



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Scuola di  
Scienze Matematiche  
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in  
Chimica

# **Preparazione e caratterizzazione di gel magnetici macroporosi con pori di forma e grandezza controllati**

## **Preparation and characterization of magnetic macroporous gels with controlled size and shape of pores**

**Relatore**  
Massimo Bonini

**Correlatore**  
Piero Baglioni

**Candidato**  
Cosimo Anichini

Anno Accademico 2012/2013

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
1.1 Nanocompositi.....	1
1.2 Idrogel polimerici e nanocompositi .....	2
1.3 Nanoparticelle magnetiche.....	3
1.4 Risposta magnetica negli idrogel magnetici .....	5
1.5 Gel macroporosi.....	5
1.5.1 Nuove strategie per la produzione di gel macroporosi .....	6
1.6 Gel magnetici macroporosi.....	8
1.7 Obiettivi .....	9
<b>2. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>10</b>
2.1 Reagenti .....	10
2.2 Sintesi e preparazione dei gel .....	11
2.2.1 Preparazione dei gel fisici .....	11
2.2.2 Sintesi dei gel di acrilammide .....	11
2.3 Sintesi di nanoparticelle di Ossido di Ferro .....	13
2.3.1 Nanoparticelle di $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .....	13
2.3.2 Nanoparticelle di $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	13
2.3.3 Nanoparticelle di FeOx commerciali.....	14
2.4 Preparazione dei gel magnetici.....	14
2.4.1 Gel di PAAm-PGD con NPs di $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .....	15
2.4.2 Gel di PAAm-PGD con NPs di $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	15
2.4.3 Gel PGD con NPs commerciali .....	16
2.5 Tecniche di criopreparazione dei gel .....	16

2.5.1 Liofilizzazione .....	16
2.5.2 Congelamento in azoto liquido <sup>15</sup> .....	18
2.5.3 Procedure di congelamento e liofilizzazione dei gel .....	19
2.6 Metodi analitici .....	20
2.6.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM).....	20
2.6.2 Scattering di Raggi X a basso angolo (SAXS) .....	24
2.6.3 Analisi termogravimetrica (TGA) .....	29
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>32</b>
3.1 Caratterizzazione delle Nanoparticelle.....	32
3.1.1 Nanoparticelle di Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	32
3.1.2 Nanoparticelle di Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	33
3.1.3 Nanoparticelle commerciali.....	34
3.2 Caratterizzazione dei gel.....	35
3.2.1 Gel di PAAm-TGD liofilizzati a diverse pressioni .....	35
3.2.2 Gel chimici e fisici congelati a -18 °C .....	41
3.2.3 Gel di chitosano e PAAm-PGD congelati a diverse velocità .....	47
3.3 Caratterizzazione dei gel magnetici.....	52
3.3.1 Gel di PAAm-PGD con nanoparticelle di Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	52
3.3.2 Gel di PAAm-PGD con nanoparticelle di Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	58
3.3.3 Gel di PAAm-PGD con nanoparticelle commerciali.....	62
<b>4. CONCLUSIONI.....</b>	<b>79</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>82</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Nanocompositi

Le nanotecnologie sono una branca delle scienze dei materiali che mira alla comprensione, alla progettazione e alla realizzazione di materiali caratterizzati da almeno una dimensione inferiore a 100 nm. Infatti, quando le dimensioni di un materiale sono nel range dei nanometri, le proprietà chimico fisiche si discostano significativamente da quelle dello stesso materiale di dimensioni maggiori del micrometro. I materiali nanostrutturati mostrano particolari proprietà chimiche, meccaniche, elettriche e magnetiche che possono essere sfruttate per migliorare le caratteristiche dei materiali tradizionali. Le peculiarità offerte da questi nuovi materiali sono state sfruttate da molti settori tra cui la medicina, l'ottica e l'elettronica. Oggigiorno, attraverso innovative tecnologie e tecniche di sintesi, è possibile disporre i nanomateriali in strutture funzionali (*self assembling*) o includerli in un materiale di supporto. Nel secondo caso, in cui si combinano una fase di dimensioni nanometriche (*filler*) e una fase grossolana di supporto (*matrice*), si parla di nanocompositi.

I nanocompositi combinano le proprietà della matrice con le proprietà del filler generando nuove caratteristiche in grado di rispondere a specifiche necessità. Il ruolo primario della matrice è quello di fornire un supporto per il filler, fornendo stabilità al prodotto ed eventualmente rendendolo processabile. Il materiale costituente la matrice di un nanocomposito può essere estremamente diversificato: polimeri, materiali ceramici e metallici sono stati usati in passato. In particolare i polimeri sono molto sfruttati poiché le nanostrutture inorganiche vengono spesso facilmente disperse e stabilizzate in soluzioni polimeriche. Inoltre molte delle tecnologie già in uso per le materie plastiche sono state semplicemente trasferite alla produzione di nanocompositi polimerici. Tra i materiali polimerici di supporto sono di particolare importanza i colloidali ed in particolare i gel.<sup>1</sup>

## 1. INTRODUZIONE

### 1.2 Idrogel polimerici e nanocompositi

Un idrogel polimerico nanocomposito è generalmente formato da una rete di catene polimeriche *cross-linked* disperse in un mezzo acquoso in presenza di nanoparticelle o nanostrutture. Il polimero *cross-linked* può formare una rete attraverso interazioni fisiche o chimiche. Le interazioni fisiche sono di natura non covalente e sono dovute spesso a legami a idrogeno, interazioni di Van der Waals e interazioni ioniche. Le interazioni chimiche invece sono di tipo covalente; in generale le interazioni chimiche sono di natura più forti di quelle fisiche, ma può anche accadere anche il contrario<sup>2</sup>. Il gel polimerico è in grado di produrre cambiamenti reversibili di volume in risposta a stimoli esterni quali cambiamenti della composizione, del pH, e della temperatura. Le nanoparticelle possono essere intrappolate tra la rete del gel o legate tramite interazioni chimiche o fisiche alle catene polimeriche. La presenza di nanoparticelle aggiunge proprietà uniche al gel come la responsività a stimoli di varia natura. Queste caratteristiche rendono i gel polimerici nanostrutturati molto adatti per applicazioni nel campo dell'ottica, dell'elettronica, dei beni culturali, dei sensori, della medicina e delle biotecnologie. Tra le varie nanoparticelle che possiamo trovare in un idrogel nanocomposito possiamo annoverare nanoparticelle di silice e metalliche, che introdurremo brevemente, e nanoparticelle magnetiche. Ad esempio le nanoparticelle di silice sono in grado di fornire all'idrogel maggiore resistenza meccanica. Nel caso di un gel di poliacrilammide-polietilenglicole con nanoparticelle di silice, queste, grazie alla superficie carica, si legano attraverso interazioni chimiche o fisiche alle catene polimeriche del gel e fungono da agente reticolante migliorando le caratteristiche meccaniche del gel.<sup>3</sup>

Idrogel nanostrutturati possono essere ottenuti anche combinando nanoparticelle metalliche, soprattutto oro e argento, con un polimero. In questo caso la presenza di nanoparticelle nel gel non ne modifica significativamente le proprietà chimiche e fisiche poiché le interazioni tra il polimero e le nanoparticelle sono deboli. Tuttavia alcune delle caratteristiche delle nanoparticelle stesse, come la conducibilità elettrica, la responsività a radiazioni elettromagnetiche e le proprietà antibatteriche sono trasferite all'idrogel. Queste caratteristiche possono essere sfruttate per creare vari tipi di sensori. Ad esempio nanoparticelle d'oro funzionalizzate in modo da legarsi

## 1. INTRODUZIONE

covalentemente ad un gel di poliacrilammide possono segnalare variazioni di temperatura. Infatti il gel di Poli(N-isopropilacrilammide) ha una transizione termodipendente dalla forma avvolta a spirale (idrofila) alla forma globulare (idrofoba). Nella transizione la distanza media tra le nanoparticelle d'oro cambia variando quindi la conducibilità elettrica del gel. Altri tipi di gel a base di nanoparticelle d'oro possono segnalare variazioni di pH: la variazione di quest'ultimo infatti cambia i valori di risonanza plasmonica superficiale, rendendo possibile valutare cambiamenti di pH misurando spettri di assorbimento UV-Vis del gel. L'aggiunta di nanoparticelle di argento invece fornisce al gel proprietà elettroniche e antibatteriche.<sup>4</sup>

### 1.3 Nanoparticelle magnetiche

La comunità scientifica è particolarmente interessata allo sviluppo di materiali "intelligenti", dotati di proprietà che possano essere modulate attraverso stimoli esterni come stress meccanici o determinati valori di pH, temperatura, campi elettrici e magnetici. In particolare polimeri e gel modulabili attraverso stimoli luminosi, termici, elettrici sono già stati sviluppati. Gli stimoli esterni possono avere effetto sia sulla matrice, che viene modificata rendendo possibile l'attivazione del materiale nanocomposito, oppure avere effetto diretto sulle nanoparticelle, che possono fungere da mediatori. Ad esempio questo è il caso di nanocompositi contenenti nanoparticelle di metalli nobili; in questi materiali le particolari proprietà ottiche ed elettroniche di queste particelle fanno sì che quando queste assorbono luce di determinata frequenza la rilascino sotto forma di calore; quest'ultimo può essere sfruttato per l'attivazione di un evento termico come la gelificazione/ solubilizzazione di una dispersione di un polimero. Tra tutti i possibili tipi di stimoli i campi magnetici hanno il privilegio particolare di non essere particolarmente invasivi e dannosi. Molti materiali, tra cui i tessuti biologici, hanno una permeabilità magnetica ( $\mu_r$ ) molto simile alla permeabilità magnetica del vuoto ( $\mu_0$ ), mentre hanno una permeabilità elettrica ( $\epsilon_r$ ) molto più piccola della permeabilità elettrica del vuoto ( $\epsilon_0$ ), perciò sono attraversati meglio da campi magnetici che da campi elettrici<sup>56</sup>; questo rende possibile la stimolazione magnetica anche a distanze notevoli dalla sorgente di onde magnetiche. I nanomateriali più adatti in grado di rispondere ad uno stimolo

## 1. INTRODUZIONE

magnetico sono le nanoparticelle magnetiche (MagNPs), queste infatti sono di dimensioni tali da poter essere incluse facilmente in molte matrici e inoltre forniscono riposte caratteristiche quando sono immerse in campi magnetici statici e dinamici. Le proprietà delle MagNPs che vengono sfruttate sono principalmente due, ossia quella di muoversi quando vengono immerse in un gradiente di campo magnetico e quella di riscaldarsi quando sottoposte a campi magnetici alternati ad alta frequenza.

Sono stati sviluppati molti metodi per preparare MagNPs in un ampio range di composizioni, forme, dimensioni e caratteristiche della superficie. Tra i vari tipi di MagNPs prodotte hanno avuto particolare successo quelle di ossido di ferro, anche grazie all'elevata stabilità di questo. Alcuni materiali come l'ossido di ferro diventano superparamagnetici quando le dimensioni delle particelle sono minori di 10 nm, ovvero i momenti magnetici di tutti gli atomi della nanoparticella sono allineati e paralleli tra loro, formando un unico dominio magnetico delle dimensioni della nanoparticella. Si potrebbe dire che è come se la nanoparticella mostrasse un unico grande momento magnetico, e non la somma di momenti atomici discordanti tra loro. In un singolo dominio, a causa dell'anisotropia magnetica, il momento magnetico può assumere due direzioni preferenziali antiparallele tra loro. La barriera energetica tra le due forme antiparallele ha di solito valori più piccoli dell'energia termica a temperatura ambiente ( $RT$ ), perciò a  $RT$  le due forme si scambiano casualmente; il tempo medio che intercorre tra due inversioni è detto tempo di rilassamento di Néel. Quando le MagNPs sono immerse in un campo magnetico alternato, la magnetizzazione di queste oscilla tra le due forme antiparallele. Se la frequenza del campo magnetico è maggiore dell'inverso del tempo di rilassamento di Néel (tipicamente maggiore di 50 kHz) la magnetizzazione delle nanoparticelle assume la forma di un ciclo di isteresi, e vengono quindi generate grandi quantità di calore. Questo effetto, detto ipertermico, ha diverse applicazioni biomediche: ad esempio può essere usato per l'ablazione termica di cellule tumorali o per il rilascio termico controllato di farmaci da materiali nanocompositi. Se invece le nanoparticelle sono sottoposte a campi magnetici alternati a bassa frequenza non avviene nessun ciclo di isteresi, ma può avvenire un rilassamento Browniano che consiste in una rotazione delle nanoparticelle e in un conseguente riscaldamento moderato dovuto all'attrito meccanico durante la rotazione.<sup>7</sup>

## 1. INTRODUZIONE

### 1.4 Risposta magnetica negli idrogel magnetici

Le MagNPs devono avere delle caratteristiche tali da poter essere incluse chimicamente nella matrice di un idrogel, devono cioè formarsi dei legami chimici o fisici tra la matrice del gel e la superficie delle MagNPs stesse. L'inclusione chimica delle MagNPs fornisce diversi vantaggi, specialmente se le nanoparticelle sono pensate per rispondere a stimoli come campi magnetici, infatti permette alle MagNPs di non formare una fase separata quando sottoposte a campi magnetici.

Il metodo più usato per preparare MagNPs di ossido di ferro è la co-precipitazione da soluzione acquosa (metodo di Massart)<sup>8</sup>; in questo caso la superficie delle nanoparticelle consiste in gruppi idrossilici legati agli atomi di ferro, ciò rende la superficie delle MagNPs facilmente funzionalizzabile e adatta a legarsi a diversi gruppi funzionali come gruppi carbossilici, solfati e fosfati. Ad esempio le MagNPs di ossido di ferro possono essere facilmente ricoperte di strati di silice attraverso semplici reazioni di condensazione con diversi silicati.<sup>9</sup> Nanoparticelle di  $Fe_3O_4$  vengono incluse chimicamente in gel di Alginato (un polisaccaride con un gruppo carbossilico per ogni unità di monosaccaride).<sup>10</sup> Sottoponendo l'idrogel magnetico a campi magnetici non uniformi si può ottenere una riduzione di volume del gel fino al 70 % del volume iniziale, con conseguente rilascio di gran parte del contenuto acquoso. Questa caratteristica può essere usata, ad esempio, per rilasciare nell'ambiente farmaci o biomolecole. MagNPs possono anche essere incluse in un idrogel di Poli(N-isopropilacrilammide) e usate per provocare un cambiamento conformazionale del gel dalla forma avvolta a spirale a quella globulare, sfruttando l'effetto ipertermico delle nanoparticelle.<sup>11</sup> Questa caratteristica può essere sfruttata per il trasporto e il rilascio di farmaci nel corpo.

### 1.5 Gel macroporosi

I materiali polimerici macroporosi sono una nuova classe di materiali di grande interesse per i settori biotecnologico, biomedico e farmaceutico. Metodi classici di sintesi di materiali polimerici macroporosi comprendono separazione di fase indotta,

## 1. INTRODUZIONE

uso di mezzi liquidi, gassosi o supercritici per la produzione di pori, tecniche di sintesi template<sup>12</sup>. Recentemente è stata sviluppata una tecnica di gelificazione per la preparazione di materiali idrofili macroporosi, conosciuti anche come “criogel”, che implica la sintesi a temperature sotto zero. Questi criogel possono essere prodotti a partire da quasi tutti i precursori di gel conosciuti con una grande varietà di morfologie e porosità. La gelificazione criotropica, anche detta criostrutturazione, è uno specifico tipo di gelificazione che consiste in un trattamento criogenico del sistema potenzialmente in grado di gelificare.

La caratteristica essenziale della gelificazione criotropica è la cristallizzazione del solvente. I criogel sono sintetizzati in mezzi acquosi semicongelati, dove i cristalli di ghiaccio fungono da porogeni e modellano la forma di questi. La caratteristica principale dei gel macroporosi sono una grande elasticità e una morfologia spongiforme, con pori larghi (fino a centinaia di micron) e interconnessi. Ci sono molti esempi di gel macroporosi spongiformi, quasi tutti basati sulla polimerizzazione radicalica del monomero in acqua a temperature minori di 0 °C.

L'ambiente di reazione è costituito da cristalli di ghiaccio e regioni non congelate contenenti il precursore che formano una microfase liquida; in queste regioni procede la reazione di polimerizzazione. Durante il congelamento i cristalli di ghiaccio crescono e si uniscono ad altri fino a creare un network continuo. Dopo lo scongelamento il sistema consiste in una matrice di canali macroporosi continua, riempiti con il solvente acquoso. Poiché i pori sono formati trasferendo il polimero dai pori stessi alle pareti, risulta che queste, oltre ad essere più spesse, hanno una concentrazione di polimero molto maggiore rispetto ai gel convenzionali.

I macrogel trovano impiego principalmente nella biocatalisi enzimatica di cellule immobilizzate, nella purificazione di molecole di interesse da fluidi contenenti particolato, nella cromatografia di cellule, virus e organismi microbici e come matrici tridimensionali per la cultura di cellule.<sup>13</sup>

### ***1.5.1 Nuove strategie per la produzione di gel macroporosi***

Per la produzione di gel macroporosi, oltre alla gelificazione criotropica, ampiamente usata e di cui abbiamo già parlato, recentemente sono state sviluppate nuove tecniche di preparazione. Queste nuove tecniche prevedono il congelamento, seguito da

## 1. INTRODUZIONE

liofilizzazione, del gel successivamente alla sua sintesi. In particolare queste tecniche sono state ampiamente utilizzate su gel fisici quali gelatina, chitosano, collagene e alginato. Particolarmente interessanti sono gli articoli di Van Vlierberghe et al.<sup>14</sup> e di Madihally e Matthew<sup>15</sup> che cercano di fare chiarezza sugli effetti dovuti alla temperatura sulla macroporosità del gel.

Nell'articolo di Madihally e Matthew un gel di chitosano al 3 % viene congelato in diverse condizioni. Il gel di chitosano viene posto in delle provette di vetro, e queste vengono poste in bagni mantenuti a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . I campioni di gel così congelati sono stati successivamente liofilizzati e la struttura è stata studiata al SEM. Si osserva una forte dipendenza della dimensione media dei pori dalla temperatura di congelamento, infatti si varia da pori di circa  $50\text{ }\mu\text{m}$  per i campioni congelati a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a pori di  $150\text{ }\mu\text{m}$  per i campioni congelati a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  e di oltre  $220\text{ }\mu\text{m}$  per i campioni congelati a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Inoltre in tutti i campioni si osserva un orientazione radiale dei pori, dovuta alla forma cilindrica delle provette, e un aumento delle dimensioni dei pori passando dalle regioni più esterne, a contatto con il vetro della provetta, verso l'interno del gel. Questo effetto è particolarmente marcato nel campione congelato a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dove esternamente si hanno pori piccoli, di circa  $5\text{-}10\text{ }\mu\text{m}$  di diametro, interconnessi e privi di direzionalità, mentre all'interno i pori sono più grandi, di circa  $50\text{ }\mu\text{m}$ , e con elongazione radiale. Questo è particolarmente significativo, in quanto dimostra che è proprio la nucleazione dell'acqua a guidare il processo di formazione dei macropori. Infatti, vicino all'interfaccia con il vetro, la nucleazione dell'acqua procede in modo diverso poiché è presente un'interfase; al contrario verso l'interno si formano pochi nuclei, e la loro crescita è direzionata dal gradiente termico. Nell'articolo si afferma che la temperatura di congelamento varia anche la velocità di raffreddamento, ma non si distingue l'effetto dell'una e dell'altra.

Questo aspetto viene invece esaminato dettagliatamente nell'articolo di Van Vlierberghe et al., dove gli esperimenti di congelamento vengono effettuati su una gelatina animale di tipo "B", i cui gruppi laterali sono chimicamente funzionalizzati con metacrilammide. Per verificare gli effetti della velocità di raffreddamento la gelatina viene raffreddata fino a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $0.15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e a  $0.83\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . La successiva analisi al SEM mostra un diametro medio dei pori di  $65\text{ }\mu\text{m}$  per la gelatina sottoposta ad un gradiente termico di  $0.83\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , e un diametro medio dei pori di  $135\text{ }\mu\text{m}$  per la

## 1. INTRODUZIONE

gelatina raffreddata più lentamente. Questo dimostra che la velocità di raffreddamento ha un effetto fondamentale nel modellamento delle dimensioni dei pori. Per verificare invece gli effetti della temperatura finale di congelamento la gelatina è stata raffreddata fino a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mantenendo la velocità di raffreddamento costante di  $0.2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . I campioni sono poi stati studiati al SEM evidenziando che la temperatura finale di congelamento non ha effetto sulla dimensione dei pori, infatti il diametro medio dei pori nei due casi è sostanzialmente analogo. Da questo studio si può concludere che, anche nei casi in cui sembrava che la temperatura finale di congelamento influenzasse la dimensione finale dei pori, in realtà questo effetto era dovuto alla velocità con cui i campioni raggiungevano la temperatura finale, chiaramente più alta nei casi in cui la temperatura finale era minore.

### 1.6 Gel magnetici macroporosi

Riportiamo qui brevemente quanto fatto da Zhao et al<sup>16</sup>. Nanoparticelle monodisperse di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  di diametro  $\sim 10\text{ nm}$  vengono incluse chimicamente in un gel di Alginato di sodio in rapporto peso/peso 13/1. All'alginato è aggiunto come *cross-linker* idrazide dell'acido adipico, per permettere al gel di mantenere la struttura porosa in seguito a cicli di liofilizzazione/reidratazione, e un peptide contenente la sequenza amminoacidica Arg-Gly-Asp per permettere una migliore adesione di materiali biologici al gel. Le dimensioni dei pori del gel e la loro connettività possono essere controllate attraverso congelamento del gel a diverse temperature e successiva liofilizzazione. Il gel viene congelato a  $-180$ ,  $-80$  e  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e le strutture ottenute alle tre diverse temperature sono studiate con il SEM previa liofilizzazione dei campioni. Si nota che il gel congelato a  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  ha delle cavità di diametro di circa  $20\text{ }\mu\text{m}$  scarsamente interconnesse (gel nanoporoso), mentre i due campioni congelati a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hanno cavità rispettivamente di  $300$  e  $700\text{ }\mu\text{m}$  altamente interconnesse (gel macroporoso). Successivamente viene valutata l'influenza della diversa porosità sulle proprietà meccaniche del gel. È già stato dimostrato che gel con elevata porosità

## 1. INTRODUZIONE

hanno minore rigidità, il che si traduce in una maggiore deformabilità quando il ferrogel è sottoposto a campi magnetici disomogenei. Gli esperimenti condotti dimostrano che l'elasticità del gel, valutata attraverso il modulo di Young, è maggiore per i gel congelati a maggiore temperatura (gel macroporosi) rispetto al gel nanoporoso. Anche la deformazione del ferrogel quando questo è sottoposto a un gradiente di campo magnetico monodirezionale mostra risultati analoghi: sottoponendo due cilindri di gel congelati a  $-180$  e  $-20$  °C ad un gradiente di campo magnetico con direzione verticale, si osserva una compressione in altezza dei due cilindri del 5 % nel primo caso e del 70 % nel secondo. Una differenza così marcata tra i due valori è dovuta al collasso delle macroporosità, come si può osservare analizzando un campione del secondo gel al SEM; inoltre la riduzione maggiore della distanza media tra le MagNPs nel secondo caso produce forze di attrazione maggiori. Entrambi i campioni di gel ritornano velocemente alle dimensioni originali quando viene spento il campo magnetico.

### 1.7 Obiettivi

Con questa tesi ci proponiamo di fare ulteriore luce sull'effetto della velocità di congelamento e della temperatura finale di congelamento sulla formazione dei macropori del gel. Inoltre, poiché i trattamenti criogenici post-sintesi sono stati sperimentati finora solo su gel fisici come alginato e chitosano, vogliamo indagare se questi effetti si riscontrano anche in gel chimici, come i gel di poliacrilammide. Gel macroporosi di questo tipo infatti, finora sono stati prodotti solo attraverso gelificazione critropica in ambiente acquoso. Vogliamo poi includere nanoparticelle magnetiche in questi gel, per vedere se effettivamente le dimensioni dei pori influenzano l'elasticità del gel e la sua risposta quando sottoposto a campi magnetici. La presenza di MgNPs nel gel potrebbe anche essere un metodo, alternativo al congelamento sotto gradiente termico, per controllare l'anisotropia dei pori. Infatti, teoricamente, se un campo magnetico fisso e unidirezionale venisse applicato al gel durante il trattamento criogenico, i macropori potrebbero formarsi schiacciati perpendicolarmente alla direzione del campo.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Reagenti

Per la sintesi del gel di acrilamide sono stati impiegati i seguenti reagenti: Acrilammide (Fluka, purum,  $\geq 98.0\%$ ), Poli(etilenglicole) dimetacrilato (Aldrich, average  $M_n$  550, contains 270-330 ppm BHT as inhibitor, 80-120 ppm MEHQ as inhibitor), Tetraetilenglicole dimetacrilato (Aldrich, technical,  $\geq 90\%$ ), N,N,N',N'-Tetrametiletildiammina (Sigma, BioReagent, suitable for electrophoresis,  $\sim 99\%$  Sigma), Persolfato di ammonio (Sigma-Aldrich, ACS reagent,  $\geq 98.0\%$ ), tutti usati senza ulteriori purificazioni. Per la sintesi dei gel di chitosano, guar e pectina sono stati usati: Acido acetico (Sigma-Aldrich, ACS reagent,  $\geq 99.7\%$ ), Chitosano (Aldrich, high purity,  $M_v$  60000-120000), Guar gum (Lamberti) e Pectina (Tic Gum).

Per la sintesi di nanoparticelle sono stati usati: Acido nitrico (Sigma-Aldrich, ACS reagent, 70%), Idrossido di tetrametilammonio (Sigma-Aldrich, ACS Reagent), Cloruro di Ferro (III) esaidrato (Sigma-Aldrich, ACS reagent, 97%), Solfato di Ferro (II) eptaidrato (Sigma-Aldrich, ACS reagent,  $\geq 99.0\%$ ), Ossido di Ferro (II, III) nanopolvere (Aldrich,  $\geq 98\%$ ), tutti senza ulteriori purificazioni. L'acqua usata in tutti gli esperimenti è stata deionizzata e filtrata con un sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, USA), che usa filtri a membrana di  $0.22\ \mu\text{m}$ , fino a un valore di resistività maggiore di  $18.0\ \text{M}\Omega\ \text{cm}$ .

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.2 Sintesi e preparazione dei gel

#### 2.2.1 Preparazione dei gel fisici

##### 2.2.1a) Gel di chitosano

In 10 ml di acqua Milli-Q sono stati aggiunti 1 ml di acido acetico e 20 mg di chitosano in polvere. La sospensione è stata omogeneizzata con il vortex e poi messa in sonicatore a 40 kHz per 10 minuti fino a completa dissoluzione. Si ottiene un gel di chitosano al 2 % w/w.

##### 2.2.1b) Gel di pectina

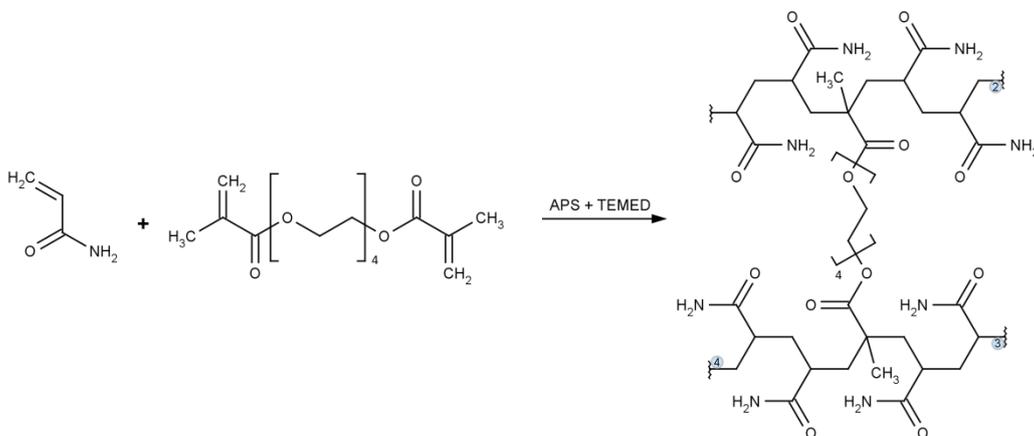
Per il gel di pectina sono disciolti 20 mg di pectina in polvere in 1 ml di acqua Milli-Q e in seguito la sospensione è omogeneizzata al vortex e sonicata a 40 kHz per 10 minuti fino a completa solubilizzazione. Si ottiene un gel di pectina al 2 % w/w.

##### 2.2.1c) Gel di guar

20 mg di Guar in polvere sono disciolti in 1 ml di acqua Milli-Q. La sospensione è quindi omogeneizzata al vortex e lasciata gelificare. Si ottiene un gel di guar al 2 % w/w.

#### 2.2.2 Sintesi dei gel di acrilammide

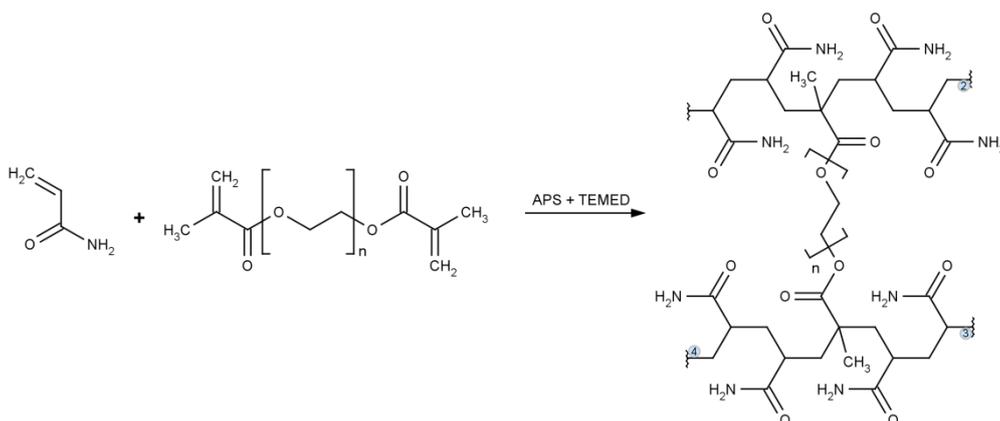
##### 2.2.2a) Poliacrilammide-Tetraetilenglicole dimetacrilato (PAAm-TGD)



## 2. MATERIALI E METODI

Si procede con la preparazione dell'iniziatore radicalico per la reazione di polimerizzazione: si sciolgono 40 mg di persolfato di ammonio in 1 ml di acqua Milli-Q per ottenere una soluzione di questo al 4%. Dopodiché acrilamide (400 mg, 5.62 mmol, 1 eq.) e tetraetilenglicole dimetacrilato (71.8 mg, 0.218 mmol, 0.039 eq.) sono sciolti in 4 ml di acqua Milli-Q. La soluzione viene omogeneizzata e a questa sono aggiunti contemporaneamente 26  $\mu$ l di N,N,N',N'-Tetrametiletilendiammina, che agisce da catalizzatore, e 260  $\mu$ l della soluzione di persolfato di ammonio al 4%. La soluzione viene nuovamente omogeneizzata e rapidamente versata in una provetta di PMMA posta in un bagno a 10 °C. La soluzione è lasciata gelificare a 10 °C per 60 minuti; dopodiché è portata a temperatura ambiente e lasciata riposare per 24h.

### 2.2.2b) Poliacrilammide-Polietilenglicole dimetacrilato (PAAm-PGD)



Il procedimento è analogo a quanto visto per il PAAm-TGD. Per prima cosa viene preparata una soluzione acquosa al 4% di persolfato di ammonio ottenuta sciogliendo 40 mg del sale in 1 ml di acqua Milli-Q. Il persolfato di ammonio agirà come iniziatore radicalico della reazione di polimerizzazione. Poi acrilammide (400 mg, 5.62 mmol, 1 eq.) e polietilenglicole dimetacrilato (80 mg, 0.145 mmol, 0.026 eq.) sono sciolti in 4 ml di acqua Milli-Q. La soluzione viene quindi omogeneizzata e a questa sono aggiunti contemporaneamente 26  $\mu$ l di N,N,N',N'-Tetrametiletilendiammina, che agisce da catalizzatore, e 260  $\mu$ l della soluzione di persolfato di ammonio al 4%. La soluzione viene nuovamente omogeneizzata e rapidamente versata in una provetta di PMMA posta in un bagno a 10 °C. La soluzione è lasciata gelificare a 10 °C per 30 minuti; dopodiché è portata a temperatura ambiente e lasciata riposare per 24h.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.3 Sintesi di nanoparticelle di Ossido di Ferro

#### ***2.3.1 Nanoparticelle di $Fe_2O_3$***

Le nanoparticelle di ossido di ferro (III) vengono preparate seguendo una variante del metodo di Massart<sup>6</sup>. In una beuta solfato di ferro (II) eptaidrato (1.39 g, 5.0 mmol, 1.0 eq) e cloruro di ferro (III) esaidrato (2.70 g, 10.0 mmol, 2.0 eq.) sono disciolti in acqua (15 ml). Qualche goccia di acido nitrico conc. è aggiunta alla soluzione per impedire l'idrolisi acida degli ioni  $Fe^{3+}$  e quindi la formazione di idrossidi. La soluzione viene scaldata in un bagno ad olio (100 °C) e portata a riflusso. Contemporaneamente in un'altra beuta viene preparata una soluzione 1 M di NaOH (2.50 g, 62.5 mmol, 12.5 eq.) in 62.5 ml di acqua, la soluzione è scaldata fino alla temperatura di ebollizione. Quando entrambe le soluzioni raggiungono la temperatura di ebollizione vengono mescolate insieme molto rapidamente. Precipita un ossido di ferro misto di colore marrone scuro. Il miscuglio è mantenuto a riflusso sotto agitazione magnetica per 120 minuti, fino ad ottenere un vistoso cambiamento di colore del precipitato da marrone scuro a rosso/marrone, e poi lasciato raffreddare. Il precipitato ottenuto, che mostra un comportamento ferromagnetico, viene separato dalla soluzione surnatante per decantazione magnetica e lavato con acqua distillata per due volte.

La sospensione così ottenuta viene omogeneizzata, dopodiché viene prelevato un volume noto della sospensione (1.0 ml) in una vial. La sospensione nella vial è lasciata essiccare in stufa per 72 h e pesata per calcolare la concentrazione delle NPs. Si ottengono 24.13 mg di  $Fe_2O_3$  corrispondenti ad una concentrazione di 24.13 mg/ml di Np. Sulla sospensione viene effettuato scattering di raggi X a basso angolo (SAXS) per determinare le dimensioni e la polidispersità delle NPs.

#### ***2.3.2 Nanoparticelle di $Fe_3O_4$***

Sotto atmosfera di azoto, solfato di ferro (II) eptaidrato (1.39 g, 5.0 mmol, 1.0 eq) e cloruro di ferro (III) esaidrato (2.70 g, 10.0 mmol, 2.0 eq.) sono sciolti in 15 ml di acqua Milli-Q precedentemente degassata gorgogliandovi azoto per 10 minuti. Qualche goccia di acido nitrico conc. è aggiunta alla soluzione per impedire l'idrolisi acida degli ioni  $Fe^{3+}$  e quindi la formazione di idrossidi. La soluzione viene scaldata in un bagno ad

## 2. MATERIALI E METODI

olio (100 °C) e portata a riflusso. Contemporaneamente in un'altra beuta viene preparata una soluzione 1 M di NaOH (2.50 g, 62.5 mmol, 12.5 eq.) in 62.5 ml di acqua, la soluzione è scaldata fino alla temperatura di ebollizione. Quando entrambe le soluzioni raggiungono la temperatura di ebollizione vengono mescolate insieme molto rapidamente sotto vigorosa agitazione. Precipita un ossido di ferro misto di colore marrone scuro. Il miscuglio è mantenuto a riflusso sotto agitazione magnetica per 30 minuti. Dopodiché il miscuglio è lasciato raffreddare e decantare. Il precipitato ottenuto, che mostra uno spiccato comportamento ferromagnetico, viene separato dalla soluzione surnatante con l'aiuto di un magnete e lavato con acqua distillata per due volte. Acqua Milli-Q è aggiunta fino a raggiungere un volume di 60 ml. La sospensione è poi omogeneizzata con il vortex e 2 ml di essa sono prelevati e posti in una vial di vetro in stufa a 60 °C per 72 h per determinarne la concentrazione. Si ottengono 88.72 mg di solido, corrispondenti ad una concentrazione di NPs del 4.4 % w/w.

### ***2.3.3 Nanoparticelle di FeOx commerciali***

Per cercare di migliorare la risposta magnetica dei gel magnetici abbiamo provato ad incorporarvi delle nanoparticelle più grandi in numero maggiore. Poiché attraverso la sintesi in soluzione non si riescono ad ottenere facilmente nanoparticelle di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> di dimensioni maggiori di 10-20 nm abbiamo usato nanoparticelle di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> commerciali ottenute con metodi meccanici e che secondo le specifiche hanno diametro di 50-100 nm.

## **2.4 Preparazione dei gel magnetici**

Per la sintesi dei gel magnetici abbiamo deciso di usare il metodo diretto<sup>13</sup>; ovvero le nanoparticelle di ossido di Ferro sono state incorporate direttamente nel gel prima della sua polimerizzazione senza essere precedentemente funzionalizzate. È stata scelta questa strada perché si è dimostrato che i gel prodotti con questo metodo non tendono a disperdere le NPs fuori dalla matrice, ma queste rimangono ben legate alla struttura del gel. Inoltre questo metodo è meno costoso, più semplice e permette di

## 2. MATERIALI E METODI

inglobare nel gel un maggior numero di NPs, poiché la funzionalizzazione di queste ne aumenterebbe significativamente la massa. Solo i gel di PAAm-PGD sono stati caricati con nanoparticelle poiché le prove effettuate in chitosano hanno dato esito negativo: infatti, poiché il gel solubilizza quando posto in acqua le nanoparticelle non vengono trattenute e si disperdono nel mezzo acquoso.

### ***2.4.1 Gel di PAAm-PGD con NPs di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>***

La sintesi del gel di Acrilammide-PGD con le nanoparticelle di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> è condotta come descritto precedente per il gel bianco con la sola differenza che l'acrilammide e il PGD sono disciolti in una sospensione acquosa di NPs al 2.4 % w/w anziché in acqua. NPs con superfici cariche sia positivamente che negativamente sono state utilizzate per indagare se la carica superficiale influiva sulla stabilità delle NPs nel gel. Per caricare positivamente le NPs alla sospensione iniziale di NPs sono aggiunte alcune gocce di HNO<sub>3</sub> fino a pH = 3. La sospensione è quindi stata separata con l'aiuto di una centrifuga per 8 minuti a 8000 rpm. La soluzione acquosa surnatante è rimossa e acqua Milli-Q è aggiunta per riportare a volume. Il procedimento è ripetuto due volte fino a pH essenzialmente neutro. Similmente, per produrre NPs cariche negativamente, alla sospensione di NPs sono aggiunte alcune gocce di idrossido di tetrametilammonio fino a pH = 14. Poi le NPs sono lavate come descritto sopra per riportare il pH alla neutralità.

### ***2.4.2 Gel di PAAm-PGD con NPs di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>***

Per il gel con le NPs di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> si è proceduto come descritto per le NPs di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. La sospensione iniziale di NPs al 4.4 % è stata diluita fino al 2.4 % w/w. Anche in questo caso le NPs sono state rese cariche superficialmente sia negativamente che positivamente.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.4.3 Gel PGD con NPs commerciali

I gel magnetici prodotti in precedenza hanno mostrato scarsa risposta ai campi magnetici per quanto riguarda una loro movimentazione e una risposta pressoché nulla per quanto riguarda la deformazione. I risultati insoddisfacenti ci hanno portato a cercare di sintetizzare dei gel con una migliore risposta magnetica. Per questo abbiamo utilizzato nanoparticelle commerciali di dimensioni maggiori e abbiamo forzato la concentrazione di NPs fino a quando la concentrazione di queste non era tale da impedire una omogenea gelificazione. Abbiamo preparato sospensioni di NPs in acqua Milli-Q al 5 %, 6 %, 8 %, 10 %, 20 %, 30 % e 50 % w/w. Tutte le sospensioni sono state omogeneizzate con il vortex prima di procedere alla sintesi dei gel. Per la sintesi abbiamo proceduto con il metodo diretto già descritto sopra. Tutti i campioni fino a quello con il 30 % di NPs in acqua hanno gelificato in modo omogeneo e senza separazioni di fase. Nel campione con 50 % di NPs in acqua invece si è avuta la precipitazione delle NPs dalla fase di gel.

## 2.5 Tecniche di criopreparazione dei gel

### 2.5.1 Liofilizzazione

#### 2.5.1a) Concetti teorici<sup>14</sup>

La liofilizzazione è un procedimento tecnologico che consiste nel rimuovere l'acqua da una sostanza mediante sublimazione, senza quindi modificarne sostanzialmente la struttura e le proprietà. Come è più facilmente intuibile dal termine inglese freeze-drying, la tecnica consiste di due fasi distinte che si basano su due processi fisici: il congelamento dell'acqua e la sua successiva sublimazione. Il campione da liofilizzare è per prima cosa congelato

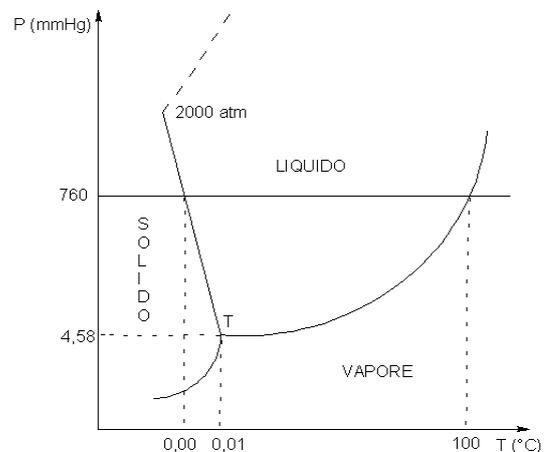


Figura 2.5-1: Diagramma di stato dell'acqua

## 2. MATERIALI E METODI

rapidamente. Nel caso ideale, un congelamento istantaneo porta al congelamento dell'acqua in uno stato amorfo, senza formazione di cristalli di ghiaccio. Un congelamento rapido dell'acqua produce molti centri di nucleazione e quindi un maggior numero di cristalli di ghiaccio di minori dimensioni. Tanto più è lento il raffreddamento, tanti meno centri di nucleazione si formano e quindi si avranno cristalli meno numerosi, ma più grossi. Cristalli più grossi possono però provocare danni a strutture cellulari e nel nostro caso possono modificare la struttura macroscopica e microscopica del gel, perciò si cerca di effettuare un rapido congelamento, immergendo il campione in azoto liquido. Il campione così congelato viene poi posto nel liofilizzatore vero e proprio, descritto nel paragrafo ad esso dedicato, dove incontra una pressione molto bassa, inferiore a 1 Torr (1.33 mbar), e una temperatura pari a quella ambientale. A questa pressione e temperatura, come si può vedere dalla figura 2.5-1, l'acqua risulterebbe gassosa, ma poiché siamo al disotto del punto triplo dell'acqua, questa passa direttamente dallo stato solido a quello gassoso senza passare da quello liquido, ovvero sublima. La sublimazione dell'acqua permette di essiccare il campione lasciandone grossomodo inalterata la struttura, poiché questa rimane rigida. Questo è di particolare importanza nell'essiccamento degli idrogel: in un normale essiccamento per evaporazione la struttura del gel collassa completamente poiché il gel mantiene la mobilità che ha quando è idratato, ma senza acqua non ha più un essenziale elemento di supporto e quindi viene schiacciato dalla forza di gravità stessa. In più la forte idrofilicità del gel fa sì che la struttura di questo tenda a seguire l'acqua liquida, ma l'evaporazione di questa ne riduce il volume portando il gel a collassare su se stesso. Tutto ciò non accade con la sublimazione del ghiaccio, poiché questo sublimando mantiene la rigidità della struttura. Si otterrà quindi un aerogel in cui i pori sono riempiti da aria anziché da acqua.

### ***2.5.1b) Strumento e condizioni operative***

La liofilizzazione è stata effettuata con un liofilizzatore VirTis Bench Top 2K (SP Scientific, New York, USA) provvisto di un condensatore da 3 L in grado di lavorare fino a temperature di -55 °C e con un sistema di tenuta del vuoto fino a 10 mTorr. Tutti i campioni, salvo quando indicato diversamente, sono stati liofilizzati ad una pressione di 30 mTorr.

## 2. MATERIALI E METODI

### ***2.5.2 Congelamento in azoto liquido***<sup>15</sup>

L'azoto è il principale gas presente nell'aria, di cui costituisce circa l'80 %. La temperatura di liquefazione, o ebollizione, dell'azoto a pressione ambientale è  $-195.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . L'azoto liquido può essere prodotto industrialmente attraverso la distillazione frazionata di aria liquida. L'azoto liquido che si ottiene può essere trasportato e conservato a temperatura ambientale, purché sia propriamente isolato termicamente. L'azoto liquido viene perciò conservato e stoccato in contenitori detti di Dewar, che consistono in due contenitori posti l'uno dentro l'altro tra i quali è interposto del vuoto in modo che si abbia il minimo scambio di calore tra i due. In questi contenitori l'azoto bolle lentamente ad una temperatura costante di  $-195.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Per questo motivo l'azoto liquido è usato principalmente come liquido criogenico: viene usato ad esempio per la conservazione di sangue e altri tessuti biologici, come liquido di raffreddamento per detector di IR e raggi-X e altri strumenti scientifici, come trappola fredda per pompe a vuoto. Il nostro interesse per l'azoto liquido deriva dal fatto che può essere usato per congelare molto rapidamente e, come abbiamo detto, un rapido congelamento evita la cristallizzazione dell'acqua, che solidifica in forma amorfa. Il congelamento in forma amorfa dell'acqua permette una perfetta conservazione delle strutture di oggetti contenenti acqua, come se quest'ultima fosse ancora liquida all'interno dell'oggetto stesso. Da qui derivano anche tutte le applicazioni in campo biologico, dove si vuole preservare la struttura dell'oggetto che si va a congelare.

Perciò piccoli campioni di gel idratati, che contengono grandi quantità d'acqua, possono essere immersi in azoto liquido e congelati rapidamente mantenendo inalterata la struttura macroscopica e microscopica dei pori.

Se questi campioni congelati vengono poi posti direttamente a liofilizzare, l'acqua sublima direttamente dalla forma amorfa, lasciando il gel completamente disidratato, ma con la struttura del gel idratato. Il gel così disidratato è pronto per essere studiato al SEM.

## 2. MATERIALI E METODI

### ***2.5.3 Procedure di congelamento e liofilizzazione dei gel***

#### ***2.5.3a Liofilizzazione del gel PAAm-TGD a diverse pressioni operative***

Vengono preparati sei diversi campioni di gel PAAm-TGD di dimensioni il più possibile simili tra di loro e posti in altrettante eppendorf. Un campione viene congelato direttamente a  $-18\text{ °C}$  e poi fatto scongelare. Gli altri quattro campioni vengono posti a liofilizzare senza previo congelamento a differenti pressioni: 30 mTorr, 52 mTorr, 82 mTorr, 112 mTorr per 3 h e successivamente reidratati.

Tutti i campioni di gel reidratati vengono poi congelati in azoto liquido e liofilizzati a 30 mTorr per essere osservati mediante microscopia SEM.

#### ***2.5.3b Congelamento in freezer di diversi gel chimici e fisici***

Per poter comprendere meglio gli effetti del congelamento sulla struttura del gel è stato condotto un confronto tra i due differenti gel di poliacrilammide, il PAAm-PGD e il PAAm-TGD e tre gel fisici quali pectina, guar e chitosano.

Cinque eppendorf sono state riempite con piccoli volumi dei diversi gel ( $\approx 1\text{ ml}$ ) e poste a congelare a  $-18\text{ °C}$  per 48 h. Altrettanti campioni invece non sono stati trattati. Successivamente i campioni sono stati estratti dal congelatore e passati direttamente in azoto liquido prima di essere liofilizzati a 30 mTorr per 24 h per essere studiati al SEM.

#### ***2.5.3c Congelamento dei gel di PAAm-PGD e chitosano a diverse velocità***

Come suggerito dall'articolo di Van Vlierberghe et al.<sup>10</sup> non solo la temperatura di congelamento, ma anche il tempo in cui essa viene raggiunta potrebbe aver effetto sulla porosità del gel. Abbiamo perciò preparato campioni di chitosano e PAAm-PGD, che tra i vari gel studiati in precedenza sono risultati quelli col struttura più ordinata e con le porosità più grandi, e li abbiamo congelati a tre diverse condizioni: in freezer a  $-18\text{ °C}$ , e a  $-10\text{ °C}$  con una velocità di raffreddamento di  $3\text{ °C/min}$  e  $0.1\text{ °C/min}$ . Piccoli volumi di gel (circa 1 ml) sono stati utilizzati. I campioni congelati in freezer sono stati inseriti in delle eppendorf. Tramite delle prove che abbiamo svolto, abbiamo rilevato una velocità di raffreddamento in freezer di  $7\text{ °C/min}$  circa. Gli altri due campioni

## 2. MATERIALI E METODI

invece sono stati congelati a velocità controllata ponendoli su un piatto portacampioni di un microscopio ottico in grado di raffreddare fino a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e dotato di rampa di temperatura da  $0.1$  a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Tutti e quattro i campioni sono stati poi passati direttamente in azoto liquido prima di essere liofilizzate a  $30\text{ mTorr}$  per  $24\text{ h}$  per essere studiati al SEM.

### *2.5.3d Congelamento dei gel magnetici*

Verificati gli effetti del congelamento a diverse velocità sui gel bianchi, le stesse prove sono state effettuate sui gel magnetici. Perciò piccoli volumi di ogni gel magnetico prodotto (circa  $1\text{ ml}$ ) sono stati congelati in freezer a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  ad una velocità di raffreddamento di  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Su altri campioni di gel invece non sono stati effettuati trattamenti termici, per evidenziare meglio gli effetti del congelamento sulla struttura. Tutti i campioni di gel sono poi stati posti in azoto liquido e liofilizzati a  $30\text{ mTorr}$  per  $24\text{ h}$  per essere studiati al SEM.

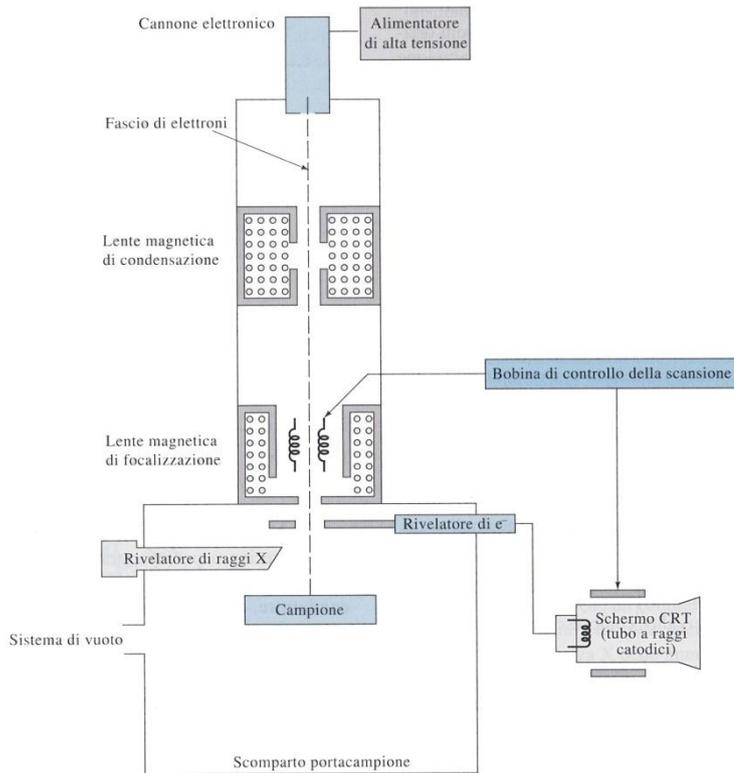
## 2.6 Metodi analitici

### *2.6.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)*

#### *2.6.1a) Descrizione dello strumento e fondamenti teorici<sup>16,17</sup>*

Il microscopio elettronico a scansione, anche detto SEM dall'inglese Scanning electron microscope, è un tipo di microscopio elettronico che produce immagini di un campione attraverso la scansione di questo con un fascio di elettroni collimati. Le caratteristiche principali di questo microscopio sono la possibilità di fornire un ampio range di ingrandimenti, tipicamente da  $100\text{X}$  a  $100000\text{X}$ , uniti ad una resa eccellente della tridimensionalità del campione. Il SEM può arrivare a mettere a fuoco oggetti di pochi nanometri. Il SEM è costituito da quattro parti fondamentali: il sistema ottico-elettronico che comprende la sorgente di elettroni, la camera porta-campione, il sistema di rivelazione degli elettroni (detector) e il sistema di presentazione delle immagini. Tutta la strumentazione soggetta al passaggio di elettroni, ovvero il sistema ottico-elettronico e la camera porta campioni, sono isolati dall'esterno e posti sotto

## 2. MATERIALI E METODI



**Figura 2.6-1** Rappresentazione schematica di un SEM

vuoto. Gli elettroni sono emessi per effetto termoionico da un filamento metallico (solitamente di Tungsteno): il filamento viene riscaldato in modo che l'agitazione termica induca gli elettroni ad abbandonare la superficie e il passaggio di corrente elettrica sul filamento, oltre a fornire il calore necessario per resistenza, ne ristabilisce la carica. Recentemente si sta diffondendo anche un altro tipo di sorgente di elettroni chiamata "Field Emission Gun" (FEG) basato sull'effetto campo, di cui parleremo meglio più avanti. Il fascio di elettroni così generato viene prima accelerato verso un anodo e poi focalizzato sul campione da un sistema di lenti elettromagnetiche. Questo fascio focalizzato viene deflesso attraverso una bobina sugli assi x e y in modo da operare la scansione sequenziale di un'area rettangolare del campione.

Ogni pixel dell'immagine formata sullo schermo è sincronizzato con la posizione del raggio sul campione nel microscopio, ovvero sullo schermo si ha una scansione analoga a quella che avviene sul campione e l'immagine risultante è quindi una mappa di distribuzione delle intensità del segnale emesso dalla zona scansionata del campione. L'ingrandimento di detta immagine è dato dal rapporto tra l'ampiezza di scansione sul campione e l'ampiezza di scansione sullo schermo.<sup>17</sup> A causa dell'interazione tra il

## 2. MATERIALI E METODI

fascio incidente ed il campione, gli elettroni vanno incontro a due fenomeni: una diffusione elastica, con variazione di direzione e trascurabile perdita di energia, e una diffusione anelastica, con perdita di energia non trascurabile. Nella diffusione anelastica, l'interazione del fascio incidente con i nuclei provoca l'emissione di raggi X, mentre l'interazione con gli elettroni più esterni provoca l'emissione di elettroni secondari. Gli elettroni primari sono elettroni originari del fascio che subiscono una diffusione elastica da parte dei nuclei sulla superficie del campione. Ciò comporta un cambio di direzione, senza una rilevante variazione in energia (sempre nell'ordine dei keV). Questi elettroni sono raccolti da un detector coassiale al fascio, in grado di analizzare gli elettroni deviati per più di 90°. L'informazione che si ottiene è un'immagine in toni di grigio che fornisce l'andamento del numero atomico medio dei nuclei che costituiscono la superficie del campione. Infatti, dove i nuclei sono più leggeri, gli elettroni entreranno più in profondità e la loro resa in elettroni primari sarà inferiore a causa dell'assorbimento da parte di un maggiore spessore di campione. Dove sono più pesanti, gli elettroni saranno maggiormente riflessi e quindi rilevati dal detector: queste risulteranno le zone più chiare dell'immagine.

Gli elettroni secondari sono elettroni emessi dagli atomi del campione in seguito alla diffusione anelastica subita dal fascio elettronico. Questi elettroni vengono espulsi dai livelli elettronici più esterni, e possiedono energia inferiore ai 50eV; inoltre vengono facilmente assorbiti dalla materia, pertanto giungeranno al rivelatore solo quelli emessi dagli strati più esterni del campione ( fino a circa 10nm di profondità). Da questi si ottiene perciò un'immagine morfologica, il cui contrasto in toni di grigio è simile all'immagine di un oggetto tridimensionale come è percepito dall'occhio umano; Come abbiamo detto, la diffusione anelastica provoca anche l'emissione di raggi X. Oltre ad una emissione di fondo continua, dovuta alla diminuzione di energia cinetica del fascio elettronico quando interagisce con il campione, si ottengono dei picchi caratteristici la cui energia riflette la struttura elettronica degli atomi che li hanno generati. Ciò costituisce la base della tecnica EDAX (Energy Dispersive Analysis of X-rays), che permette di avere un'analisi quantitativa della composizione atomica del campione.

Le caratteristiche più interessanti del SEM sono proprio la grande profondità di campo e la possibilità di passare rapidamente da ingrandimenti di poche centinaia di volte, a i

## 2. MATERIALI E METODI

massimi consentiti dal microscopio senza dover ogni volta rimettere a fuoco il soggetto poiché la distanza focale viene mantenuta indipendentemente dall'ingrandimento. Un'altra caratteristica estremamente interessante del SEM è l'estrema semplicità nel preparare i campioni. Questi ultimi devono essere in primo luogo resistenti alle basse pressioni e poco volatili e inoltre devono essere conduttori; se questi non lo sono si ricorre ad una metallizzazione molto sottile (50-100 Å) con grafite, argento o oro. È necessario infatti che il materiale possa scaricare a terra la tensione che si accumula durante la scansione con il fascio elettronico, per evitare che si creino degli artefatti nell'immagine e che il campione si degradi. Uno svantaggio rispetto a sistemi ottici è invece, come abbiamo detto, la necessità di lavorare in alto vuoto per permettere al fascio di elettroni di raggiungere il campione.

Nei nuovi microscopi elettronici a scansione basati sull'effetto campo (FE-SEM) la preparazione del campione può essere resa ancora più semplice poiché non è necessario che esso sia conduttore. Infatti questi microscopi, oltre a permettere una risoluzione maggiore, hanno anche un migliore rapporto segnale/rumore che permette di lavorare a potenziali minori. Questo è reso possibile dalla maggiore coerenza, dal minore diametro e dalla maggiore densità di corrente del fascio elettronico prodotto attraverso l'effetto campo rispetto al fascio prodotto per effetto termoionico. Un cannone elettronico ad effetto campo è formato da un ago di tungsteno, la cui punta ha un diametro di pochi nanometri<sup>18</sup>; questo ago è tenuto ad un potenziale di diversi kV più basso rispetto ad un vicino elettrodo. La grande differenza di potenziale unita alla forma a punta dell'ago fanno sì che nei pressi della punta si creino degli enormi campi elettrici tali da promuovere l'emissione di elettroni per effetto campo<sup>19</sup>.

### *2.6.1b) Strumento e preparazione dei campioni*

Le misure al SEM sono state condotte su campioni disidratati e non metallizzati ad un FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope) SIGMA (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany), usando un fascio di elettroni accelerati ad 1 kV e il detector di elettroni primari (In Lens). Le analisi EDAX (Energy Dispersive Analysis of X-rays) sono state effettuate da un detector INCA 250 (Oxford Instruments, UK) usando un fascio di elettroni accelerati a 8 kV.

## 2. MATERIALI E METODI

I campioni sono stati preparati tagliando sezioni sottili (< 1 mm) del gel liofilizzato e deponendolo su dei portacampioni di alluminio di forma circolare detti stub, ricoperti di uno scotch biadesivo conduttivo alla grafite.

### 2.6.2 Scattering di Raggi X a basso angolo (SAXS)

#### 2.6.2a) Descrizione dello strumento e fondamenti teorici<sup>20</sup>

Con Diffusione a basso angolo o Scattering a basso angolo (SAS dall'inglese Small Angle Scattering) si intendono una serie di tecniche analitiche in cui la radiazione è diffusa dal campione e il pattern di diffusione risultante è analizzato per trarre informazioni riguardo la dimensione, la forma e l'orientamento di particelle scatteranti presenti nel campione. Si conoscono lo scattering a basso angolo di raggi X (SAXS), scattering a basso angolo di neutroni (SANS), e scattering a basso angolo di luce (SALS, o anche LS). Le informazioni ricavabili e le dimensioni delle particelle investigabili dipendono dalla radiazione impiegata. Ad esempio, lo scattering di luce non può essere adatto allo studio di campioni otticamente opachi, mentre il SAXS non può essere impiegato facilmente su campioni spessi o che richiedono contenitori in materiali particolari. Tutte e tre queste tecniche fanno uso delle medesime equazioni di base per analizzare i dati ottenuti. Le leggi ottenute da Guinier, Kratky, Zimm e Porod<sup>21,22</sup>, con piccoli aggiustamenti che tengono conto delle differenze tra le radiazioni, possono essere usate indifferentemente in qualsiasi esperimento di scattering a basso angolo e questo ha

Radiazione	Raggi X	Neutroni	Luce Laser
Lunghezza d'onda	0.1-5 Å	1-15 Å	100-1000 nm
Sensibile ad inhomogeneità di:	Densità Elettronica	Densità Nucleare	Polarizzabilità (Indice di Rifrazione)
Tecniche di Scattering:	SAXS, WAXS	SANS, USANS, WANS	SLS, DLS
Spessore del campione:	1-2 mm	1-2 mm	1-10 mm

Figura 2.6-2 Confronto tra le varie tecniche di scattering a basso angolo

## 2. MATERIALI E METODI

certamente contribuito a rendere più semplice sia lo sviluppo di queste tecniche che l'analisi dei risultati ottenuti.

In un esperimento di scattering a basso angolo, una radiazione collimata, non necessariamente monocromatica, viene diretta su di un campione, andando ad investire un volume  $V$ , detto volume di scattering, dato da:

$$V = A \cdot t_s$$

In cui  $A$  è la sezione di impatto del raggio incidente e  $t_s$  è il cammino della radiazione nel campione, ovvero lo spessore del campione stesso.

Quando la radiazione incidente colpisce il campione, una parte di questa viene trasmessa, un'altra viene assorbita dal campione stesso e una parte viene diffusa.

Prendiamo adesso in considerazione un detector capace di misurare l'intensità della radiazione che lo colpisce. Supponiamo che la superficie di questo detector abbia delle dimensioni date da  $dx$  e  $dy$  e che la sua posizione sia caratterizzata da una certa distanza  $L_{sd}$  dal campione e da un certo angolo di scattering,  $q$ . In pratica questa cella acquisisce il flusso della radiazione scatterata all'interno di un angolo solido  $d\Omega$ , dato da:

$$d\Omega = \frac{dx \cdot dy}{L_{sd}^2}$$

Il flusso  $I(Q)$  può essere espresso in termini generali come:

$$I(\lambda, \theta) = I_0(\lambda) \Delta\Omega \eta(\lambda) T V \frac{d\sigma}{d\Omega}(Q)$$

dove  $I_0$  rappresenta il flusso incidente,  $\eta$  è un coefficiente che rende conto dell'efficienza del detector (a volte indicato come *risposta del detector*),  $T$  è l'indice di trasmissione del campione e  $(d\sigma/d\Omega)$  è una funzione che dipende dal modulo del vettore di scattering  $Q$  ed è denominata *sezione d'urto differenziale*. I primi tre termini dipendono dallo strumento, mentre i restanti tre dal campione.

Prendiamo adesso in considerazione lo scattering a basso angolo di raggi X. L'obiettivo dell'esperimento è la determinazione della sezione d'urto differenziale; infatti questa grandezza contiene tutte le informazioni riguardanti le dimensioni, la forma e le interazioni degli oggetti scatteranti presenti nel campione in esame.

La sezione d'urto è esprimibile come:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega}(Q) = N_p V_p^2 (\Delta\delta)^2 P(Q) S(Q) + B_{inc}$$

## 2. MATERIALI E METODI

dove  $N_p$  rappresenta la concentrazione numerica degli oggetti scatteranti (numero di particelle per unità di volume),  $V_p$  è il volume di un singolo elemento scatterante e  $\Delta\delta^2$  è il quadrato della differenza delle densità di scattering o “scattering length density” (SLD), spesso indicato anche come contrasto (si veda più avanti per la definizione di tale grandezza).  $P(Q)$  è una funzione nota come fattore di forma, ed in pratica racchiude le informazioni sulle dimensioni e sulla forma degli oggetti;  $S(Q)$  è anch’essa una funzione, detta fattore di struttura, e fornisce informazioni sulle interazioni tra gli oggetti;  $Q$  è il modulo del vettore di scattering ed infine  $B_{inc}$  è il segnale (isotropico) di background incoerente. La sezione d’urto differenziale ( $d\sigma/d\Omega$ ) ha le dimensioni dell’inverso di una lunghezza e viene normalmente espressa in  $\text{cm}^{-1}$ .

Il vettore di scattering  $Q$  è il modulo del vettore risultante dalla differenza tra i vettori d’onda incidente  $k_i$  e scatterato  $k_s$ , ed è definito come :

$$Q = |\vec{Q}| = \vec{k}_s - \vec{k}_i = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$$

$Q$  ha le dimensioni dell’inverso di una lunghezza ed è espresso generalmente in  $\text{\AA}^{-1}$  o in  $\text{nm}^{-1}$ . Combiniamo ora la relazione precedente con la famosa *legge di Bragg*,

$$n\lambda = 2d \sin \theta/2$$

e otteniamo la seguente relazione:

$$d = \frac{2\pi}{Q}$$

dove  $d$  è una distanza caratteristica.

Queste relazioni sono fondamentali negli esperimenti di scattering a basso angolo, in quanto permettono sia di configurare uno strumento (ovvero assicurarsi che il range di  $Q$  che lo strumento è in grado di indagare corrisponda alle dimensioni degli oggetti che vogliamo studiare), sia di analizzare rapidamente gli oggetti “scatteranti” in base alla posizione dei picchi di diffrazione nello spazio di  $Q$ .

Torniamo ora sulla densità di scattering (o SLD, dall’inglese “scattering length density”), essenziale per valutare il contrasto in un esperimento di scattering.

Tale grandezza per una molecola formata da  $i$  atomi può essere calcolata mediante una semplice espressione:

$$SLD_{XRay} = \frac{\sum_i^n Z_i r_e}{V_m}$$

## 2. MATERIALI E METODI

Il contrasto è dato semplicemente dalla differenza tra la densità di scattering della particella scatterante,  $\delta_p$ , e quella della matrice in cui la particella si trova,  $\delta_m$ , il tutto elevato al quadrato:  $\delta^2 = (\delta_p - \delta_m)^2$

Chiaramente, se il contrasto è uguale a zero, l'intensità scatterata è nulla.

Il fattore di forma è una funzione che descrive come  $(d\sigma/d\Omega)$  è modulata dagli effetti di interferenza tra la radiazione scatterata da parti differenti dello stesso oggetto scatterante, perciò questa funzione dipende fortemente dalla forma dell'oggetto. L'equazione generale del fattore di forma  $P(Q)$  è stata data da Van de Hulst:

$$P(Q) = \frac{1}{V_p^2} \left| \int_0^V \exp[if(Q, \alpha)] dV_p \right|^2$$

Dove  $\alpha$  è un parametro di forma che può rappresentare, ad esempio, una lunghezza o un raggio. Fortunatamente sono disponibili espressioni analitiche per le forme più comuni, mentre le espressioni relative a forme più complesse normalmente possono essere dedotte a partire da quelle più semplici. Poiché le nanoparticelle da noi prodotte si presume abbiano una forma sferica, esaminiamo le formule per il fattore struttura e forma per quanto riguarda una sfera di raggio  $R_p$ :

$$P(Q) = \left[ \frac{3[\sin(QR_p) - QR_p \cos(QR_p)]}{(QR_p)^3} \right]^2$$
$$S(Q) = 1 + \frac{4\pi N_p}{QV} \int_0^\infty [g(r) - 1] r \sin(Qr) dr$$

Quest'ultima funzione descrive come  $d\sigma/d\Omega$  è modulato dagli effetti di interferenza tra la radiazione scatterata da diversi oggetti scatteranti, e di conseguenza essa dipende fortemente dall'ordine locale all'interno del campione. In altre parole lo scattering a basso angolo può essere usato per ricavare informazioni sulle posizioni relative degli oggetti scatteranti, generalmente attraverso la cosiddetta funzione di distribuzione radiale:

$$G(r) = \frac{4\pi N_p r^2}{V} g(r)$$

dove  $r$  rappresenta una distanza radiale, diretta dal centro verso l'esterno di ogni oggetto scatterante nel campione, mentre  $g(r)$  si ottiene mediante antitrasformata di Fourier dell'equazione che fornisce il fattore di struttura stesso. Solitamente  $G(r)$  è una funzione oscillante e smorzata, che descrive una distribuzione di densità. Inoltre, il logaritmo naturale di questa funzione,  $\ln[G(r)]$ , è direttamente correlato alla funzione

## 2. MATERIALI E METODI

dell'energia potenziale che descrive le interazioni tra gli oggetti. È importante sottolineare che, al tendere della concentrazione degli oggetti a zero (vale a dire  $Np \rightarrow 0$ ), il valore di  $S(Q)$  tende a 1, ovvero l'andamento dell'intensità scatterata è determinato unicamente dal fattore di forma.

### *2.6.2b Strumento e condizioni operative*

Le misure al SAXS sono state condotte con un HECUS S-3 Micro, equipaggiato di due rivelatori per SAXS e WAXS, con detector OED 50M sensibile alla posizione contenente 1024 canali di 54  $\mu\text{m}$  di larghezza. La radiazione incidente è una Cu  $K\alpha$  di lunghezza d'onda  $\lambda = 0.154 \text{ nm}$ , originata da un generatore di raggi-X Seifert ID-, operante ad una potenza massima di 2 kW. Un filtro di nickel di 10  $\mu\text{m}$  di spessore è stato usato per rimuovere la radiazione Cu  $K\beta$ . Il volume tra il campione e il detector è stato posto sotto vuoto ( $P < 1 \text{ mbar}$ ) durante le misure per minimizzare lo scattering dovuto all'aria. Le curve di scattering sono state ottenute con un Q-range tra 0.007 and 0.54  $\text{\AA}^{-1}$ , dove Q è il vettore di scattering, e  $\theta$  è l'angolo di scattering. La temperatura è stata controllata attraverso un Peltier con un'accuratezza di 0.1 °C. I campioni sono stati inseriti in un portacampioni smontabile consistente in due sottili finestre di Kapton e un distanziatore di acciaio di 1 mm. Il contributo della cella vuota è stato sottratto usando il rapporto di trasmissione cella/campione.

I campioni sono stati preparati riempiendo dei capillari di vetro di 1.5 mm di diametro con sospensioni diluite delle NPs, e sigillando poi il capillare con colla a caldo (etilene vinil acetato). Le misure sono state corrette utilizzando come bianco un analogo capillare riempito di acqua Milli-Q.

## 2. MATERIALI E METODI

### **2.6.3 Analisi termogravimetrica (TGA)**

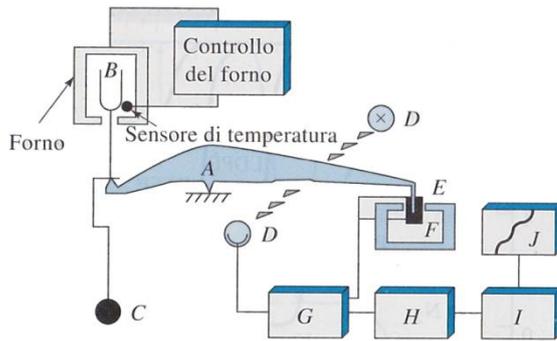
#### *2.6.3a) Descrizione dello strumento e fondamenti teorici<sup>16</sup>*

L'analisi termo gravimetrica o TGA (dall'inglese Thermal Gravimetric Analysis) è un metodo di analisi in cui si effettua la registrazione continua delle variazioni di massa di un campione in atmosfera controllata in funzione della temperatura o del tempo. Il diagramma che si ottiene in cui la massa è riportata in funzione della temperatura o del tempo è chiamato termogramma o curva di decomposizione termica.

Lo strumento per la TGA è formato da una microbilancia sensibile, chiamata termobilancia, un forno, un sistema di distribuzione del gas per garantire un'atmosfera inerte o al contrario reattiva e un sistema computerizzato per il controllo dello strumento e l'acquisizione ed elaborazione dei dati.

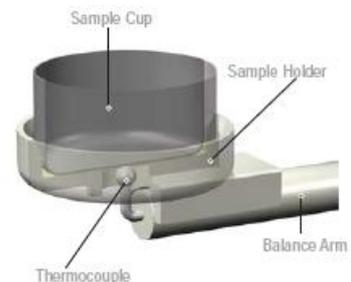
La bilancia solitamente ha una portata tra 1 e 100 mg e una sensibilità alle variazioni di massa fino a 0.1 µg. In figura 2.6-3 è mostrato un diagramma schematico della bilancia. Solo il braccio della bilancia che porta il campione è posto nel forno, mentre il resto è isolato termicamente da esso. Le variazioni di massa nel campione provocano una deflessione del braccio che si interpone tra una sorgente luminosa e un fotodiodo funzionando da otturatore. La variazione di corrente risultante nel fotodiodo viene amplificata e trasmessa all'interno di una bobina posta tra i poli di un magnete fisso. Il campo magnetico generato dalla bobina riporta il braccio della bilancia alla sua posizione di origine. Contemporaneamente le variazioni della corrente che passa nel fotodiodo vengono inviate al computer e trasformate in informazioni sulla perdita di massa tramite un sistema di elaborazione dei dati. Lo strumento da noi usato dispone di una bilancia costituita da due bracci di ceramica identici per l'alloggiamento di un campione e di un riferimento. In questo modo lo strumento è in grado di rilevare la differenza di peso fra i due bracci, in modo da eliminare i contributi strumentali, migliorando precisione e accuratezza della misura.

## 2. MATERIALI E METODI



**Figura 2.6-3 Componenti di una termobilancia**

Il forno consiste in una camera isolata termicamente dall'esterno in grado di produrre un range di temperature che va dalla temperatura ambiente fino a 1500 °C o più. Solitamente può essere impostata una velocità di riscaldamento da 0.1 °C/min a 100 °C/min e la temperatura può essere controllata con una precisione di 0.1 °C ed un'accuratezza di 1 °C. Per spurgare il forno e prevenire l'ossidazione del campione è presente un flusso continuo di un gas inerte, solitamente azoto o argon. Spesso si possono ottenere anche condizioni ossidanti usando come gas di spurgo ossigeno. È possibile anche impostare un cambiamento del tipo di gas di spurgo durante l'esperimento. Al termine dell'esperimento il forno viene raffreddato tramite aria forzata. La temperatura registrata dovrebbe essere idealmente quella del campione. Per fare ciò tuttavia si dovrebbe inserire una termocoppia direttamente nel campione, operazione che può essere abbastanza problematica. Perciò solitamente la temperatura è misurata tramite una termocoppia collocata il più vicino possibile al contenitore del campione. Nel caso dello strumento da noi utilizzato la termocoppia platino/platino-rodio è incorporata nelle estremità dei bracci di ceramica, sotto gli alloggiamenti di campione e riferimento. La termocoppia controlla tramite un sistema di feedback negativo anche la tensione che attraversa la resistenza che riscalda il forno, in modo da avere un accurato controllo della temperatura.



**Figura 2.6-4 Posizionamento della termocoppia del campione**

## 2. MATERIALI E METODI

Il campione solitamente è contenuto in una vaschetta di platino, alluminio o allumina. Il platino è molto usato per la sua inerzia e facilità di pulizia. Le operazioni da compiere prevedono l'impostazione del programma di riscaldamento, la taratura della vaschetta, il caricamento di questa con il campione, la sua pesata, l'avvio del programma di riscaldamento e il raffreddamento. Una scansione può durare anche qualche ora.

Registrandolo la massa in funzione della variazione di temperatura la termogravimetria fornisce un'informazione quantitativa, ma limitata a fenomeni fisici quali la vaporizzazione, la sublimazione e il desorbimento, e chimici quali la decomposizione termica e l'ossidazione. Perciò la TGA è applicata nelle analisi composizionali e nell'ottenimento di profili di decomposizione di sistemi a più componenti e nella determinazione quantitativa dei livelli di umidità di un campione.

### *2.6.3b Strumento e condizioni operative*

Le analisi termogravimetriche sono state effettuate con un SDT Q600 della TA Instruments (Philadelphia, USA). I campioni sono stati posti in contenitori di allumina e analizzati in flusso di azoto a 100 ml/min con il seguente programma: rampa da temperatura ambiente a 800 °C a 10 °C/min e a seguire rampa da 800 °C a 1100 °C a 50 °C/min.



Figura 2.6-5 SDT Q600 (TA Instruments)

## 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.1 Caratterizzazione delle Nanoparticelle

#### 3.1.1 Nanoparticelle di $Fe_2O_3$

##### 3.1.1a SAXS

Le nanoparticelle di  $Fe_2O_3$  da noi prodotte sono state indagate tramite SAXS per determinarne dimensioni e polidispersione.

Infatti nel processo di sintesi di nanoparticelle non si riescono ad ottenere NPs perfettamente identiche e di uguale dimensione. Una sospensione colloidale si dice polidispersa quando è caratterizzata da particelle di dimensione variabile all'interno di un certo range. Assumiamo che i raggi delle NPs presentino una distribuzione probabilistica data dalla funzione di Schulz<sup>23</sup>:

$$f(R) = \frac{(z+1)^{z+1}}{R_m \Gamma(z+1)} \left(\frac{R}{R_m}\right)^z \exp\left[-\frac{(z+1)R}{R_m}\right]$$

Dove  $R_m$  è il raggio medio della polidispersione e  $z$  è correlato alla polidispersità  $p$  attraverso la seguente relazione:  $p = (z+1)^{-1/2}$ .

Tanto più è piccolo  $p$  tanto più le nanoparticelle sono monodisperse.

L'intensità di scattering  $I(Q)$  è data da:

$$I(Q) = A \cdot \varphi \cdot P(Q) \cdot S(Q) + I_{bkg}$$

Dove  $P(Q)$  e  $S(Q)$  sono i fattori di forma e di struttura per nanoparticelle sferiche già incontrati,  $A$  è l'ampiezza in accordo con il setup strumentale usato e  $I_{bkg}$  è il background incoerente.

Lo spettro ottenuto (Figura 3.1-1) è stato poi fittato con il programma IGOR, usando la funzione preimpostata Polycore Fit, e impostando Shell Thickness (spessore del guscio) = 0 e  $S(Q) = 0$ . Il fitting dà come risultato nanoparticelle di raggio  $r = 4.07$  nm e polidispersità  $p = 0.786$ .

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

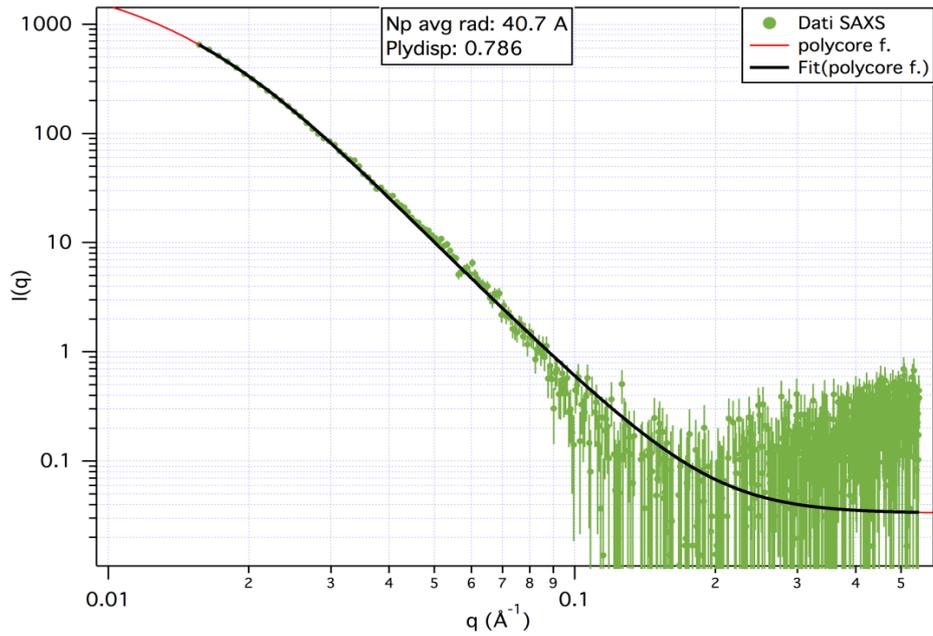


Figura 3.1-1: Distribuzione dell'intensità  $I$  in funzione di  $Q$  e relativo fitting per una sospensione di NPs di  $\text{Fe}_2\text{O}_3$

#### 3.1.2 Nanoparticelle di $\text{Fe}_3\text{O}_4$

##### 3.1.2a SAXS

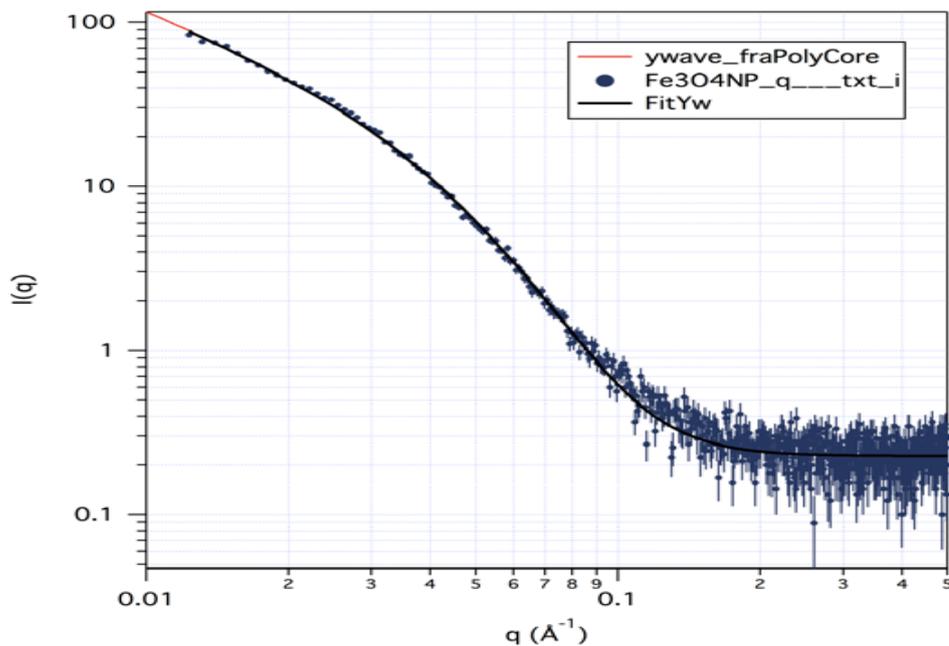


Figura 3.1-2: Distribuzione dell'intensità  $I$  in funzione di  $Q$  e relativo fitting per una sospensione di NPs di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

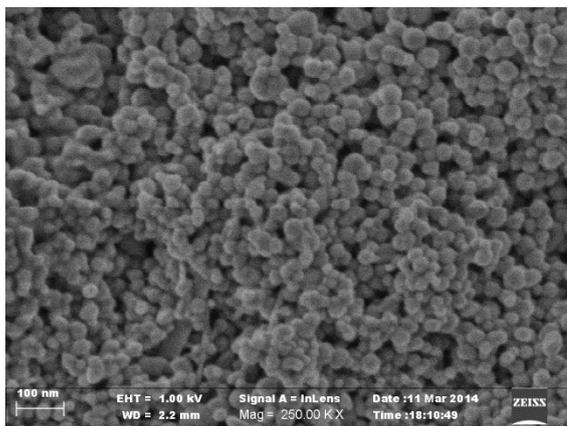
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Per le NPs di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  si è proceduto come descritto per le NPs di maghemite. Si ottiene la distribuzione delle intensità mostrata nella Figura 3.1-2 che fittata dà come risultato NPs di raggio  $r = 1.72 \text{ nm}$  e polidispersità  $p = 0.712$ .

#### **3.1.3 Nanoparticelle commerciali**

##### **3.1.3a SEM**

Le nanoparticelle di magnetite commerciali da noi usate sono state acquistate dalla Aldrich. Queste sono definite come nanopolvere di Ossido di Ferro (II,III) e hanno un diametro dichiarato dal produttore di 50-100 nm. L'analisi è stata effettuata attraverso un microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Tuttavia abbiamo deciso di esaminare le NPs al SEM, per valutarne le dimensioni e la polidispersità. Come si può vedere in Figura 3.1-3, le nanoparticelle sono abbastanza monodisperse, con un diametro compreso tra 30 nm e 60 nm. Questo valore è inferiore a quello dichiarato dal produttore.



**Figura 3.1-3: Nanoparticelle commerciali di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , ingrandimento 250000X**

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

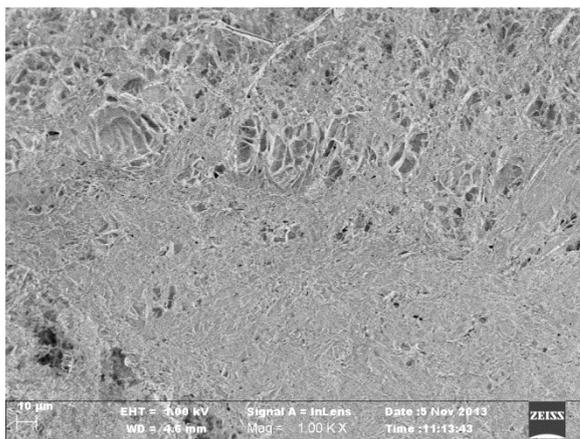
## 3.2 Caratterizzazione dei gel

### 3.2.1 Gel di PAAm-TGD liofilizzati a diverse pressioni

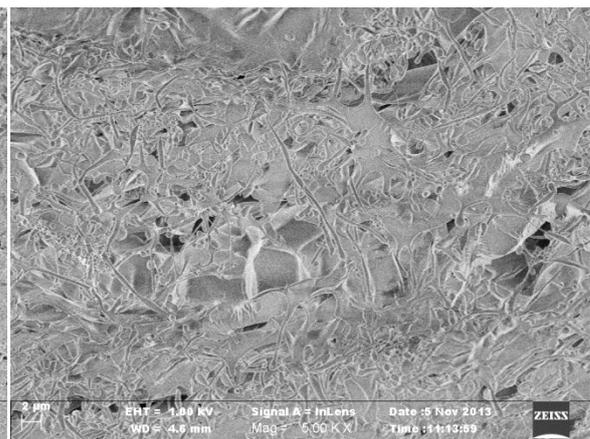
I campioni di PAAm-TGD liofilizzati direttamente, senza previo congelamento, a diverse pressioni sono poi stati sezionati e studiati al SEM. I campioni sono stati scansionati utilizzando un raggio di elettroni di energia  $E = 1 \text{ kV}$ .

#### 3.2.1a PAAm-TGD congelato a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$

Riportiamo qui le immagini ottenute al SEM del gel PAAm-TGD congelato a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  e poi successivamente lasciato scongelare.

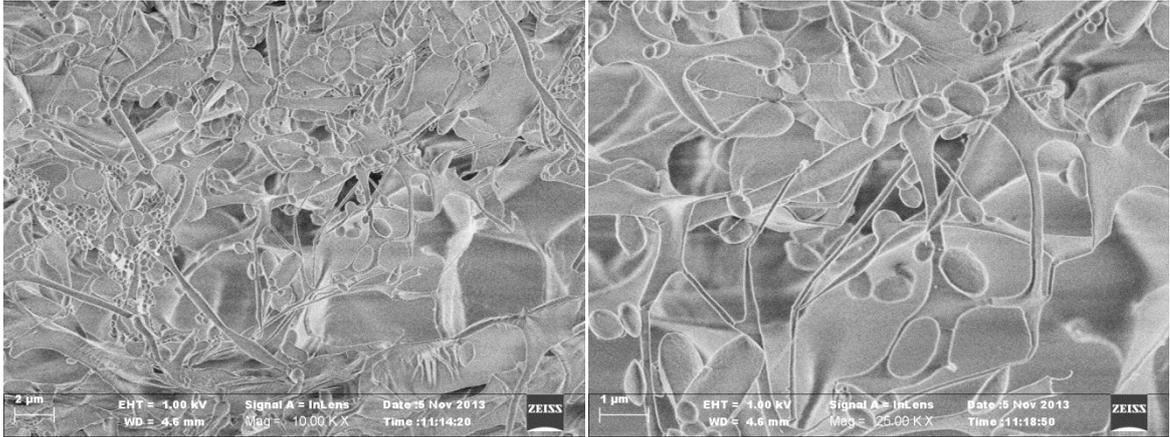


**Figura 3.2-1: Campione congelato a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ , ingrandimento 1000X**



**Figura 3.2-2: Campione congelato a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ , ingrandimento 5000X**

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE



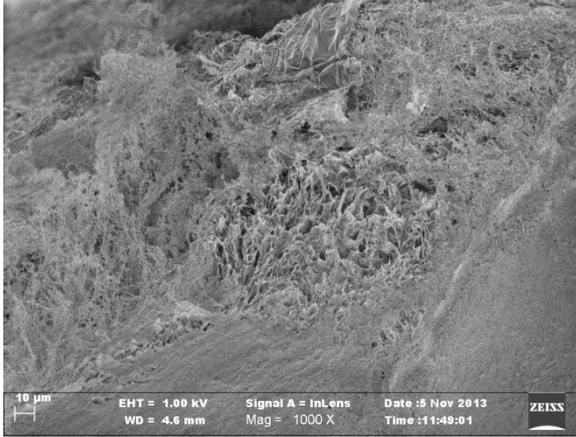
**Figura 3.2-3: Campione congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 10000X**      **Figura 3.2-4: Campione congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 25000X**

Il campione congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  è quello che tra tutti mostra dei pori di dimensioni maggiori. Si possono notare pori di  $20 - 30\text{ }\mu\text{m}$  di diametro abbastanza interconnessi tra di loro. Il gel appare costituito da strutture fibrose e fogli, oltre che da strutture globulari di circa  $0,5\text{ }\mu\text{m}$  di diametro.

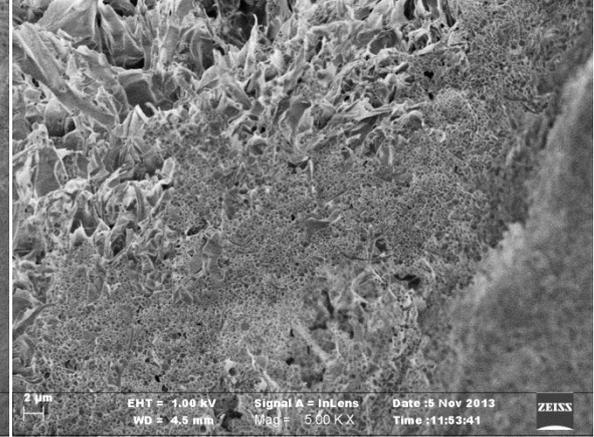
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.2.1b PAAm-TGD liofilizzato a 30 mTorr

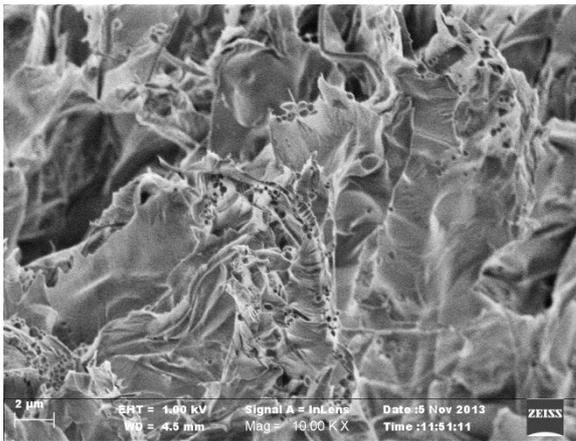
Riportiamo qui le immagini ottenute al SEM del gel PAAm-TGD liofilizzato a 30 mTorr senza previo congelamento e poi successivamente reidratato.



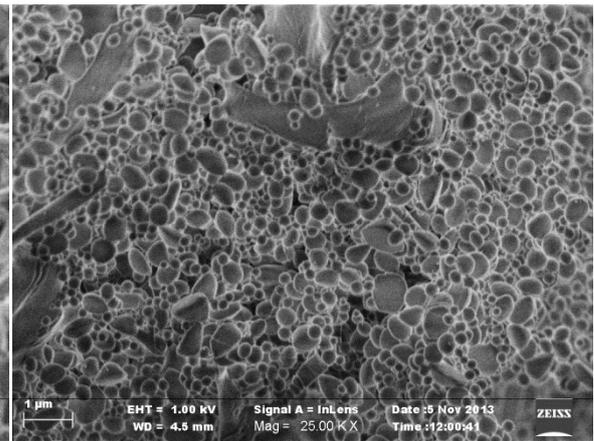
**Figura 3.2-5: Campione liofilizzato a 30 mTorr, ingrandimento 1000X**



**Figura 3.2-6: Campione liofilizzato a 30 mTorr, ingrandimento 5000X**



**Figura 3.2-7: Campione liofilizzato a 30 mTorr, ingrandimento 10000X**



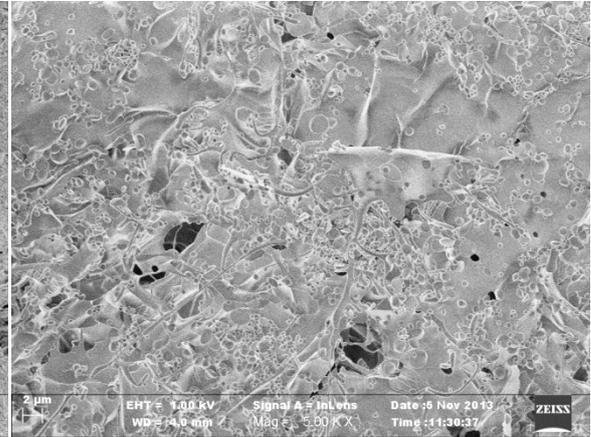
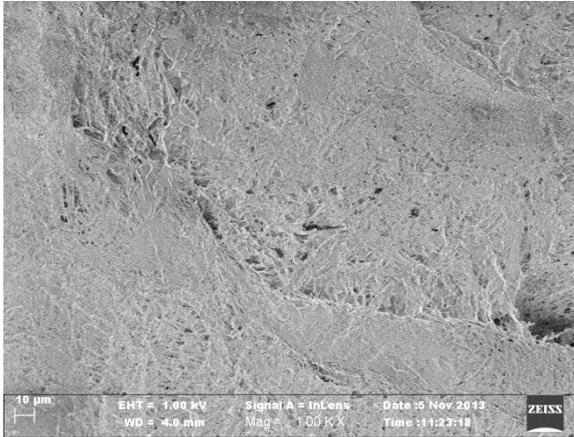
**Figura 3.2-8: Campione liofilizzato a 30 mTorr, ingrandimento 25000X**

Come si può vedere il campione liofilizzato a 30 mTorr osservato al SEM mostra due fasi morfologicamente distinte: accanto ad una tipica struttura fibrosa e lamellare troviamo zone dense di strutture globulari apparentemente legate tra loro solo attraverso interazioni deboli. Nella Figura 3.2-6 si possono osservare le due fasi distinte e separate in macroregioni. In Figura 3.2-7 è mostrato un dettaglio della fase fibroso/lamellare, mentre in Figura 3.2-8 si possono osservare chiaramente le strutture globulari di polimero.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

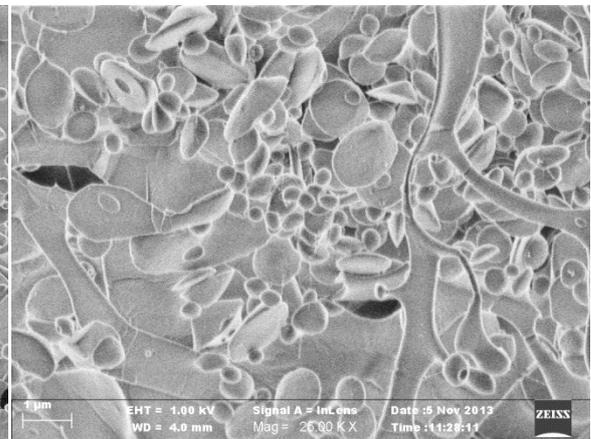
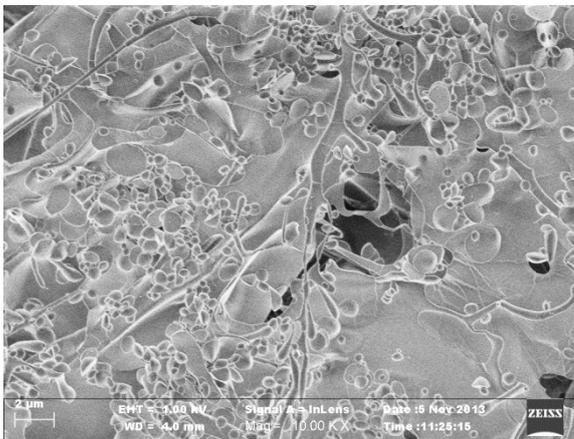
#### 3.2.1c PAAm-TGD liofilizzato a 52 mTorr

Riportiamo qui le immagini ottenute al SEM del gel PAAm-TGD liofilizzato a 52 mTorr senza previo congelamento e poi successivamente reidratato.



**Figura 3.2-9: Campione liofilizzato a 30 mTorr, ingrandimento 10000X**

**Figura 3.2-10: Campione liofilizzato a 30 mTorr, ingrandimento 10000X**



**Figura 3.2-11: Campione liofilizzato a 30 mTorr, ingrandimento 10000X**

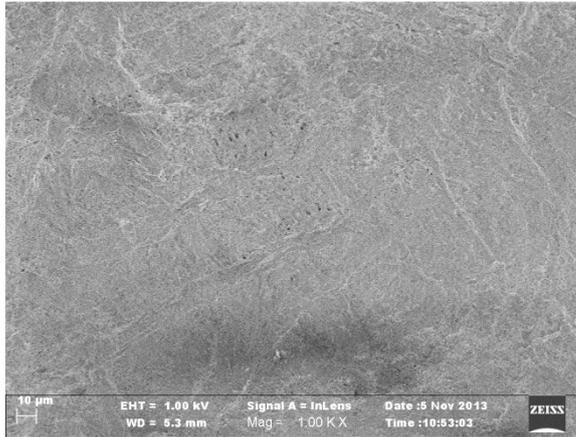
**Figura 3.2-12: Campione liofilizzato a 30 mTorr, ingrandimento 10000X**

Il campione liofilizzato a 52 mTorr osservato al SEM mostra una struttura piuttosto compatta, con porosità di dimensioni inferiori al micrometro e una piccola percentuale, inferiore al 10 %, di pori con diametro maggiore di 2 μm. Si notano delle strutture dendritiche circondate da strutture globulari.

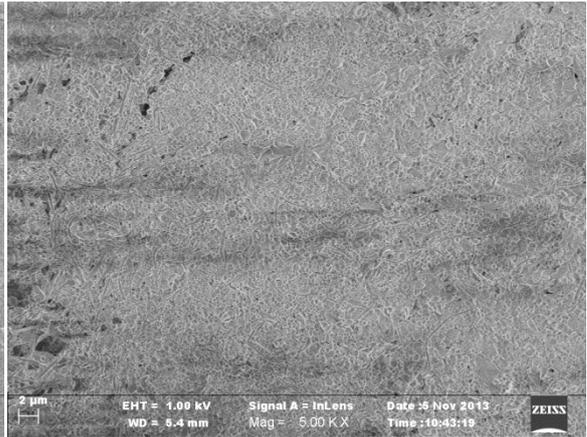
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.2.1dPAAm-TGD liofilizzato a 82 mTorr

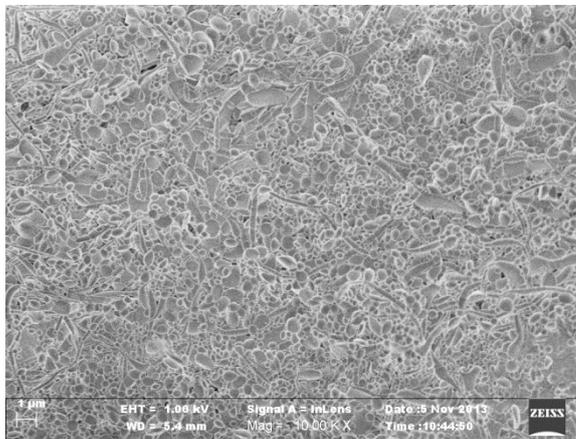
Riportiamo qui le immagini ottenute al SEM del gel PAAm-TGD liofilizzato a 82 mTorr senza previo congelamento e poi successivamente reidratato.



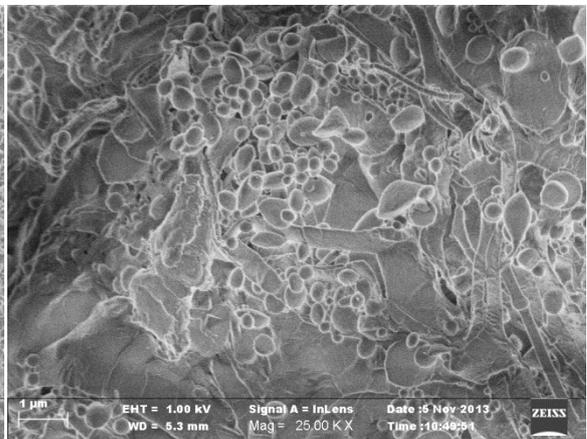
**Figura 3.2-13: Campione liofilizzato a 82 mTorr, ingrandimento 1000X**



**Figura 3.2-14: Campione liofilizzato a 82 mTorr, ingrandimento 5000X**



**Figura 3.2-15: Campione liofilizzato a 82 mTorr, ingrandimento 10000X**



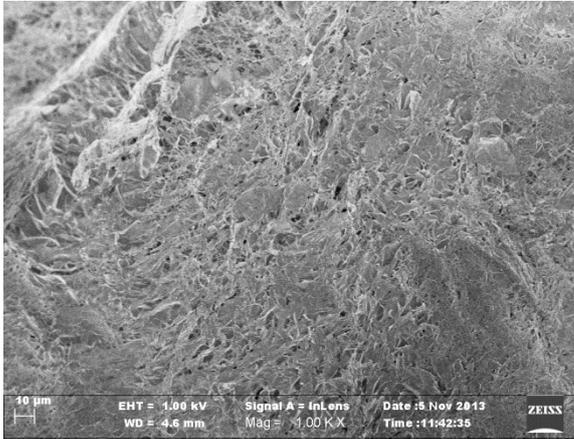
**Figura 3.2-16: Campione liofilizzato a 82 mTorr, ingrandimento 25000X**

Il campione liofilizzato a 82 mTorr mostra al SEM una struttura molto compatta, con poche e piccole porosità di dimensioni inferiori a 1 µm. Le fibre sono corte e sono presenti un gran numero di strutture globulari.

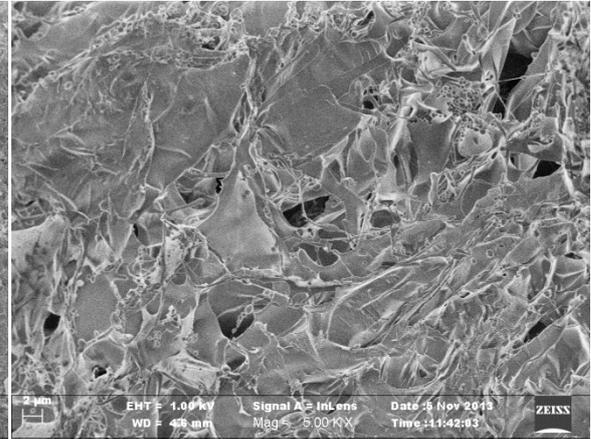
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.2.1e PAAm-TGD liofilizzato a 110 mTorr

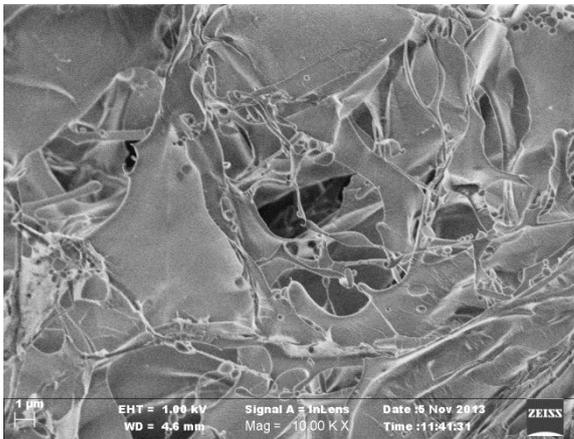
Riportiamo qui a seguito le immagini ottenute al SEM del gel PAAm-TGD liofilizzato a 110 mTorr senza previo congelamento e poi successivamente reidratato.



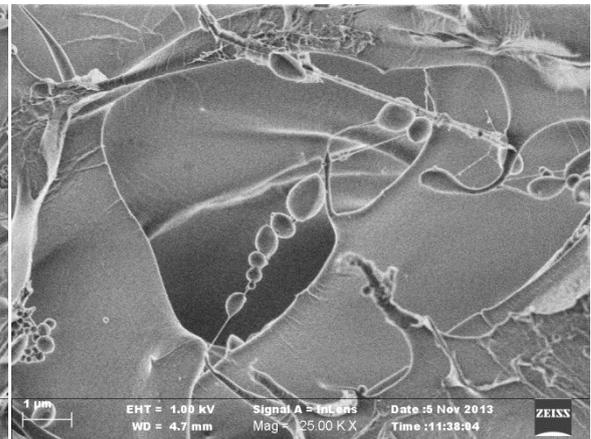
**Figura 3.2-17: Campione liofilizzato a 110 mTorr, ingrandimento 1000X**



**Figura 3.2-18: Campione liofilizzato a 110 mTorr, ingrandimento 5000X**



**Figura 3.2-19: Campione liofilizzato a 110 mTorr, ingrandimento 10000X**



**Figura 3.2-20: Campione liofilizzato a 110 mTorr, ingrandimento 25000X**

Il campione di gel liofilizzato a 110 mTorr osservato al SEM presenta una struttura costituita di fogli di gel interconnessi tra di loro, oltre ad un numero ridotto di strutture fibrose. Sono invece quasi completamente assenti le strutture globulari. I pori sono molto numerosi e hanno dimensioni variabili comprese tra 1 e 5 μm.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.2.1f *Discussione dei dati*

Da tutti i campioni studiati emerge chiaramente che la pressione a cui abbiamo liofilizzato i nostri campioni non contribuisce significativamente alla formazione di macropori. L'unico campione in cui abbiamo notato un incremento della porosità è il gel di PAAm-TGD congelato in freezer a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Questo può essere dovuto al fatto che liofilizzando direttamente i gel si ha un parziale congelamento di essi per caduta di pressione, ma le condizioni di questo congelamento non sono controllabili e sono difficilmente riproducibili. Per questo abbiamo deciso di concentrarci solo sugli effetti del congelamento.

#### 3.2.2 *Gel chimici e fisici congelati a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$*

Per poter comprendere meglio gli effetti del congelamento sulla struttura dei gel è stato condotto un confronto tra due differenti gel di poliacrilammide e tre gel fisici quali pectina, guar e chitosano. I campioni dei vari gel sono stati congelati in freezer a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e poi passati in azoto liquido prima di essere liofilizzati e studiati al SEM. I campioni sono stati scansionati utilizzando un raggio di elettroni di energia  $E = 1\text{ kV}$ .

##### 3.2.2a *Gel di chitosano*

Riportiamo qui a seguito le immagini ottenute al SEM del gel di chitosano congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Abbiamo analizzato con il SEM anche una sezione del gel non sottoposto a trattamenti criogenici.

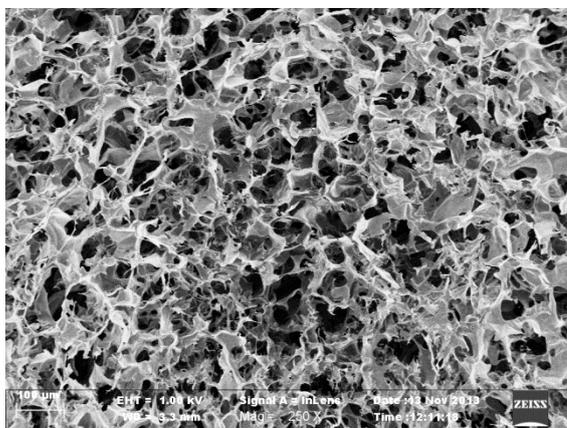


Figura 3.2-21: Gel di chitosano congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 250X

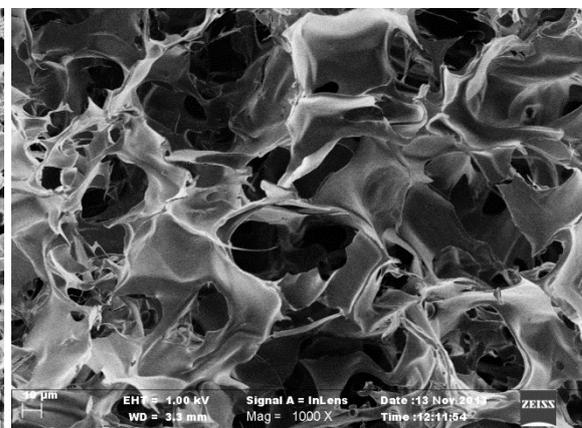
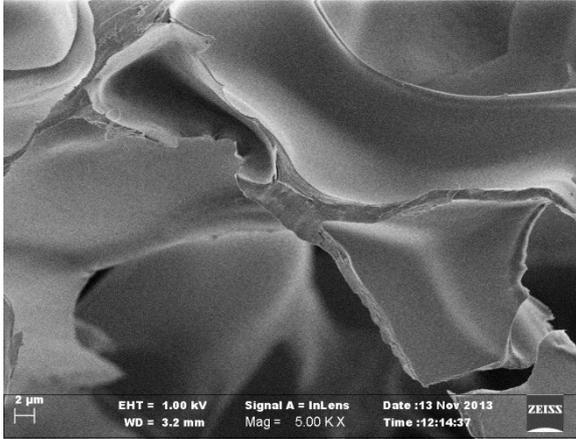
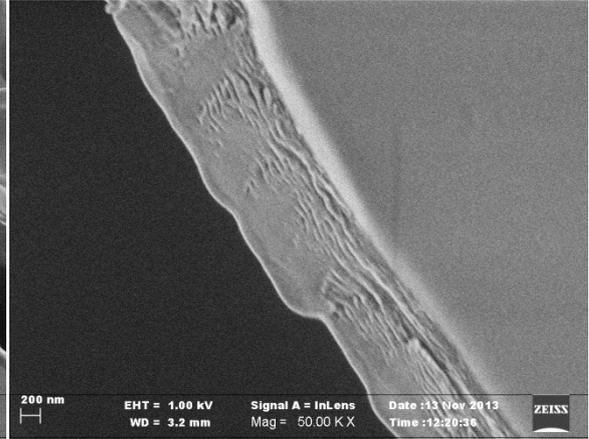


Figura 3.2-22: Gel di chitosano congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 1000X

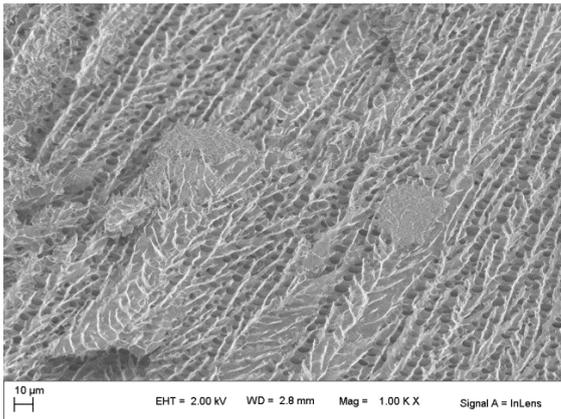
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE



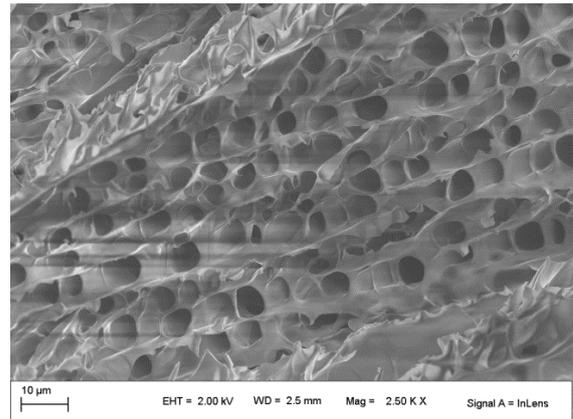
**Figura 3.2-23: Gel di chitosano congelato a -18°C, ingrandimento 5000X**



**Figura 3.2-24: Gel di chitosano congelato a -18°C, ingrandimento 50000X**



**Figura 3.2-25: Gel di chitosano non congelato, ingrandimento 2500X**



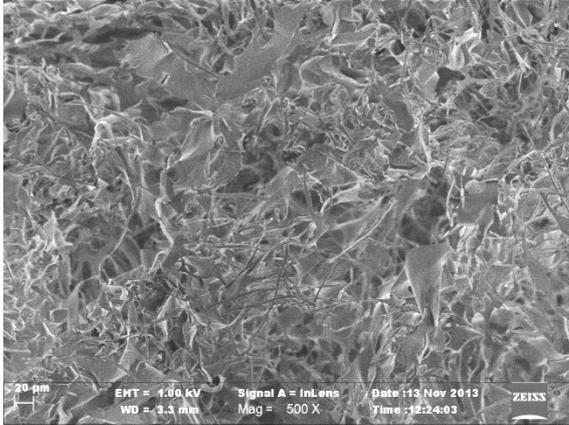
**Figura 3.2-26: Gel di chitosano non congelato, ingrandimento 1000X**

Come si può notare dalle immagini riprese al SEM, il chitosano congelato a -18 °C presenta pori numerosi e altamente interconnessi, di dimensioni comprese tra i 20 e i 100 μm. Nella Figura 3.2-24 si può notare un dettaglio della parete di un poro, che mostra come questa sia costituita dall'unione di più fogli. Il chitosano non sottoposto a trattamenti criogenici invece mostra pori meno numerosi e più piccoli, con diametro di circa 5 μm.

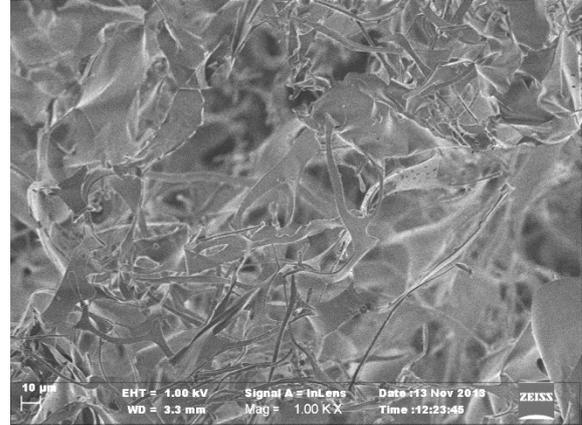
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.2.2b Gel di pectina

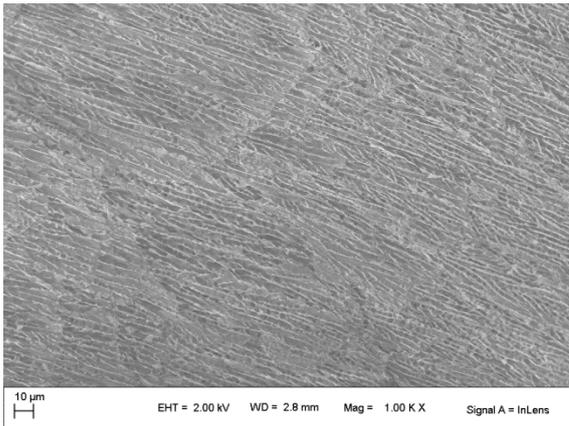
Riportiamo qui di seguito le immagini ottenute al SEM del gel di pectina congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e del gel non sottoposto a trattamento criogenico, usato come confronto.



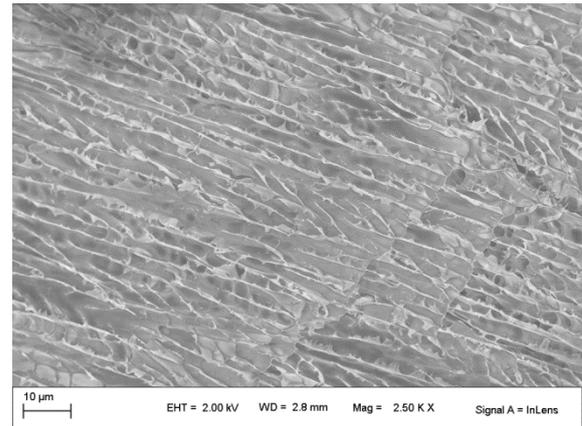
**Figura 3.2-27: Gel di pectina congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 500X**



**Figura 3.2-28: Gel di pectina congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 1000X**



**Figura 3.2-28: Gel di pectina non congelato, ingrandimento 1000X**



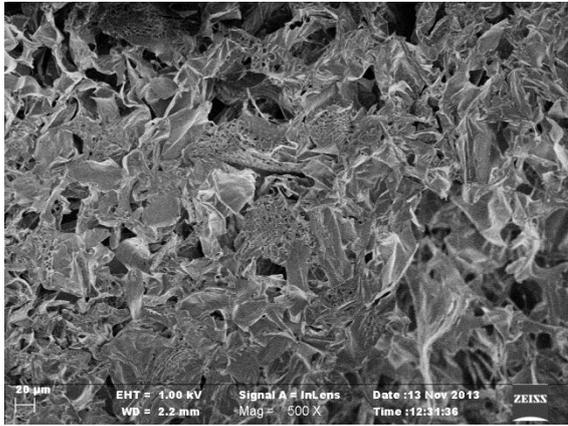
**Figura 3.2-30: Gel di pectina non congelato, ingrandimento 2500X**

Anche nel caso della pectina si nota una notevole differenza tra il gel che è stato congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e il gel di confronto. Nel primo caso infatti si nota una struttura a rete, fibrosa e molto interconnessa, in cui è difficile individuare dei veri e propri pori, le dimensioni delle cavità in questa struttura superano i  $50\text{ }\mu\text{m}$ . Nel gel di confronto invece sono presenti dei veri e propri pori, con diametro  $< 5\text{ }\mu\text{m}$ . Questi pori sono ordinati e disposti lungo file parallele.

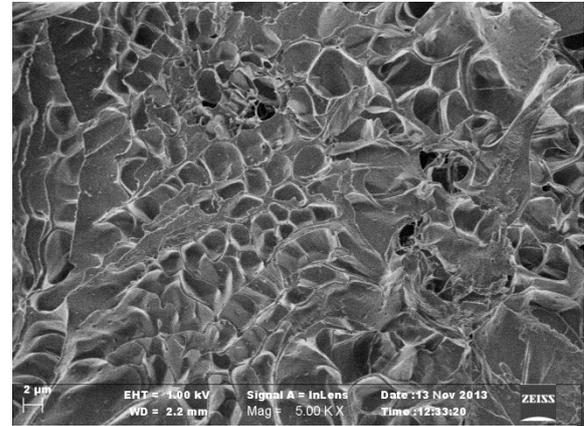
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.2.2c Gel di guar

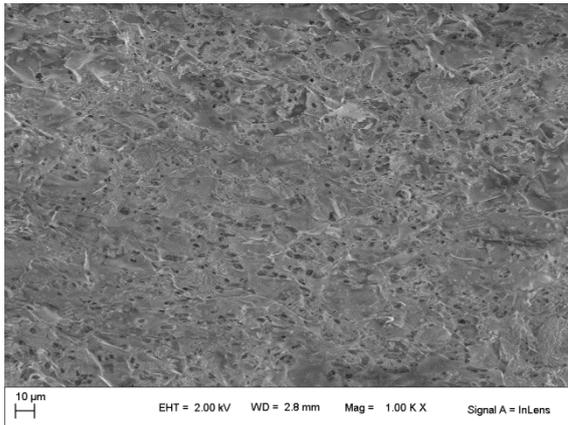
Riportiamo qui di seguito le immagini ottenute al SEM del gel di guar congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Abbiamo analizzato con il SEM anche una sezione del gel non sottoposto a trattamenti criogenici per utilizzarlo come confronto.



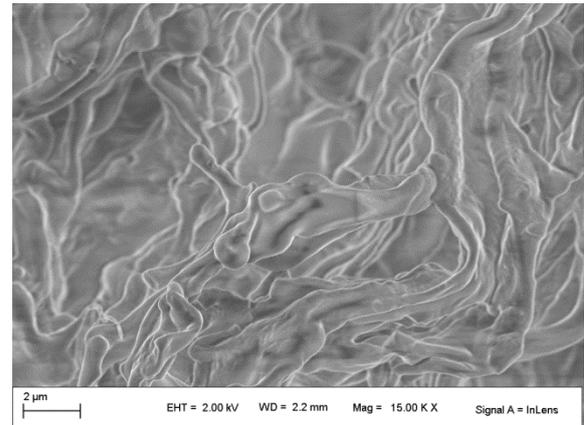
**Figura 3.2-31: Gel di guar congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 500X**



**Figura 3.2-32: Gel di guar congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 5000X**



**Figura 3.2-29: Gel di guar non congelato, ingrandimento 1000X**



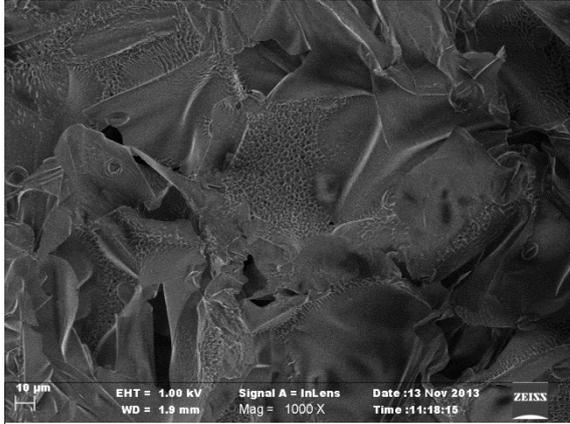
**Figura 3.2-34: Gel di guar non congelato, ingrandimento 15000X**

Come si può vedere nelle immagini il gel di guar congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  mostra una struttura formata da macropori, di diametro  $> 20\text{ }\mu\text{m}$  e spesse pareti in cui sono presenti dei micropori, di diametro di circa  $2\text{ }\mu\text{m}$  (Figura 3.2-32). Nel gel non congelato invece sono presenti solo i micropori.

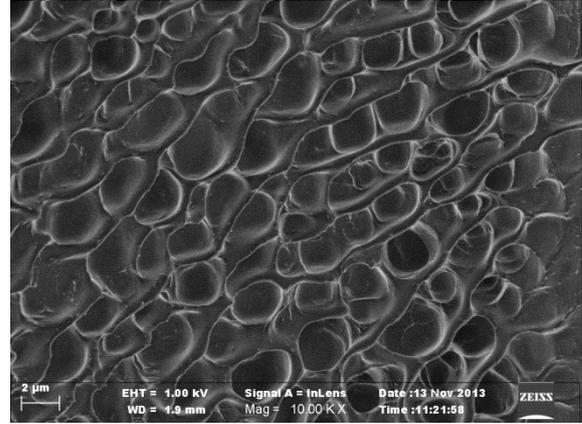
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.2.2d Gel di PAAm-TGD

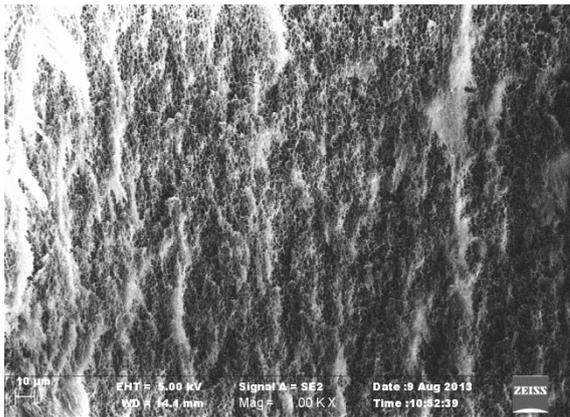
Riportiamo qui di seguito le immagini ottenute al SEM del gel di PAAm-TGD congelato a  $-18^{\circ}\text{C}$  e del gel non sottoposto a trattamento criogenico, usato come confronto.



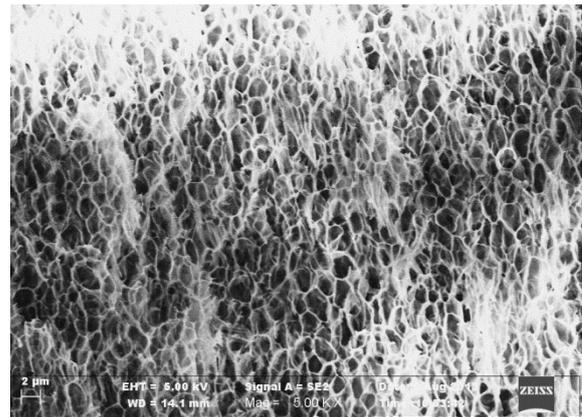
**Figura 3.2-31: Gel di PAAm-TGD congelato a  $-18^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 1000X**



**Figura 3.2-30: Gel di PAAm-TGD congelato a  $-18^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 10000X**



**Figura 3.2-32: Gel di PAAm-TGD non congelato, ingrandimento 1000X**



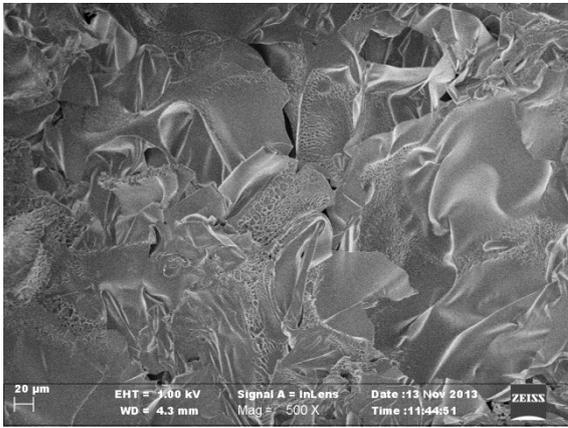
**Figura 3.2-33: Gel di PAAm-TGD non congelato, ingrandimento 5000X**

Come si può vedere nelle immagini riprese al SEM, anche nel caso del PAAm-TGD si possono notare notevoli differenze tra la struttura del gel congelato a  $-18^{\circ}\text{C}$  e il gel di confronto. In tutti e due i campioni è presente una struttura microporosa con pori di circa  $2\ \mu\text{m}$  di diametro. Tuttavia nel campione di gel congelato si può osservare anche una struttura macroporosa a fogli sovrapposti, con cavità di grandezza maggiore di  $50\ \mu\text{m}$ .

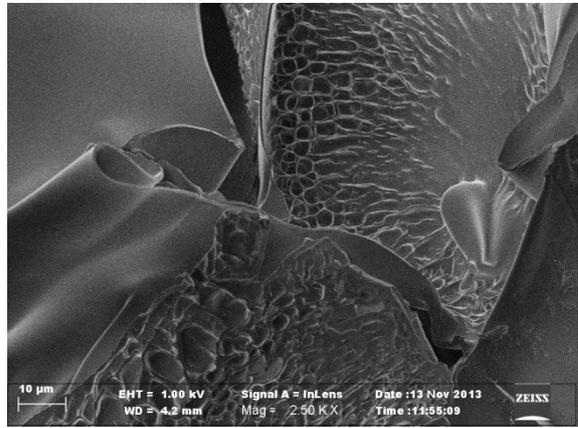
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.2.2e Gel di PAAm-PGD

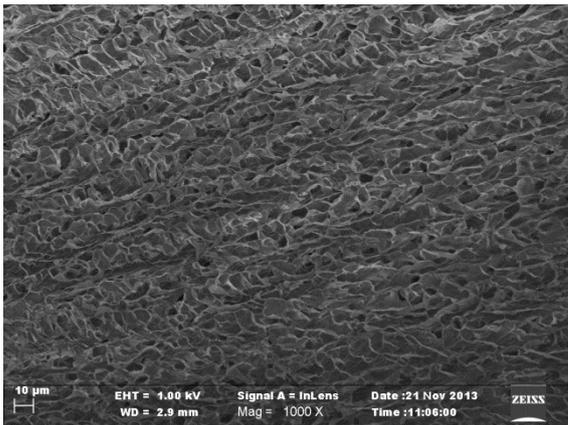
Riportiamo qui di seguito le immagini ottenute al SEM del gel di PAAm-PGD congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e dello stesso gel non sottoposto a trattamenti criogenici.



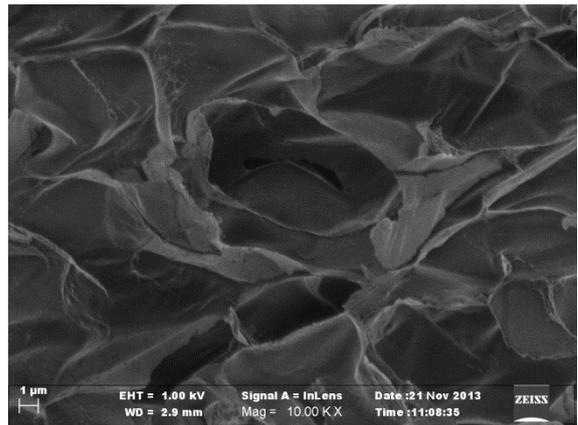
**Figura 3.2-39: Gel di PAAm-PGD congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 500X**



**Figura 3.2-40: Gel di PAAm-PGD congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 2500X**



**Figura 3.2-41: Gel di PAAm-PGD non congelato, ingrandimento 1000X**



**Figura 3.2-34: Gel di PAAm-PGD non congelato, ingrandimento 10000X**

Anche nel caso del gel di PAAm-PGD si può osservare una differenza marcata tra il campione congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e il campione non sottoposto a trattamenti criogenici. Il campione congelato infatti presenta delle macroporosità di diametro compreso tra i  $50$  e i  $100\text{ }\mu\text{m}$  con strutture a fogli sovrapposti e interconnessi. Sulle pareti di questi fogli sono presenti degli accenni di pori, di diametro tra i  $2$  e i  $5\text{ }\mu\text{m}$ . Questo fatto fa ipotizzare che i macropori si siano formati per il collasso dei pori più piccoli in strutture lamellari più compatte. Il campione non congelato presenta solo microporosità, molto numerose e abbastanza interconnesse, con diametro di circa  $5\text{ }\mu\text{m}$ .

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### *3.2.2f Discussione dei dati*

Tutte le immagini ottenute al SEM mostrano che il congelamento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  dei gel sia fisici che chimici ha un effetto determinante sulla formazione delle macroporosità. Questo conferma i risultati ottenuti in precedenza<sup>11</sup> per i gel fisici e inoltre dimostra che gli stessi effetti sono riscontrabili sui gel chimici di poliacrilammide. In tutti e due i gel di poliacrilammide da noi studiati infatti abbiamo ottenuto la formazione di macropori quando questi sono stati congelati a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . In tutti i campioni da noi studiati questi macropori sembrano derivare dal collasso della struttura microporosa. Le pareti dei macropori infatti sono di spessore maggiore e in molti casi si può osservare come su di esse siano ancora presenti dei micropori, di forma e dimensioni analoghe a quelli presenti nei gel non congelati; inoltre nel chitosano congelato è chiaramente visibile come una parete di un macroporo sia costituita dall'unione di tanti strati, che probabilmente non sono altro che le pareti dei micropori collassate le une sulle altre (vedi Figura 3.2-24). Questo suggerisce che in tutti i casi i macropori si siano formati in modo analogo. La crescita dei cristalli di ghiaccio sottrae il polimero dalle regioni in via di solidificazione e lo concentra nelle regioni in cui è ancora presente acqua liquida, ed è in queste zone che il polimero precipita andando a costituire quelle che saranno le pareti del macrogel. Lo scioglimento dei cristalli di ghiaccio poi lascia posto a regioni di acqua priva di polimero che vanno a costituire i macropori del gel. Dai risultati ottenuti si nota che i gel che hanno subito maggiori modifiche della porosità quando sottoposti a trattamento criogenico sono stati il chitosano come esempio di gel fisico e il PAAm-PGD come esempio di gel chimico. Perciò nei successivi esperimenti abbiamo deciso di concentrarsi solo su questi due gel.

#### **3.2.3 Gel di chitosano e PAAm-PGD congelati a diverse velocità**

In questa fase il nostro scopo è stato quello di mostrare quale sia l'influenza della velocità di congelamento piuttosto che la temperatura finale di raffreddamento sulla formazione dei macropori. Perciò abbiamo preso i nostri campioni di gel chitosano e PAAm-PGD e li abbiamo fatti raffreddare fino a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $3.0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e fino a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . I campioni sono poi stati liofilizzati previo congelamento in azoto liquido e studiati al SEM

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.2.3a Gel di chitosano

Riportiamo qui le immagini ottenute al SEM del gel di chitosano congelato fino a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $3.0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e fino a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

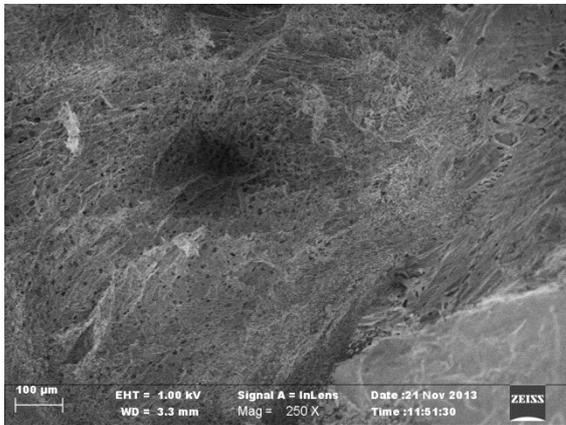


Figura 3.2-36: Gel di chitosano congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 250X

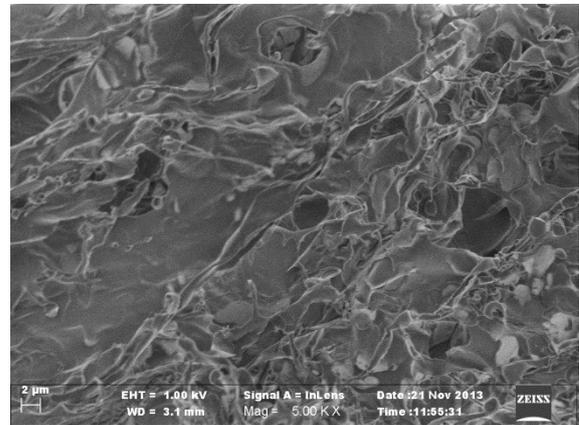


Figura 3.2-35: Gel di chitosano congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 5000X

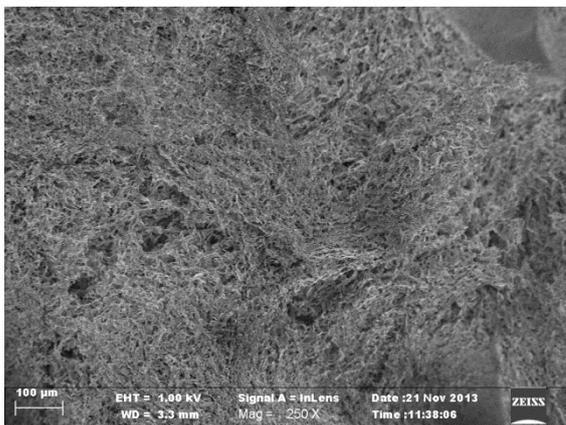


Figura 3.2-38: Gel di chitosano congelato a  $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , ingrandimento 250X

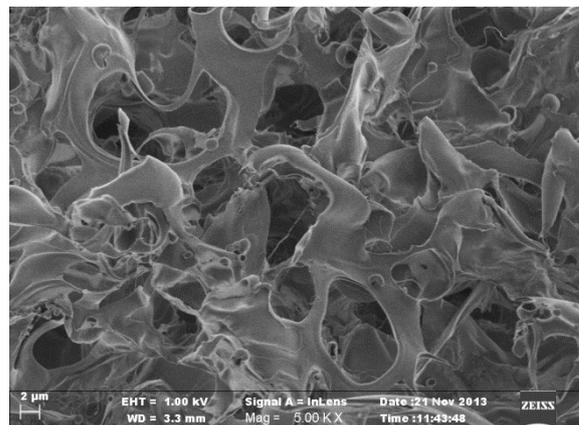
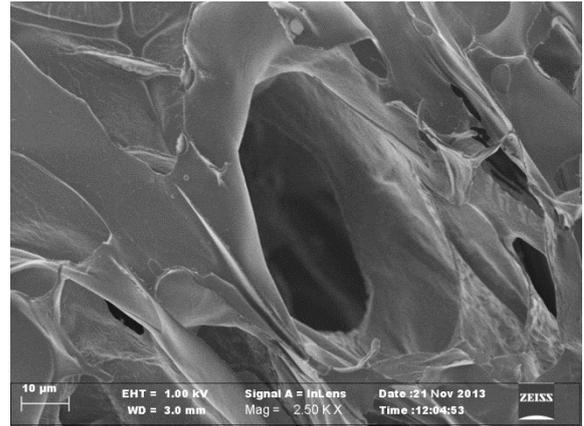
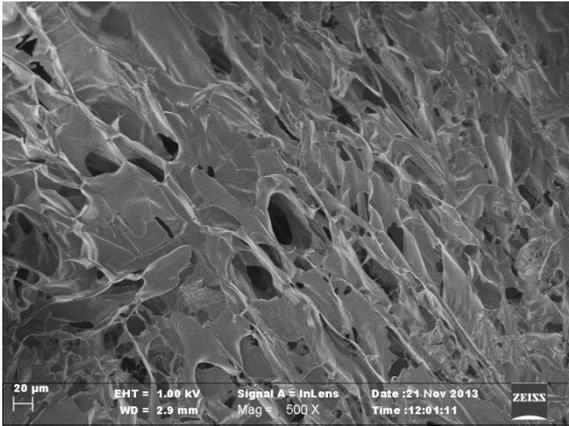


Figura 3.2-37: Gel di chitosano congelato a  $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , ingrandimento 5000X

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE



**Figura 3.2-40: Gel di chitosano congelato a 0.1 °C/min, ingrandimento 500X**

**Figura 3.2-39: Gel di chitosano congelato a 0.1 °C/min, ingrandimento 2500X**

Nelle immagini precedenti è ben visibile l'effetto della velocità di raffreddamento sulla formazione dei macropori nel gel di chitosano. Nelle figure Figura 3.2-35 e Figura 3.2-36 si può vedere come il gel congelato in freezer con una velocità di raffreddamento di 7 °C/min mostra una struttura con micropori di dimensioni < 2 μm. Il gel raffreddato a 3 °C/min mostra una struttura simile, con pori di dimensioni leggermente superiori, tra i 2 e i 5 μm, ma più numerosi. Il gel raffreddato a 0.1 °C/min mostra gli effetti più evidenti della velocità di raffreddamento sulla formazione dei macropori. Infatti questo gel è formato da numerosi pori interconnessi di diametro intorno ai 20 μm. Il volume dei pori è quindi aumentato di un fattore 10<sup>3</sup> passando da una velocità di raffreddamento di 3 °C/min a 0.1 °C/min.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.2.3b Gel di PAAm-PGD

Riportiamo qui le immagini ottenute al SEM del gel di PAAm-PGD congelato fino a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $3.0\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e fino a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

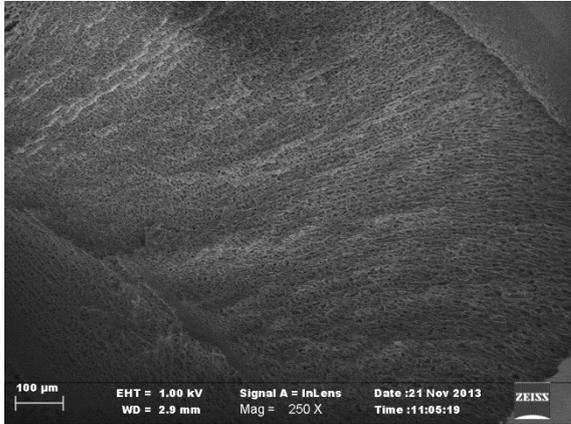


Figura 3.2-42: Gel di PAAm-PGD congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 250X

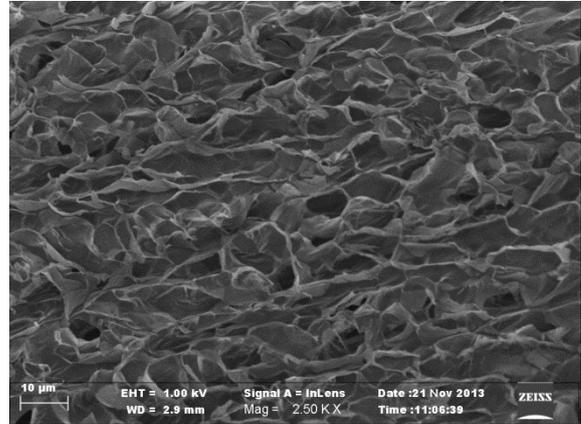


Figura 3.2-41: Gel di PAAm-PGD congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 2500X

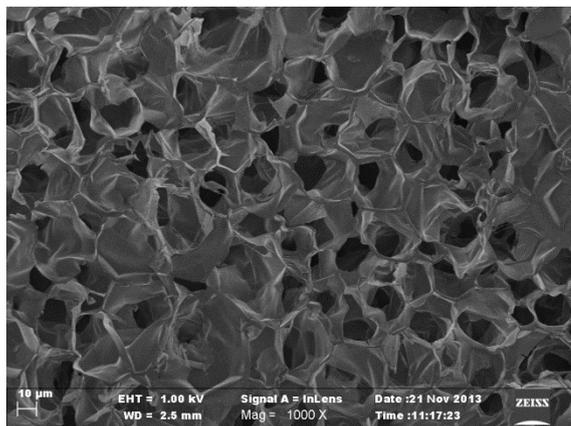


Figura 3.2-43: Gel di PAAm-PGD congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 1000X

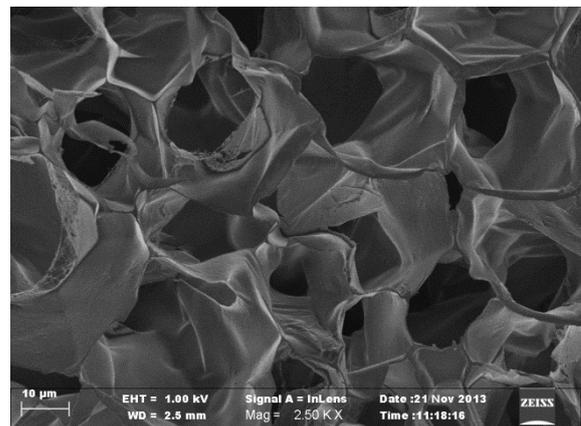


Figura 3.2-44: Gel di PAAm-PGD congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ingrandimento 2500X

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

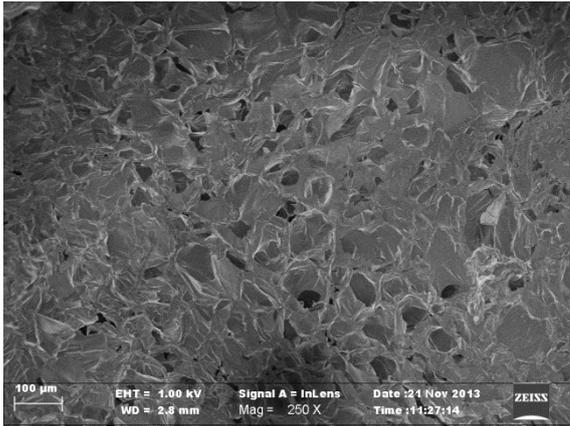


Figura 3.2-46: Gel di PAAm-PGD congelato a 0.1 °C/min, ingrandimento 1000X

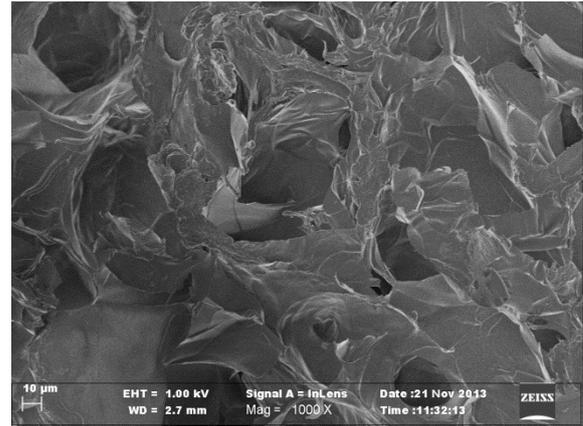


Figura 3.2-45: Gel di PAAm-PGD congelato a 0.1 °C/min, ingrandimento 1000X

Nel caso del gel di PAAm-PGD l'incremento delle dimensioni dei pori con il diminuire della velocità di raffreddamento è ancora più evidente che nel gel di chitosano. Come si può notare dalle immagini infatti nel gel congelato in freezer ad una velocità di raffreddamento di 7 °C/min sono presenti numerosi pori interconnessi con un diametro medio inferiore ai 5 µm. Nel gel congelato con una velocità di raffreddamento di 3.0 °C/min si notano pori ugualmente numerosi e interconnessi ma con un diametro medio superiore intorno ai 20 µm. Come si può osservare nelle figure 3.2-46 e 3.2-47 i pori hanno prevalentemente una forma esagonale e formano una struttura ad alveare. Questo potrebbe essere un indizio importante per sostenere la teoria che i macropori si siano formati in seguito alla crescita di cristalli di ghiaccio; infatti come è noto i cristalli di ghiaccio hanno una geometria esagonale e quindi la loro crescita potrebbe aver costretto i pori ad assumere questa forma.

Il campione di gel congelato con una velocità di raffreddamento di 0.1 °C/min mostra pori ancora più grandi, di diametro compreso tra i 50 e i 100 µm. Si riscontra perciò un aumento del volume dei pori di circa 60 volte passando da 7 °C/min a 3.0 °C/min a un aumento di oltre 10<sup>3</sup> volte passando da 7 °C/min a 0.1 °C/min.

#### 3.2.3c Discussione dei dati

Dalle immagini riprese al SEM dei gel di chitosano e PAAm-PGD congelati con diverse velocità di raffreddamento emerge chiaramente che il fattore determinante nella formazione delle macroporosità è proprio la velocità con cui viene congelato il gel, e

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

non la temperatura finale di congelamento. Questo dato conferma quanto già provato da Van Vlierberghe et al.<sup>10</sup> per i gel fisici quali la gelatina di tipo B ed inoltre ne estende la validità anche per i gel chimici di poliacrilammide. Anzi, nel caso del gel di PAAm-PGD l'effetto della velocità di raffreddamento sulle dimensioni dei pori è ancora più evidente che per il chitosano poiché il volume dei pori aumenta in proporzioni maggiori passando da una velocità di raffreddamento di 7 °C/min a 0.1 °C/min.

La minore velocità di raffreddamento determina la formazione di un minor numero di nuclei di congelamento e quindi la formazione di cristalli meno numerosi e più grandi. Cristalli più grandi produrranno pori di dimensioni più grandi una volta che si sono sciolti. Questa ipotesi è avvalorata dalle immagini prodotte al SEM del gel di PAAm-PGD congelato a 3 °C/min (figure 3.2-51 e 3.2-52) dove si notano pori di forma esagonale. Questa forma è infatti tipica di molti cristalli di ghiaccio.

### **3.3 Caratterizzazione dei gel magnetici**

Dopo la caratterizzazione dei gel bianchi siamo passati alla caratterizzazione dei gel con le nanoparticelle magnetiche. Questi gel sono stati analizzati al SEM per determinarne la struttura macroporosa e attraverso la TGA e la microanalisi EDAX per determinarne l'analisi elementare e in particolare la percentuale di ferro sul totale.

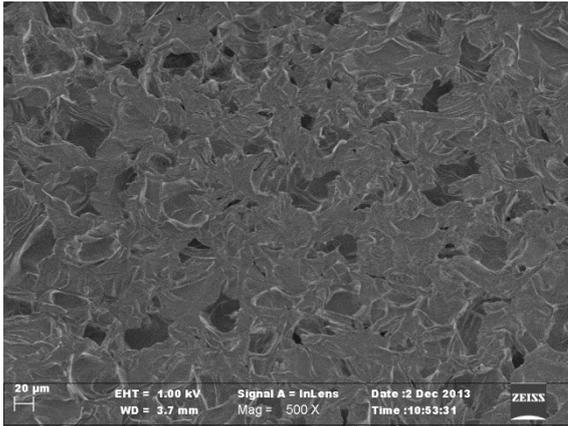
#### ***3.3.1 Gel di PAAm-PGD con nanoparticelle di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>***

I gel di PAAm-PGD sono stati sintetizzati sia con NPs cariche positivamente che negativamente. Le analisi SEM e la TGA sono state effettuate su tutti e due i tipi di gel, ma, poiché non si sono notate differenze né microscopiche né macroscopiche nella struttura dei gel caricati con i due differenti tipi di NPs, abbiamo deciso di riportare nei paragrafi seguenti solo i risultati dei gel caricati con NPs positive.

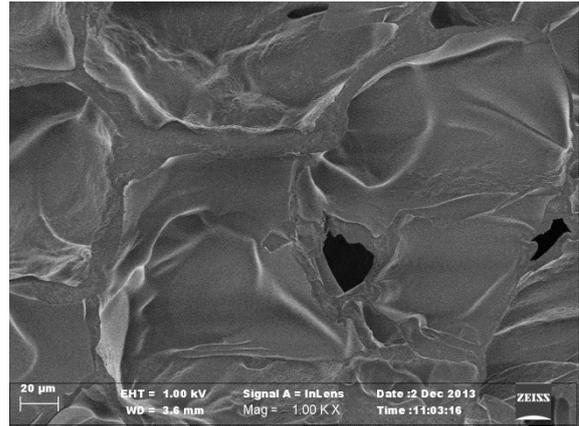
##### ***3.3.1a SEM***

Riportiamo qui di seguito le immagini ottenute al SEM dei campioni di gel di PAAm-PGD con NPs di maghemite congelati fino a -10 °C a 0.1 °C/min e fino a -18 °C a 7 °C/min.

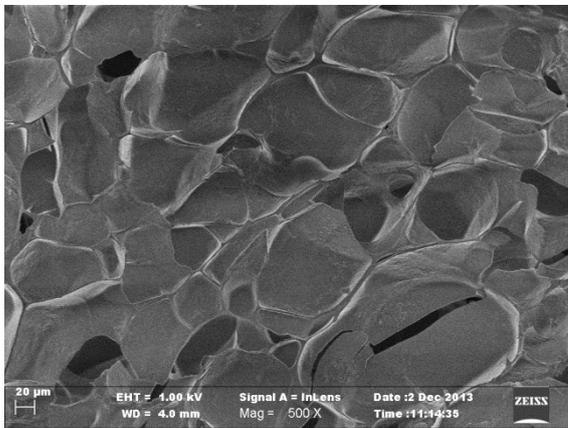
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE



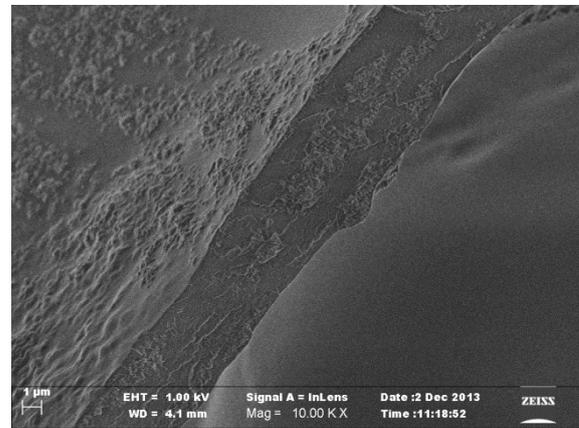
**Figura 3.3-1: Gel di PAAm-PGD con NPs di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> congelato a -18 °C, ingrandimento 500X**



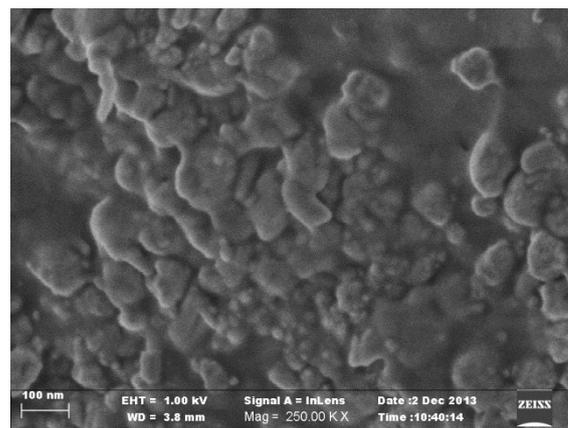
**Figura 3.3-2: Gel di chitosano con NPs di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> congelato a -18 °C, ingrandimento 1000X**



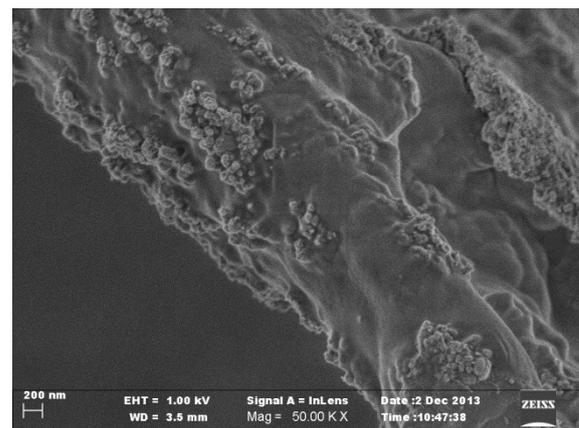
**Figura 3.3-3: Gel di PAAm-PGD con NPs di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> congelato a 0.1°C/min, ingrandimento 500X**



**Figura 3.3-4: Gel di PAAm-PGD con NPs di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> congelato a 0.1°C/min, ingrandimento 10000X**



**Figura 3.3-5: Gel di PAAm-PGD con NPs di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> congelato a 0.1°C/min, ingrandimento 250000X**



**Figura 3.3-6: Gel di PAAm-PGD con NPs di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> congelato a 0.1°C/min, ingrandimento 50000X**

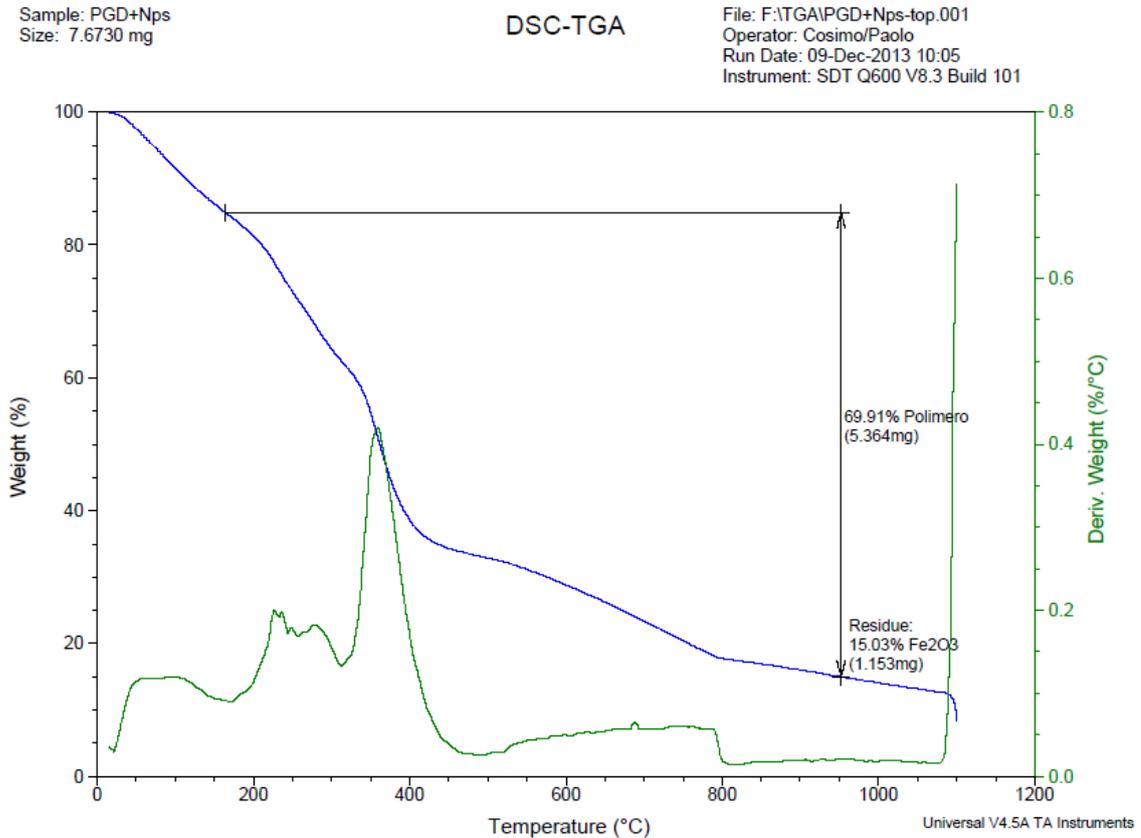
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Come si può vedere dalle immagini riprese al SEM i due gel di PAAm-PGD con NPs di maghemite congelate con due differenti velocità di raffreddamento hanno una morfologia molto diversa. Nel gel congelato a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  si possono notare pori poco numerosi, di diametro medio di circa  $20\text{ }\mu\text{m}$ , circondati da spesse pareti (fino a  $5\text{--}10\text{ }\mu\text{m}$ ). Il gel raffreddato fino a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  invece mostra una struttura “a bolle”, con pori di diametro molto vario, dai  $20$  ai  $100\text{ }\mu\text{m}$ . Anche in questo caso le pareti hanno uno spessore di circa  $5\text{ }\mu\text{m}$  (Figura 3.3-). In Figura 3.3- sono mostrati due dettagli delle pareti del gel in cui sono ben visibili gli agglomerati di nanoparticelle di maghemite. In Figura 3.3- si riescono a distinguere le singole NPs, che hanno un diametro di circa  $10\text{ nm}$ .

#### ***3.3.1b Analisi termogravimetrica (TGA)***

Per verificare la percentuale di  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  sul polimero totale abbiamo effettuato l'analisi termogravimetrica sul gel parzialmente disidratato. Poiché siamo interessati solo a verificare la percentuale di  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  sul polimero e non siamo interessati a verificarne il grado di idratazione, il gel è stato prima disidratato così da poter minimizzare l'errore derivato dall'utilizzo di piccoli volumi di gel. Il campione analizzato è stato prelevato ad un centimetro dal fondo della provetta in cui è stato sintetizzato il gel, prima di sottoporlo a trattamenti criogenici. Riportiamo qui di seguito il termogramma effettuato.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE



**Figura 3.3-1: Termogramma del gel di PAAm-PGD con NPs di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

Nel termogramma si notano diverse diminuzioni di massa. La prima, fino a 150 °C circa, è ancora inerente all'evaporazione dell'acqua residua. Oltre i 160 °C, fino a 800 °C, possiamo osservare le perdite di massa dovute alla vaporizzazione e decomposizione del polimero. Ciò che rimane oltre gli 800 °C è solo l'ossido di ferro.

Considerando che la decomposizione del polimero inizia dopo i 160 °C possiamo calcolare la percentuale di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sul totale del polimero facendo il rapporto tra il 15.0 % di massa del Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> residuo e il 69.9 % di massa del polimero. Otteniamo come risultato il 21.5 % di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sul polimero totale. Questo risultato concorda con i dati teorici. Possiamo infatti ricordare che abbiamo usato 4 ml di sospensione di NPs al 2.4 % per solubilizzare 406 mg di acrilamide. Il contributo in massa dato dal cross-linker è trascurabile. Questo significa che su 406 mg di acrilamide erano presenti 96 mg di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; facendo il rapporto tra i due valori si ottiene una percentuale di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sul polimero totale uguale al 23.6 %. Questa percentuale è abbastanza concorde con i dati ricavati dalla TGA.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.3.1c Analisi elementare EDAX

Su i gel di PAAm-PGD con NPs abbiamo anche effettuato l'analisi elementare per determinare la percentuale di Fe sul totale degli altri elementi. L'analisi è stata effettuata su entrambi i campioni congelati a differenti velocità, ma, poiché i dati ottenuti erano concordi, di seguito abbiamo mostrato solo il grafico e i dati del campione congelato in freezer.

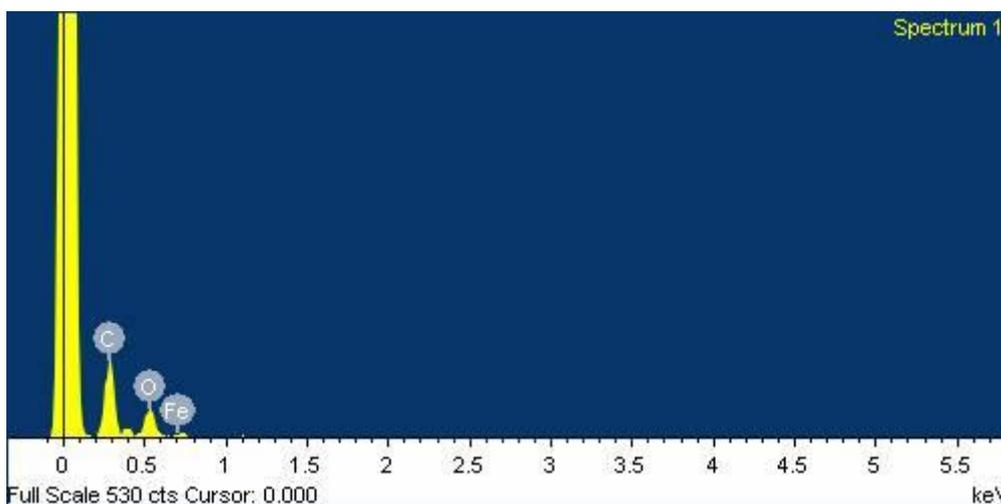


Figura 3.3-2: Spettro di emissione di raggi X del campione

Element	App	Intensity	Weight%	Weight%	Atomic%
	Conc.	Corrn.		Sigma	
C K	23.77	1.5338	43.94	4.54	54.27
N K	1.49	0.2924	14.40	5.61	15.25
O K	11.29	1.0915	29.34	3.69	27.21
Fe L	2.06	0.4743	12.32	5.45	3.27
Totals			100.00		

Dalle intensità dei picchi è possibile calcolare la percentuale dei vari elementi, operazione che il programma svolge in automatico. Possiamo per semplicità considerare solo il rapporto tra ferro e carbonio.

Le percentuali di ferro e carbonio calcolate dallo spettro sono rispettivamente il 3.27 % e il 54.27 % sul totale degli elementi. Facendo il rapporto tra i due valori si trova che il

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

ferro è il 6.02 % del carbonio totale. Possiamo ora confrontare questo valore con quello calcolato per via stechiometrica. Consideriamo ancora una volta che il polimero sia costituito solo da PAAm, trascurando il cross-linker. Riportiamo di seguito i calcoli effettuati.

La massa molare dell'unità monomerica della PAAm, che ha formula  $C_3H_5NO$  è:  
 $M_m = 71.07 \text{ g/mol}$ .

La massa molare dell'ossido di ferro (III) è:  $M_m = 159.7 \text{ g/mol}$

Sapendo che nella nostra sintesi abbiamo utilizzato 406 mg di AAm e 96 mg di  $Fe_2O_3$  possiamo calcolare il numero di moli di ferro e di carbonio presenti nel nostro polimero. Avremo per il carbonio:  $N_m = \frac{3 \cdot 406 \text{ mg}}{71.07 \text{ g/mol}} = 17.13 \text{ mmol}$ , dove abbiamo moltiplicato il numero di milligrammi per tre poiché per ogni mole di acrilamide abbiamo tre moli di carbonio.

Per il ferro invece abbiamo:  $N_m = \frac{2 \cdot 96 \text{ mg}}{159.7 \text{ g/mol}} = 1.203 \text{ mmol}$

Facendo il rapporto tra i due valori troviamo che il ferro è il 7.18 % del carbonio totale. Questo valore, considerando le approssimazioni fatte, può essere considerato concorde con il valore sperimentale trovato del 6.02 %.

#### ***3.3.1d Valutazione della deformabilità del gel sottoposto a campi magnetici***

I gel magnetici preparati sottoposti a trattamento criogenico sono stati posti all'interno di vial di vetro sopra ad un magnete permanente in grado di produrre un campo magnetico di intensità massima uguale a 0.6 Tesla. Abbiamo osservato se erano visibili deformazioni dei gel. Tuttavia non è stato osservato nessun cambiamento né nel gel congelato in freezer, né nel gel congelato a 0.1 °C/min.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.3.2 Gel di PAAm-PGD con nanoparticelle di $Fe_3O_4$

Anche in questo caso i gel di PAAm-PGD sono stati sintetizzati sia con NPs di magnetite cariche positivamente che negativamente, ma poiché non vi erano differenze visibili nei due differenti gel, abbiamo deciso di riportare solo i risultati delle analisi ottenute sui gel con NPs cariche positivamente.

##### 3.3.2a SEM

Riportiamo qui di seguito le immagini ottenute al SEM dei campioni di gel di PAAm-PGD con nanoparticelle di  $Fe_3O_4$  congelati a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  con una velocità di raffreddamento di  $7\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  e a  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  con una velocità di  $0.1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ .

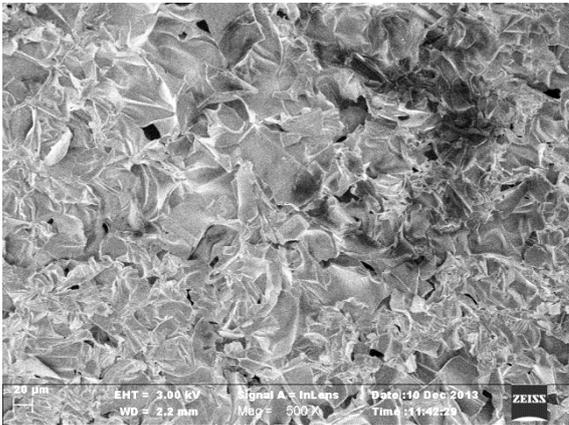


Figura 3.3-09: Gel di PAAm-PGD con NPs di  $Fe_3O_4$  congelato a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ , ingrandimento 500X

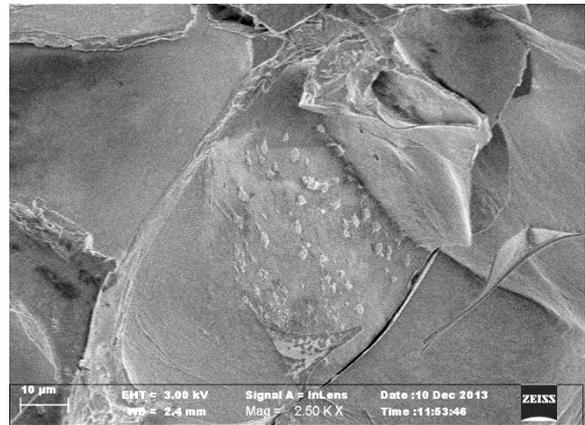


Figura 3.3-4: Gel di PAAm-PGD con NPs di  $Fe_3O_4$  congelato a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ , ingrandimento 2500X

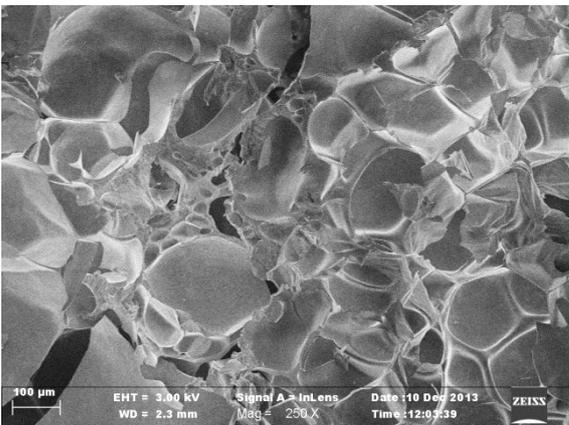


Figura 3.3-3: Gel di PAAm-PGD con NPs di  $Fe_3O_4$  congelato a  $0.1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , ingrandimento 250X

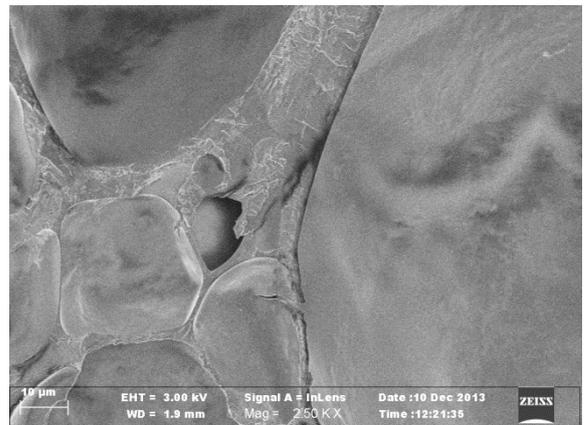
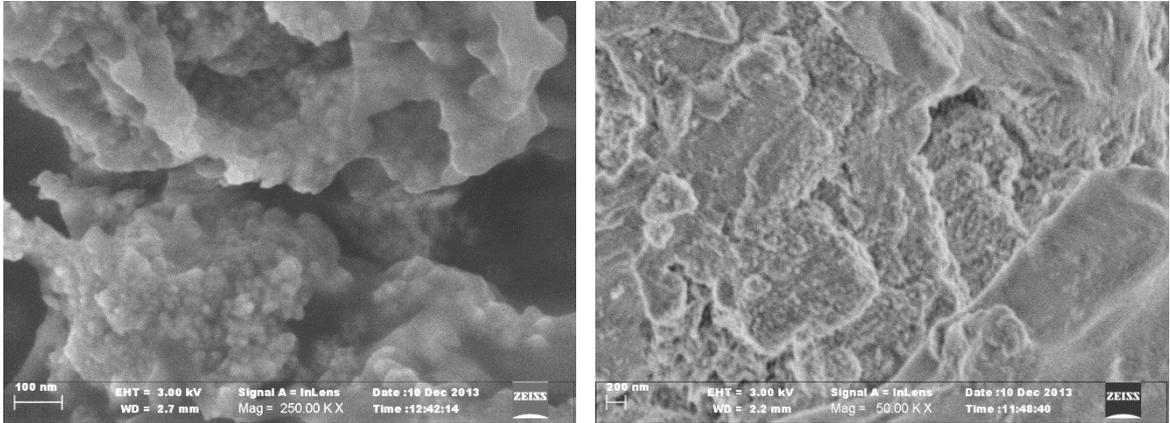


Figura 3.3-12: Gel di PAAm-PGD con NPs di  $Fe_3O_4$  congelato a  $0.1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , ingrandimento 2500X

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE



**Figura 3.3-6: Gel di PAAm-PGD con NPs di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  congelato a  $0.1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , ingrandimento 250000X**      **Figura 3.3-5: Gel di PAAm-PGD con NPs di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  congelato a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ , ingrandimento 50000X**

Come si può notare dalle immagini riprese al SEM, anche in questo caso, i due campioni congelati con differenti velocità di raffreddamento presentano una morfologia molto distinta. Il campione congelato a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  a  $7\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  ha una struttura macroscopica molto disordinata, in cui è difficile individuare dei pori. Questi ultimi hanno un diametro medio di circa  $20\text{ }\mu\text{m}$ . Nel gel congelato a  $0.1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  invece notiamo una struttura “a bolle” con pori decisamente più grandi, dai  $50$  ai  $200\text{ }\mu\text{m}$  di diametro. Come avevamo visto nel campione di PAAm-PGD bianco congelato a  $3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , anche in questo caso i vari pori formano tra loro angoli di circa  $120^\circ$ . Tuttavia sembra che questi pori non siano molto interconnessi tra di loro, a differenza di quanto avevamo osservato per i gel di PAAm-PGD bianchi. Nelle figure 3.3-12 e 3.3-13 sono visibili le nanoparticelle di magnetite distribuite sulla superficie del polimero. In particolare nella figura 3.3-12 si possono distinguere le singole nanoparticelle, che hanno un diametro di circa  $10\text{ nm}$ .

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.3.2b Analisi termogravimetrica (TGA)

Per valutare la percentuale di nanoparticelle di magnetite sul polimero totale è stata effettuata l'analisi termogravimetrica. Il procedimento seguito è stato lo stesso già adottato per il gel di PAAm-PGD con NPs di maghemite. Di seguito riportiamo il termogramma ottenuto.

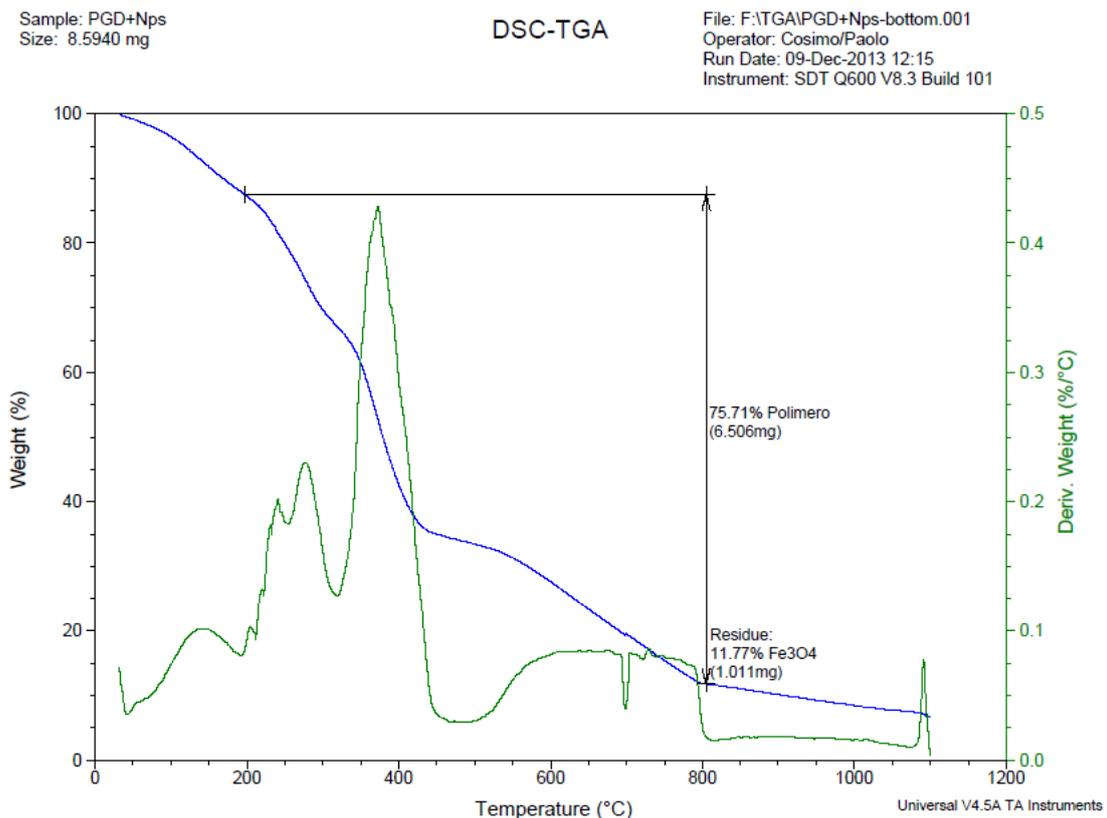


Figura 3.3-7: Termogramma del gel di PAAm-PGD con NPs di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Anche in questo caso notiamo diverse diminuzioni di massa. La prima, fino a 150 °C circa, è ancora inerente all'evaporazione dell'acqua residua. Oltre i 160 °C, fino a 800 °C, possiamo osservare le perdite di massa dovute alla vaporizzazione e decomposizione del polimero. Ciò che rimane oltre gli 800 °C è solo l'ossido di ferro. Considerando che la decomposizione del polimero inizia dopo i 160 °C possiamo calcolare la percentuale di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sul totale del polimero facendo il rapporto tra il 11.77 % di massa del Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> residuo e 75.71 % di massa del polimero. Otteniamo come risultato il 15.5 % di Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sul polimero totale. Questo risultato è un po' distante dai dati teorici. Possiamo infatti ricordare che abbiamo usato 4 ml di sospensione di NPs al 2.4 % per solubilizzare 408 mg di acrilamide. Trascuriamo il contributo in massa dato

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

dal cross-linker. Questo significa che su 408 mg di acrilamide erano presenti 96 mg di  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , facendo il rapporto tra i due valori si ottiene una percentuale di  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  sul polimero totale uguale al 23.5 %.

#### 3.3.2c Analisi elementare EDAX

Anche in questo caso è stata effettuata l'analisi EDAX per determinare le percentuali dei vari elementi. Le misure sono state effettuate su entrambi i gel congelati a differenti velocità, ma, poiché i dati ottenuti erano concordi, di seguito abbiamo mostrato solo il grafico e i dati del campione congelato in freezer.

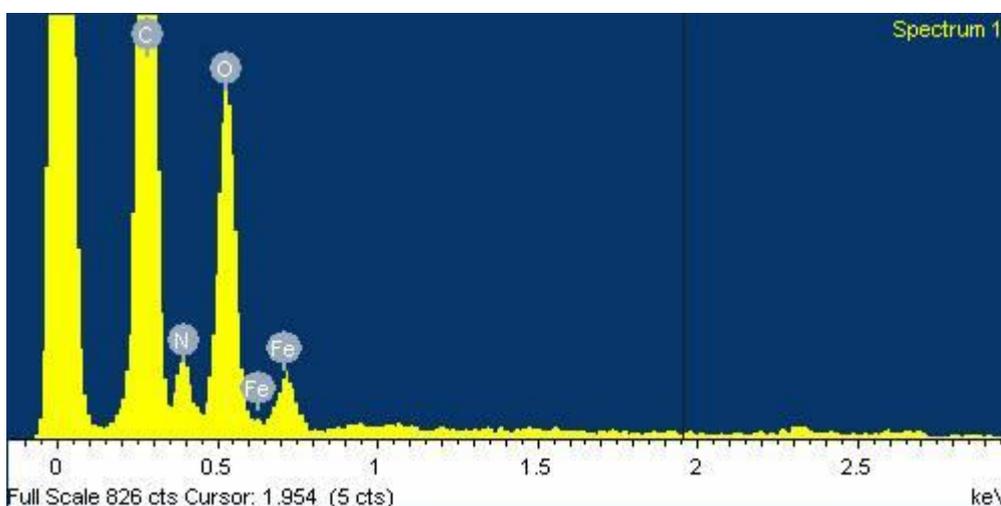


Figura 3.3-8: Spettro di emissione di raggi X del gel di PAAm-PGD con NPs di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Element	Weight%	Atomic%
C K	42.88	55.09
N K	11.89	13.10
O K	28.07	27.07
Fe L	17.17	4.74
Totals	100.00	

Come abbiamo detto, il programma riporta automaticamente la percentuale in peso ed atomica dei vari elementi in rapporto all'intensità dei picchi. Possiamo per semplicità considerare solo il rapporto tra ferro e carbonio.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Le percentuali atomiche di ferro e carbonio calcolate dallo spettro sono rispettivamente il 4.74 % e il 55.09 % sul totale degli elementi. Facendo il rapporto tra i due valori si trova che il ferro è il 8.60 % del carbonio totale. Possiamo ora confrontare questo valore con quello calcolato per via stechiometrica. Consideriamo ancora una volta che il polimero sia costituito solo da PAAm, trascurando il cross-linker. Riportiamo di seguito i calcoli effettuati.

La massa molare dell'unità monomerica della PAAm, che ha formula  $C_3H_5NO$  è:  
 $M_m = 71.07 \text{ g/mol}$ .

La massa molare dell'ossido di ferro (II,III) è:  $M_m = 231.5 \text{ g/mol}$

Sapendo che nella nostra sintesi abbiamo utilizzato 408 mg di AAm e 96 mg di  $Fe_3O_4$  possiamo calcolare il numero di moli di ferro e di carbonio presenti nel nostro polimero. Avremo per il carbonio:  $N_m = \frac{3 \cdot 408 \text{ mg}}{71.07 \text{ g/mol}} = 17.22 \text{ mmol}$ .

Per il ferro invece abbiamo:  $N_m = \frac{3 \cdot 96 \text{ mg}}{231.5 \text{ g/mol}} = 1.244 \text{ mmol}$

Facendo il rapporto tra i due valori troviamo che il ferro è il 7.22 % del carbonio totale. Questo valore, considerando le approssimazioni fatte, può essere considerato concorde con il valore sperimentale trovato del 8.60 %.

#### ***3.3.2d Valutazione della deformabilità del gel sottoposto a campi magnetici***

Abbiamo effettuato le stesse prove svolte per i gel di PAAm-PGD con NPs di maghemite anche per i gel di PAAm-PGD con NPs di  $Fe_3O_4$ . Abbiamo sottoposto a campo magnetico stazionario sia i gel congelati alle due differenti velocità, sia il gel non sottoposto a trattamento criogenico. Tuttavia anche in questo caso non abbiamo notato nessuna deformazione del gel. L'unica differenza, osservabile in tutti e tre i campioni, è stata una maggiore forza di attrazione tra il magnete e i campioni rispetto ai gel di PAAm-PGD con nanoparticelle di  $Fe_2O_3$ .

#### ***3.3.3 Gel di PAAm-PGD con nanoparticelle commerciali***

In questo caso sono stati sintetizzati gel di PAAm-PGD con diverse concentrazioni di nanoparticelle commerciali di  $Fe_3O_4$ . Sono stati congelati a  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$  con una velocità di

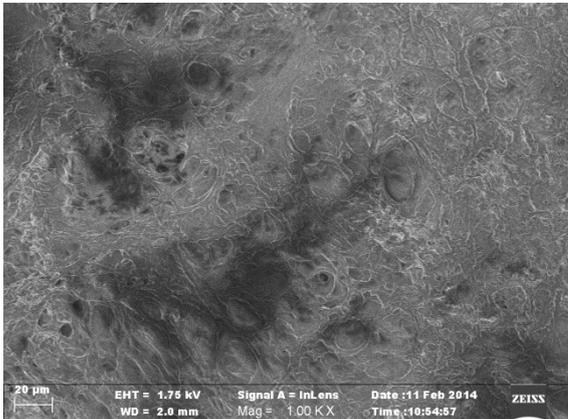
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

raffreddamento di 0.1 °C/min solo i campioni di gel con NPs al 5 %, 10 % e 30 %. Su questi campioni sono state effettuate le analisi SEM per indagarne la morfologia e EDAX per calcolare la percentuale di ferro sul totale.

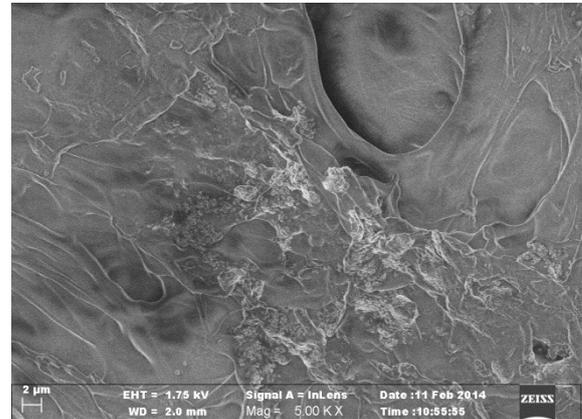
#### 3.3.3a SEM

Abbiamo analizzato con il SEM i campioni di gel congelati fino a -10 °C con una velocità di raffreddamento di 0.1 °C/min e per confronto anche i campioni di gel non congelati. Per analizzare i campioni è stato usato un raggio elettronico di potenza 1.75 kV.

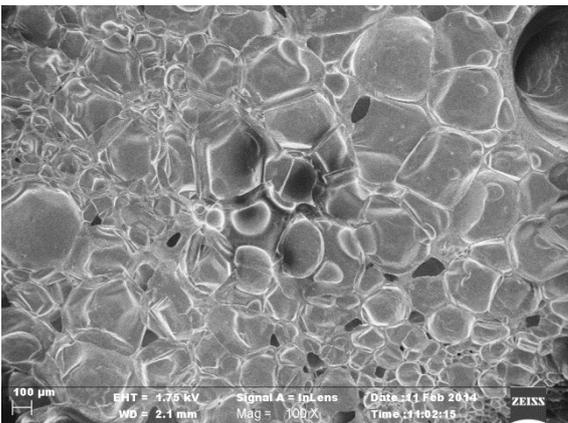
**PAAm-PGD con NPs al 5 %:** Riportiamo qui di seguito le immagini ottenute al SEM del gel di PAAm-PGD con NPs commerciali al 5 %.



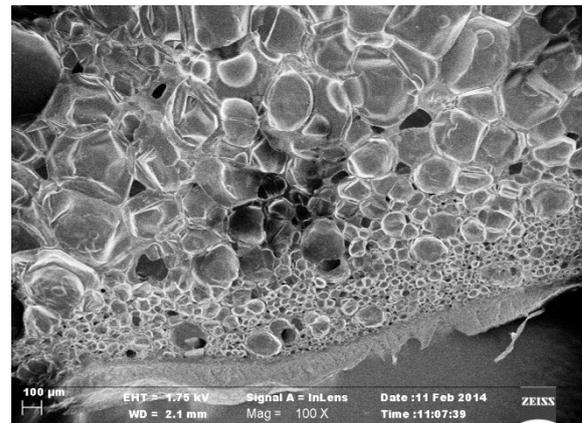
**Figura 3.3-9: PAAm-PGD con NPs al 5 % non congelato, ingrandimento 1000X**



**Figura 3.3-10: PAAm-PGD con NPs al 5 % non congelato, ingrandimento 5000X**



**Figura 3.3-12: PAAm-PGD con NPs al 5 % congelato a 0.1°C/min, ingrandimento 100X**

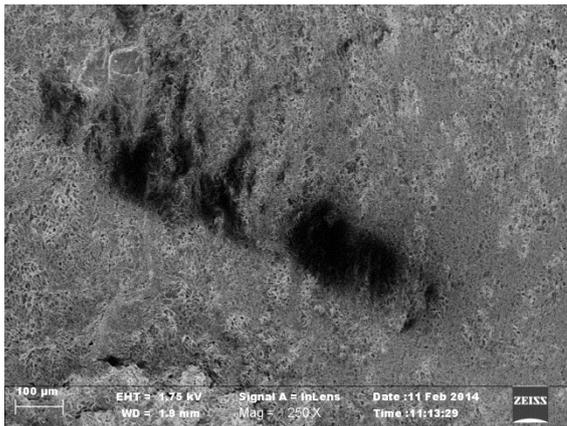


**Figura 3.3-11: PAAm-PGD con NPs al 5 % congelato a 0.1°C/min, ingrandimento 100X**

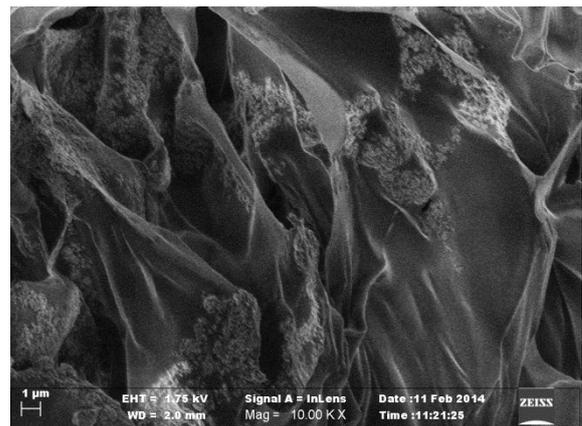
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Come si può notare dalle immagini, la morfologia dei due gel è profondamente diversa. Nel caso del gel non sottoposto a trattamenti criogenici notiamo una struttura molto uniforme, quasi liscia, con pori piccoli, di 2-10  $\mu\text{m}$  di diametro, e poco profondi. Nel gel congelato con una velocità di raffreddamento di 0.1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  notiamo una struttura a bolle, con pori grandi e di diametro molto vario compreso tra i 50  $\mu\text{m}$  e i 400  $\mu\text{m}$ ; tuttavia questi pori sembrano scarsamente interconnessi. È interessante notare (vedi Figura 3.3-11) come i pori abbiano un diametro crescente passando dall'esterno del gel verso l'interno. Si passa infatti da una decina di micrometri di diametro per i pori vicino ai bordi a oltre 400  $\mu\text{m}$  per i pori più interni.

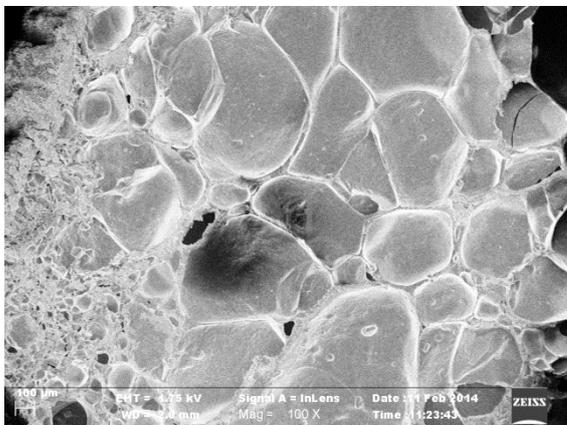
**PAAm-PGD con NPs al 10 %:** Riportiamo qui di seguito le immagini ottenute al SEM del gel di PAAm-PGD con NPs commerciali al 10 % congelato a 0.1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  insieme al gel di confronto.



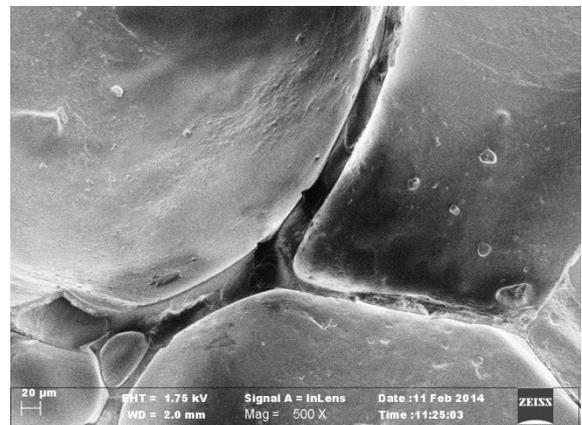
**Figura 3.3-14:** PAAm-PGD con NPs al 5 % non congelato, ingrandimento 100X



**Figura 3.3-13:** PAAm-PGD con NPs al 5 % non congelato, ingrandimento 100X



**Figura 3.3-16:** PAAm-PGD con NPs al 5 % congelato a 0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , ingrandimento 100X

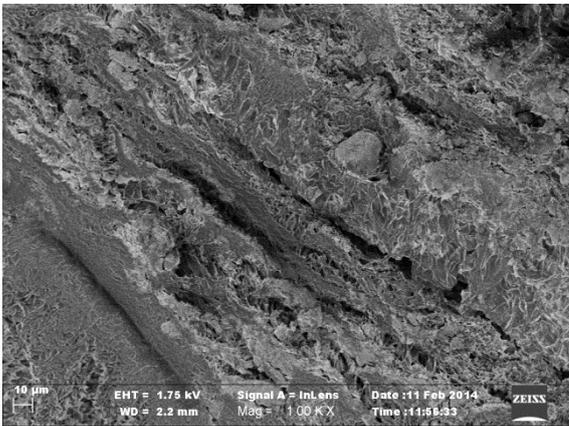


**Figura 3.3-15:** PAAm-PGD con NPs al 5 % congelato a 0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , ingrandimento 100X

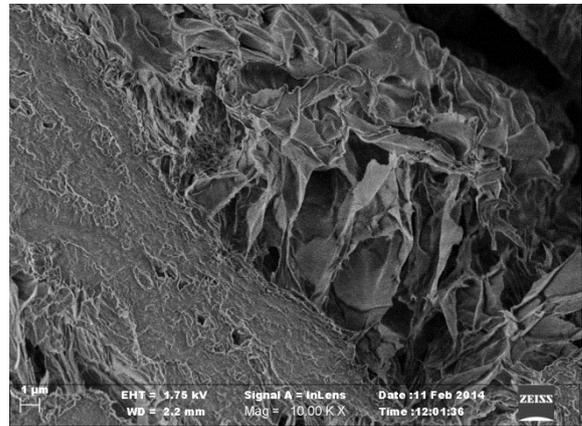
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Anche in questo caso la morfologia dei due gel è molto diversa. Il gel non congelato infatti presenta pori piccoli numerosi e piuttosto interconnessi tra do loro. Il diametro di questi pori è compreso tra 2  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ . Il gel congelato a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  con una velocità di raffreddamento di  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  invece mostra una struttura "a bolle" con pori visibili ad occhio nudo di diametro compreso tra 200  $\mu\text{m}$  e 800  $\mu\text{m}$ . Tuttavia questi pori sembrano isolati gli uni dagli altri, come delle vere e proprie bolle. Come si può vedere in Figura 3.3-15 le pareti dei pori hanno uno spessore che può superare i 20  $\mu\text{m}$ .

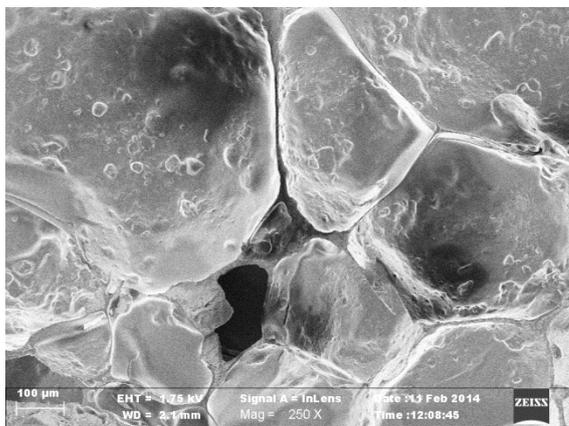
**PAAm-PGD con NPs al 30 %:** Riportiamo qui di seguito le immagini ottenute al SEM del gel di PAAm-PGD con NPs commerciali al 30 % congelato a  $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  insieme al gel di confronto.



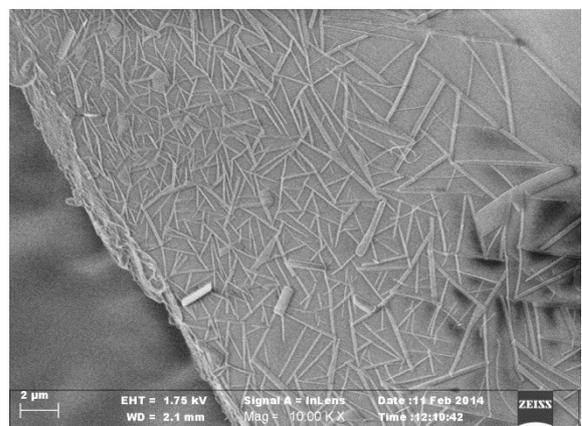
**Figura 3.3-17: PAAm-PGD con NPs al 30 % non congelato, ingrandimento 1000X**



**Figura 3.3-20: PAAm-PGD con NPs al 30 % non congelato, ingrandimento 10000X**

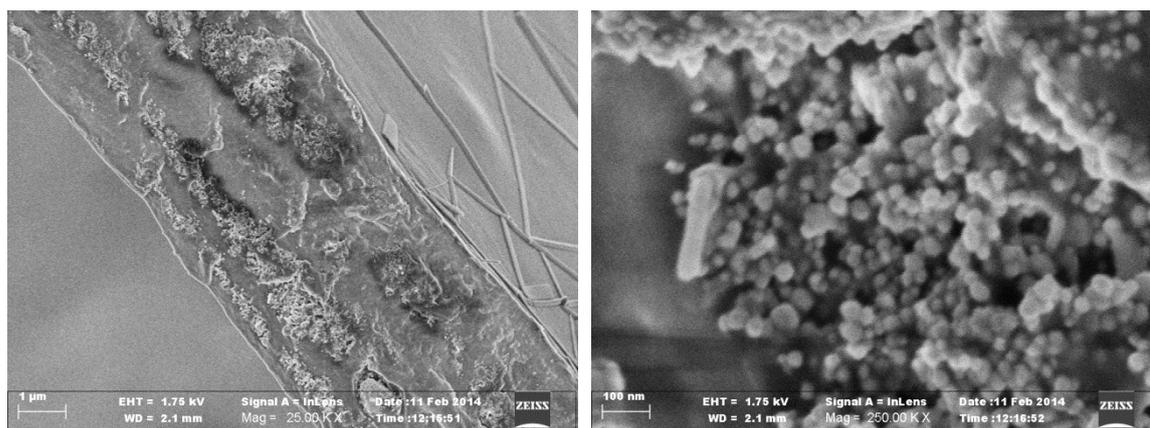


**Figura 3.3-19: PAAm-PGD con NPs al 30 % non congelato, ingrandimento 250X**



**Figura 3.3-18: PAAm-PGD con NPs al 30 % non congelato, ingrandimento 10000X**

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE



**Figura 3.3-22: PAAm-PGD con NPs al 30 % congelato a 0.1°C/min, ingrandimento 25000X**      **Figura 3.3-21: PAAm-PGD con NPs al 30 % congelato a 0.1°C/min, ingrandimento 250000X**

Come possiamo vedere, anche il gel di PAAm-PGD con NPs al 30 % mostra risultati in accordo con quanto già visto per gli altri gel di PAAm-PGD. Il campione congelato a 0.1 °C/min e quello non sottoposto a congelamento infatti mostrano due strutture macroscopiche completamente diverse tra loro. Nel gel non congelato possiamo notare una struttura macroscopica piuttosto disomogenea, con regioni compatte, dove i pori sono pochi e di dimensioni inferiori al micrometro e regioni molto porose, con pori di dimensioni comprese tra 2 μm e 5 μm. Al contrario nel gel congelato a 0.1 °C/min si può osservare sempre una struttura “a bolle” con pori di diametro tra 400 μm e 1 mm. In Figura 3.3-18 si possono osservare delle strane formazioni presenti sulla superficie della parete di un poro, che almeno in apparenza sembrano dei cristalli, forse di acrilammide. In Figura 3.3-22 invece è mostrata la sezione di una parete di un poro, che come si può vedere ha uno spessore di circa 5 μm. All’interno sono visibili aggregati di nanoparticelle (dettaglio in Figura 3.3-21) di forma sferica, di diametro compreso tra 30 nm e 60 nm.

#### **3.3.3b Analisi elementare EDAX**

Riportiamo qui di seguito i risultati delle analisi EDAX, effettuate per determinare le percentuali dei vari elementi. Le misure sono state effettuate su tutti i campioni di gel, ma abbiamo deciso di riportare solo le analisi effettuate sui gel non congelati poiché la struttura di questi era più omogenea.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### PAAm-PGD con NPs al 5 %

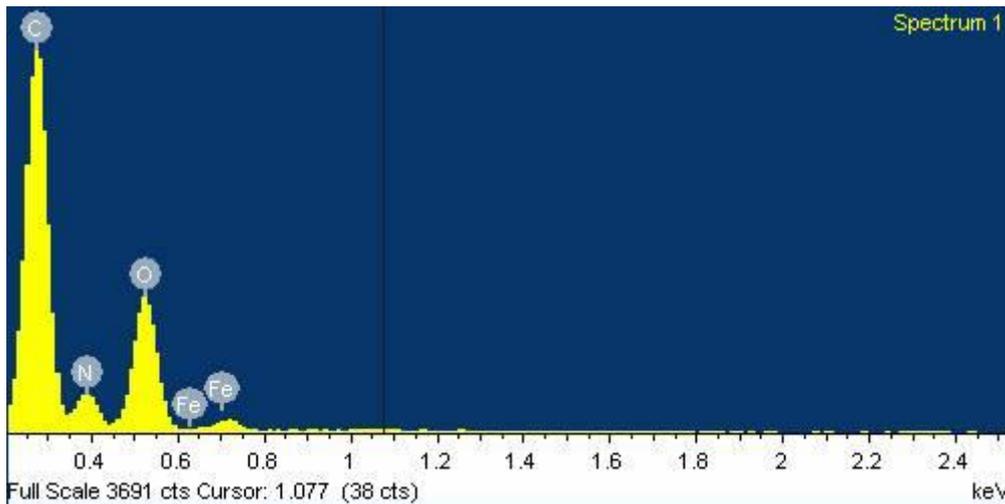


Figura 3.3-23: Spettro di emissione di raggi X del gel di PAAm-PGD con NPs al 5 %.

Element	Weight%	Atomic%
C K	46.79	55.97
N K	15.19	15.58
O K	29.12	26.16
Fe L	8.90	2.29
Totals	100.00	

Anche in questo caso valutiamo solo il rapporto tra ferro e carbonio. Attraverso l'analisi dell'intensità dei picchi emerge che il carbonio e il ferro sono rispettivamente il 55.97 % e il 2.29 % sul totale degli elementi. Facendo il rapporto tra i due elementi si trova che il ferro è il 4.09 % del carbonio presente.

Confrontiamo ora questo dato con quello teorico. I calcoli effettuati sono stati omessi poiché sono gli stessi già visti per gli altri gel con NPs di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Abbiamo usato 400 mg di acrilamide e 200 mg di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

$$\text{Avremo per il carbonio: } N_m = \frac{3 \cdot 400 \text{ mg}}{71.07 \text{ g/mol}} = 16.88 \text{ mmol} .$$

$$\text{Per il ferro invece abbiamo: } N_m = \frac{3 \cdot 200 \text{ mg}}{231.5 \text{ g/mol}} = 2.592 \text{ mmol}$$

Facendo il rapporto e moltiplicando per 100 otteniamo che il ferro è il 15.3 %. Questo valore teorico è molto diverso da quello risultante dalle analisi EDAX.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### PAAm-PGD con NPs al 10 %

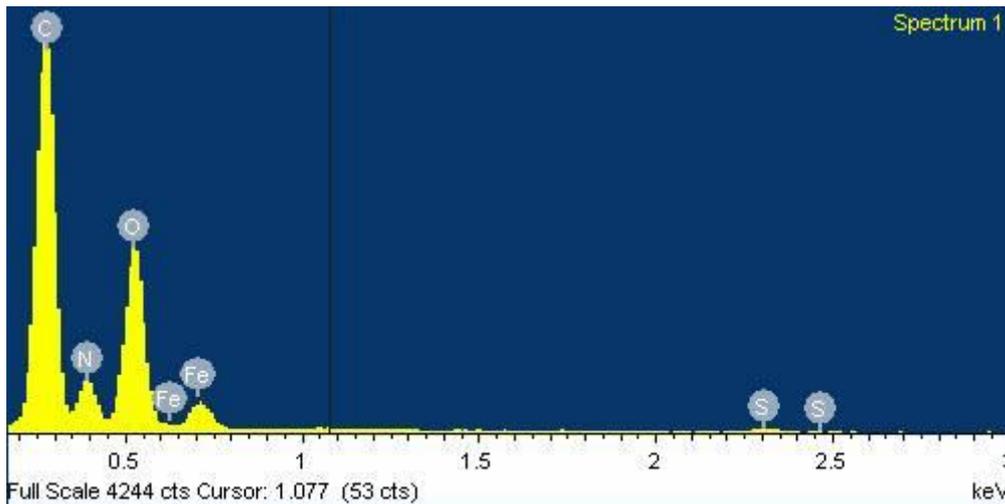


Figura 3.3-24: Spettro di emissione di raggi X del gel di PAAm-PGD con NPs al 10 %.

Element	Weight%	Atomic%
C K	40.49	52.01
N K	14.31	15.77
O K	28.51	27.50
S K	0.57	0.27
Fe L	16.12	4.45
Totals	100.00	

Anche in questo caso valutiamo solo il rapporto tra ferro e carbonio. Attraverso l'analisi dell'intensità dei picchi emerge che il carbonio e il ferro sono rispettivamente il 52.01 % e il 4.45 % sul totale degli elementi. Facendo il rapporto tra i due elementi si trova che il ferro è il 8.56 % del carbonio presente.

Confrontiamo ora questo dato con quello teorico. I calcoli effettuati sono stati omessi poiché sono gli stessi già visti per gli altri gel con NPs di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Abbiamo usato 400 mg di acrilamide e 400 mg di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

$$\text{Avremo per il carbonio: } N_m = \frac{3 \cdot 400 \text{ mg}}{71.07 \text{ g/mol}} = 16.88 \text{ mmol} .$$

$$\text{Per il ferro invece abbiamo: } N_m = \frac{3 \cdot 400 \text{ mg}}{231.5 \text{ g/mol}} = 5.184 \text{ mmol}$$

Facendo il rapporto e moltiplicando per 100 otteniamo che il ferro è il 30.7 %. Questo valore teorico è molto diverso da quello risultante dalle analisi EDAX.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### PAAm-PGD con NPs al 30 %

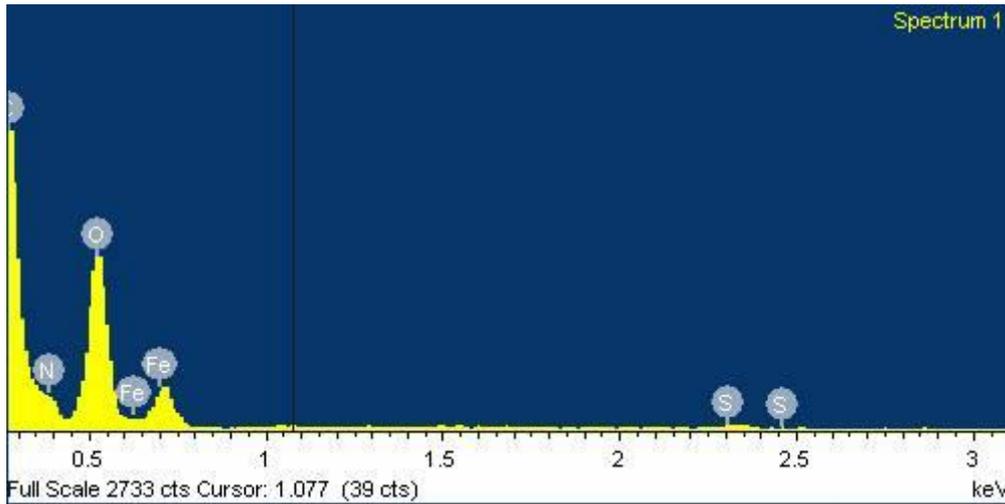


Figura 3.3-25: Spettro di emissione di raggi X del gel di PAAm-PGD con NPs al 30 %.

Element	Weight%	Atomic%
C K	37.86	54.07
N K	4.72	5.78
O K	29.25	31.36
S K	0.60	0.32
Fe L	27.57	8.47
Totals	100.00	

Anche in questo caso valutiamo solo il rapporto tra ferro e carbonio. Attraverso l'analisi dell'intensità dei picchi emerge che il carbonio e il ferro sono rispettivamente il 54.07 % e il 8.47 % sul totale degli elementi. Facendo il rapporto tra i due elementi si trova che il ferro è il 15.66 % del carbonio presente.

Confrontiamo ora questo dato con quello teorico. I calcoli effettuati sono stati omessi poiché sono gli stessi già visti per gli altri gel con NPs di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Abbiamo usato 400 mg di acrilamide e 1200 mg di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

$$\text{Avremo per il carbonio: } N_m = \frac{3 \cdot 400 \text{ mg}}{71.07 \text{ g/mol}} = 16.88 \text{ mmol} .$$

$$\text{Per il ferro invece abbiamo: } N_m = \frac{3 \cdot 1200 \text{ mg}}{231.5 \text{ g/mol}} = 5.184 \text{ mmol}$$

Facendo il rapporto e moltiplicando per 100 otteniamo che il ferro è il 92.1 %. Questo valore teorico è molto diverso da quello risultante dalle analisi EDAX.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati così diversi delle analisi EDAX effettuate rispetto ai valori teorici potrebbero derivare dal fatto che il carbonio rilevato attraverso l'analisi non sia solo il carbonio del gel, ma in parte sia anche il carbonio dello scotch rivestito di grafite su cui sono stati posti i campioni. Infatti il raggio elettronico utilizzato per le analisi aveva una potenza di 8 kV, ciò significa che il raggio è penetrato ad una profondità di diversi micron al di sotto della superficie del campione. Questo, unito al fatto che i campioni erano molto sottili e porosi, può effettivamente aver provocato l'emissione di raggi-X anche da parte del supporto oltre che del campione.

#### ***3.3.3c Analisi termogravimetrica (TGA)***

Anche in questo caso abbiamo effettuato l'analisi termogravimetrica per valutare la percentuale di ferro sul polimero totale con un metodo alternativo all'analisi EDAX. I campioni di gel da analizzare sono stati prelevati a 2 cm dal fondo della provetta in cui è stato sintetizzato il gel. Riportiamo qui di seguito i termogrammi relativi ai tre diversi gel sintetizzati.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### PAAm-PGD con NPs commerciali al 5%:

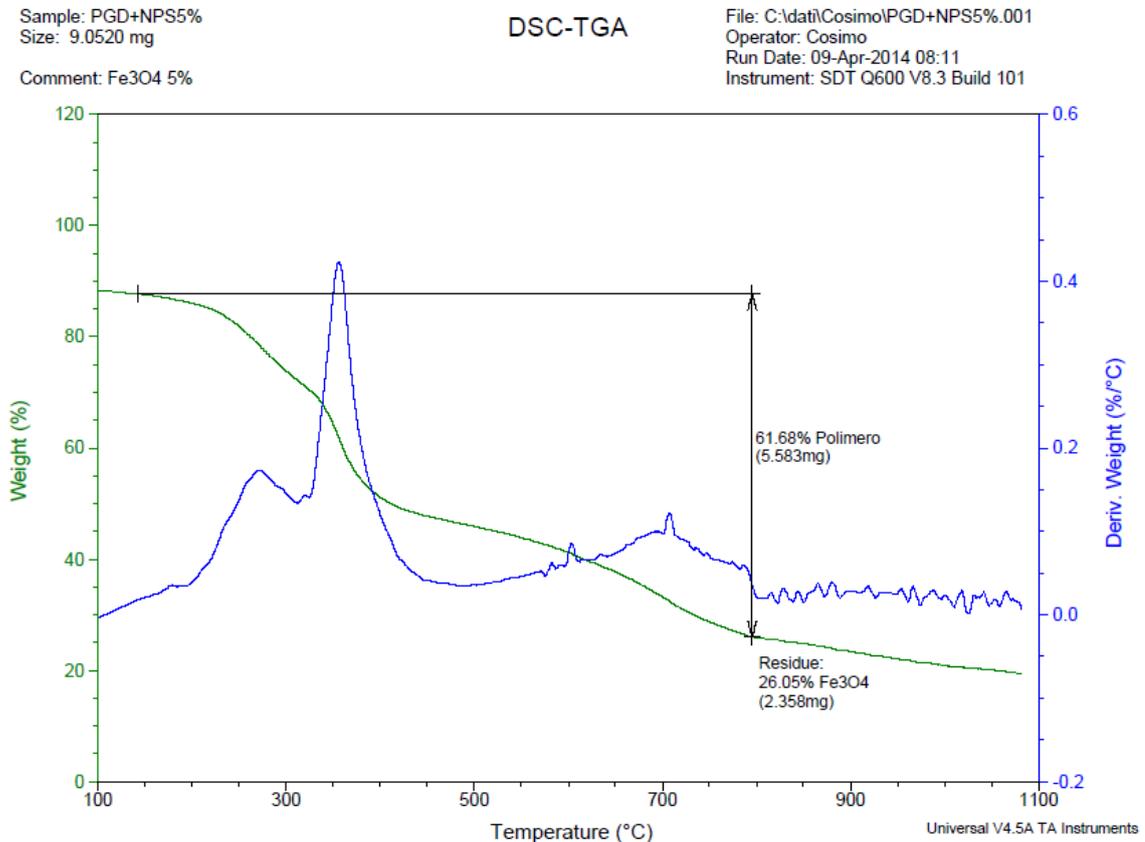


Figura 3.3-26: Termogramma del PAAm-PGD con NPs commerciali al 5%

Il campione è stato precedentemente disidratato lasciandolo a 110 °C per 20 minuti. La diminuzione di massa che si verifica tra 150 °C e 800 °C è relativa alla decomposizione del polimero. Oltre questa temperatura rimane solo l'ossido di ferro che si decompone solo a temperature molto superiori. La percentuale di ferro sul polimero totale è uguale al 42.2 %.

Possiamo considerare che abbiamo usato un totale di 200 mg di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e 400 mg di AAm per la sintesi. Facendo il rapporto si trova che teoricamente l'ossido di ferro dovrebbe essere il 50 % del polimero. Il risultato inferiore che si ottiene potrebbe essere dovuto ad una precipitazione di parte delle NPs sul fondo della provetta durante la sintesi del gel.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### PAAm-PGD con NPs commerciali al 10%:

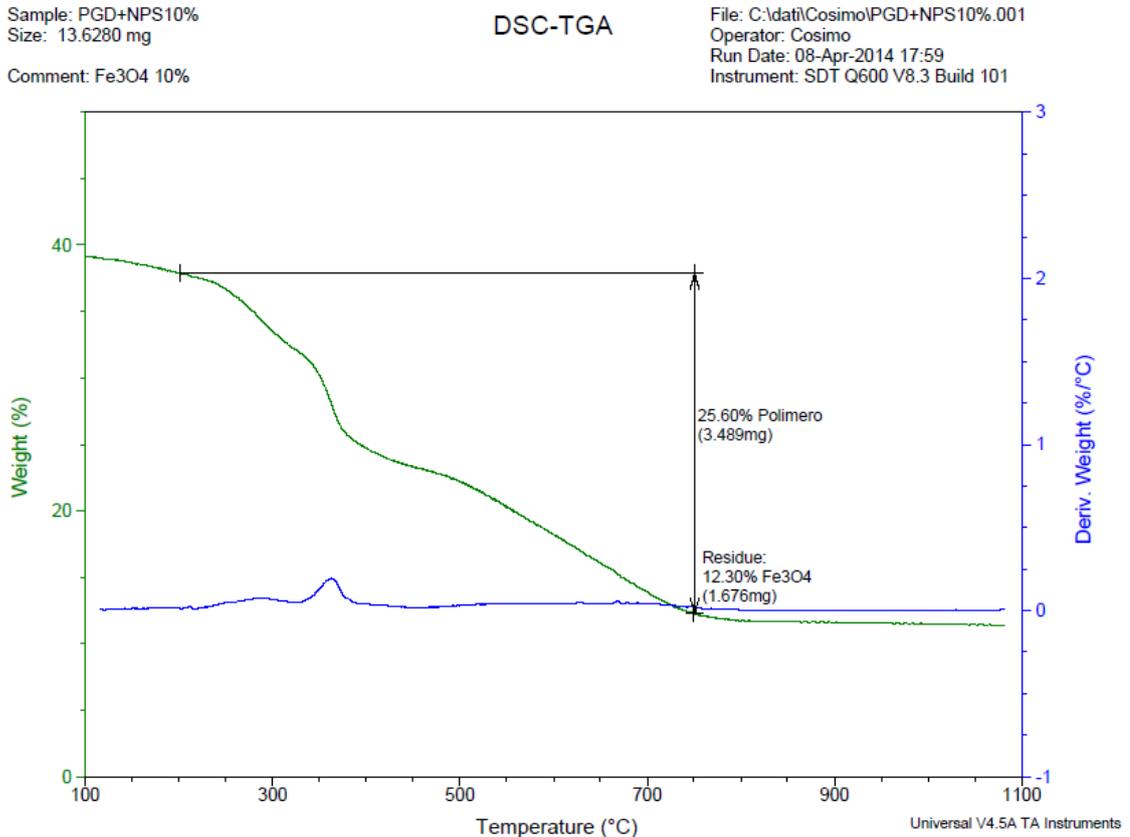


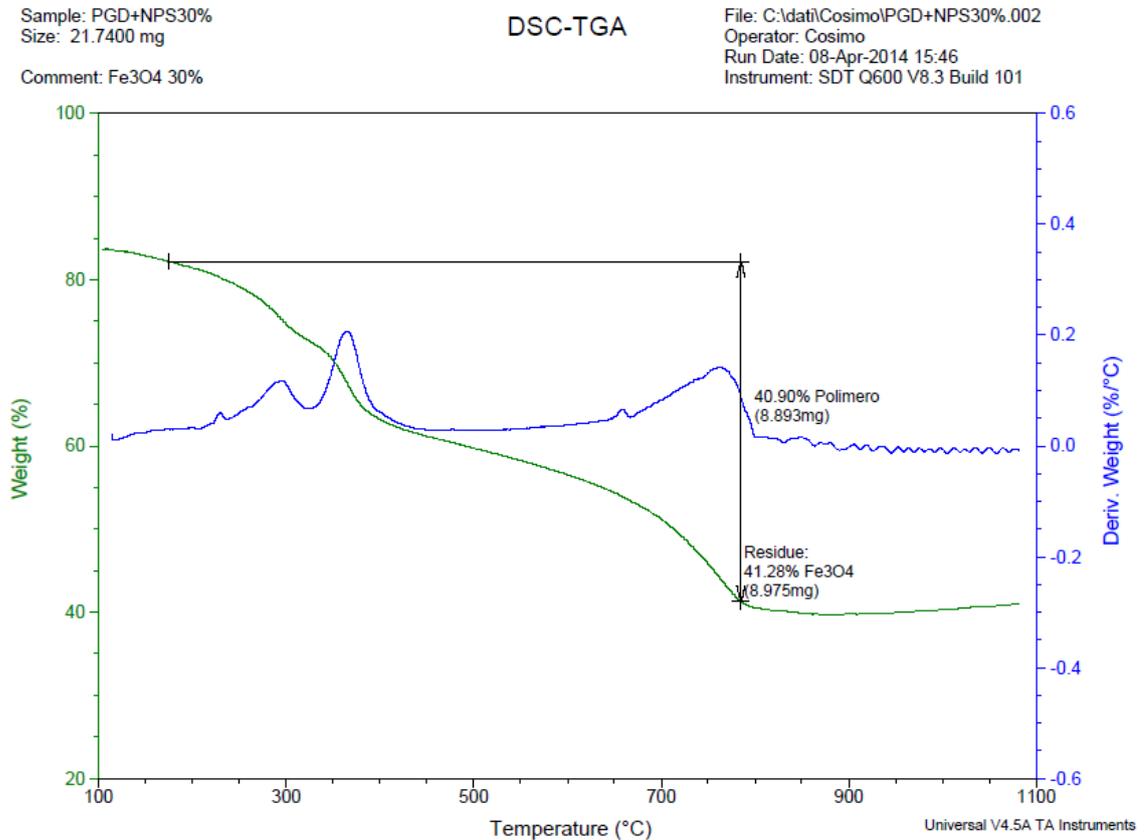
Figura 3.3-27: Termogramma del PAAm-PGD con NPs commerciali al 10%

Anche in questo caso abbiamo prima disidratato il campione. La diminuzione di massa che si verifica tra 150 °C e 800 °C è relativa alla decomposizione del polimero. Oltre questa temperatura rimane solo l'ossido di ferro che si decompone solo a temperature molto superiori. La percentuale di ferro sul polimero totale è uguale al 48.0 %.

Possiamo considerare che abbiamo usato un totale di 400 mg di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e 400 mg di AAm per la sintesi. Facendo il rapporto si trova che teoricamente l'ossido di ferro dovrebbe essere il 100 % del polimero. Il risultato inferiore che si ottiene potrebbe essere dovuto ad una precipitazione di parte delle NPs sul fondo della provetta durante la sintesi del gel, che a causa della maggiore concentrazione di NPs è avvenuto in misura maggiore rispetto al gel con il 5% di NPs.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### PAAm-PGD con NPs commerciali al 30%:



**Figura 3.3-28: Termogramma del PAAm-PGD con NPs commerciali al 30%**

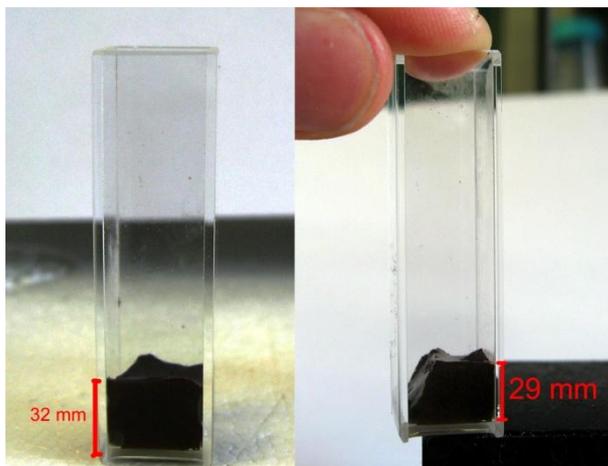
Anche in questo caso abbiamo prima disidratato il campione. La diminuzione di massa che si verifica tra 150 °C e 800 °C è relativa alla decomposizione del polimero. Oltre questa temperatura rimane solo l'ossido di ferro che si decompone solo a temperature molto superiori. La percentuale di ferro sul polimero totale è uguale al 100.9 %.

Per calcolare la percentuale teorica possiamo considerare che abbiamo usato un totale di 1200 mg di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e 400 mg di AAm per la sintesi. Facendo il rapporto si trova che teoricamente l'ossido di ferro dovrebbe essere il 300 % del polimero. Il risultato inferiore che si ottiene potrebbe essere dovuto ad un'ingente precipitazione di parte delle NPs sul fondo della provetta durante la sintesi del gel.

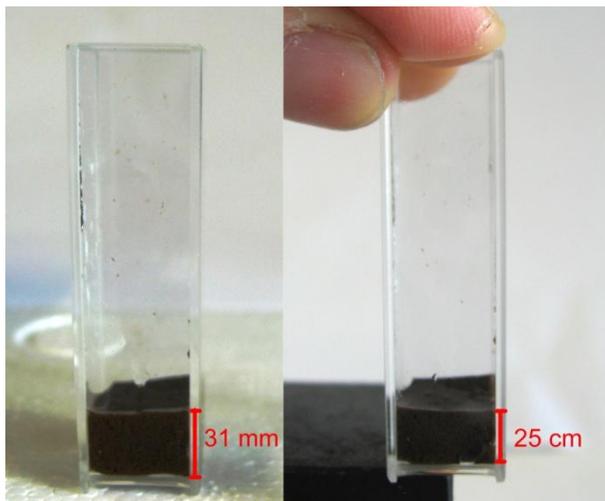
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### *3.3.3d Valutazione della deformabilità del gel sottoposto a campi magnetici*

Per valutare la risposta magnetica dei gel i nostri campioni sono stati tagliati a cubetti e posti all'interno di cuvette di PMMA. Abbiamo poi posto le cuvette sopra un magnete in grado di produrre un campo magnetico di 0.6 Tesla. Abbiamo infine fotografato le cuvette in presenza e in assenza del campo magnetico. In questo caso abbiamo notato delle deformazioni del gel, che abbiamo valutato confrontando la lunghezza della cuvetta con l'altezza del gel all'interno di essa. Riportiamo qui i risultati ottenuti.

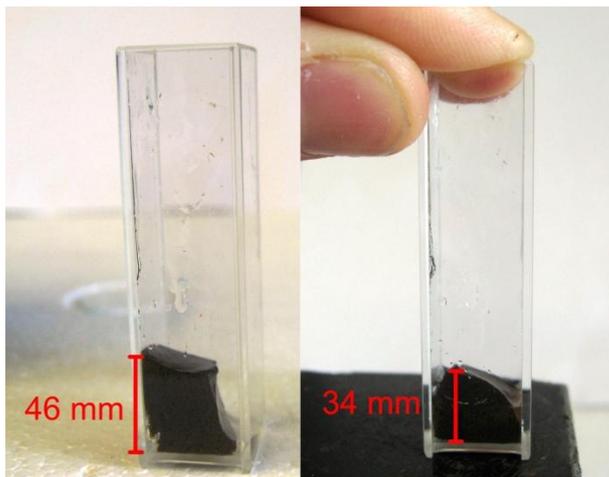


**Figura 3.3-29: Deformazione sotto campo magnetico del gel di PAAM-PGD con NPs al 5 % congelato a 0.1 °C/min**



**Figura 3.3-30: Deformazione sotto campo magnetico del gel di PAAM-PGD con NPs al 10 % congelato a 0.1 °C/min**

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE



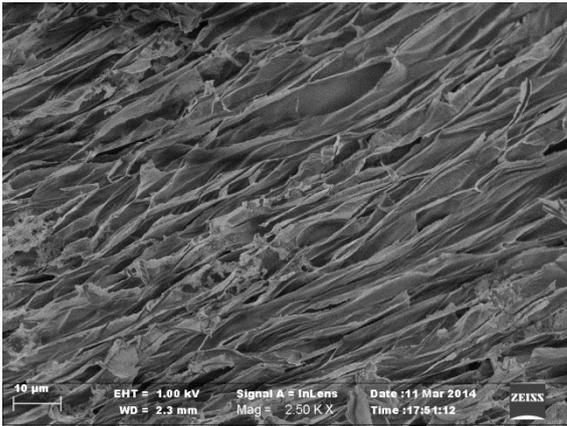
**Figura 3.3-31: Deformazione sotto campo magnetico del gel di PAAM-PGD con NPs al 30 % congelato a 0.1 °C/min**

Si può facilmente calcolare la deformazione che subisce ciascun gel. Si trova che il gel con NPs al 5 % subisce un 9 % di deformazione in senso longitudinale, il gel con NPs al 10 % ha una deformazione del 19 % e il gel con NPs al 30 % ha una deformazione del 26 %. È quindi evidente che la forza magnetica responsabile della deformazione del gel è proporzionale al numero di nanoparticelle magnetiche presenti al suo interno.

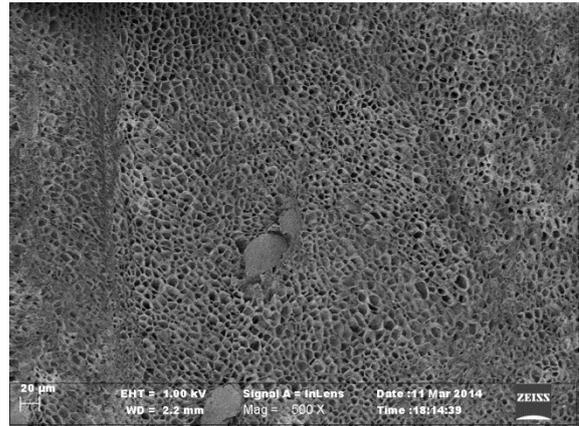
#### ***3.3.3e Osservazione al SEM della struttura del gel sottoposto a campo magnetico***

Per indagare come la deformazione del gel si traducesse in deformazione dei pori abbiamo congelato il gel sottoposto al campo magnetico in azoto liquido, e poi liofilizzato il gel. In questo modo, tramite il congelamento in azoto liquido e la successiva liofilizzazione, abbiamo potuto fissare la struttura del gel per poterla poi studiare al SEM. Le analisi sono state effettuate solo sul gel di PAAm-PGD con NPs di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  commerciali al 10 %, precedentemente congelato a 0.1 °C/min. Abbiamo scelto questo gel poiché aveva una struttura più omogenea rispetto al gel con il 30 % di NPs, ma al contempo mostrava una buona deformazione quando sottoposto a campo magnetico. Di seguito sono mostrate le immagini riprese al SEM di due sezioni del gel: una parallela al campo magnetico applicato ed una perpendicolare ad esso.

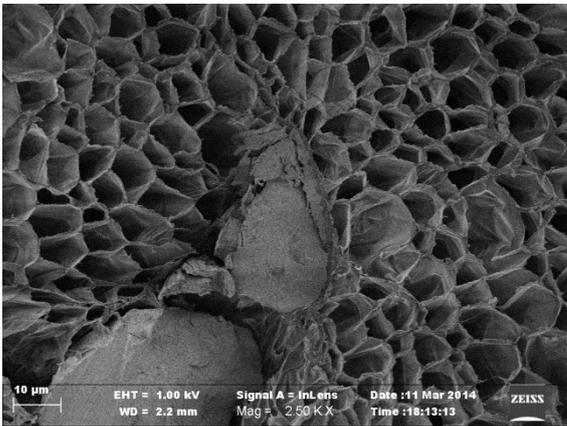
### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE



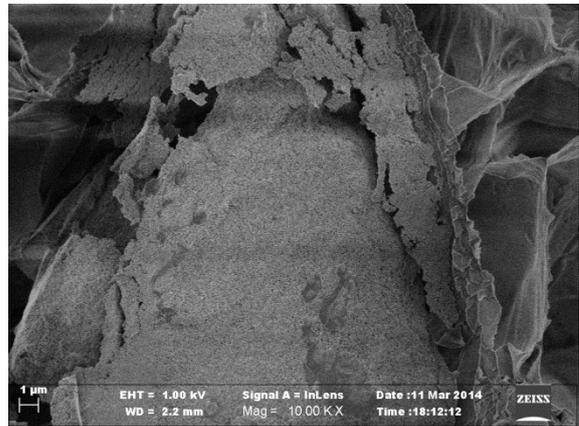
**Figura 3.3-35: Sez perp. del gel sottoposto a campo magnetico, ingrandimento 2500X**



**Figura 3.3-34: Sez. parallela del gel sottoposto a campo magnetico, ingrandimento 500X**



**Figura 3.3-33: Sez. parallela del gel sottoposto a campo magnetico, ingrandimento 2500X**



**Figura 3.3-32: Sez. parallela del gel sottoposto a campo magnetico, ingrandimento 10000X**

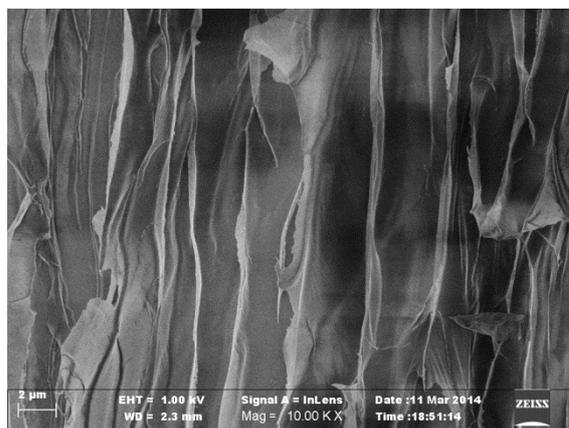
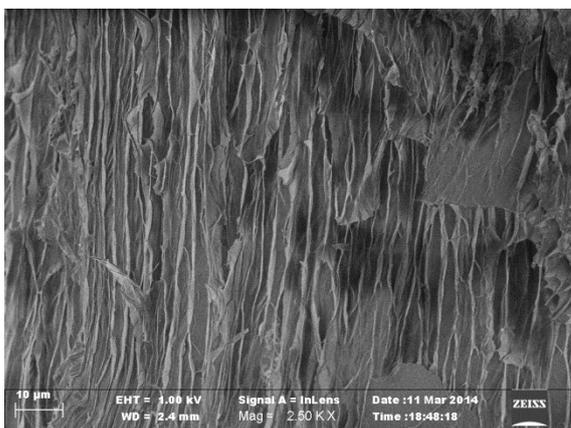
Come si può vedere dalle immagini, il gel presenta dei pori schiacciati e allungati nel senso perpendicolare al campo magnetico (Figura 3.3-35). I pori hanno una lunghezza di circa 30 μm e una larghezza di circa 5 μm. Questo è un risultato concorde con il fatto che il gel risultasse schiacciato perpendicolarmente al campo magnetico. Nelle figure Figura 3.3-33Figura 3.3-34 possiamo osservare delle sezioni trasversali degli stessi pori. Questi pori hanno un diametro di circa 5 μm e sono molto profondi. Come si può notare, nel senso parallelo al campo magnetico, i pori non mostrano anisotropia; infatti questi presentano una struttura a celle di alveare e non assumono direzioni spaziali preferenziali. In Figura 3.3-32 si può vedere il dettaglio di un aggregato di NPs,

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

segno evidente che già a queste concentrazioni di NPs nel gel non si riesce ad ottenere una buona omogeneità di queste.

#### *3.3.3f Congelamento del gel con NPs commerciali sottoposto a campo magnetico*

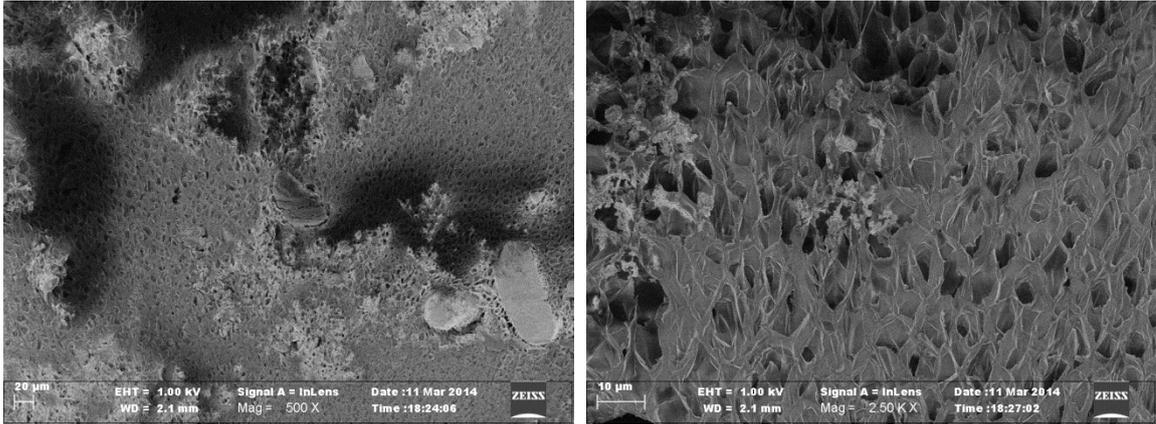
Dopo aver verificato che la forma dei pori di un gel magnetico macroporoso cambia quando il gel è sottoposto ad un campo magnetico, abbiamo voluto sperimentare se è possibile indurre un cambiamento permanente della forma dei pori, congelando lentamente il gel sotto un campo magnetico stazionario. Abbiamo deciso di svolgere le prove sul gel di PAAm-PGD con NPs commerciali al 10 %. Per fare questo abbiamo congelato il gel a 0.1 °C/min fino ad una temperatura di -10 °C in una vial di vetro a contatto con un magnete in grado di produrre un campo magnetico di 0.6 Tesla. Il gel è stato poi lasciato scongelare, per assicurarci che il cambiamento della forma dei pori fosse permanente, e poi liofilizzato per l'analisi SEM. Il gel è stato sezionato parallelamente e perpendicolarmente al campo magnetico, per verificare se i pori avessero assunto una direzione spaziale preferenziale. Qui di seguito riportiamo i risultati ottenuti.



**Figura 3.3-36: Gel di PAAm-PGD con NPs al 10 %, congelato a 0.1 °C/min sotto campo magnetico, sez. perp. al c. m., ingrandimento 2500X**

**Figura 3.3-37: Gel di PAAm-PGD con NPs al 10 %, congelato a 0.1 °C/min sotto campo magnetico, sez. perp. al c. m., ingrandimento 10000X**

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE



**Figura 3.3-38: Gel di PAAm-PGD con NPs al 10 %, congelato a 0.1 °C/min sotto campo magnetico, sez. parallela al c. m., ingrandimento 500X**      **Figura 3.3-39: Gel di PAAm-PGD con NPs al 10 %, congelato a 0.1 °C/min sotto campo magnetico, sez. parallela al c. m., ingrandimento 2500X**

Come si può vedere dalle immagini SEM, nella direzione perpendicolare al campo magnetico i pori sono molto schiacciati, con una lunghezza tra 30  $\mu\text{m}$  e 40  $\mu\text{m}$  e una larghezza media di appena 2  $\mu\text{m}$  (Figura 3.3-36 e Figura 3.3-37). Inoltre i pori sembrano abbastanza interconnessi tra di loro. Nelle figure Figura 3.3-39 e Figura 3.3-38 sono mostrati ingrandimenti diversi degli stessi pori sezionati parallelamente al campo magnetico. In questo caso si può osservare come parallelamente al campo magnetico i pori non abbiano direzioni preferenziali nello spazio, ed abbiano un diametro medio tra 2  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$ .

Dall'esame del campione al SEM sembrerebbe quindi possibile controllare la forma dei pori attraverso il congelamento lento del gel sotto un campo magnetico stazionario. Questo risultato è particolarmente importante perché dimostrerebbe che è possibile controllare la forma dei pori in modo diverso dalle tecniche fin ora sviluppate.

## 4. CONCLUSIONI

Attraverso questo lavoro di tesi c'eravamo posti diversi obiettivi. In primo luogo volevamo far luce sulla validità delle tecniche sviluppate finora per la produzione di gel macroporosi attraverso metodi criogenici post-sintesi e verificare se queste tecniche fossero applicabili anche a gel di tipo chimico. Volevamo inoltre sperimentare l'applicazione di queste tecniche agli stessi gel con nanoparticelle magnetiche. In particolare eravamo interessati ad individuare le formulazioni di nanoparticelle più adatte a dare gel stabili e con una buona risposta magnetica. Volevamo infatti vedere se sfruttando la risposta magnetica del gel fosse possibile ottenere cambiamenti strutturali indotti da magnetismo.

Abbiamo perciò sintetizzato vari tipi di gel fisici e chimici e li abbiamo sottoposti a varie condizioni di raffreddamento, congelamento e liofilizzazione per vedere quali fossero gli effetti sulla morfologia di ciascuna delle diverse condizioni. Abbiamo poi deciso di concentrarci sui gel chimici di PAAm cross-linkati con polietilenglicole. Questi gel sono stati sintetizzati con nanoparticelle di maghemite e magnetite prodotte in soluzione e con particelle di magnetite prodotte meccanicamente in diverse concentrazioni. Anche questi gel sono stati sottoposti a varie condizioni di congelamento per modificarne la morfologia. Tutti i gel sono stati analizzati attraverso il SEM per evidenziarne le caratteristiche morfologiche e attraverso l'analisi elementare EDAX e la termogravimetria per stabilirne il contenuto ferroso.

Dai risultati del nostro lavoro si può stabilire che, in accordo con quanto trovato da Van Vlierberghe et al.<sup>10</sup>, è possibile modificare la porosità di gel sia chimici che fisici attraverso il lento congelamento dell'acqua presente al loro interno. Abbiamo infatti mostrato che è proprio la formazione e la crescita dei cristalli di ghiaccio ad indurre le modifiche nella porosità degli idrogel. Più i gel vengono raffreddati lentamente, minore è il numero di nuclei di congelamento che si formano nell'acqua. In seguito questi nuclei crescono fino a formare dei cristalli in regioni prive di polimero, costringendo il polimero che era presente in queste regioni a concentrarsi verso le zone in cui è ancora presente acqua liquida. Qui il polimero si concentra sempre di più fino a precipitare, formando le spesse pareti dei macropori, a loro volta formati a causa

#### 4. CONCLUSIONI

della crescita dei cristalli di ghiaccio. Con questa tesi si chiarisce quindi l'aspetto determinante che ha la velocità di raffreddamento nella formazione dei macropori. In letteratura avevamo infatti trovato notizie contrastanti riguardo gli effetti della temperatura finale di congelamento<sup>12</sup> e della velocità di congelamento<sup>10</sup> sulla formazione dei macropori. La temperatura finale di congelamento ha anch'essa effetto sulla macroporosità solo poiché differenze di temperature maggiori presuppongono uno scambio di calore più veloce e quindi una maggiore velocità di raffreddamento.

Chiaramente la velocità di raffreddamento ha effetti più o meno marcati a seconda della mobilità del gel. Gli effetti sono particolarmente evidenti nel caso di gel con alta mobilità, come i gel fisici ed in particolare il chitosano. Perciò abbiamo scelto di lavorare su un gel chimico reso particolarmente mobile grazie alla presenza di ponti di polietilenglicole.

Abbiamo inoltre verificato che gli stessi effetti dati dalla velocità di raffreddamento sono riscontrabili in gel con nanoparticelle magnetiche all'interno, senza apprezzabili differenze nella modellabilità della porosità del gel dovute alla presenza di diverse concentrazioni di nanoparticelle al loro interno.

Abbiamo visto che è possibile sintetizzare gel magnetici stabili inglobando direttamente le nanoparticelle nel gel al momento della sintesi, senza previa funzionalizzazione di esse. In questo modo abbiamo potuto raggiungere notevoli percentuali di nanoparticelle magnetiche all'interno del gel senza ottenere separazioni di fasi. Abbiamo visto come l'uso di nanoparticelle più grandi possa permettere la sintesi di gel con concentrazioni di queste in quantità persino superiore rispetto al polimero stesso. A parità di concentrazione in peso infatti, una sospensione di nanoparticelle più piccole contiene un numero più grande di queste rispetto ad una sospensione di nanoparticelle più grandi. La stabilità del gel sembra correlata al numero di nanoparticelle al suo interno piuttosto che alla loro concentrazione in peso. Questo probabilmente dipende dal fatto che un maggior numero di nanoparticelle si traduce in un maggior numero di punti in cui la corretta reticolazione del gel è disturbata. La percentuale di nanoparticelle inglobabili dipende probabilmente anche dal particolare cross-linker usato: il polietilenglicole in questo senso sembra un cross-linker particolarmente adatto. Tuttavia questo aspetto merita di essere approfondito

#### 4. CONCLUSIONI

per capire meglio come diversi tipi di cross-linker possano influenzare la stabilità dei gel con nanoparticelle.

Infine abbiamo dimostrato che è possibile sfruttare la risposta magnetica dei gel con nanoparticelle magnetiche in sinergia con il congelamento di essi per produrre gel con pori di forma controllata. Abbiamo infatti visto che congelando lentamente il gel magnetico in presenza di un campo magnetico stazionario e unidirezionale è possibile indurre delle modifiche permanenti nella forma dei pori. Anche questo aspetto merita di essere sviluppato ulteriormente.

In definitiva questo lavoro di tesi definisce alcune linee guida utili a creare idrogel macroporosi con pori di forma e dimensioni controllate. Questi gel macroporosi potrebbero essere particolarmente utili nel campo biomedico e biotecnologico. Potrebbero essere usati infatti come supporti per la crescita e la proliferazione cellulare, e come supporti per cromatografia di componenti macroscopiche come cellule e microrganismi. Inoltre la presenza di nanoparticelle magnetiche potrebbe servire per utilizzare questi macrogel magnetici come ambienti confinati dove far interagire cellule e sostanze farmacologiche bersaglio, sfruttando la risposta magnetica del gel per il rilascio controllato delle sostanze bersaglio o delle cellule stesse.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- (1) Ridi, F.; Bonini, M.; Baglioni, P. *Adv. Colloid Interface Sci.*
- (2) Mandal, S.; Lee, M. V.; Hill, J. P.; Vinu, A.; Ariga, K. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, *10*, 21–33.
- (3) Schexnailder, P.; Schmidt, G. *Colloid Polym. Sci.* **2009**, *287*, 1–11.
- (4) Elettromagnetismo ambientale - Meccanismi di interazione dei campi magnetici con i tessuti biologici  
[http://roma2.rm.ingv.it/it/tematiche/39/elettromagnetismo\\_ambientale/40/meccanismi\\_di\\_interazione\\_dei\\_campi\\_magnetici\\_con\\_i\\_tessuti\\_biologici](http://roma2.rm.ingv.it/it/tematiche/39/elettromagnetismo_ambientale/40/meccanismi_di_interazione_dei_campi_magnetici_con_i_tessuti_biologici)  
(accessed Mar 24, 2014).
- (5) Carpinelli, G. *Ann. Dell Ist. Super. Sanità* **30**, 37–40.
- (6) Sun, Y.; Ma, M.; Zhang, Y.; Gu, N. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2004**, *245*, 15–19.
- (7) Bonini, M.; Berti, D.; Baglioni, P. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2013**, *18*, 459–467.
- (8) Liu, Y.; Goebel, J.; Yin, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 2610–2653.
- (9) Plieva, F. M.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1657–1671.
- (10) Van Vlierberghe, S.; Cnudde, V.; Dubruel, P.; Masschaele, B.; Cosijns, A.; De Paepe, I.; Jacobs, P. J. S.; Van Hoorebeke, L.; Remon, J. P.; Schacht, E. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 331–337.
- (11) Madhally, S. V.; Matthew, H. W. T. *Biomaterials* **1999**, *20*, 1133–1142.
- (12) Zhao, X.; Kim, J.; Cezar, C. A.; Huebsch, N.; Lee, K.; Bouhadir, K.; Mooney, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 67–72.
- (13) Zrínyi, M.; Barsi, L.; Büki, A. *Polym. Gels Netw.* **1997**, *5*, 415–427.
- (14) Freeze-drying. *Wikipedia, the free encyclopedia*, 2014.
- (15) Nitrogen. *Wikipedia, the free encyclopedia*, 2014.
- (16) Skoog, D. A.; Holler, J. F.; Crouch, S. R.; Sabbatini, L. *Chimica analitica strumentale*; Edises: Napoli, 2009.
- (17) Scanning electron microscope. *Wikipedia, the free encyclopedia*, 2014.
- (18) Office for Learning and Teaching. *Scanning electron microscopy in practice*, 2013.
- (19) Field emission gun. *Wikipedia, the free encyclopedia*, 2014.
- (20) Pethrick, R. A.; 1942-; Dawkins, J. V. **1999**.
- (21) Rice, S. A. *J. Polym. Sci.* **1956**, *19*, 594–594.
- (22) Walenta, E. *Acta Polym.* **1985**, *36*, 296–296.
- (23) Bienert, R.; Emmerling, F.; Thünemann, A. F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 1651–1660.