configurazione SS.

### 3.2 Determinazione di una procedura per ricavare la concentrazione di soluzioni di SPIONs

Nella seconda parte dell'attività sperimentale è stata impostata una procedura per ricavare la concentrazione di soluzioni acquose di SPIONs. Ci si è avvalsi a questo scopo della spettroscopia UV-visibile: questa tecnica analitica permette di determinare l'intensità luminosa assorbita da un campione (assorbanza), o trasmessa attraverso di esso (trasmittanza), in funzione della lunghezza d'onda della radiazione incidente.

Avvalendosi della legge di Lambert-Beer è infatti possibile collegare l'assorbanza (o la trasmittanza) di una soluzione alla sua concentrazione [49]:

$$A = \frac{I_A}{I_0} = \epsilon(\lambda) \cdot l \cdot M \quad (3.6)$$

Dove  $A$  è l'assorbanza, espressa come rapporto tra l'intensità di luce assorbita e l'intensità della luce incidente,  $M$  è la molarità,  $l$  è il cammino percorso dalla radiazione attraverso la soluzione ed  $\epsilon(\lambda)$  è il coefficiente di assorbimento molare, funzione della lunghezza d'onda della radiazione.

La soluzione da esaminare viene versata all'interno di una cuvetta, realizzata con un materiale trasparente nell'intervallo di lunghezze d'onda di misura (tipicamente quarzo o plastica), e viene posta nello spazio apposito all'interno dello spettrometro; in un alloggiamento adiacente viene inserita una cuvetta contenente unicamente il solvente presente nella soluzione (in questo caso acqua deionizzata), in modo che lo strumento elimini il contributo del soluto nello spettro di assorbimento. Lo strumento principale utilizzato per le misure è stato uno spettrofotometro UV-visibile (Perkin Elmer® Lambda35, fig. 18), in grado di effettuare misure tra 190 nm e 1100 nm e con un'accuratezza sui valori di assorbanza pari a  $\pm 0.001$ ; lo strumento sfrutta due sorgenti di radiazione differenti per la regione UV (190:350 nm) e visibile-IR (350:1100nm).

Contemporaneamente, è stato adoperato per le misure anche un altro spettrometro, ovvero un colorimetro (Vernier® GoDirect Colorimeter, fig. 18), in quanto, trattandosi di uno strumento molto semplice e di ridotte dimensioni, collegabile tramite cavo USB ad un computer ed in grado di restituire istantaneamente il valore misurato, costituisce un'alternativa per ridurre le tempistiche delle misurazioni rendendo l'intero procedimento più pratico ed efficiente; l'accuratezza di questo strumento in misure di assorbanza è tuttavia pari a  $\pm 0.01$ , quindi un ordine di grandezza inferiore rispetto a quella dello spettrofotometro.



Fig. 18: Lo spettrofotometro (sinistra) e il colorimetro (destra) utilizzati per effettuare le misure.

Il colorimetro è in grado di misurare l'assorbanza di un campione in fase liquida in corrispondenza di quattro lunghezze d'onda: 420 nm, 470 nm, 565 nm e 635 nm, per cui è necessario selezionare tra queste quella ottimale da utilizzare nelle successive misure di cattura.

Per poter conoscere la concentrazione di un campione di soluzione prelevato dal circuito bisogna costruire una curva di calibrazione attraverso la quale correlare l'assorbanza misurata dallo spettrofotometro/colorimetro con la concentrazione.

Sono state preparate undici soluzioni di nanoparticelle, con concentrazioni comprese tra 0.01 g/L e 0.3 g/L, diluendo una soluzione madre di SPIONs sintetizzata attraverso il metodo di co-precipitazione; le nanoparticelle non sono state funzionalizzate.

Sono state effettuate misure di assorbanza con lo spettrofotometro su tali soluzioni, per valutare lo spettro di assorbimento nell'intero intervallo di lunghezze d'onda dello strumento:

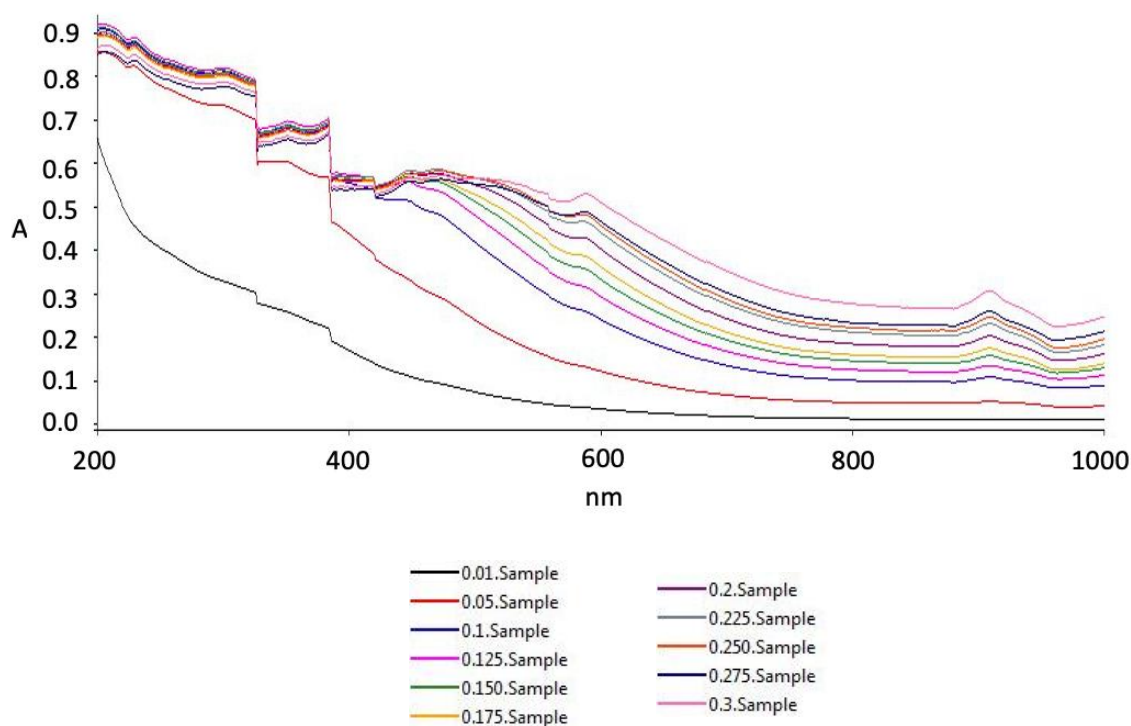


Fig. 49S: spettro di assorbanza in funzione della lunghezza d'onda (nm) di soluzioni di SPIONs a diversa concentrazione.

Da un confronto con gli spettri presenti in letteratura riguardanti soluzioni di SPIONs [43-47] risulta che l'andamento dello spettro è in linea con quanto osservato; si notano due anomalie tra 300 e 400 nm, una attribuita al cambio di sorgente (da UV a visibile, attorno a 350 nm), l'altra di origine strumentale. Siccome le concentrazioni delle soluzioni tipicamente utilizzate in esperimenti di cattura sono circa 0.05 g/L [48], è stato deciso di sintetizzare altre soluzioni con concentrazioni tra 0.01 e 0.05 g/L e si è considerato un limite massimo di concentrazione inferiore per la taratura, ovvero da 0.01 g/L fino a 0.15 g/L (fig. 19).

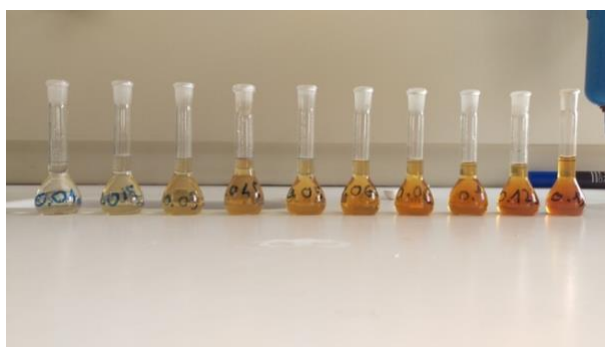


Fig. 19: soluzioni di taratura, in concentrazione crescente da sinistra a destra.

Di seguito sono invece riportate le curve ottenute dalle misure sulle dieci soluzioni nell'intervallo definitivo:

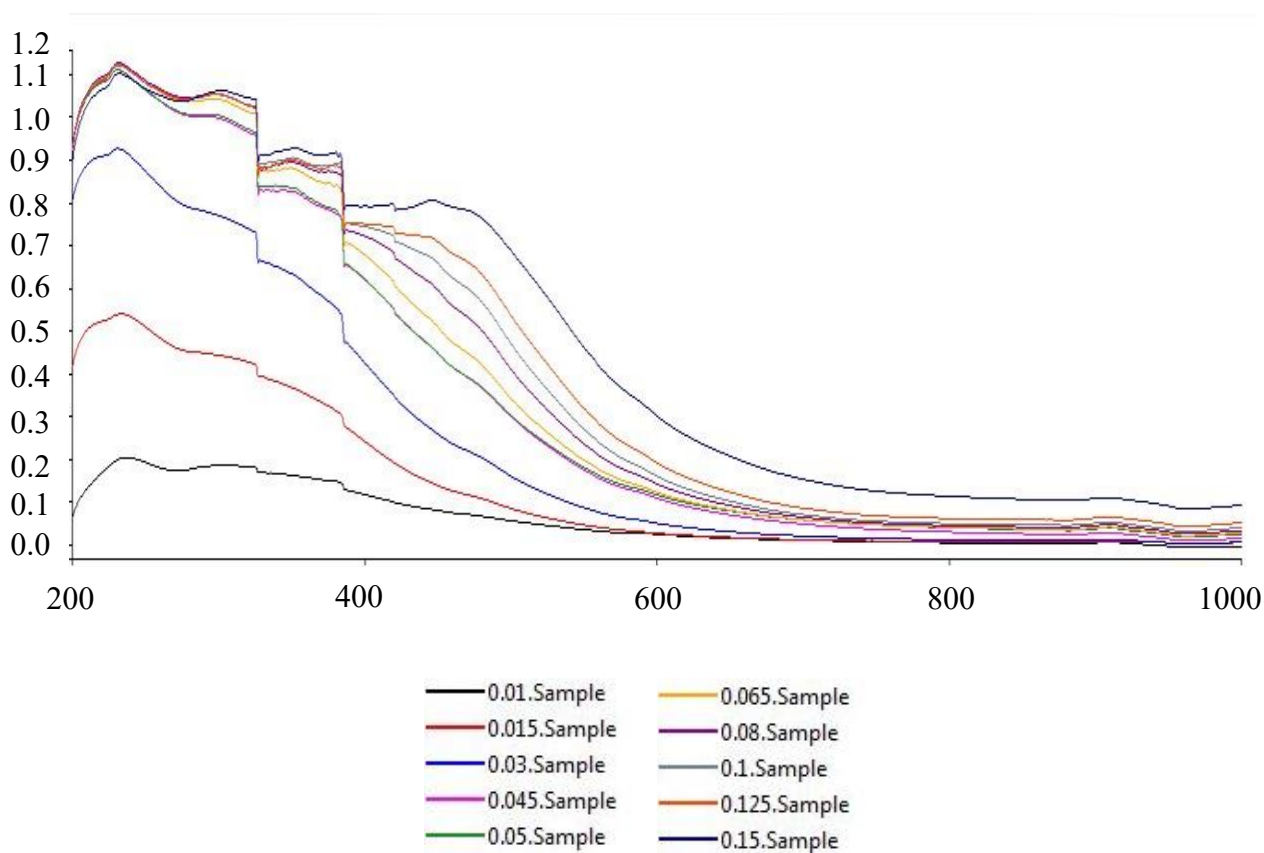


Fig. 50S: spettro di assorbimento in funzione della lunghezza d'onda (nm) di soluzioni di SPIONs a diversa concentrazione.

Per ottenere un confronto più preciso, i valori di concentrazione delle soluzioni sono stati determinati attraverso la tecnica ICP-AES (fig. 20), acronimo di *Inductive Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy*. Si tratta di una tecnica spettroscopica nella quale una sorgente altamente energetica, in questo caso costituita da un plasma di argon a temperature di alcune migliaia di gradi centigradi, atomizza il campione, il quale emette radiazione elettromagnetica caratterizzata da uno spettro dipendente dagli elementi chimici che compongono il materiale. Attraverso l'analisi di tale spettro, quindi, è possibile distinguere i diversi elementi chimici che costituiscono il campione, mentre analizzando l'intensità della radiazione emessa è possibile determinare la quantità degli elementi; con questa tecnica spettroscopica è possibile determinare elementi in tracce presenti in quantità fino all'ordine delle parti per miliardo (ppb).

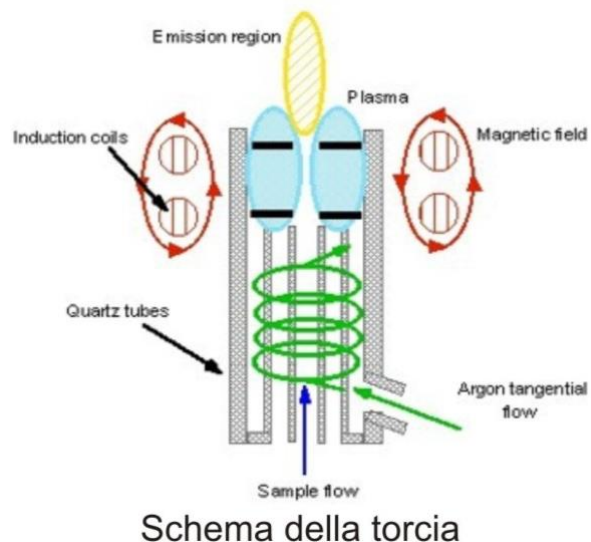
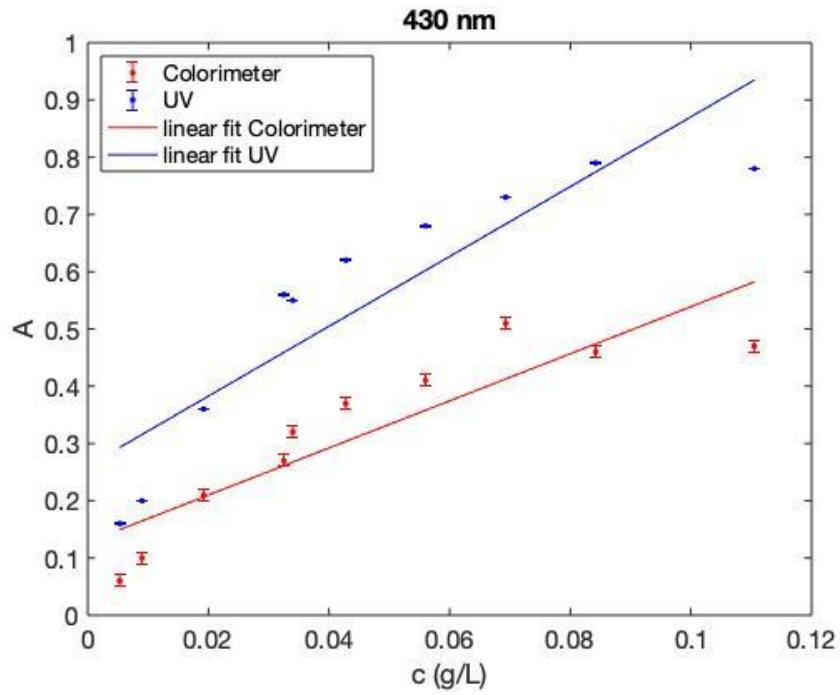


Fig. 20: spettrometro ICP-AES (sinistra), schema della torcia con cui si atomizza il campione (destra) [50, 51].

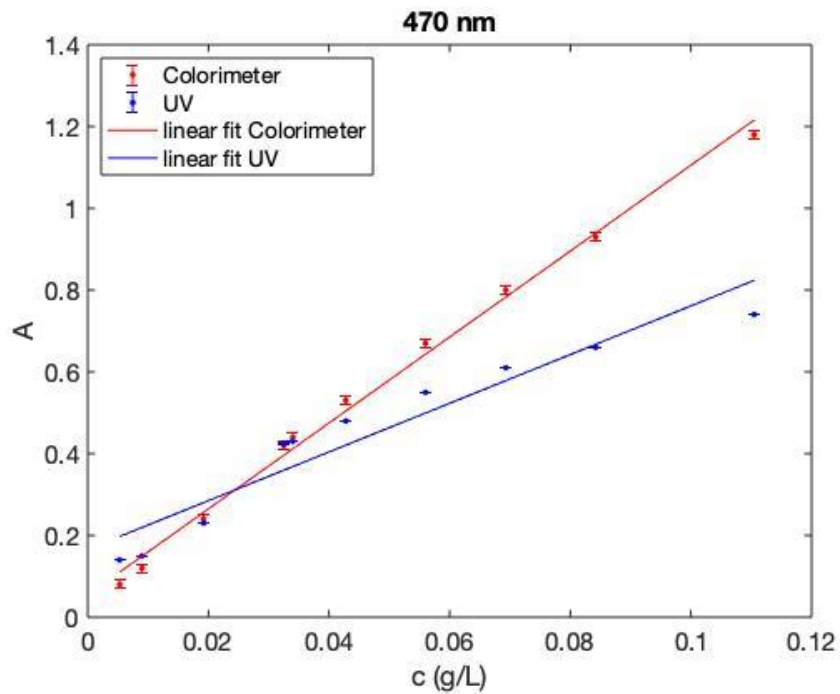
Di seguito viene mostrata una tabella che riporta le quantità di ferro presente nelle soluzioni determinate tramite ICP-AES, espresse in ppm e g/L:

Fe (ppm)	c <sub>ICP</sub> (g/L)
5.3	0.005
9.0	0.009
19.2	0.019
32.5	0.032
34	0.034
42.8	0.043
56	0.056
69.3	0.069
84.2	0.084
110.5	0.111

Il comportamento dei dati ottenuti dalle misure di assorbanza è stato modellizzato tramite fit lineari; nei grafici mostrati nelle due pagine successive sono riportati i risultati per entrambi gli strumenti utilizzati e in corrispondenza di ciascuna delle quattro lunghezze d'onda considerate:



*Fig. 51S: curve di calibrazione di spettrofotometro e colorimetro corrispondenti alla lunghezza d'onda di 430 nm.*



*Fig. 52S: curve di calibrazione di spettrofotometro e colorimetro corrispondenti alla lunghezza d'onda di 470 nm.*

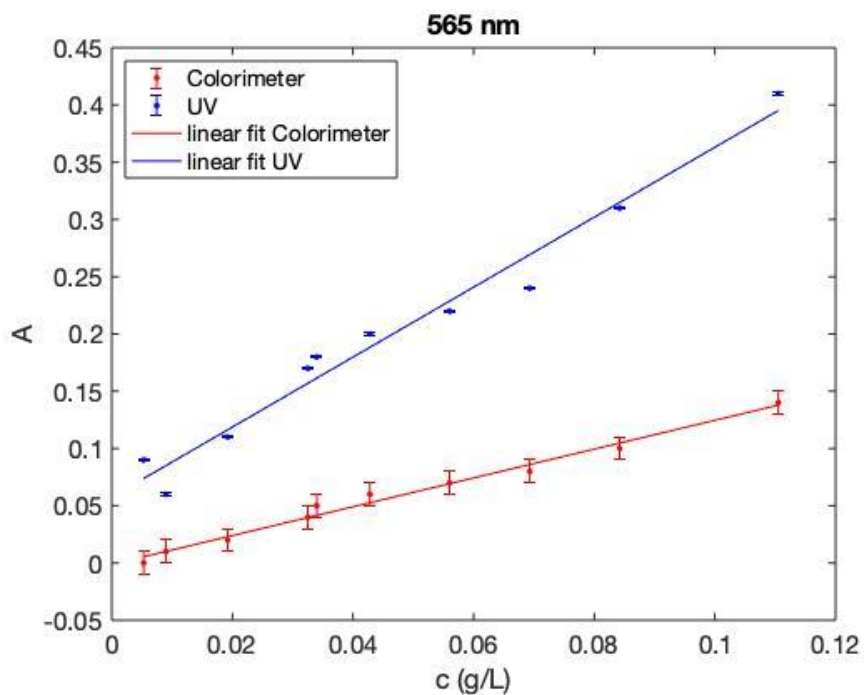


Fig. 53S: curve di calibrazione di spettrofotometro e colorimetro corrispondenti alla lunghezza d'onda di 565 nm.

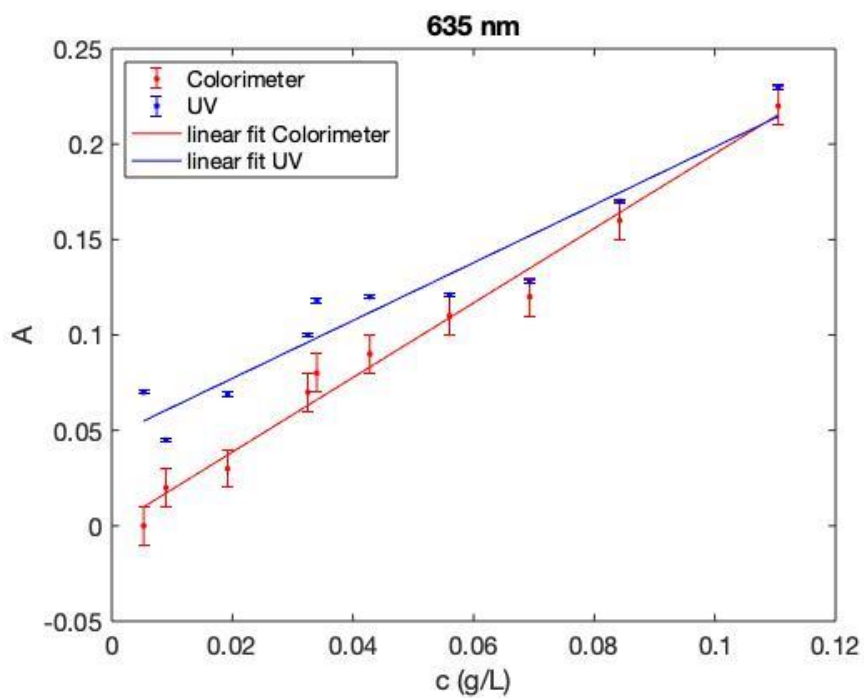


Fig. 54S: curve di calibrazione di spettrofotometro e colorimetro corrispondenti alla lunghezza d'onda di 635 nm.

È necessario a questo punto determinare la lunghezza d'onda ottimale da utilizzare per effettuare le misure di assorbanza; sono stati considerati a tal fine quattro fattori, ovvero la bontà del fit, l'entità degli errori sperimentali rispetto ai valori misurati, la discrepanza tra le risposte dei due strumenti utilizzati e l'intensità del segnale misurato:

#### - bontà del fit

Per esprimere la qualità dei fit è stato utilizzato il parametro  $R^2$ , definito attraverso la seguente espressione:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{\sum_i (y_i - y_{FIT})^2} \quad (3.7)$$

Il suo valore è compreso tra 0 e 1, limiti che corrispondono rispettivamente ad un totale disaccordo tra fit e dati e ad un accordo perfetto tra di essi; in questo caso il fit considerato è lineare, per cui si cerca un valore di lunghezza d'onda della radiazione in corrispondenza del quale l'andamento dei dati sperimentali si avvicini maggiormente a quello di una retta, quindi il valore di  $R^2$  deve essere il più vicino possibile ad 1.

#### - errori sperimentali

L'incertezza sui dati di assorbanza misurati è pari a  $\pm 0.01$  per quelli ottenuti con il colorimetro e  $\pm 0.001$  per quelli determinati con lo spettrofotometro; se il valore misurato e il relativo errore sono dello stesso ordine di grandezza, la lunghezza d'onda non è adeguata.

A tal proposito, viene definito un parametro denominato  $G$ :

$$G = \frac{err}{y_{MAX}} \quad (3.8)$$

Il termine *err* indice l'errore sperimentale sui dati, mentre  $y_{MAX}$  è il valore massimo di assorbanza misurato e viene considerato come una stima dell'ordine di grandezza dell'assorbanza; quindi, minore è il valore di  $G$ , minore è il peso delle incertezze strumentali sulle misure ad una determinata lunghezza d'onda.

#### - accordo tra gli strumenti

Se le risposte del colorimetro e dello spettrofotometro si discostano tra loro eccessivamente ad una data lunghezza d'onda, le misure non possono essere effettuate.

La differenza nelle risposte dei due strumenti viene quantificata attraverso il seguente parametro:

$$\Delta_{STRUM} = \left| \frac{\sum_{i=1}^N (y_i^{COL} - y_i^{UV})}{N} \right| \quad (3.9)$$

Tale grandezza esprime una differenza media tra le risposte degli strumenti nell'intero intervallo di misura e risulta tanto più vicina a zero quanto più le risposte degli strumenti sono simili tra loro; pertanto, si cercano valori di questo parametro che siano più piccoli possibile.

#### - intensità del segnale

Questo parametro è direttamente correlato alla sensibilità del singolo strumento: più è elevato, più precise saranno le misure; si tiene conto di questo considerando l'intervallo di assorbanza ad una data lunghezza d'onda, definito come:

$$\Delta A = A_{MAX} - A_{MIN} \quad (3.10)$$



Nella tabella sottostante sono riportati i parametri precedentemente definiti, calcolati per ciascuna lunghezza d'onda:

$\lambda$ (nm)	Strumento	$R^2$	$G$	$\Delta_{STRUM}$	$\Delta A$
430	UV-vis	0.81	0.0013	0.23	0.63
	Colorimetro	0.80	0.0196		0.45
<b>470</b>	UV-vis	0.92	0.0014	0.10	0.60
	Colorimetro	0.99	0.0085		1.1
565	UV-vis	0.97	0.0024	0.14	0.35
	Colorimetro	0.99	0.0714		0.14
635	UV-vis	0.92	0.0043	0.06	0.18
	Colorimetro	0.98	0.0455		0.22

Dal confronto dei parametri, si è concluso che la lunghezza d'onda ottimale in corrispondenza della quale effettuare le misure di assorbanza è **470 nm**, infatti, nonostante il fit dei dati raccolti con lo spettrofotometro sia migliore a 565 nm, a quest'ultima lunghezza d'onda la differenza tra le risposte dei due strumenti è più alta, gli errori sperimentali pesano maggiormente sui valori misurati e l'intensità del segnale misurato è notevolmente inferiore.

### 3.3 Assemblaggio del circuito di simulazione

Il circuito di simulazione di un sistema cardiovascolare è mostrato nella foto seguente, in cui sono indicati anche i componenti:

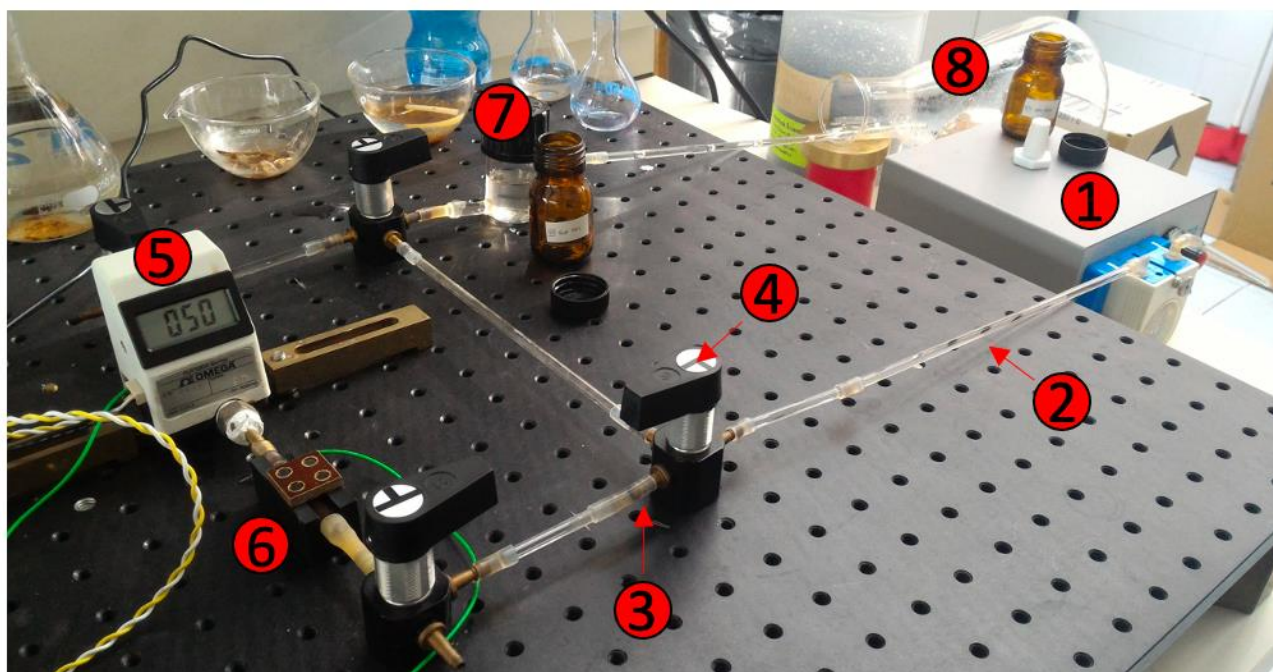


Fig. 21: circuito di simulazione in cui sono numerati i diversi componenti.

- 1 - Pompa peristaltica (VELP® Scientifica SP311)
- 2 - Tubi in vetro (diametro interno 2 mm)
- 3 - Tubi di gomma (per raccordare)
- 4 - Rubinetti
- 5 - Flussimetro (OMEGA® FLR 1000-9D)
- 6 - simulazione in vetro di un organo animale e configurazione di magneti
- 7 - Sito di prelievo della soluzione
- 8 - Contenitore della soluzione

Il circuito ha una struttura molto semplice: esso presenta due rami, uno principale, che contiene un modello in vetro di un ipotetico *organo animale* ed un flussimetro, e uno parallelo; il flusso può essere direzionato nell'uno o nell'altro ruotando le manopole dei rubinetti presenti agli incroci. Il ramo parallelo serve per controllare il funzionamento della pompa immediatamente prima dell'inizio di una misura: in esso, infatti, viene direzionata la soluzione per controllare che non ci siano malfunzionamenti, evitando quindi di contaminare l'organo. La soluzione contenente SPIONs viene versata all'interno di una beuta codata (indicata con il numero 8 in figura), la quale è stata opportunamente posizionata di modo da poter collegare la pompa peristaltica al beccuccio collocato in prossimità della base e permettere al tubo collegato al sito di prelievo di immettere il fluido nella parte superiore. La pompa peristaltica simula la funzione del cuore della cavia, ovvero fa circolare la soluzione all'interno del sistema e per fare ciò sfrutta un sistema meccanico: un tubo di gomma, inserito all'interno di un apposito alloggiamento, viene compresso periodicamente dalla rotazione di un rotore la cui velocità di rotazione può essere regolata tramite una manopola. Sono selezionabili dieci diverse velocità di rotazione, tuttavia siccome la pompa non è provvista di un display per leggere il valore della velocità di flusso corrispondente, è stato necessario utilizzare un flussimetro, che restituisce valori in ml/min; è stato scelto di collegare tale strumento direttamente all'uscita dell'organo (il verso di circolazione della soluzione è orario) per poter individuare nel corso delle misure eventuali ostruzioni.

I tubi di vetro sono l'equivalente dei vasi sanguigni di un sistema biologico e sono collegati tra loro e ai vari componenti del circuito (rubinetti, pompa, organo) tramite raccordi in gomma più corti possibile.

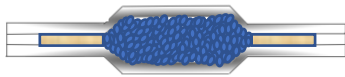


Fig. 22: illustrazione del componente che simula l'organo di una cavia.

Nella figura a fianco viene rappresentata schematicamente la struttura meccanica adottata per simulare l'effetto di filtraggio di un organo animale: essa è stata costruita riempiendo un contenitore cilindrico in vetro di dimensioni maggiori dell'impianto di circolazione con sferette di vetro, di diametro intorno a 0.5 mm; ciò costituisce un

tentativo di modellizzare la presenza di fitte reti di vasi sanguigni che si trovano all'interno di un organo

reale. Alle due estremità sono stati infine inseriti dei fasci di lana di vetro per evitare la fuoriuscita delle sfere durante le misure, permettendo contemporaneamente il passaggio della soluzione.

### 3.3.1 Taratura flussimetro

Il funzionamento del flussimetro utilizzato è garantito dalla casa madre in un intervallo di velocità di flusso comprese tra 50 ml/min e 500 ml/min; dovendo effettuare misure anche a 25 ml/min, è stato deciso di tarare lo strumento manualmente anche a velocità di flusso più bassi rispetto a quelle indicate dalla casa madre.

È stata quindi eseguita una serie di misure di velocità di flusso, utilizzando la pompa peristaltica per regolare il flusso ed è stato misurato il tempo per riempire interamente dei matracci tarati a capacità nota, attraverso un cronometro. Il rapporto tra il volume del contenitore, espresso in millilitri, ed il tempo di riempimento, espresso in minuti, corrisponde alla velocità di flusso reale, mentre il valore letto sul display del flussimetro è la risposta dello strumento; riportando in un grafico (in figura 55S) questi due parametri è stato ottenuto l'andamento riportato nella figura sottostante, dove è mostrato, per confronto, anche l'andamento ideale:

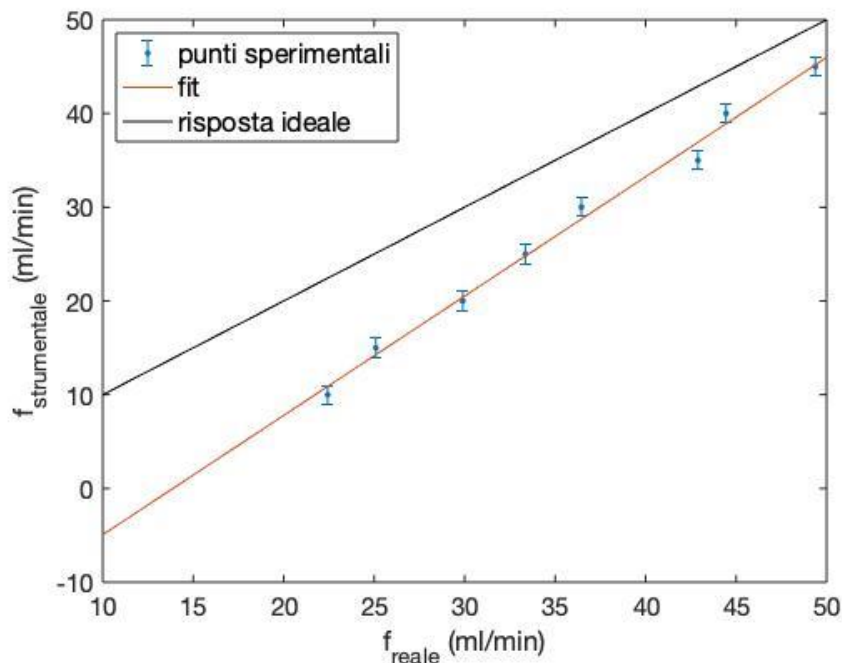


Fig. 55S: curva di taratura del flussimetro per velocità di flusso inferiori a quelle comprese nel range di funzionamento garantito dal produttore dello strumento.

Si nota che, all'avvicinarsi all'intervallo di velocità garantito dal produttore, il disaccordo tra la risposta reale e la risposta ideale diminuisce; dal grafico è stato estrapolato il valore di lettura del flussimetro che corrisponde ad una velocità di flusso reale di 25 ml/min, ovvero **14 ± 1 ml/min**.

### 3.4 Misure del profilo di concentrazione nel tempo delle nanoparticelle nel circuito

In quest'ultima parte vengono mostrati e commentati i risultati delle misure di cattura delle nanoparticelle sia in assenza che in presenza di una configurazione di magneti permanenti; tali misure sono state eseguite utilizzando le configurazioni di magneti descritte nel paragrafo 1 del presente capitolo e hanno lo scopo di simulare dei test *in vivo* su cavie; si vuole determinare, in particolare, il guadagno temporale nell'accumulo di nanoparticelle all'interno dell'organo applicando un campo magnetico. Una soluzione acquosa di SPIONs, con concentrazione di 0.025 g/L, è stata fatta scorrere all'interno del circuito per un tempo totale di sei ore e, ad intervalli di tempo regolari, sono stati effettuati prelievi di soluzione sui quali sono state effettuate misure di assorbanza sia con lo spettrofotometro che con il colorimetro, utilizzando la lunghezza d'onda della sorgente di 470 nm, basandosi sulle conclusioni emerse dalla fase di calibrazione. I dati di assorbanza raccolti con gli spettrometri sono stati convertiti in concentrazioni e, successivamente, essendo interessati alla frazione di nanoparticelle che sono state trattenute dall'organo, è stato calcolato il rapporto di ogni singolo valore misurato rispetto alla concentrazione misurata a  $t=0$  min per ciascuna serie di misure e tale rapporto è stato sottratto ad uno, valore di riferimento corrispondente alla frazione totale di SPIONs presenti in soluzione.

Definiamo la funzione della concentrazione  $y(C)$  la quantità rappresentativa della "cattura relativa" di nanoparticelle:

$$y(C) = 1 - \frac{C}{C_0} \quad (3.11)$$

Si noti che la concentrazione  $C$  è una funzione implicita del tempo  $t$ . Le curve  $y(C)$  vs  $t$  sono mostrate in figura 56S e 57S: il segnale da zero e tende idealmente ad uno, ovvero ad una situazione in cui le nanoparticelle vengono completamente catturate; in realtà ci si può aspettare che la cattura non sia totale ma che giunga ad un valore di regime e ciò è dovuto al fatto che le nanoparticelle aderiscono in parte anche alle pareti dei tubi in gomma, alla lana di vetro e, in misura minore, alle pareti dei tubi di vetro. Quest'ultimo fenomeno non costituisce un problema, in quanto esso si manifesta sia in presenza che in assenza dei magneti, per cui l'effetto si compensa nel momento in cui si confrontano le diverse curve. Al termine di ogni ciclo di misura, il circuito viene disassemblato e pulito, in particolare l'organo viene svuotato e, dopo lavaggio, riempito con nuove sfere di vetro pulite.

#### 3.4.1 Configurazione di magneti *over skin*

Inizialmente è stato studiato l'effetto sull'accumulo di particelle da parte della configurazione di quattro magneti, in particolare è stata utilizzata la configurazione NNNN in quanto, dai risultati delle prime misure, era risultato che ad essa è associato il più alto valore di  $\mathbf{B} \cdot \mathbf{grad}(\mathbf{B})$  e, pertanto, che essa è in grado di esercitare la maggiore forza magnetica sugli SPIONs.

I magneti sono stati posti al di sopra dell'organo tramite un supporto in materiale plastico (fig. 23) e i campioni di soluzione sono stati prelevati dal circuito ogni trenta minuti.

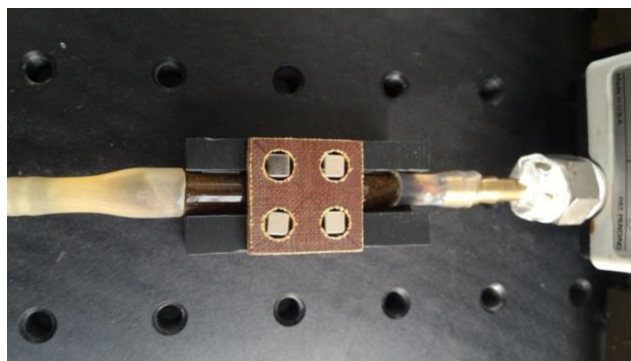


Fig. 23: configurazione di magneti posta al di sopra dell'organo in vetro, utilizzando un supporto.

### 3.4.2 Risultati

Di seguito sono mostrati i risultati delle misure di cattura, in presenza e in assenza di magneti, con una velocità di flusso della soluzione pari a 55 ml/min.

#### Colorimetro

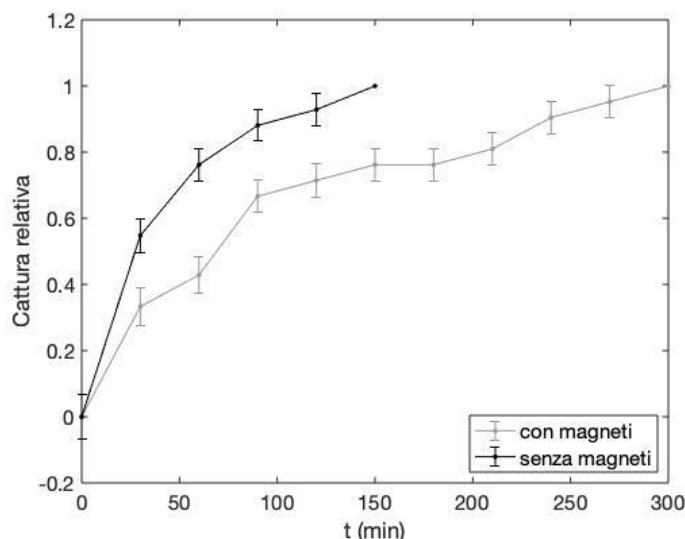


Fig. 56S: confronto tra l'accumulo di particelle in presenza e in assenza di magneti, misurato con il colorimetro.

#### Spettrofotometro

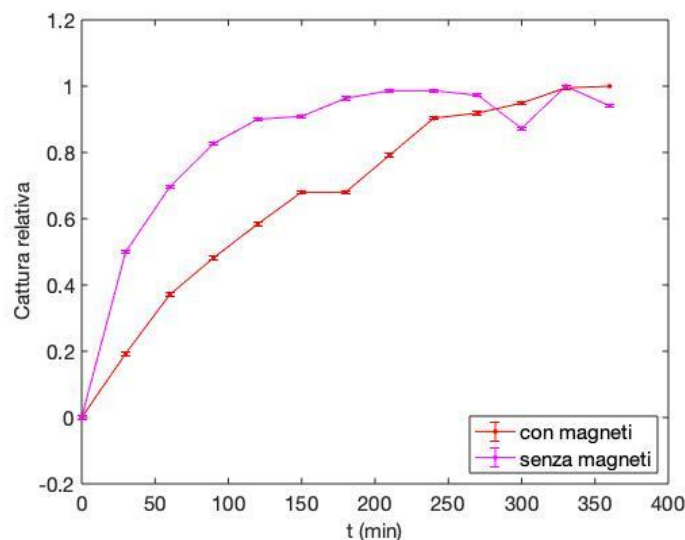


Fig. 57S confronto tra l'accumulo di particelle in presenza e in assenza di magneti, misurato con lo spettrofotometro.

### 3.4.3 Discussione

Si evince, analizzando i grafici, che la cattura in presenza di magneti risulta più lenta rispetto a quella "fisiologica", cioè dovuta alla presenza delle sfere di vetro all'interno dell'organo; per spiegare questo risultato, si è supposto che l'effetto della configurazione di magneti sia stato nullo o controproducente. Osserviamo inoltre che vi è una distanza di diversi millimetri tra i magneti e la

superficie dell'organo, poiché tale configurazione è stata pensata per essere applicata all'esterno dell'organismo.

Pertanto, la conclusione su queste prime misure è che l'effetto della configurazione a quattro magneti non può essere studiato con l'apparato così costruito.

#### 3.4.4 Coppia di magneti per applicazione *under skin*

Successivamente, sono state effettuate le medesime misure di cattura sulla configurazione *under skin* composta da magneti orientati in versi opposti (NS) ed attaccati alla superficie dell'organo tramite bi-scotch, tra i quali è stato posto un separatore in PTFE (fig. 24).

Le misure sono state effettuate sempre per un tempo complessivo di sei ore, ma prelevando ogni quarto d'ora invece che ogni mezz'ora, in modo da ottenere un andamento più definito e più facilmente modellizzabile; al termine delle misure, è stato possibile notare visivamente un accumulo di nanoparticelle in corrispondenza dei magneti (fig. 24).

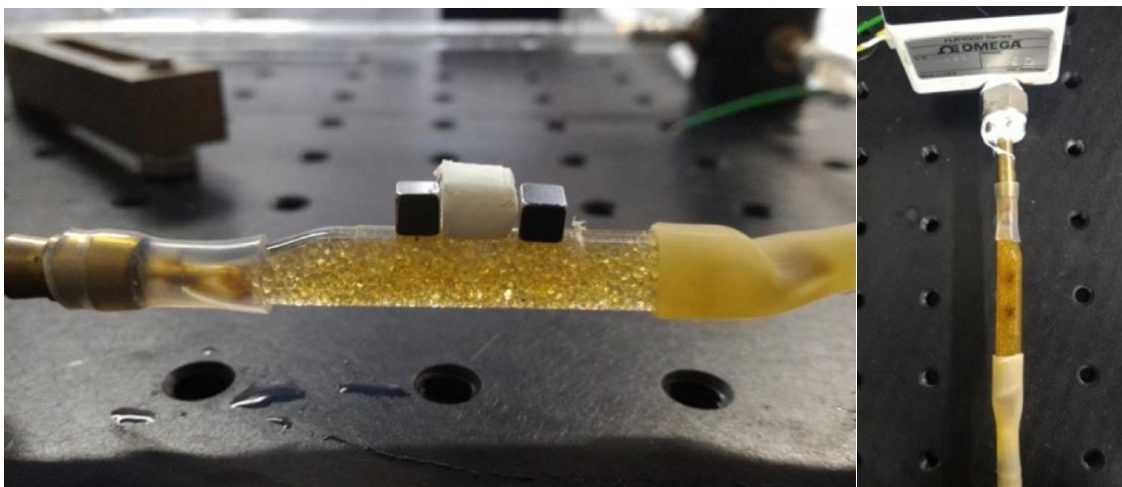


Fig. 24: configurazione costituita da una coppia di magneti tra i quali è posto un separatore in PTFE (sinistra); immagine che mostra l'effetto dei magneti sulle nanoparticelle in soluzione al termine di una misura (destra).

Sono state effettuate in totale sei serie di misure, tre senza applicare i magneti e tre con i magneti applicati; dai risultati ottenuti sono state calcolate delle curve medie, dopo aver convertito i valori di assorbanza in concentrazioni e successivamente è stata ripetuta la stessa procedura utilizzata per l'altra configurazione per ottenere la frazione di SPIONs catturata dall'organo.

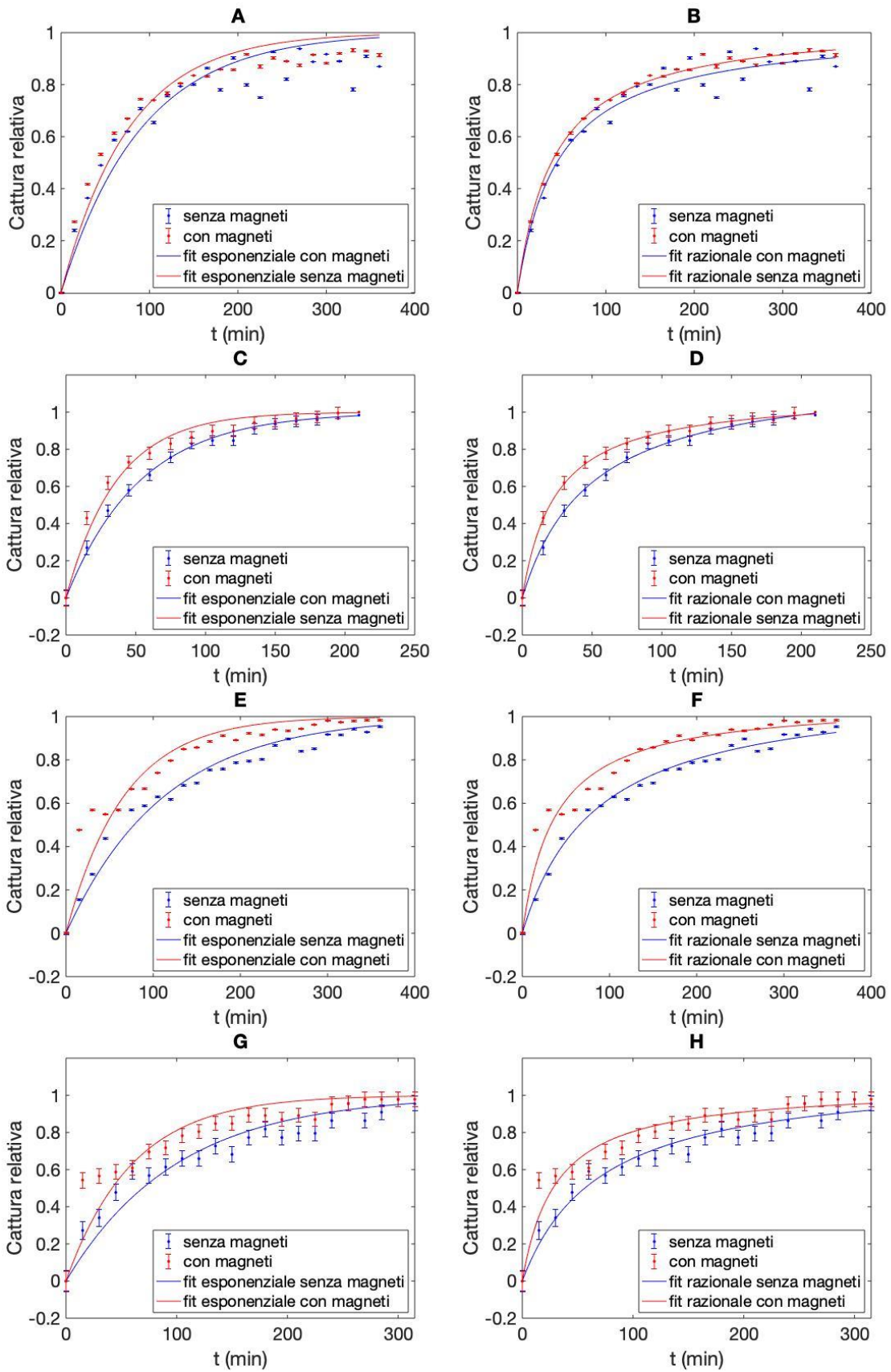
L'andamento delle curve di cattura è stato modellizzato utilizzando due tipi di fit: il primo di tipo esponenziale e il secondo razionale, ovvero dato dal rapporto di due polinomi di primo grado nel tempo caratterizzati da coefficienti di proporzionalità differenti:

$$C(t) = 1 - e^{(-b_e t)} \quad \text{esponenziale} \quad (3.12)$$

$$C(t) = 1 - \frac{[(a_r t) + b_r]}{[(c_r t) + b_r]} \quad \text{razionale} \quad (3.13)$$

#### 3.4.5 Risultati

Di seguito (fig. 58S A-H) sono riportate le curve  $y(C)$  vs  $t$  determinate dai dati raccolti con spettrofotometro (A, B, E, F) e colorimetro (C, D, G, H), a 55 ml/min (A, B, C, D) e 25 ml/min (E, F, G, H) di velocità di flusso. Sono mostrati, in grafici separati, i fit esponenziale e razionale, confrontati con i dati sperimentali.



*Fig. 58S: curve di raccolta di nanoparticelle in presenza ed in assenza di magneti, ottenute modellizzando i dati raccolti con i due strumenti utilizzando due tipi di fit; A, B, E, F: curve relative ai dati ottenuti con lo spettrofotometro; C, D, G, H: curve relative ai dati ottenuti con il colorimetro; A, B, C, D: velocità di flusso 55 ml/min; E, F, G, H: velocità di flusso 25 ml/min.*

Nella tabella sottostante sono riportati i parametri delle curve di fit utilizzate per modellizzare i dati sperimentali ( $b_e$  per il fit esponenziale e  $a_r$ ,  $b_r$  e  $c_r$  per il fit razionale), assieme ai valori di  $R^2$ :

Figura	$V_{Flusso}$ (ml/min)	Strumento	Fit	Parametri (senza magneti)	Parametri (con magneti)
A	55	UV	esponenziale	$b_e=0.01104$ $R^2=0.8659$	$b_e=0.01307$ $R^2=0.9228$
B	55	UV	razionale	$a_r=-0.07123$ $b_r=166.8$ $c_r=3.606$ $R^2=0.9561$	$a_r=-0.1586$ $b_r=156.3$ $c_r=3.758$ $R^2=0.994$
C	55	Col	esponenziale	$b_e=0.01879$ $R^2=0.9953$	$b_e=0.0275$ $R^2=0.9733$
D	55	Col	razionale	$a_r=-0.8174$ $b_r=177.1$ $c_r=3.641$ $R^2=0.9971$	$a_r=-0.2223$ $b_r=51.68$ $c_r=2.167$ $R^2=0.9989$
E	25	UV	esponenziale	$b_e=0.008879$ $R^2=0.9526$	$b_e=0.01509$ $R^2=0.8831$
F	25	UV	razionale	$a_r=-0.5588$ $b_r=331.4$ $c_r=3.961$ $R^2=0.983$	$a_r=-0.2385$ $b_r=124.1$ $c_r=3.332$ $R^2=0.9497$
G	25	Col	esponenziale	$b_e=0.009904$ $R^2=0.9148$	$b_e=0.01653$ $R^2=0.8243$
H	25	Col	razionale	$a_r=-0.1756$ $b_r=114$ $c_r=1.694$ $R^2=0.9651$	$a_r=-0.03949$ $b_r=43.18$ $c_r=1.545$ $R^2=0.9373$

In generale, il fit razionale risulta essere quello che meglio descrive il comportamento dei dati sperimentali, tuttavia il fit esponenziale ha il vantaggio di essere un modello più semplice, essendo necessario un unico parametro per definirne la funzione. Inoltre, è molto più immediato il confronto tra le curve che descrivono la raccolta in presenza dei magneti e quelle in assenza dei magneti considerando il parametro del fit esponenziale: più  $b_e$  è grande, più la raccolta di nanoparticelle descritta dalla curva è rapida.



Nella tabella seguente sono riportati invece alcuni dati specifici estrapolati dai modelli utilizzati: in particolare, sono mostrati i tempi corrispondenti al raggiungimento del 50% e dell'80% di nanoparticelle catturate, in presenza ( $t_M$ ) e in assenza ( $t_{NM}$ ) di magneti, esplicitando anche il guadagno temporale dovuto alla presenza dei magneti ( $\Delta t = t_{NM} - t_M$ ); tali valori sono stati estrapolati dalle curve di fit esponenziale e razionale.

V <sub>flusso</sub> (ml/min)	Strumento	Fit	C <sub>rel</sub> (%)	t <sub>M</sub> (min) ±0.1	t <sub>NM</sub> (min) ±0.1	Δt (min) ±0.2
55	UV	esponenziale	50	53	62.8	9.8
55	UV	esponenziale	80	123.1	145.8	22.7
55	UV	razionale	50	38.4	44.5	6.1
55	UV	razionale	80	137.4	168.4	31
55	Col	esponenziale	50	25.2	36.9	11.7
55	Col	esponenziale	80	58.5	85.6	27.1
55	Col	razionale	50	19.8	33.6	13.8
55	Col	razionale	80	63.1	91.7	28.6
25	UV	esponenziale	50	46	78.1	32.1
25	UV	esponenziale	80	106.6	181.2	74.6
25	UV	razionale	50	32.6	65.6	33
25	UV	razionale	80	109.7	196.3	86.6
25	Col	esponenziale	50	41.6	69.2	27.6
25	Col	esponenziale	80	96.5	160.5	64
25	Col	razionale	50	27.6	56.3	28.7
25	Col	razionale	80	97.6	173	76.4

### 3.4.6 Discussione

Dai dati estrapolati si possono fare le seguenti considerazioni:

1) L'accumulo di nanoparticelle in corrispondenza dell'organo è più veloce se sono applicati i magneti

Tale effetto, non misurabile per la configurazione di quattro magneti, è invece evidente utilizzando la coppia di magneti che simula un'applicazione 'under skin'; ciò è dovuto sia alla minore distanza tra la configurazione e l'organo e quindi alla maggiore forza magnetica esercitata sulle nanoparticelle in soluzione, sia alla geometria della configurazione.

2) Il guadagno di tempo per raggiungere una certa percentuale di raccolta è più elevato in corrispondenza della velocità di flusso più bassa.

La forza totale che agisce sugli SPIONs dipende sia dal flusso della soluzione che scorre che dal prodotto tra il campo ed il gradiente, quindi all'aumentare della velocità di flusso, la forza necessaria per contrastare il flusso, il quale tenderebbe a trascinare con sé le particelle, aumenta.

3) Lo spettrofotometro UV-visibile ed il colorimetro mostrano risposte differenti.

In particolare, i valori estrapolati dalle curve di fit relative ai dati ottenuti con il colorimetro sono sempre inferiori rispetto a quelli delle curve ricavate dai dati misurati con lo spettrofotometro: in media la differenza  $t_{UV} - t_{Col}$  è **28.78 min**. Tuttavia, nel momento in cui si calcola il guadagno temporale, tale discrepanza in parte si riduce: la differenza tra i guadagni temporali ( $\Delta t_{UV} - \Delta t_{Col}$ ) calcolati risulta in media **6.15 min**.

I dati ottenuti con lo spettrofotometro, essendo quest'ultimo lo strumento più accurato e preciso, sono da considerare i più affidabili.

### 3.5 Riferimenti bibliografici del capitolo 3

- [42] J. Taylor, “Introduzione all’analisi degli errori, lo studio delle incertezze nelle misure fisiche”, Zanichelli, II ed., 80-81 (2014)
- [43] V. Arora, A. Sood, J. Shah, R.K. Kotnala, T. Jain, “Synthesis and characterization of thiolated pectin stabilized gold coated magnetic nanoparticles”, *Materials Chemistry and Physics* 173, 161-167 (2016).
- [44] H. Maleki, A. Simchi, M. Imani, “Size-controlled synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and their surface coating by gold for biomedical applications”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 324, 3997–4005 (2012).
- [45] F. Mohammad, G. Balaji, A. Weber, R. Uppu, C. Kumar, “Influence of Gold Nanoshell on Hyperthermia of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) (Supporting Information)”, *Phys. Chem. C* 114, 19194–19201 (2010).
- [46] C. Justin, A. Samrot, D. Sruthi, C. Sahithya, K. Bhavya, C. Saipriya, “Preparation, characterization and utilization of coreshell super paramagnetic iron oxide nanoparticles for curcumin delivery”, *PLoS ONE* 13, 7 (2018).
- [47] P. Zhao, M. Liu, T. Madanayake, C. Reena, M. Zheng, Z. Cheng, Y. Huang, X. Wang, “Cationic porphyrin@SPION nanospheres as multifunctional anticancer therapeutics: magnetic targeting, photodynamic potential and bio-safety research” *RSC Adv.* 6, 103137 (2016).
- [48] A. Gupta, S. Wells, “Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies”, *IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIOSCIENCE* 3, 1 (2004).
- [49] [https://didattica-2000.archived.uniroma2.it/MA2/deposito/spettroscopia\\_UV.pdf](https://didattica-2000.archived.uniroma2.it/MA2/deposito/spettroscopia_UV.pdf)
- [50] <https://mercurilab.units.it/it/tags/strumentazione>
- [51] [http://www.dst.uniroma1.it/sites/default/files/Laboratori/Schema\\_ICP-AES\\_1.jpg](http://www.dst.uniroma1.it/sites/default/files/Laboratori/Schema_ICP-AES_1.jpg)
- [52] J. Hwang, W. Wang, “Application of ICP-AES to Analysis of Solutions”, *APPLIED SPECTROSCOPY REVIEWS*, 30(4), 231-350 (1995).
- [53] S. Laurent, A. Saei, S. Behzadi, A. Panahifar, M. Mahmoudi, “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges”, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11:9, 1449-1470 (2014).
- [54] N. Depalo, R. Iacobazzi, G. Valente, I. Arduino, S. Villa, F. Canepa, V. Laquintana, E. Fanizza, M. Striccoli, A. Cutrignelli, A. Lopodota, L. Porcelli, A. Azzariti, M. Franco, M. Curri, N. Denora, “Sorafenib delivery nanoplatform based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles magnetically targets hepatocellular carcinoma”, *Nano Research* 10, 2431–2448 (2017).
- [55] K. Al-Jamal, J. Bai, J. Wang, A. Protti, P. Southern, L. Bogart, H. Heidari, X. Li, A. Cakebread, D. Asker, W. Al-Jamal, A. Shah, S. Bals, J. Sosabowski, Q. Pankhurst, “Magnetic Drug Targeting: Preclinical in Vivo Studies, Mathematical Modeling, and Extrapolation to Humans”, *NanoLett.* 16, 5652–5660 (2016).

## 4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Sono state studiate due diverse tipologie di configurazioni di magneti per simulare due diverse possibili applicazioni *in vivo*: una configurazione a quattro magneti con magneti diversi e diverse possibili orientazioni per *magnetic drug delivery* “*over skin*” oppure una configurazione a due magneti separati da teflon (non magnetico) per simulare esperimenti *in vivo* “*under skin*”.

Una collocazione *over skin* dei magneti è poco invasiva per la cavia e può anche essere mantenuta per diversi giorni senza indurre problemi fisiologici di alcun tipo, invece l’uso di magneti “*under skin*” implica un minimo intervento chirurgico sulla cavia e non può essere protratto nel tempo, in quanto vi è il rischio dell’insorgenza di infezioni.

I risultati delle mappature sulle configurazioni hanno evidenziato che ai magneti di forma cubica è associato un valore più elevato di  $B_z \cdot \text{grad}(B_z)$  rispetto ai magneti esagonali, pertanto sono in grado di esercitare un’influenza maggiore sulle nanoparticelle iniettate in un organismo e sono stati utilizzati per le successive misure sul circuito; per simulare un’applicazione “*under skin*” è stata utilizzata una configurazione composta da magneti orientati in direzione opposta (NS), mentre ci si è avvalsi di una configurazione a quattro magneti orientati tutti nella stessa direzione (NNNN) per ricreare le condizioni di un test *in vivo* in cui i magneti sono applicati dall’esterno dell’organismo.

Dopo aver determinato le configurazioni di magneti da testare, è stato sviluppato un sistema per determinare la concentrazione di nanoparticelle presenti in soluzione attraverso la misura dell’assorbimento luminoso, con l’uso di due spettrofotometri; è stata quindi costruita una curva assorbanza-concentrazione in corrispondenza di 4 valori di lunghezza d’onda della radiazione incidente (430 nm, 470 nm, 565 nm e 635 nm) e sono state determinate le condizioni migliori per effettuare le misure sul circuito.

Il circuito è stato costruito utilizzando una pompa peristaltica, che simula un cuore, dei tubi di vetro opportunamente sagomati, un organo simulato ed un flussimetro per controllare la velocità di flusso della soluzione circolante. Si è infine proceduto alle misure di cattura delle nanoparticelle, effettuate sia in presenza che in assenza di magneti, per valutare l’effetto di questi ultimi: la configurazione di magneti da applicare *over skin* non ha mostrato effetti sulla raccolta di SPIONs, mentre la coppia di magneti separati da PTFE, pensata per essere inserita sottopelle, ha incrementato l’accumulo di nanoparticelle in corrispondenza dell’organo. In particolare, sono state effettuate misure a due velocità di flusso della soluzione (25 ml/min e 55 ml/min) che hanno fornito come risultato una cattura superiore dovuta ai magneti in condizioni di velocità di flusso inferiori; inoltre, l’effetto dei magneti è risultato più intenso in corrispondenza della velocità di flusso più bassa.

Le prove di accumulo in dinamico, infatti, hanno mostrato che l’effetto della configurazione a quattro magneti non è abbastanza intenso da poter essere misurato con il circuito che è stato realizzato e ciò è dovuto anche al fatto che, essendo tale configurazione pensata per un utilizzo “*over skin*”, è stata posta ad una distanza dall’organo di alcuni millimetri, determinando una forte riduzione della forza magnetica percepita dalle nanoparticelle. L’uso della coppia di magneti cubici, invece, incrementa l’accumulo di nanoparticelle nel tempo: in altre parole, il tempo necessario per raggiungere una certa percentuale di SPIONs catturati è minore se vengono applicati i magneti. L’effetto positivo di un campo magnetico sull’accumulo di nanoparticelle in un organo è già stato misurato in esperimenti *in vivo* eseguiti su cavie da laboratorio [55], inoltre, il guadagno temporale è maggiore in corrispondenza della velocità di flusso della soluzione più bassa, ovvero 25 ml/min: ciò è spiegabile se si considera che la forza associata al flusso è più bassa, quindi in tal caso l’effetto del campo magnetico è più marcato.

Per quanto riguarda un confronto tra i due fit, quello razionale è risultato essere il più vicino all’andamento reale dei dati, infatti i valori di  $R^2$  sono più vicini ad 1, tuttavia il fit esponenziale è un modello molto più semplice in quanto caratterizzato da un unico parametro (contro i tre dell’altro).

La conclusione a cui si giunge invece dal confronto tra spettrofotometro e colorimetro è che i due strumenti forniscono risposte piuttosto diverse, come si può notare confrontando i valori estrapolati dei tempi riportati nelle tabelle sovrastanti; tuttavia, i risultati del guadagno temporale ( $\Delta t$ ) mostrano

una discrepanza molto minore, al massimo di dieci minuti. Ciò accade poiché vi è un errore sistematico relativo alla risposta del colorimetro, infatti risulta che i valori di tempo estrapolati sono sempre inferiori rispetto a quelli ottenuti con lo spettrofotometro e nel momento in cui si esegue la sottrazione per calcolare il guadagno temporale, gli errori in parte si compensano. In definitiva, il colorimetro, pur essendo uno strumento molto più comodo e veloce da utilizzare, non è sufficientemente accurato per poter essere utilizzato come strumento di ricerca.

In questo lavoro di tesi si è cercato di ottenere alcune informazioni utili per applicazioni *in vivo* di *magnetic drug delivery*.

L'utilizzo di una configurazione di magneti permanenti che possa veicolare e accumulare, su un particolare organo di una cavia di laboratorio, un certo numero di particelle magnetiche opportunamente funzionalizzate e recanti un farmaco, presuppone la conoscenza di alcune informazioni di base:

1. il tipo di configurazione di magneti permanenti;
2. il modo di applicazione dei magneti;
3. il tempo necessario per avere il massimo accumulo possibile senza pregiudicare la salute dell'animale.

L'ottenimento di queste informazioni ha richiesto alcune procedure:

- a) studio di diverse configurazioni di magneti permanenti a seconda anche del tipo di applicazione (sopra pelle o sottopelle);
- b) la costruzione di un circuito dinamico che simuli la circolazione sanguigna passante per un organo della cavia;
- c) la determinazione della variazione di concentrazione delle nanoparticelle nel tempo per poter fornire indicazioni sul tempo di applicazione dei magneti.

La realizzazione di sistemi *in vitro* di questo tipo, nell'ambito biomedicale relativo al trasporto di farmaci veicolato tramite un campo magnetico, è un ambito di ricerca relativamente recente, sono pochi infatti gli studi di questo tipo reperibili in letteratura; per questo motivo, sono stati selezionati solo alcuni parametri da variare (velocità di flusso, tipo di fit, configurazione di magneti) mentre gli altri sono stati fissati in principio, come ad esempio la concentrazione della soluzione di partenza, mantenuta sempre a 0.025 g/L e l'utilizzo di nanoparticelle non funzionalizzate (*bare SPIONs*). I passi successivi in questo tipo di studi *in vitro* includeranno gradualmente altri parametri: sarà necessario, ad esempio, eseguire misure a diverse concentrazioni delle soluzioni di partenza, con diverse configurazioni di magneti oppure variando la forma e le dimensioni dell'organo simulatore. Il traguardo che si vuole raggiungere è quello di sviluppare un robusto ed efficiente metodo di simulazione *in vitro* delle condizioni che si verificano in terapie di *magnetic drug delivery* e *magnetic hyperthermia*, che serva da sostegno ai test preclinici *in vivo*.

## APPENDICE

### A.1 Interazioni di scambio e ferromagnetismo

Le interazioni più forti tra momenti magnetici all'interno della materia sono le interazioni cosiddette di scambio. Le interazioni dipolari, associate all'energia di due dipoli magnetici  $\mu_1$  e  $\mu_2$  posti a distanza  $r$  l'uno dall'altro [23]:

$$E = \frac{\mu_0}{4\pi r^3} \left[ \vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2 - \frac{3(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r})}{r^2} \right] \quad (\text{A.1})$$

sono molto deboli e acquisiscono importanza unicamente a temperature dell'ordine dei millikelvin. Le interazioni di scambio sono responsabili degli ordinamenti magnetici a lungo raggio e sono dovute sostanzialmente all'interazione tra spin elettronici.

Si consideri inizialmente un sistema di due elettroni con coordinate spaziali  $\mathbf{r}_1$  e  $\mathbf{r}_2$  il cui stato è descritto dalle funzioni d'onda  $\psi_a$  e  $\psi_b$ : per definire la funzione d'onda complessiva di uno stato legato si deve tenere conto del fatto che essa deve essere globalmente antisimmetrica rispetto allo scambio di due elettroni. Di conseguenza, il termine che descrive lo spin può essere o simmetrico (stato di tripletto,  $S=1$ ) oppure antisimmetrico (stato di singoletto,  $S=0$ ). Tra i due stati esiste una differenza di energia,  $E_S - E_T$ , che può essere espressa in termini del prodotto  $S_1 \cdot S_2$ , cioè il prodotto tra gli operatori momento angolare di spin applicati ai due elettroni. Questo prodotto vale  $-\frac{3}{4}$  per un elettrone nello stato di singoletto e  $\frac{1}{4}$  per uno nello stato di tripletto.

L'Hamiltoniana del sistema può essere scritta come:

$$\hat{H} = \frac{1}{4}(E_S + 3E_T) - (E_S - E_T)\vec{S}_1 \cdot \vec{S}_2 \quad (\text{A.2})$$

Il secondo termine dell'espressione è spin-dipendente e può essere scritto esplicitando l'integrale di scambio:

$$\hat{H}^{spin} = -2J\vec{S}_1 \cdot \vec{S}_2 \quad (\text{A.3})$$

$$J = \frac{(E_S - E_T)}{2} = \int \psi_a^*(\vec{r}_1)\psi_b^*(\vec{r}_2)\hat{H}\psi_a(\vec{r}_2)\psi_b(\vec{r}_1)d\vec{r}_1d\vec{r}_2 \quad (\text{A.4})$$

Il calcolo dell'integrale di scambio in un sistema multi-elettronico è molto complesso, tuttavia, servendosi del modello di Heisenberg, si può scrivere l'Hamiltoniana globale come somma di interazioni tra coppie di spin:

$$\hat{H} = -\sum_{ij} J_{ij}\vec{S}_i \cdot \vec{S}_j \quad (\text{A.5})$$

Gli elettroni interagenti all'interno di una coppia possono essere sullo stesso atomo oppure su atomi vicini: in quest'ultimo caso gli stati legati sono combinazioni di stati in cui la densità elettronica è massima su entrambi gli atomi, indicando quindi una delocalizzazione degli elettroni. Ciò implica che, siccome gli elettroni sono soggetti ad un confinamento ridotto, vi è un guadagno di energia cinetica per il sistema.

Per una descrizione del ferromagnetismo si può utilizzare il modello di Weiss; la Hamiltoniana di un sistema ferromagnetico si può scrivere come:

$$\hat{H} = -\sum_{ij} J_{ij} \vec{S}_i \cdot \vec{S}_j + g\mu_B \sum_j \vec{S}_j \cdot \vec{B} \quad (\text{A.6})$$

Il secondo termine è l'energia di Zeeman, cioè l'energia posseduta da un sistema di elettroni in un campo magnetico  $B$ .

Nell'ambito del modello di Weiss, si approssimano gli effetti delle interazioni di scambio definendo un campo molecolare  $\mathbf{B}_{mf}$ , agente su uno spin nel sito  $i$ -esimo e prodotto dagli spin vicini, considerato identico per l'intero sistema.

Il termine di scambio della Hamiltoniana si può perciò scrivere come:

$$-2\vec{S}_i \sum_{ij} J_{ij} \vec{S}_j = g\mu_B \vec{S}_i \cdot \vec{B}_{mf} \quad (\text{A.7})$$

La Hamiltoniana totale è pari a:

$$\hat{H} = g\mu_B \sum_j \vec{S}_j \cdot (\vec{B} + \vec{B}_{mf}) \quad (\text{A.8})$$

L'espressione è equivalente a quella di una Hamiltoniana che descrive un paramagnete sottoposto ad un campo magnetico  $\mathbf{B} + \mathbf{B}_{mf}$ .

È possibile, inoltre, correlare il campo molecolare alla magnetizzazione definendo un costante di proporzionalità  $\lambda$ :

$$\vec{B}_{mf} = \lambda \vec{M} \quad \text{con } \lambda \gg 0 \quad (\text{A.9})$$

A basse temperature i momenti magnetici, anche a campo esterno nullo, sono in grado di orientarsi data la presenza di  $\mathbf{B}_{mf}$ , mentre ad alte temperature le fluttuazioni termiche tendono a disallineare i momenti magnetici determinando una caduta della magnetizzazione. In corrispondenza della temperatura critica  $T_c$ , l'ordine magnetico risulta completamente distrutto dalle fluttuazioni:

$$T_c = g_j \mu_B (J + 1) \frac{\lambda \vec{M}_{sat}}{3k_B} = \frac{n\lambda\mu_B^2}{3k_B} \quad (\text{A.10})$$

Le formule riportate finora si riferiscono ad un modello di Weiss in cui, per semplicità, si è supposto che il sistema considerato avesse un momento angolare nullo ( $L=0$ , quindi  $J = S$ ); ciò è adeguato ad esempio per descrivere sistemi con elettroni 3d, ma non è sempre vero.

Nel caso più generale,  $\mathbf{J} = \mathbf{L} + \mathbf{S}$  e la temperatura critica ha la seguente forma:

$$T_c = \left[ 2Z \frac{(g_j - 1)J}{3k_B} \right] J(J + 1) \quad (\text{A.11})$$

## A.2 Domini magnetici

Il ferromagnetismo è uno stato termodinamico della materia, caratterizzato da una temperatura di transizione definita ( $T_c$ ) che ne delimita il campo di esistenza.

Questo aspetto è meglio evidenziato se per la descrizione del fenomeno si considera il modello di Landau per un ferromagnete.

La teoria, di carattere generale, sfrutta considerazioni di tipo termodinamico per definire una transizione di fase, e si riescono in questa maniera a descrivere più dettagliatamente determinati aspetti, come ad esempio la formazione dei domini magnetici.

Il fulcro del modello di Landau risiede nella definizione di un parametro d'ordine (la cui identità fisica a priori è sconosciuta e viene identificata durante i calcoli) rispetto al quale esprimere e calcolare l'energia libera del sistema. Nel caso della descrizione di una transizione ferromagnetica, il parametro d'ordine coincide con la magnetizzazione  $\mathbf{M}$  e in funzione di essa viene calcolata l'energia libera di Helmholtz del sistema. Si utilizza a tal proposito uno sviluppo in serie di potenze in  $M$ , fermandosi al secondo termine, con esponenti pari, siccome non vi è alcuna differenza da un punto di vista energetico tra un'orientazione dei momenti magnetici verso 'l'alto' piuttosto che verso il 'basso' quando non è presente un campo magnetico esterno [23]:

$$F(M) = F_0 + a(T)M^2 + bM^4 \quad (\text{A.12})$$

$F_0$  e  $b$  sono termini costanti.

Si riesce a descrivere adeguatamente la transizione di fase se si ammette che  $a(T)$  cambi segno a  $T=T_c$ , per cui:

$$a(T) = a_0(T - T_c) \quad (\text{A.13})$$

A questo punto, per ricavare lo stato fondamentale del sistema, si ricercano i minimi dell'energia libera:

$$\frac{\partial F}{\partial M} = 2a_0(T - T_c)M + 4bM^3 = 2M(a_0(T - T_c) + 2bM^2) = 0 \quad (\text{A.14})$$

Risolvendo:

$$M = 0 \quad \text{per } T \geq T_c \quad (\text{A.15})$$

$$M = \pm \left[ \frac{a_0(T - T_c)}{2b} \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{per } T < T_c \quad (\text{A.16})$$

A  $T=T_c$  vi è una rottura della simmetria del sistema: preferenzialmente, i momenti magnetici si orientano in una direzione piuttosto che in un'altra. Nei casi in cui questa rottura avviene in modi diversi all'interno del materiale, si formano molteplici zone all'interno delle quali i momenti si orientano lungo direzioni preferenziali differenti: si tratta dei domini magnetici.

Diversi domini sono separati tra loro da pareti denominate bordi di dominio, all'interno delle quali si ha un passaggio progressivo da un'orientazione ad un'altra.

La formazione dei domini è correlata ad un bilancio energetico tra il costo per la creazione del dominio stesso e l'energia di demagnetizzazione.

In corrispondenza dei bordi di un materiale ferromagnetico, siccome  $\nabla H = -\nabla M$ , si ha una brusca variazione di  $M$  che comporta una divergenza del campo magnetico e ciò causa l'insorgenza di campi di demagnetizzazione  $\mathbf{H}_d$  che comportano un costo energetico di  $B^2/2\mu_0$  J per unità di volume.

Nello specifico, l'energia di demagnetizzazione vale:

$$E_{dm} = -\frac{\mu_0}{2} \int_V \vec{M} \cdot \vec{H}_d d\tau \quad (\text{A.17})$$

Per un campione di forma ellissoidale, magnetizzato in direzione di uno degli assi principali, l'espressione si riduce a:

$$E_{dm} = \frac{\mu_0}{2} NM^2V \quad (\text{A.18})$$

Con  $N$  il fattore di demagnetizzazione e  $V$  il volume del campione.

L'energia di demagnetizzazione viene ridotta attraverso la formazione dei domini, tuttavia quest'ultimo processo ha anch'esso un costo energetico, dato in particolare dal bilancio di due contributi:

### 1) Energia di disallineamento

due spin la cui orientazione relativa differisce di un angolo  $\theta$  possiedono un'energia pari a:

$$E = -2JS^2 \cos \theta \quad (\text{A.19})$$

Se  $\theta = 0$ , l'energia è minima ( $E_{\min} = -2JS^2$ ), mentre raggiunge il suo valore massimo se  $\theta = \pi$  ( $E_{\max} = 2JS^2$ ).

L'energia media di disallineamento considerando un angolo generico non nullo e  $\ll 1$  è:

$$E_m = JS^2 \theta^2 \quad (\text{A.20})$$

Nel caso di un cosiddetto muro di Bloch (fig. 25a), una parete che separa domini i cui momenti sono orientati di  $180^\circ$  tra loro e in cui si ha una progressiva rotazione su piani paralleli rispetto al piano del muro, una rotazione di un angolo  $\pi$  avviene in un numero  $N$  di siti di spin, per cui l'energia di una fila di spin è pari a:

$$NE_m = JS^2 \frac{\pi^2}{N} \quad (\text{A.21})$$

Considerando complessivamente i piani, dato  $1/a$  il numero di file di spin per ogni  $m^2$  di muro di Bloch, si ha che la densità superficiale di energia associata al bordo di dominio è pari a:

$$\sigma_{BW} = JS^2 \frac{\pi^2}{Na^2} \quad (\text{A.22})$$

Al tendere di  $N$  ad infinito, quest'energia tende a zero. Questo significa che il sistema, in assenza di altri contributi energetici, tenderebbe ad essere costituito da un unico dominio.

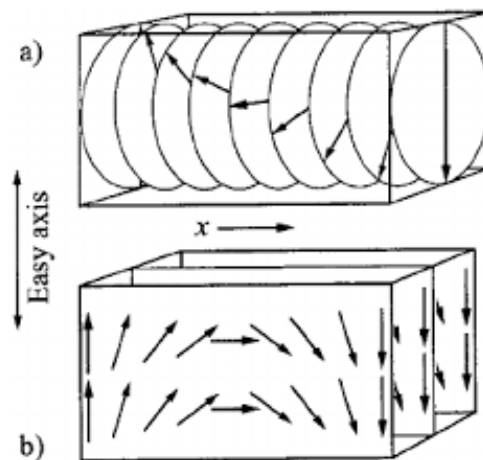


Fig. 25: rappresentazione di un muro di Bloch (a) e di Neel (b) [23].



## 2) Anisotropia magnetocristallina

Un solido cristallino è generalmente anisotropo, poiché gli atomi o le molecole sono organizzati in determinate strutture, caratterizzate da valori di lunghezze ed angoli di legame differenti nelle tre dimensioni.

Per quanto riguarda le proprietà magnetiche, i cristalli possiedono un asse di facile magnetizzazione ed uno di difficile magnetizzazione, quindi esistono direzioni preferenziali di orientazione dei momenti magnetici per le quali l'energia è minima.

Nel caso, ad esempio, del Co, il termine energetico relativo all'anisotropia si scrive come:

$$E_{an} = K_1 \sin^2 \theta + K_2 \sin^4 \theta \quad (\text{A.23})$$

Con  $\theta$  l'angolo tra la magnetizzazione e la perpendicolare ai piani esagonali della struttura.

In un ferromagnete quindi, all'interno dei singoli domini i momenti magnetici tenderanno ad allinearsi in direzione degli assi di facile magnetizzazione della struttura, mentre nei bordi, essendoci una rotazione progressiva dei momenti verso la direzione preferenziale del dominio adiacente, essi avranno necessariamente una componente del momento non nulla in direzione di un asse di difficile magnetizzazione, determinando un incremento di energia.

Se per semplicità si assume un'espressione per la densità di anisotropia energetica del tipo  $K \sin^2 \theta$ , con direzioni preferenziali 0 e  $\pi$ , e considerando un effetto globale, si può calcolare il contributo relativo ad un muro di Bloch:

$$E_{BW}^{an} = \frac{N}{\pi} \int_0^\pi K \sin^2 \theta d\theta = \frac{NK}{2} \quad (\text{A.24})$$

La densità superficiale totale di energia per un muro di Bloch è quindi pari a:

$$\sigma_{BW}^{tot} = JS^2 \frac{\pi^2}{Na^2} + \frac{NKa}{2} \quad (\text{A.25})$$

La configurazione di equilibrio si ricava ponendo  $dE_{BW}/dN = 0$ , ottenendo quindi:

$$N = \pi S \left( \frac{2J}{Ka^3} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.26})$$

Di conseguenza, lo spessore di un muro di Bloch è pari a:

$$\delta = Na = \pi S \left( \frac{2J}{Ka} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{A.27})$$

### A.3 Nanomagnetismo

Avvalendosi della Teoria del Superparamagnetismo, si vuole determinare la magnetizzazione di un insieme di nanoparticelle, ciascuna costituita da un singolo dominio magnetico; il sistema si trova alla temperatura  $T$ , sottoposto ad un campo magnetico  $H$  e in uno stato superparamagnetico.

Lo sviluppo del calcolo è simile a quello usato per ricavare la magnetizzazione di un sistema paramagnetico, in quanto i momenti magnetici all'interno delle singole particelle sono ferromagneticamente accoppiati tra loro e ciascuna particella è costituita da un singolo dominio; l'unica differenza è che i momenti considerati sono più grandi.

L'insieme di momenti magnetici segue una distribuzione di Boltzmann relativamente al campo magnetico; l'energia potenziale di ciascun momento magnetico si scrive come [26]:

$$E_B = -\mu H \cos \theta \quad (\text{A.28})$$

In seguito, si determina il numero  $dn$  di momenti magnetici presenti tra  $\theta$  e  $\theta+d\theta$  in un volume sferico:

$$dn = K e^{\left(\frac{-E_B}{k_B T}\right)} dA = 2\pi C \int_0^\pi e^{\left(\frac{\mu H \cos \theta}{k_B T}\right)} \sin \theta d\theta \quad (\text{A.29})$$

la costante  $C$  si ottiene ponendo che il numero totale di momenti sia  $n$ . Infine:

$$M = \int_0^n \mu \cos \theta dn \quad (\text{A.30})$$

Esprimendo il rapporto tra  $M$  e la magnetizzazione di saturazione  $M_s$ :

$$\frac{M}{M_s} = \coth \frac{\mu H}{k_B T} - \frac{k_B T}{\mu H} = L \left( \frac{\mu H}{k_B T} \right) \quad (\text{A.31})$$

$L$  è la funzione di Langevin.

Sperimentalmente, si effettuano misure di magnetizzazione del sistema in funzione del campo applicato in corrispondenza di diverse temperature e si riportano globalmente i dati sotto forma di  $M/M_s$  in funzione di  $H/T$ . Idealmente, se il sistema è superparamagnetico, le curve tendono ad un andamento universale, descritto dalla curva di Langevin.

Nella realtà vi sono diversi fattori che modificano la risposta magnetica di un sistema, come una distribuzione delle dimensioni delle nanoparticelle, un'anisotropia superficiale o interazioni magnetiche tra le particelle.

Se l'energia termica  $k_B T$  non è sufficientemente elevata da mascherarli, questi effetti si manifestano nei dati sperimentali come deviazioni rispetto all'andamento predetto dalla curva di Langevin.

È altresì vero che, anche in presenza di importanti fluttuazioni termiche, è possibile osservare delle anomalie, dovute ad una incoerenza tra i momenti magnetici all'interno delle singole particelle.

Sovente si osserva un diverso rilassamento degli spin presenti sulla superficie della nanoparticella rispetto a quelli nel bulk e questo effetto si manifesta ad alte temperature.

In questi casi, è visibile un andamento lineare di  $M/M_s$  vs  $H/T$ , in aggiunta a quello atteso e all'aumentare della temperatura sono sempre di più gli spin presenti nel bulk che si iniziano a comportare come quelli superficiali.

La differenza di comportamento è attribuita alla rottura della simmetria del reticolo in superficie che porta all'instaurarsi di un'anisotropia a carattere unidirezionale, specifica del particolare sito reticolare occupato dagli atomi.

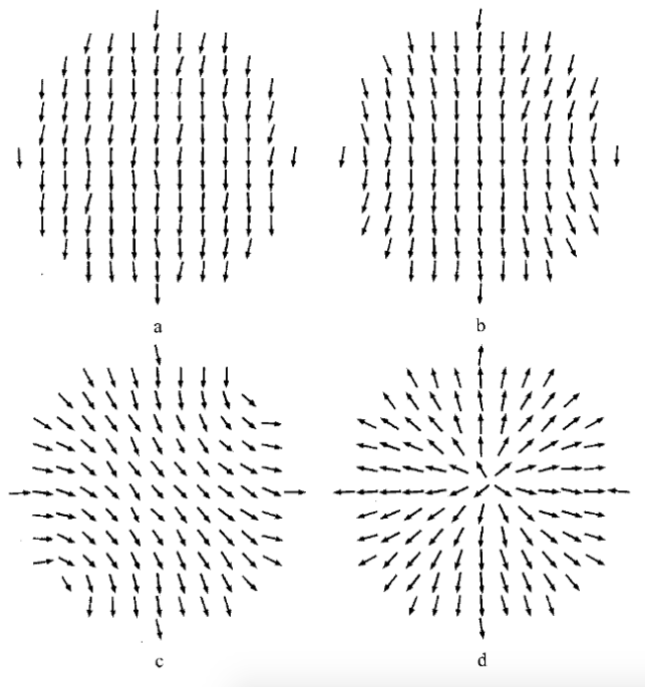
Gli effetti superficiali possono essere descritti attraverso un modello delle particelle *core-shell*: ciascuna nanoparticella è costituita da una zona interna, caratterizzata da un comportamento ferromagnetico o antiferromagnetico, descrivibile con la teoria superparamagnetica e una parte esterna in cui gli spin sono disordinati e interagiscono sia tra loro che con quelli all'interno.

Esiste una formula empirica che permette di valutare un'anisotropia efficace globale:

$$K_{eff} = K_V + \frac{6K_S}{\langle D \rangle} \quad (\text{A.32})$$

Con  $K_V$  e  $K_S$  contributi del volume e della superficie rispettivamente e  $\langle D \rangle$  il diametro delle particelle.

Nella figura sottostante (fig. 26) sono mostrati arrangiamenti di spin ottenuti tramite simulazioni con metodo Montecarlo relativi a diversi valori del rapporto tra  $K_S$  e  $K_V$ ; all'aumentare di quest'ultimo la magnetizzazione della particella diminuisce progressivamente.



*Fig. 26: orientazione degli spin di una particella superparamagnetica per valori di  $K_s/K_v$  pari a: 1 (a), 10 (b), 40 (c) e 60 (d) [27].*

#### A.4 Riferimenti bibliografici dell'appendice

[23] S. Blundell, “Magnetism in condensed matter”, Oxford Master Series in Condensed Matter Physics (2001).

[26] M. Knobel, W. C. Nunes, L. M. Socolovsky, E. De Biasi, J. M. Vargas and J. C. Denardin; “Superparamagnetism and Other Magnetic Features in Granular Materials: A Review on Ideal and Real Systems, Journal of Nanoscience and Nanotechnology”, Vol. 8, 2836–2857 (2008).

[27] A. Kolhatkar, A. C. Jamison, D. Litvinov, R. C. Willson, T. Randall Lee, “Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles”, Int. J. Mol. Sci. 14, 15977-16009 (2013).