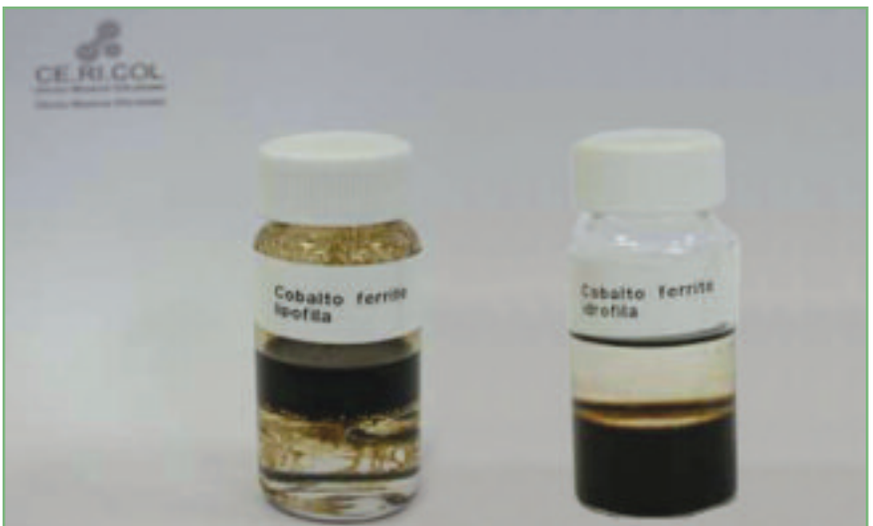


Nanoparticelle funzionalizzate in fase lipofila (sinistra) e idrofila (destra) in un sistema acqua-olio

Daniele Bonacchi
CERICOL, Centro Ricerche Colorobbia
Sovigliana-Vinci (FI)
bonacchid@colorobbia.it
Mauro Comes Franchini
Dipartimento di Chimica Organica
"A. Mangini"
Università di Bologna
mauro.comesfranchini@unibo.it

NANOPARTICELLE MAGNETICHE DI COBALTO FERRITE PER APPLICAZIONI IN NANOMEDICINA

Nanoparticelle di cobalto ferrite sono state sintetizzate, ricoperte con acidi fosfonici e idrossamici e completamente caratterizzate. È stata verificata l'efficienza ipertermica di nanoparticelle non rivestite dimostrando una maggior efficienza rispetto alla magnetite.

I sistemi nanostrutturati hanno ricevuto recentemente grande attenzione per applicazioni biomedicali grazie alla loro compatibilità dimensionale con le cellule (5-100 μm), i virus (20-450 nm) le proteine (5-50 nm) ed i geni (larghezza 2 nm, lunghezza 10-100 nm) [1]. Per questo motivo è nata recentemente la "Nanomedicina".

Le nanoparticelle magnetiche si comportano come piccoli magneti perché possono essere manipolate da una forza magnetica esterna e se abbiniamo questa caratteristica con la penetrabilità dei campi magnetici nei tessuti umani, si può facilmente intuire come si possono avere un grande numero di applicazioni biomediche.

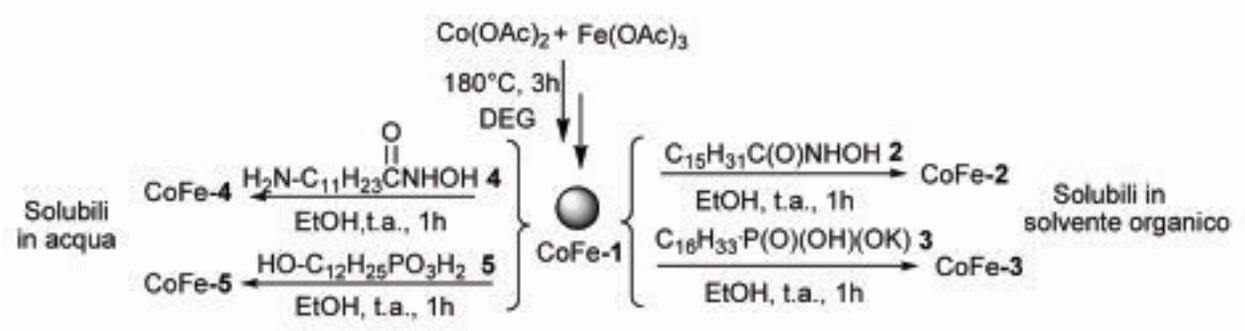
Attualmente ingenti sforzi si stanno effettuando per la ricerca di nuove metodologie terapeutiche ed in particolare per la cura dei tumori. L'approccio innovativo si basa sul fatto che le terapie anti-tumorali devono colpire i tessuti malati, anziché quelli sani, ed in questo senso la nanomedicina sta emergendo come un potente mezzo per perseguire tale scopo, grazie alla possibile somministrazione mirata di farmaci (*targeted drug delivery*) [2] anche tramite vettori magnetici. Le nanoparticelle magnetiche possono inoltre essere visualizzate in tecniche di immagine ormai ampiamente affermate come la

risonanza magnetica [3], fatto questo che permette di visualizzare la posizione esatta della nanoparticella permettendo una sua più accurata manipolazione. Un ulteriore vantaggio dell'uso di nanoparticelle magnetiche in nanomedicina è che esse assorbono l'energia elettromagnetica convertendola in calore (effetto ipertermico magnetico) [4] e possono quindi essere usate come elementi riscaldanti così da indurre un controllato aumento di temperatura; questo effetto è oggi una delle applicazioni biomedicali più studiate per la distruzione di cellule cancerogene [5]. Per applicazioni in campo medico è necessario che le nanoparticelle magnetiche presentino determinate proprietà chimico-strutturali e magnetiche [6]. Innanzitutto, devono essere chimicamente stabili e deve esserne possibile la funzionalizzazione della superficie mediante molecole organiche o polimeri. L'introduzione di nanoparticelle nel corpo umano richiede che queste siano sospese in acqua o siano facilmente ridisperse, evitando di formare aggregati così da non avere embolia dei vasi sanguigni. Altro fattore molto importante è l'abilità di eludere il sistema immunitario, questo è infatti molto efficiente nel riconoscere ed eliminare materiali estranei, le nanoparticelle devono quindi essere in grado di persistere nel flusso sanguigno per il tempo necessario a raggiungere il bersaglio. Le caratteristiche magnetiche, d'altro canto, sono essenziali per una buona efficienza del materiale sia per quanto riguarda il targeting magnetico che per l'ipertermia. Per quest'ultima in particolare, una buona risposta magnetica non solo riduce l'invasività del processo ma, dato che la concentrazione del sistema nel tessuto bersaglio è il fattore critico, aumenta drasticamente le possibilità di successo della terapia.

Oggigiorno, la grande maggioranza delle ricerche in questo campo ha come oggetto particelle magnetiche di ossido di ferro [7] (magnetite o maghemite), in quanto esse hanno un eccellente grado di biocompatibilità, sono economiche e possono essere preparate in diverse dimensioni mediante una grande varietà di metodi di sintesi. Recentemente, la necessità di ottenere sistemi di particelle monodisperse per applicazioni nel campo della registrazione magnetica ha fortemente stimolato la ricerca di nuovi metodi di sintesi per la produzione di un'ampia varietà di nanoparticelle di leghe diverse (FePt, CoPt, FePd, $CoFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$, $SmCo_5$) [8].

Fra queste, la cobalto ferrite ($CoFe_2O_4$) sta riscuotendo particolare interesse per applicazioni anche in campo biomedico. La cobalto ferrite ha struttura a spinello ed, in confronto ad altre ferriti magnetiche, possiede un'alta anisotropia magnetocristallina e di conseguenza un'elevata coercitività. Tali fattori aprono nuove prospettive per l'uso di nanoparticelle di cobalto ferrite per applicazioni in campo medico anche se fino ad oggi l'impiego, benché prospettato, non è stato possibile a causa di alcuni ostacoli derivanti soprattutto dalle particolari tecniche di sintesi adottate (superficie non accessibile per la presenza di tensioattivi, tendenza ad aggregarsi in soluzione e rilascio di cobalto in soluzione acquosa) [9].

In questo articolo presenteremo i risultati ottenuti in questa linea di ricerca basata sull'utilizzo di nanoparticelle di cobalto ferrite per applicazioni in nanomedicina e più precisamente per il trattamento terapeutico tramite ipertermia di tumori solidi. La sintesi della nanoparticelle di cobalto ferrite è stata realizzata mediante il metodo *polyol* (Schema). Tale versatile tecnica di sintesi consiste nella reazione di idrolisi ad alta temperatura tra sali metallici in solventi non tossici altobollenti, quali ad esempio il dietilenglicole (DEG), e ci ha permesso la produzione di una dispersione stabile di cobalto ferrite in una varietà di composizioni e diverse stechiometrie



Schema - Sintesi della cobalto ferrite CoFe-1 e ricoprimento con leganti organici 2-5

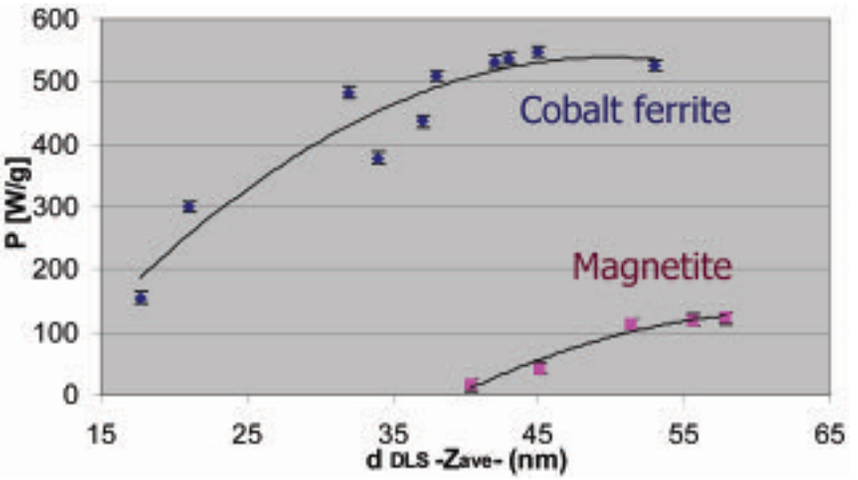


Fig. 1 - Efficienza ipertermica di dispersioni nanoparticellari a base di magnetite e cobalto ferrite

su scala di 1 kg [10] con una stretta distribuzione in dimensioni e con diametro medio di 5,5 nm. Recentemente inoltre è stato sviluppato un metodo che prevede sintesi successive (risintesi) in grado di far variare le dimensioni delle nanoparticelle tra 5 e 50 nm. Abbiamo quindi affrontato il problema del coating organico della superficie nanoparticellare con l'obiettivo di comprendere il tipo di interazione tra la superficie e la molecola organica e di avere la possibilità di rendere sia liposolubile che idrofila la cobalto ferrite, caratteristiche queste importanti in base al successivo utilizzo del *core* magnetico. Le molecole selezionate per la ricopertura sono state degli acidi fosfonici e/o idrossamici, composti scarsamente investigati per il coating di nanoparticelle magnetiche ma che si sono dimostrati molto efficaci nel ricoprimento. In particolare, gli acidi idrossamici 2 e 4 e gli acidi fosfonici 3 e 5 sono stati selezionati per questo lavoro, i prodotti difunzionali 4 e 5 ed il monofunzionale 2 sono stati ottenuti per sintesi, mentre il derivato fosfonico 3 è commerciale. Nello Schema vengono mostrate le condizioni di reazione ottimizzate per il ricoprimento delle superfici: è interessante notare come i prodotti di copertura CoFe-2 e -3 sono solubili ed estraibili in solvente organico mentre CoFe-4 è solubile in ambiente acquoso, CoFe-5 in acqua-etanolo 1/1 e CoFe-5 è anche solubile in acqua ma tende ad aggregarsi (ridisperdibile comunque con blando riscaldamento).

La spettroscopia infrarossa è molto utile per comprendere le interazioni dei gruppi funzionali organici con le superfici nanostrutturate. Dagli spettri FT-IR è stato dunque possibile verificare l'avvenuta reazione in quanto per il prodotto 2 le due bande che si trovano nella regione di stretching del C=O carbossilico (1.663 e 1.623 cm^{-1}) dopo l'aggancio sulla cobalto ferrite scompaiono lasciando posto ad una banda allargata a numero d'onda inferiore (1.596 cm^{-1}); stesso comportamento per il derivato difunzionale 4 che

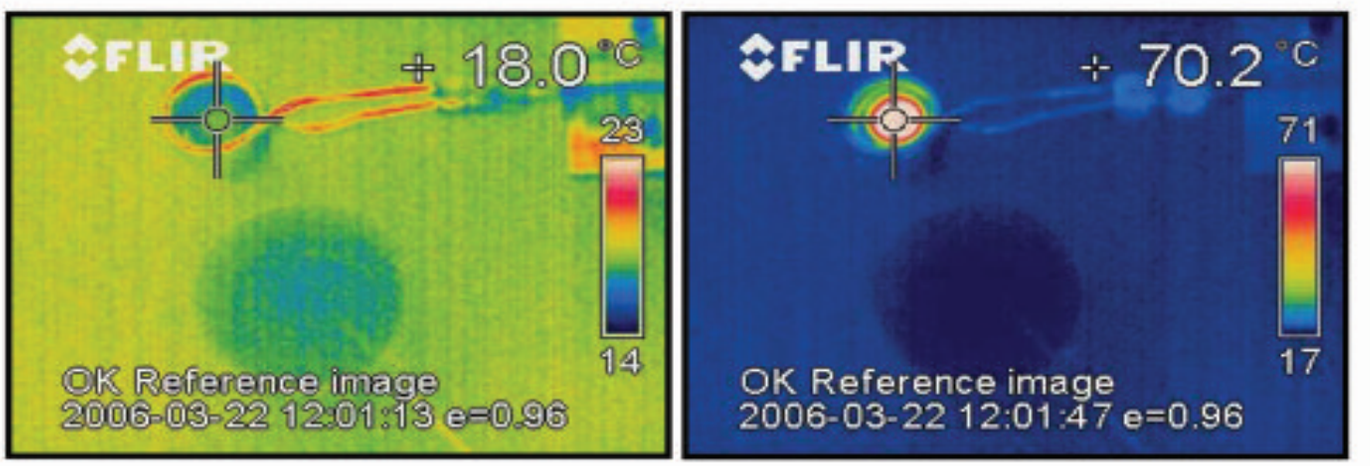


Fig. 2 - Immagine termografica di una dispersione nanoparticellare di cobalto ferrite al 3% w/w (H=21 kA/m; t=30 sec; f=170 kHz)

ha mostrato l'unica banda del CO a 1.605 allargata e spostata a 1.576 cm^{-1} dopo l'aggancio. Nel caso dei leganti fosfonici 3 e 5, si nota che le bande di stretching del gruppo PO per 3 (1.216 e 937 cm^{-1}) dopo il ricoprimento spariscono mentre le bande di stretching del gruppo PO_3 (1.079 e 1.005 cm^{-1}) risultano allargate e spostate (1.122 e 1.057 cm^{-1}) in accordo con i comportamenti riportati in letteratura [11]. Analogo comportamento per il prodotto 5: spariscono gli stretching a 1.233 e 936 cm^{-1} mentre si allargano e si spostano da 1.162 e 1.010 cm^{-1} a 1.096 a 933 cm^{-1} gli stretching del gruppo PO_3.

Per valutare la percentuale di materiale organico e dunque il grado di ricoprimento sono state effettuate delle analisi termogravimetriche (TGA). Abbiamo calcolato un grado di ricoprimento del 33,8 e 35% per CoFe-3 e CoFe-5 che è molto soddisfacente, se consideriamo che il valore teorico per 3 calcolato dividendo la superficie totale per sfere ideali di diametro 5,5 nm diviso l'area stimata occupata dal legante (0,24 nm^2/molecola) [11] è del 33%. Per quanto riguarda i derivati idrossamici 2 e 4 la TGA ha fornito valori di ricopertura minori ovvero del 24% per CoFe-2 e del 18% per CoFe-4. Infine con misure di *dynamic light scattering* (DLS) si è determinato che il diametro medio delle nanoparticelle ricoperte è di 13,5 nm per CoFe-2, 14,1 nm per CoFe-3, 37,8 nm per CoFe-4 e 15,7 nm per CoFe-5. A parte CoFe-4, che ha mostrato un certo grado di aggregazione, gli altri tre campioni hanno mostrato un buon indice di polidispersità (inferiore a 0,2).

Uno studio sulla cessione di cobalto in soluzione è indispensabile se si vuole procedere con applicazioni biomedicali, ma in letteratura investigazioni di questo tipo non sono riportate. A scopo comparativo abbiamo preso un campione bulk di cobalto ferrite di 10 μm e lo abbiamo dializzato per 24 ore con acqua distillata a pH neutro; dopo 24 ore la cessione di cobalto valutata all'ICP (Ion Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy) è risultata inferiore allo 0,1%. Al contrario la stessa dialisi nel campione di CoFe-1 ha evidenziato una cessione del 31% dopo 24 ore. Tale risultato è spiegabile in base alla differenza di area superficiale attiva che nelle nanoparticelle è 10^6 volte maggiore che nel materiale bulk. Certamente questo comportamento pone il problema del controllo del rilascio di ioni in soluzione in quanto oltre ai problemi di potenziale tossicità [12], le proprietà magnetiche potrebbero variare notevolmente e con esse le caratteristiche necessarie per applicazioni in ipertermia. Abbiamo dunque dializzato anche i 4 campioni ricoperti con shell organico ed ottenuto i seguenti valori di cessione in termini percentuali: 1% per CoFe-2; <1% per CoFe-3, 10% per CoFe-4; <1% per CoFe-5. La cessione delle cobalto ferriti ricoperte con derivati monofunzionali CoFe-2 e -3, essendo liposolubili, è stata valutata con un sistema bifasico acqua/esano ed è risultata trascurabile per entrambi i leganti. Risulta evidente che, peraltro in accordo con i valori di TGA ovvero di ricopertura, i derivati fosfonici sembrano più adatti ad evitare la cessione di Co in soluzione acquosa e particolarmente importante è il valore ottenuto per CoFe-5 che, essendo solubile in ambiente acquoso, ben si presta per test preliminari di ipertermia. Passando alle proprietà magnetiche della cobalto ferrite queste presentano una magnetizzazione di saturazione comparabile con quelle degli ossidi di ferro mentre hanno un'anisotropia cristallina in fase massiva un ordine di grandezza superiore. Nel caso di materiale nanoparticellare, poi, questa anisotropia cristallina aumenta ulteriormente, incrementando la differenza con gli ossidi di ferro [13]. Secondo i modelli attualmente impiegati per comprendere l'effetto ipertermico [14] la variazione di anisotropia magnetica dovrebbe indurre esclusivamente una variazione della componente fuori fase che compare nell'espressione di efficienza ipertermica (Fig. 1). Secondo alcuni studi, sembrerebbe che l'anisotropia magnetica di nanoparticelle di magnetite di circa 20 nm sia già sufficiente a provocare ipertermia per rilassamento browniano escludendo il rilassamento magnetico (Nèel), l'utilizzo di nanoparticelle di cobalto ferrite dovrebbe quindi abbassare la dimensione minima

Cobalt Ferrite Magnetic Nanoparticles for Hyperthermic Applications in Medicine

ABSTRACT

Highly monodisperse and stable cobalt ferrite ($CoFe_2O_4$) nanoparticles have been produced on a kilogram scale, coated with mono- and difunctional phosphonic-, hydroxamic-acids, and the coated nanoparticles have been fully characterized. Evaluation of hyperthermic efficiency of cobalt ferrite dispersion indicate a strong increase in respect to magnetite of the same dimension. Finally we present a biocompatible composite comprising magnetic nanoparticles able to perform magnetic hyperthermia.

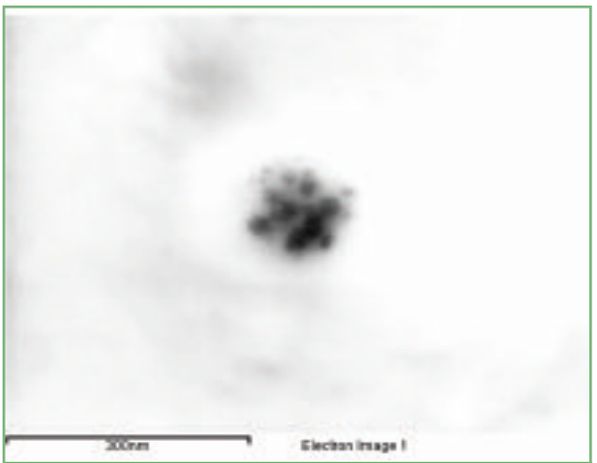


Fig. 3 - Immagine FEG-SEM con rivelatore STEM di un nanobioreattore, i punti scuri rappresentano le nanoparticelle di cobalto ferrite intrappolate in materiale polimerico

necessaria a questi requisiti. Sperimentalmente è stato invece osservato nei nostri laboratori che nanoparticelle di cobalto ferrite sono nettamente più efficienti rispetto a quelle di magnetite. In soli 30 s la temperatura di una dispersione liquida al 3% in cobalto ferrite passa da 18 °C a 70 °C (Fig. 2), rispetto ai 30 °C raggiunti con la magnetite delle stesse dimensioni. Questo risultato, che necessita di ulteriori approfondimenti, risulta comunque sbalorditivo e mostra come i modelli attualmente utilizzati [14] non spiegano del tutto il fenomeno ipertermico e necessitino di approfondire il ruolo dell'anisotropia magnetica. In ogni caso viene rispettato l'andamento lineare con la concentrazione di materiale inorganico e parabolico con il campo elettromagnetico applicato. Da quanto sopra esposto possiamo vedere come l'utilizzo di altri tipi di materiali, oltre alla magnetite, possa portare ad un netto aumento dell'efficienza ipertermica. Le particelle magnetiche di cobalto ferrite ricoperte con i leganti organici indicati nello Schema sono state successivamente opportunamente funzionalizzate e inglobate in vari tipologie di materiali biocompatibli (Fig. 3), la dimensione media del carrier finale è di 200 nm e forma una dispersione acquosa stabile anche in soluzione fisiologica (0,9% di NaCl), compatibile quindi con la somministrazione parenterale. Anche l'efficienza ipertermica del nanobioreattore magnetico è stata verificata, la potenza finale risulta essere paragonabile a quella del materiale non trattato ed è stato possibile raggiungere, dopo un irraggiamento di 10 minuti, la temperatura di 46 °C necessaria per l'apoptosi cellulare.

Conclusioni

In questo articolo abbiamo dimostrato la fattibilità di un approccio innovativo nella cura di diverse patologie tra cui il cancro. Questo approccio innovativo consentirebbe di ridurre drasticamente, se non eliminare, i numerosi effetti collaterali dei farmaci antitumorali somministrati in modo sistemico, consentendo la cura di patologie difficilmente accessibili dalla chirurgia. Anche se siamo solo agli inizi, ed innumerevoli ostacoli potrebbero sbarrare la strada a questa strategia, le prospettive che si intravedono non possono far altro che consigliare di aumentare gli investimenti in questa ricerca. Attualmente stiamo indagando l'efficacia *in vitro* ed *in vivo* del nanobioreattore magnetico come agente ipertermico ed il prossimo passo sarà l'inclusione dei farmaci per abbinare al fattore farmacologico il fattore ipertermico che potrebbe portare ad un effetto sinergico nel trattamento.

Bibliografia e note

[1] Nanoparticles. From Theory to Application, Gunther Schmidt (Ed.), Wiley-VCH, 2004.

[2] J. Dobson, *Drug Develop. Res.*, 2006, **67**, 55.

[3] M.F. Kirchner *et al., Cancer Res.*, 2003, **63**, 8122.

[4] Q.A. Pankhurst *et al., J. Phys. D.: Appl. Phys.*, 2003, **36**, R167.

[5] A. Jordan *et al., Int. J. Hypertermia*, 1997, **13**, 587; A. Jordan *et al., J. Magn. Magn. Mater.*, 1999, **201**, 413.

[6] Y. Gao, Biofunctionalization of Nanomaterials, Ch. 3, Vol. 1, in Nanotechnologies for the life science, Challa S.S.R. Kumar (Ed.), Wiley-VCH, 2006.

[7] A.K. Gupta, *Biomaterials*, 2005, **26**, 3995.

[8] S.H. Sun *et al., Science*, 2000, **287**, 1989; H.W. Gu *et al., J. Appl. Phys.*, 2003, **93**, 7589; T. Hyeon *et al., J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 12789.

[9] V. Villai, D.O. Shah, *J. Magn. Magn. Mater.*, 1996, **163**, 243; A. Wijaya *et al., Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 2006, Vol. 900E, 1.

[10] G. Baldi, A. Barzanti, M. Bitossi, *PCT EP*03/02281, 2002.

[11] S. Pawsey *et al., Langmuir*, 2002, **18**, 5205.

[12] La carcinogenicità del Co è ancora dibattuta. V.: http://www.iarc.fr International Agency for Research in Cancer.

[13] L.D. Tung *et al., J. Appl. Phys.*, 2003, **93**, 7486.

[14] R.E. Rosenweig, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2002, **252**, 370.