

Academia Oamenilor de Știință din România

RAPORT DE ACTIVITATE

Nr. 2

Suporturi magnetice destinate eliberării controlate

Director de Proiect:

Prof. Dr. Ing. Ecaterina ANDRONESCU

Membru Titular al AOSR

Cercetător:

As. Univ. Drd. Ing. Ionela Andreea NEACȘU

Universitatea POLITEHNICA din București

Septembrie 20183

CUPRINS

1.	Materiale și metode.....	2
1.1	Sinteza Fe ₃ O ₄	2
1.2	Sinteza Fe ₃ O ₄ @acid glutamic	3
2.	Tehnici specifice de caracterizare.....	4
2.1	Difracția de raze X (XRD).....	4
2.2	Microscopia electronică de baleiaj (SEM).....	4
2.3	Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)	5
2.4	Magnetometrie cu probă vibrantă (VSM).....	5
2.5	Microscopia electronică prin transmisie (TEM)	5
2.6	Analiza termică complexă (TG/DSC).....	6
3.	Rezultate și discuții.....	6
3.1	Caracterizarea pulberii de Fe ₃ O ₄	6
3.2	Caracterizarea pulberii de Fe ₃ O ₄ @acid glutamic	12
4.	Perspectivă	17

1. Materiale și metode

1.1 Sinteza Fe_3O_4

Utilizând metoda co-precipitării, descrisă în cele ce urmează (figura 1), a fost realizată sinteza nanoparticulelor de magnetită:

În vederea obținerii a 3 g magnetită se cântăresc 3,6 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ și 4,2 g $FeCl_3$ care se solubilizează în 600 mL apă ultrapură, sub agitare magnetică continuă. O altă soluție bazică este obținută prin solubilizarea a 4.5 g NaOH în 300 mL apă ultrapură, asigurând astfel un pH adecvat procesului de coprecipitare. Prima soluție, ce conține ioni de fier se adaugă peste soluția bazică, în picătură, cu debit constant, cu ajutorul unei pompe peristaltice. La finalul picurării, cu ajutorul unui magnet, se efectuează decantarea accelerată a nanoparticulelor de magnetită prin plasarea paharului care conține suspensia deasupra magnetului. După decantare, menținând magnetul sub pahar, în aceeași poziție relativă față de acesta, faza lichidă este îndepărtată. Precipitatul este spălat cu apă ultrapură în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari și materiilor prime nereacționate, până la obținerea unui pH neutru. După spălare, nanoparticulele sunt uscate în etuva cu vid, la temperatura de $60^\circ C$ pentru 24 h.

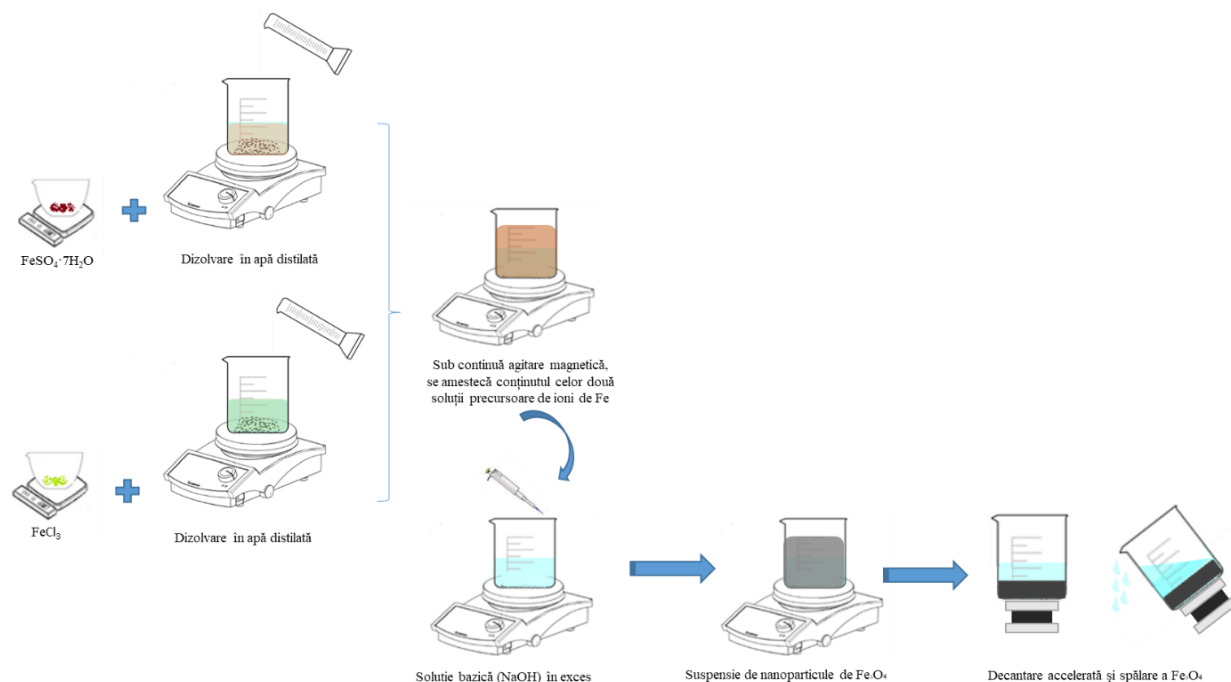


Figura 1. Schema de obținere a nanoparticulelor de magnetită (Fe_3O_4)

1.2 Sinteza $Fe_3O_4@$ acid glutamic

Sinteza nanoparticulelor de magnetită acoperită cu acid glutamic (figura 2) a fost realizată prin metoda co-precipitării modificate (figura 3) astfel:

Pentru obținerea a 3 g magnetită acoperită cu acid glutamic se cântăresc 3,6 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ și 4,2 g $FeCl_3$ care se solubilizează în 600 mL apă ultrapură, sub agitare magnetică continuă. O altă soluție bazică este obținută prin solubilizarea a 4.5 g NaOH în 300 mL apă ultrapură, asigurând astfel un pH adecvat procesului de coprecipitare. În soluția bazică astfel obținută se dozează acidul glutamic în raport molar 1:2 față de magnetită. Prima soluție, ce conține ioni de fier se adaugă peste soluția bazică, în picătură, cu debit constant, cu ajutorul unei pompe peristaltice. La finalul picurării, cu ajutorul unui magnet, se efectuează decantarea accelerată a nanoparticulelor de magnetită prin plasarea paharului care conține suspensia deasupra magnetului. După decantare, menținând magnetul sub pahar, în aceeași poziție relativă față de acesta, faza lichidă este îndepărtată. Precipitatul este spălat cu apă ultrapură în vederea îndepărtării produșilor de reacție secundari și materiilor prime nereacționate, până la obținerea unui pH neutru. După spălare, nanoparticulele sunt uscate în etuva cu vid, la temperatura de 60°C pentru 24 h.

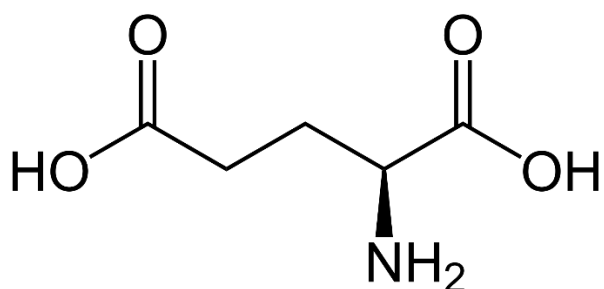


Figura 2. Formula structurală a acidului glutamic

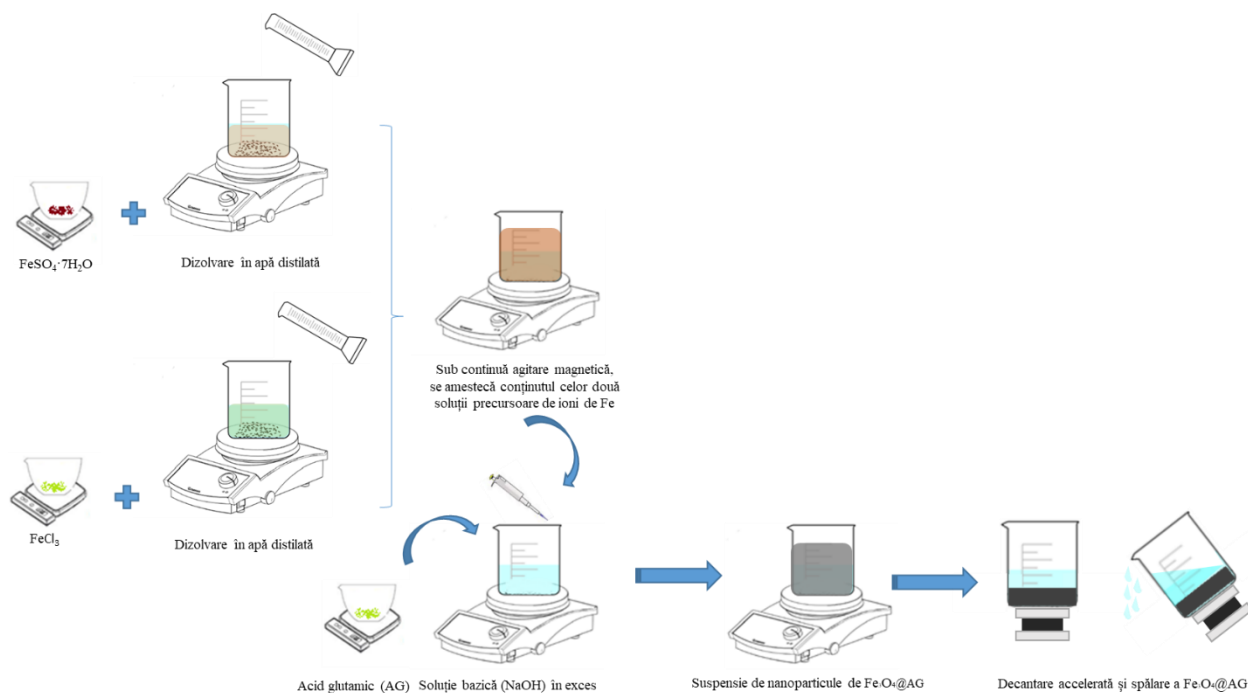


Figura 3. Schema de obținere a nanoparticulelor de magnetită ($Fe_3O_4@AG$)

2. Tehnici specifice de caracterizare

2.1 Difracția de raze X (XRD)

Analiza XRD a fost realizată în scopul caracterizării materialelor sintetizate din punctul de vedere al cristalinității acestora, precum și al fazelor componente, pentru anticiparea ulterioară a proprietăților aferente în cazul utilizării lor ca sisteme cu eliberare controlată în terapia cancerului.

Analiza de difracție de raze X a fost efectuată utilizând un echipament PANalytical Empyrean în geometrie Bragg-Brentano echipat cu un tub de raze X cu anod de Cu ($\lambda_{CuK\alpha}=1.541874 \text{ \AA}$) cu focalizare în linie, fantă divergentă programabilă pe partea incidentă și fantă anti-împrăștiere programabilă montat pe detector PIXcel3D pe partea difractată. Spectrul a fost achiziționat pe domeniul de unghiuri $20-80^\circ 2\theta$, cu pas de achiziție de 0.02° și timp de achiziție pe pas de 100s.

2.2 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

Microscopia electronică de baleiaj s-a realizat cu în vederea evidențierii aspectelor referitoare la morfologia probelor sintetizate, respectiv a dimensiunii particulelor, a gradului de cristalinitate existent. Achiziția de imagini a fost realizată cu ajutorul microscopului electronic de baleiaj de înaltă rezoluție, Inspect F50, la 30KeV și diverse magnificații.

2.3 Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)

Investigarea prin metoda FT-IR a pulberilor sintetizate a presupus analizarea unor cantități reduse de probă prin intermediul spectrometrului model Nicolet iS50R. Măsurătorile au fost efectuate la temperatura camerei, utilizându-se modulul de atenuare totală a reflexiei (ATR), fiind efectuate 32 de scanări ale probelor între 4000 și 440 cm^{-1} , la o rezoluție de 4 cm^{-1} . Înregistrarea spectrală a datelor a fost posibilă prin conectarea spectrometrului la o unitate de preluare și prelucrare a datelor, prin intermediul programului de lucru Omnic.

Valorile energetice reduse ce sunt caracteristice radiațiilor infraroșii determină, în urma interacției cu un compus, absorbția radiației electromagnetice de către moleculele substanței iradiate și apariția unor vibrații specifice grupărilor funcționale din moleculele compusului chimic. Legăturile chimice dintr-o moleculă, rezultate în urma absorbției radiației infraroșii, pot prezenta diverse tipuri de vibrații precum vibrații de alungire (în care se înregistrează o variație a distanței interatomice) sau vibrații de deformare (în care unghiul de valență dintre legăturile covalente ce au în comun un atom suferă modificări în plan sau în afara acestuia). Grupările funcționale ale moleculelor prezintă capacitatea de a absorbi radiația electromagnetică în infraroșu doar la anumite valori ale lungimii de undă, ceea ce permite înregistrarea de către interferometru a unor maxime de absorbție în infraroșu caracteristice. Maximele de absorbție rezultate sunt ulterior analizate.

2.4 Magnetometrie cu probă vibrantă (VSM)

Proprietățile magnetice ale nanosistemelor complexe au fost investigate la temperatura camerei, înregistrând funcția de susceptibilitate magnetică a câmpului magnetic prin intermediul magnetometrului cu probă vibrantă, model LakeShore 7404.

2.5 Microscopia electronică prin transmisie (TEM)

Imaginile obținute prin TEM corespunzătoare probelor de magnetită și magnetită acoperită cu acid glutamic au fost obținute cu ajutorul unui microscop electronic prin transmisie de înaltă rezoluție model TecnaiTM G2 F30 S-TWIN echipat cu SAED, achiziționat de la compania FEI. Microscopul funcționează în modul de transmisie la o tensiune de 300 kV, rezoluția punctuală și cea de linie garantate având valorile de 2 Å, respectiv 1 Å.

Analiza particularităților rețelelor cristaline poate fi efectuată prin intermediul difracției de electroni pe arie selectată (SAED), în interiorul unui microscop electronic prin transmisie. Această tehnică de investigare este similară – din punct de vedere al principiului metodei – cu difracția de raze X, cu următoarele deosebiri: radiația incidentă este reprezentată de un fascicul de electroni, iar analizarea probei este realizată pe zone cu dimensiuni de ordinul nanometrilor.

Difracția specifică a fasciculului de electroni permite investigarea complexă a probei de interes: constatarea naturii cristaline sau amorfe, identificarea sistemului cristalografic, identificarea eventualelor defecte structurale, precum și determinarea compozițională.

2.6 Analiza termică complexă (TG/DSC)

Analiza termică complexă (TG/DSC) a fost realizată cu ajutorul unui Sistem de analiză termică complexă STA (TG/DSC) - FTIR – GCMS, NETZSCH STA 449 F3 Jupiter, efectuând o încălzire a probei cu viteză constantă până la 1000°C.

Analiza termogravimetrică (TG) este o tehnică analitică ce permite obținerea de date privind stabilitatea termică și conținutul compușilor volatili, prin monitorizarea variației de masă a probei ce este supusă unui tratament termic. Evaluarea comportamentului termic al probei ce se dorește a fi analizată se realizează prin transferarea unei cantități variabile de energie termică spre probă și monitorizarea proprietăților de material ce sunt modificate – în cazul de față, masa probei.

Analiza termică diferențială (calorimetria diferențială, DSC) are la bază compararea variației temperaturii unei probe cu a unui etalon, care nu prezintă transformări de fază în intervalul de temperaturi analizat. Metoda evidențiază transformările de fază în stare solidă, care au un mic efect termic însoțitor. Suplimentar, corelând pierderile de masă ale probei cu intervalele de temperatură în care au fost înregistrate, dar și cu natura exo-/endo-termă a modificărilor probei, analiza termică complexă (TG/DSC) permite obținerea de date relevante privind natura și metoda de obținere a materialului analizat, precum și identificarea probei din punct de vedere chimic.

3. Rezultate și discuții

3.1 Caracterizarea pulberii de Fe₃O₄

Spectrul de difracție de raze X înregistrat pentru proba de magnetită este reprezentat în Figura 4. Rezultatele obținute au fost interpretate pe baza fișei ASTM (en. American Society for Testing and Materials) PDF4+ [04-013-9808].

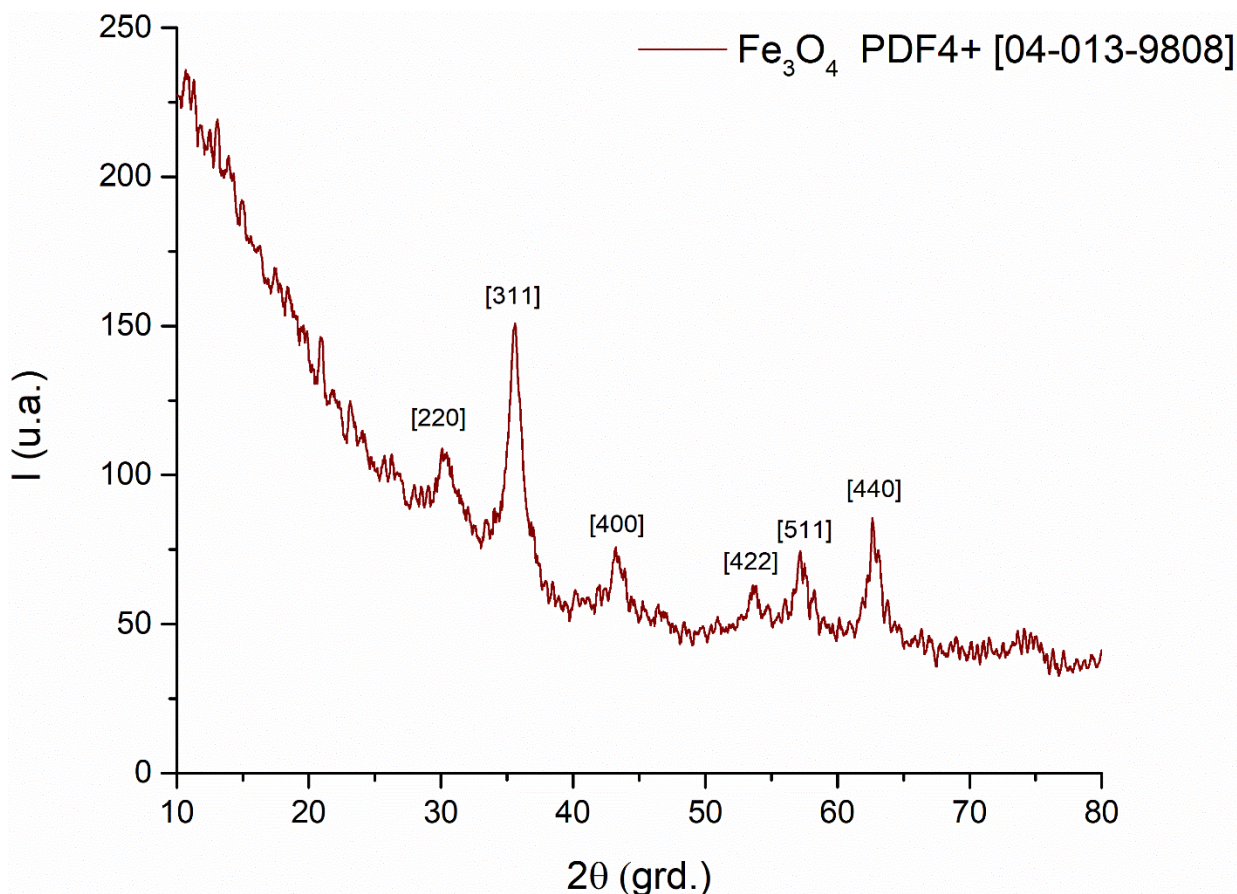


Figura 4. Difractograma de raze X pentru pulberea de Fe_3O_4 , cu evidențierea planelor de cristalizare

Prin urmare spectrul indică un material cu un grad scăzut de cristalinitate, iar în intervalul 2θ ($10-80^\circ$) investigat se remarcă prezența a 6 interferențe de difracție specifice, la valori estimate ale unghiului 2θ de $30, 35, 43, 54, 57$ și 62° . Conform datelor tabelare disponibile în fișele ASTM, maximele de difracție identificate în cazul nanoparticulelor sintetizate experimental corespund planelor de difracție $(2\ 2\ 0)$, $(3\ 1\ 1)$, $(4\ 0\ 0)$, $(4\ 2\ 2)$, $(5\ 1\ 1)$, respectiv $(4\ 4\ 0)$ ale magnetitei, cristalizată în sistem cubic.

Din imaginile de microscopie electronică de baleiaj prezentate în figura 5 reiese o morfologie cvasi-sferică, cu particule foarte fine, cu diametrul cuprins între $4-7\text{ nm}$, dispuse preponderent în aglomerări (figura X). Nanomaterialele sintetizate prezintă caracteristici greu observabile în SEM. Din acest motiv, au fost necesare investigații amănunțite de microscopie electronică prin transmisie.

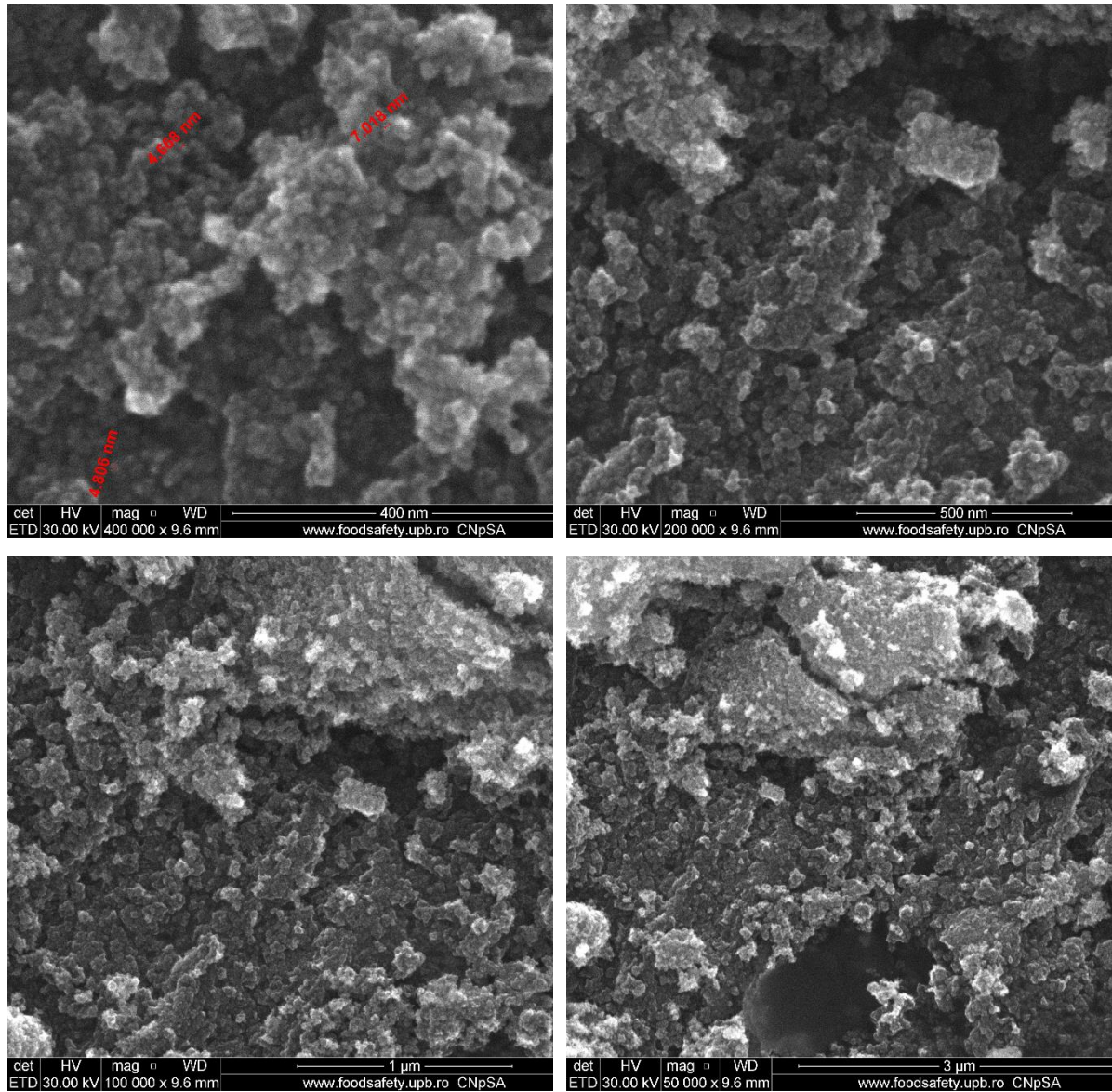


Figura 5. Micrografii SEM pentru pulberea de Fe_3O_4

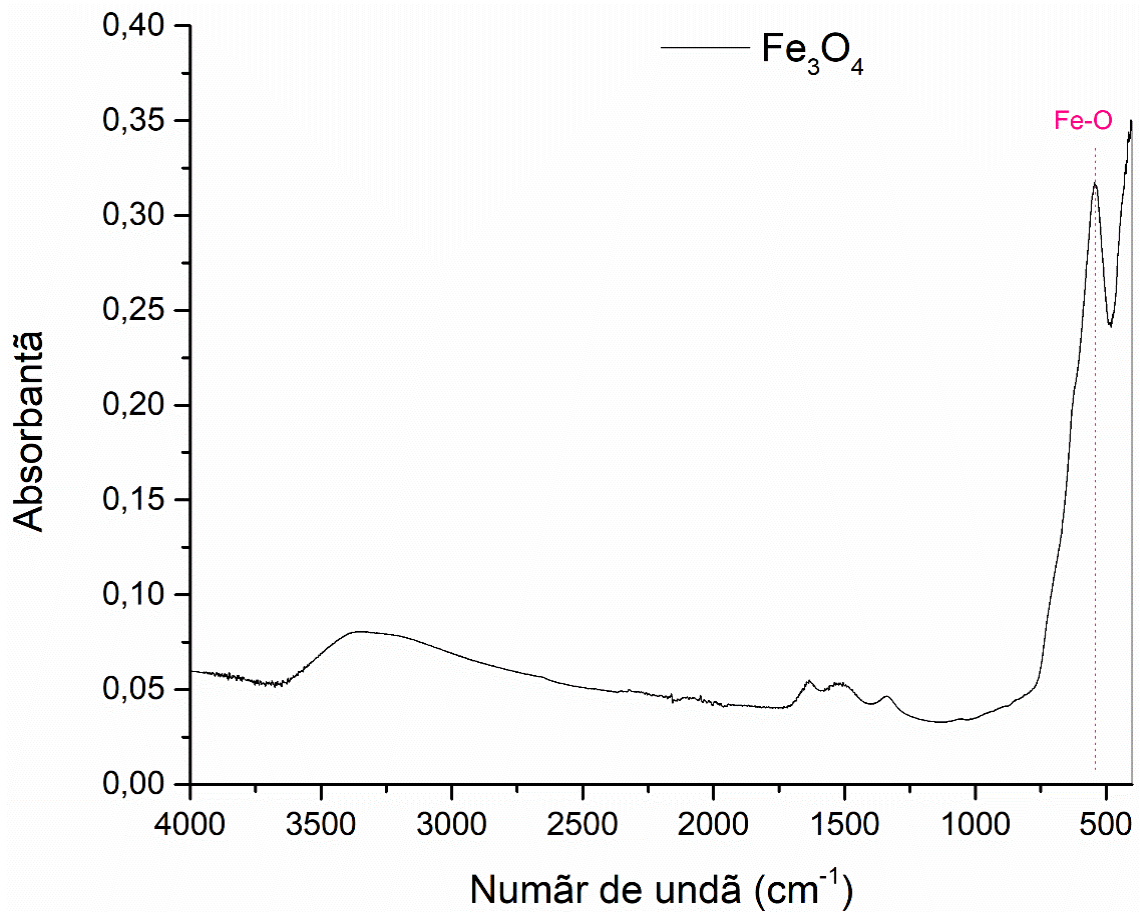


Figura 6. Spectrul FT-IR pentru pulberea de Fe₃O₄

Spectrul FT-IR pentru proba de Fe₃O₄ este prezentat în figura 6. Banda de absorbție puternică situată la aproximativ 547 cm⁻¹ corespunde legăturii Fe-O din magnetită.

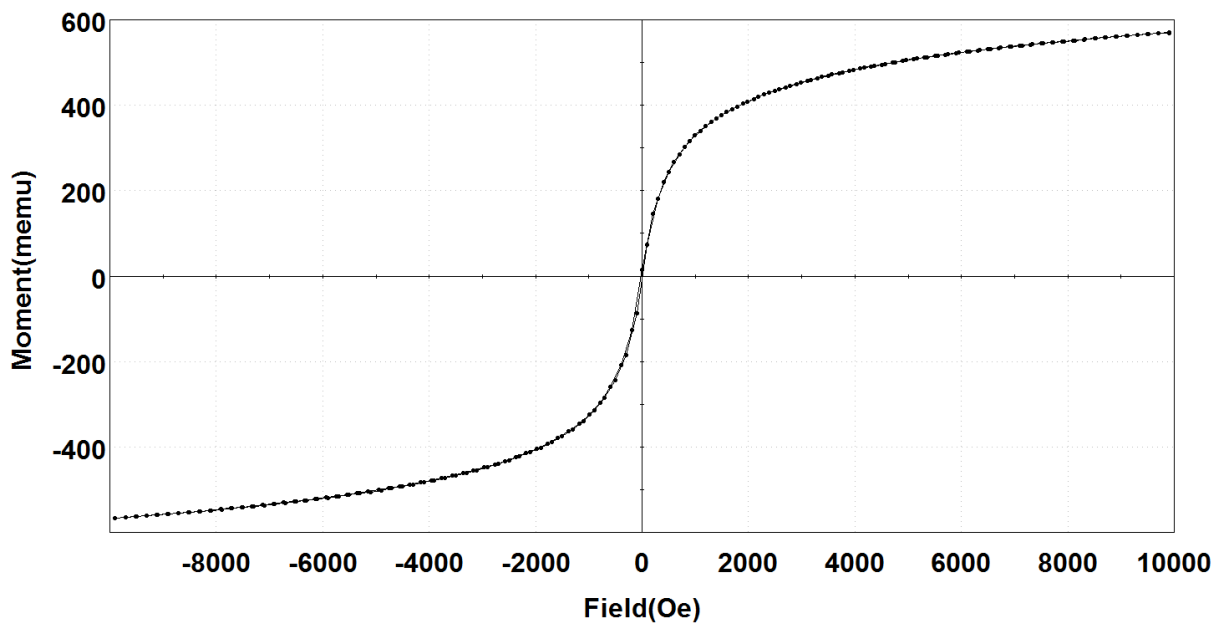


Figura 7. Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe₃O₄ la temperatura de 25°C

În figura 7 este prezentată variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe_3O_4 la temperatura de 25°C . Se observă că în intervalul -2000 și 2000 Oe a valorii câmpului magnetic aplicat, magnetizația prezintă o creștere semnificativă, atingând valoarea de saturație la aproximativ 5000 Oe, acest comportament fiind caracteristic magnetitei. Dacă în cazul magnetitei bulk magnetizația de saturație este de aproximativ 95 emu/g, în domeniul biomedical, o magnetizație de saturație de 10 emu/g este suficientă pentru ca nanoparticulele magnetice să poată fi utilizate ca sisteme cu eliberare controlată. Nanoparticulele de magnetită sintetizate în cadrul acestui studiu prezintă o magnetizație de saturație de 58 emu/g, datorită direct proporționalității cu valoarea diametrului de nanoparticulă. Prin urmare, nanoparticulele magnetice sintetizate dispun de proprietățile magnetice necesare pentru a fi utilizate ca sisteme complexe în eliberare controlată.

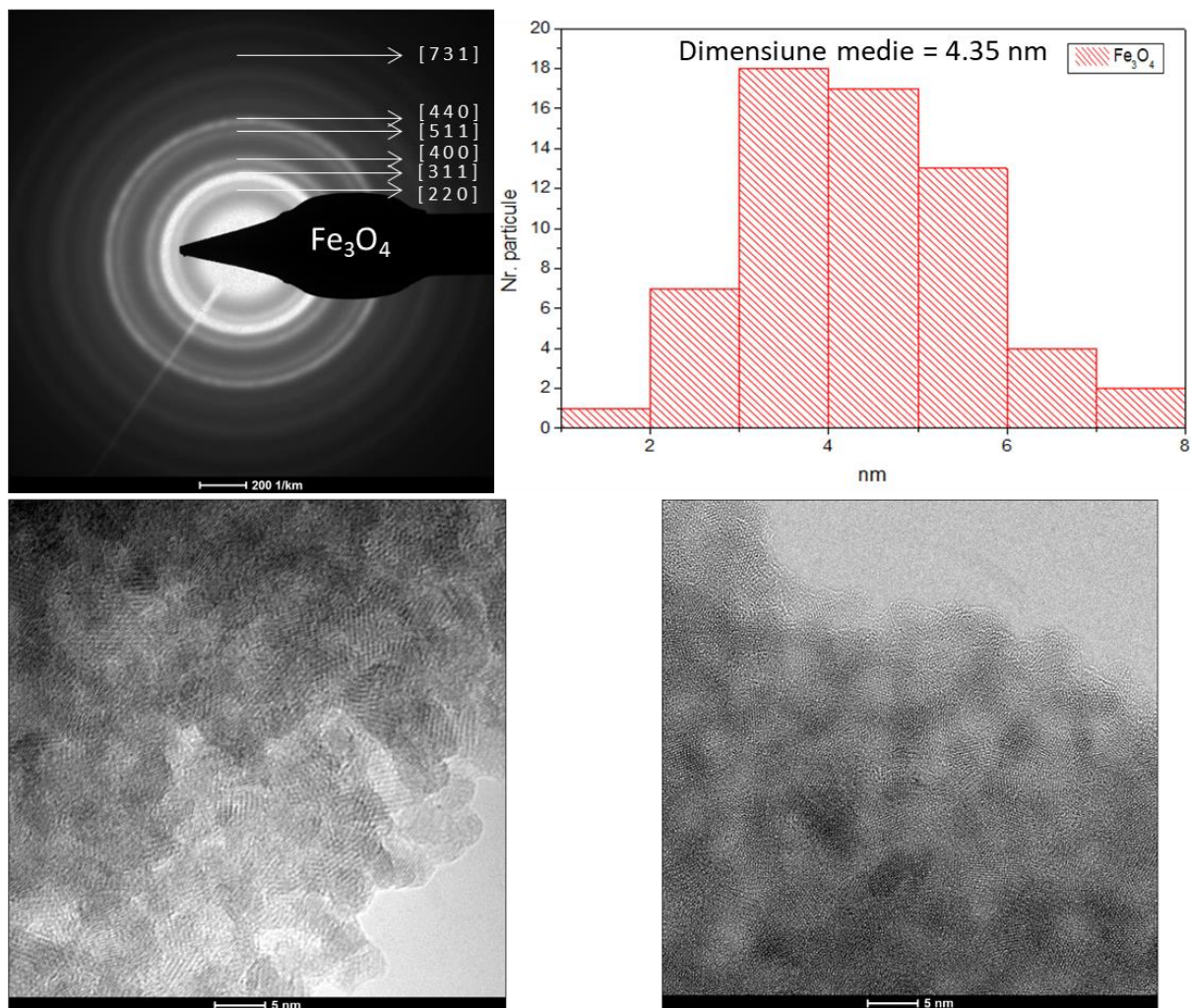


Figura 8. Imagine TEM în câmp luminos, difracție de electroni pe arie selectată și distribuție după dimensiune obținute pe proba de Fe_3O_4

În Figura 8 sunt prezentate multiplele informații furnizate de către microscopia electronică prin transmisie. Astfel, din imaginea de microscopie electronică prin transmisie în câmp luminos obținută pentru proba de magnetită se poate observa faptul că proba este formată din aglomerate de nanoparticule, cu o morfologie preponderent sferică și poliedrală. Dimensiune medie de particulă este de 4,35 +/-0,02 nm, având o distribuție monomodală, conform histogramei prezentate de asemenea în figura 8. Din difracția de electroni pe arie selectată (SAED) realizată se pot observa planele de cristalizare caracterizate prin indicii Miller evidențiați și în XRD, respectiv (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1), (4 4 0) ale magnetitei.

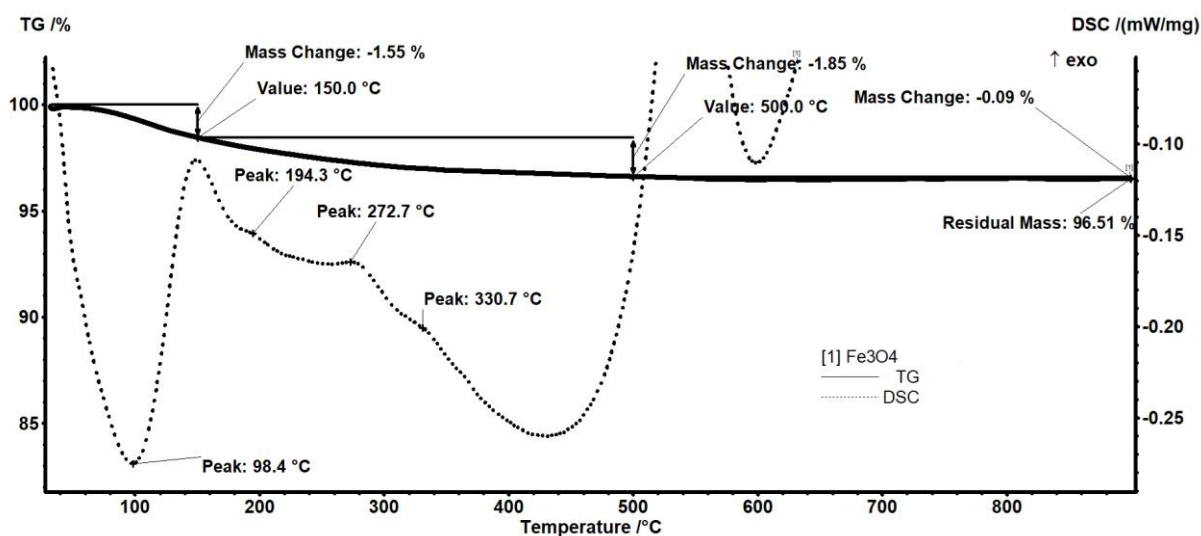


Figura 9. Analiza termică complexă pe pulberea de Fe_3O_4 (TG/DSC)

Din analiza termică complexă prezentată în figura 9 se observă că în intervalul 30-150°C are loc prima pierdere de masă (1.55%), însoțită de un efect endoterm cu minimul la 98.4°C. Pierdere de masă este cauzată de eliminarea apei din probă și eventual, a unor grupări -OH de pe suprafața nanoparticulelor.

În intervalul 150-500°C pierdere de masă înregistrată este 1.85%, și este însoțită de mai multe efecte, slabe, suprapuse. În principiu se pot degrada resturi de precursori rămase din sinteza magnetitei. Peak-ul de la 330°C poate fi atribuit transformării magnetitei în maghemită (proces de oxidare). Pe curba DSC se observă un efect slab exoterm la 544.4°C. Acesta reprezintă o transformare de fază, a maghemitei în hematit. Este o transformare de fază specifică, întâlnită la majoritatea probelor cu magnetită, dar poziția acestui maxim este dependentă de mulți factori: dimensiunea nanoparticulelor, forma, metoda de sinteză etc. Pe intervalul 500-900°C se înregistrează o pierdere de masă de 0.09% (practic masa rămâne constantă. Masa reziduală este 96.51% iar în final proba are culoare negru-gri.

3.2 Caracterizarea pulberii de Fe_3O_4 @acid glutamic

În Figura 10 sunt prezentate spectrele de difracție de raze X ale probelor de magnetită și magnetită@acid glutamic. După cum se poate observa, în ambele spectre se identifică prezența maximelor de difracție caracteristice magnetitei, anterior detaliate. De remarcat este faptul că intensitatea interferențelor de difracție, în cazul probei ce conține și compus organic, are valori mai ridicate la unghiuri mici în comparație cu proba de magnetită pură. Acest lucru poate fi pus pe seama prezenței fazei organice cristaline pe suprafața nanoparticulelor magnetice, cu maxime de difracție la 2θ de 30 și 35 (atribuite acidului glutamic conform PDF4+ [00-019-1757]), rezultatul fiind un efect sinergetic al celor 2 faze evidențiate.

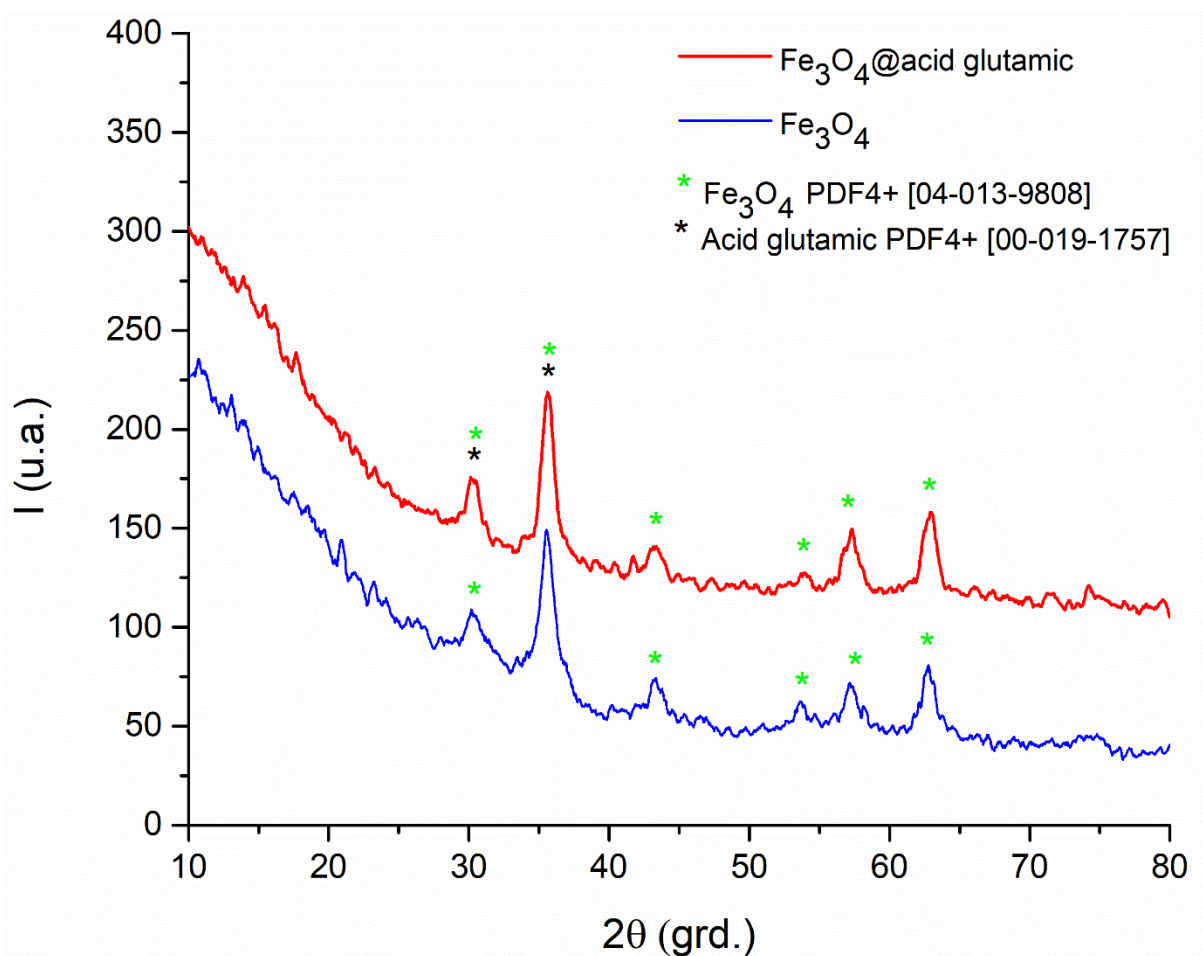


Figura 10. Diffractograma de raze X pentru pulberea de Fe_3O_4 @acid glutamic și evidențierea diferențelor față de Fe_3O_4

Din punct de vedere morfologic, imaginile de microscopie electronică de baleiaj efectuate pe probele de Fe_3O_4 @acid glutamic (Figura 11) indică prezența unor particule cu formă preponderent sferică, organizate sub forma unor aglomerate. Micrografiile obținute oferă primele indicii asupra caracterului nanodimensionat al materialelor (dimensiuni de particulă mai mici de 10 nm dar preponderent mai mari decât cele de magnetită simplă).

Compusul organic utilizat în procesul de sinteză pare să fi acoperit individual particulele oxidice. Determinările sunt, însă, dificil de realizat, datorită prezenței acidului glutamic care alterează calitatea imaginilor (compus instabil la 30kV). Prin urmare, se recomandă utilizarea microscopiei electronice prin transmisie ca tehnică de caracterizare a nanosistemelor complexe, pentru obținerea unor informații cu un nivel ridicat de acuratețe.

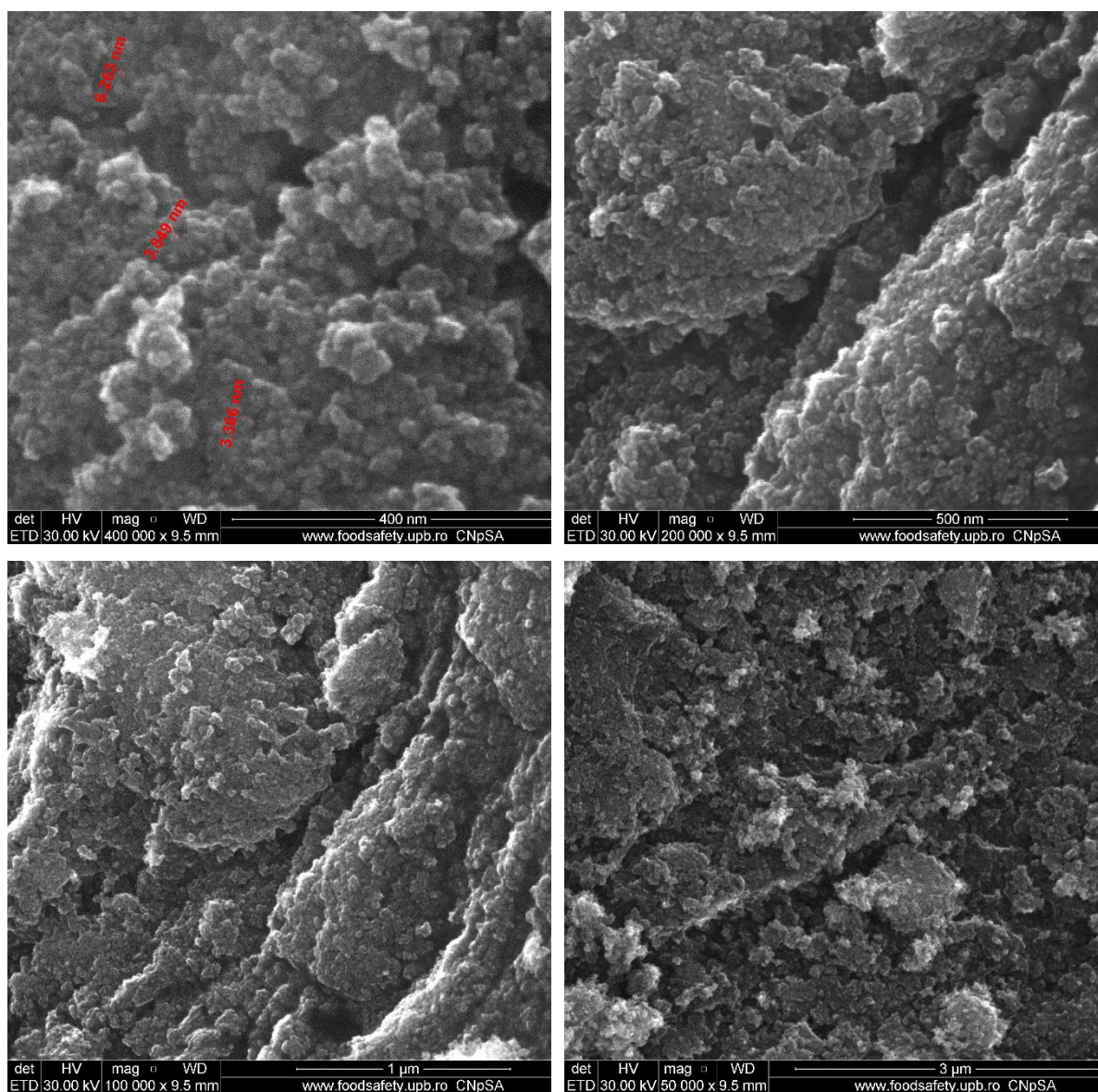


Figura 11. Micrografii SEM pentru pulberea de Fe_3O_4 @acid glutamic

În figura 12 sunt prezentate cu intenția studiului comparativ spectrele FT-IR ale Fe_3O_4 (anterior detaliat), Acid glutamic și Fe_3O_4 @Acid glutamic. În spectrul corespunzător acidului glutamic se observă benzile caracteristice, în corelație cu formula structurală a acidului glutamic, prezentată în figura 2, astfel: la 3005 cm^{-1} banda specifică vibrației de întindere a legăturii O-H, la 2855 cm^{-1} banda specifică vibrației de întindere a legăturii C-H, la 1690 cm^{-1}

banda specifică legăturii C=O și la 1523 cm^{-1} banda specifică vibrației de întindere a legăturii N-H din gruparea amino. Spectrul probei de Fe_3O_4 @Acid glutamic prezintă elemente comune celor 2 faze componente, regăsind astfel în jurul valorii de 550 cm^{-1} banda ce corespunde legăturii Fe-O din magnetită, iar în intervalul de $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ benzile specifice acidului glutamic. Absorbanta celor din urmă nu înregistrează însă valori ridicate, posibil din cauza unei cantități prea mici de fază organică de pe suprafața particulelor oxidice.

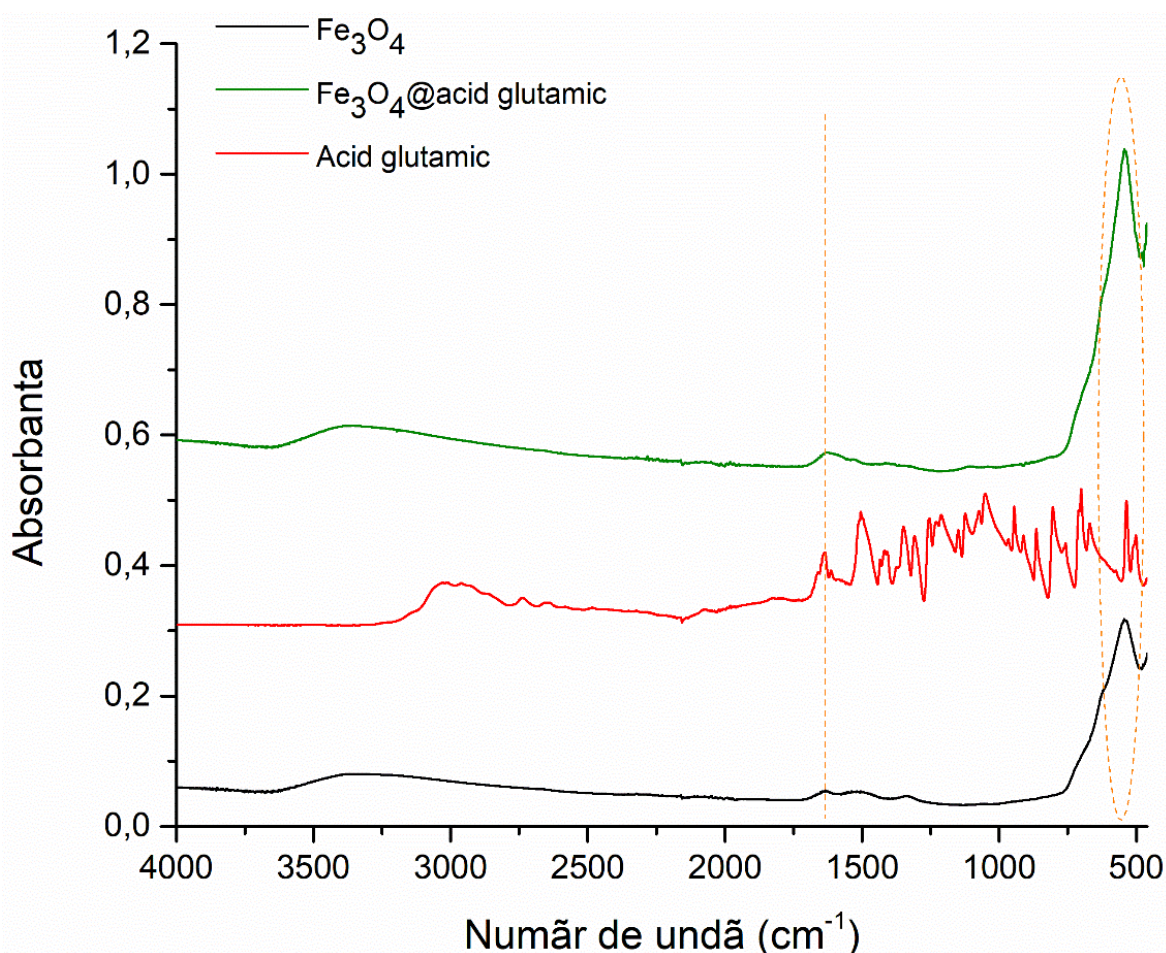


Figura 12. Spectrul FT-IR pentru proba de Fe_3O_4 @Acid glutamic

În figura 13 este prezentată variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe_3O_4 @acid glutamic la temperatura de 25°C . Se observă că în intervalul -2000 și 2000 Oe a valorii câmpului magnetic aplicat, magnetizația prezintă o creștere semnificativă, atingând valoarea de saturație la aproximativ 5000 Oe , similar magnetitei pure anterior prezentată. Nanoparticulele de Fe_3O_4 @acid glutamic sintetizate în cadrul acestui studiu prezintă o magnetizație de saturație de 42 emu/g și dispun de proprietățile magnetice necesare pentru a fi utilizate ca sisteme complexe în eliberare controlată.

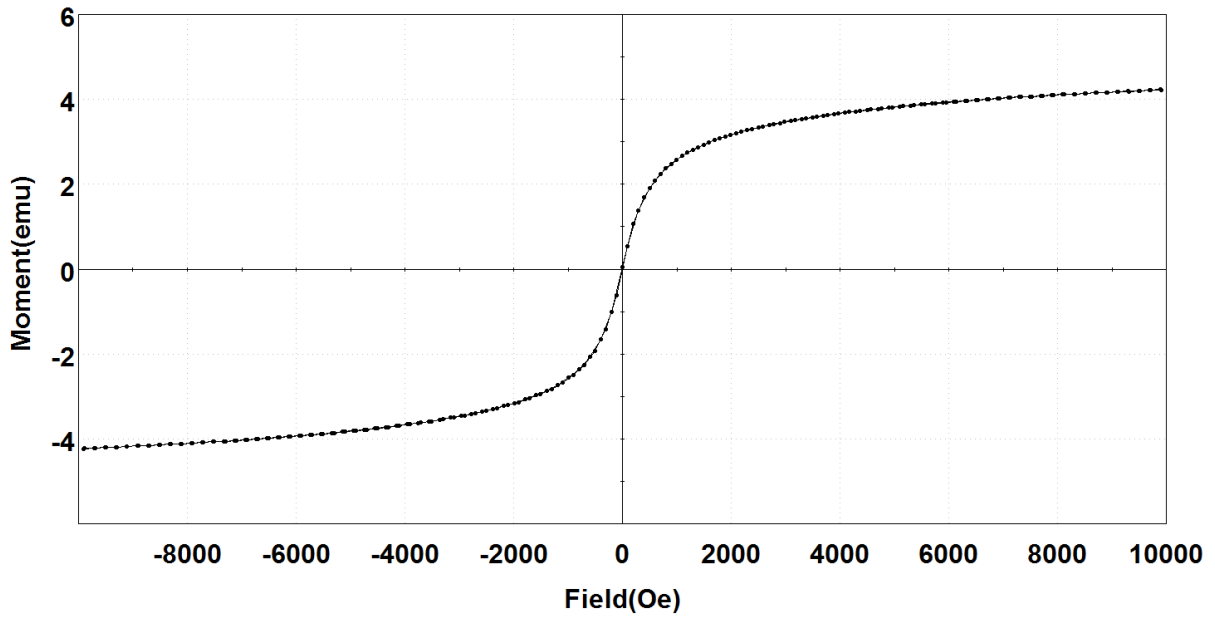


Figura 13. Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe_3O_4 @Acid glutamic la temperatura de $25^\circ C$

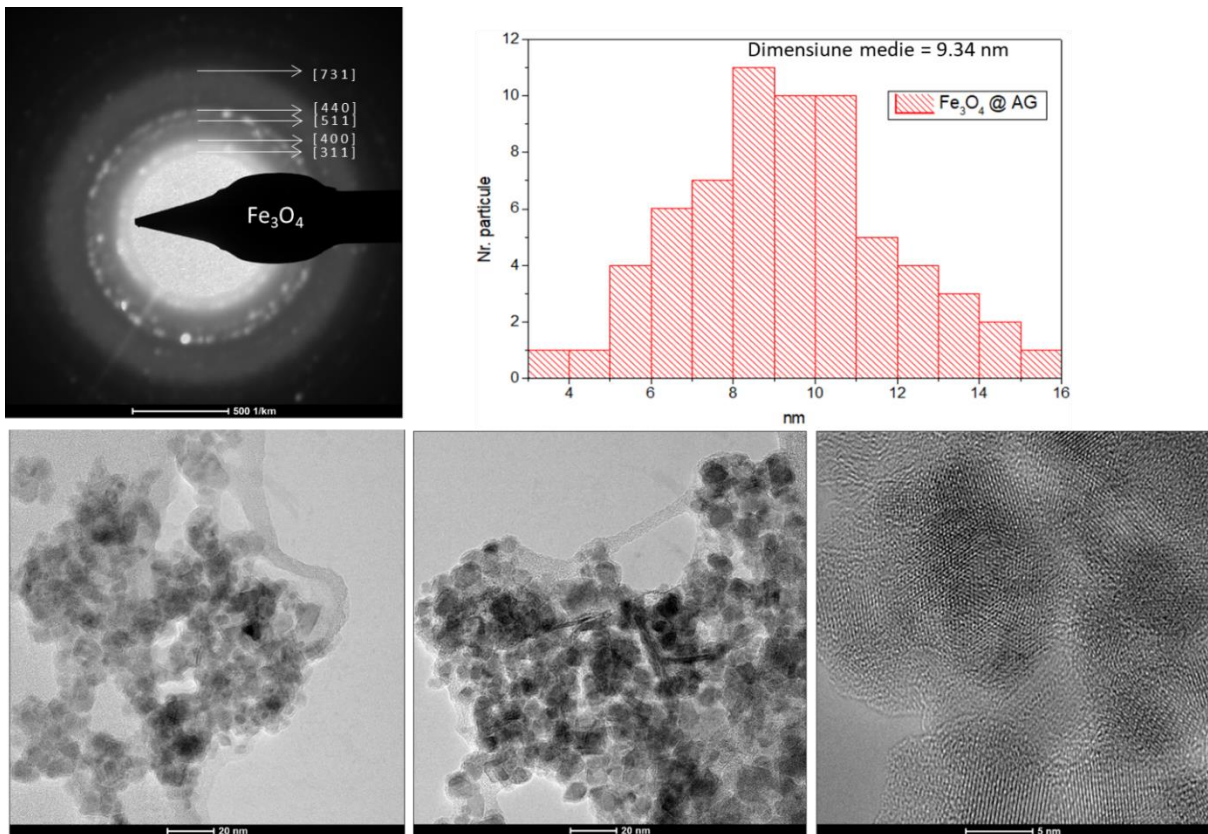


Figura 14. Imagine TEM în câmp luminos, difracție de electroni pe arie selectată și distribuție după dimensiune obținute pe proba de Fe_3O_4 @Acid glutamic

Din analizele de microscopie electronică prin transmisie efectuate pe materialul hibrid magnetită-acid glutamic reiese faptul că pulberea prezintă un grad crescut de cristalinitate, iar la suprafața particulelor se observă un strat necristalin, format dintr-un compus organic, de 1-2 nm, dispus uniform și echidistant în jurul particulelor oxidice, marcându-se mai degrabă formarea de nanostructuri de tip miez-înveliș (figura 14). Dimensiunea medie de particulă în acest caz este de 9.34 nm, mai mare decât în cazul magnetitei simple.

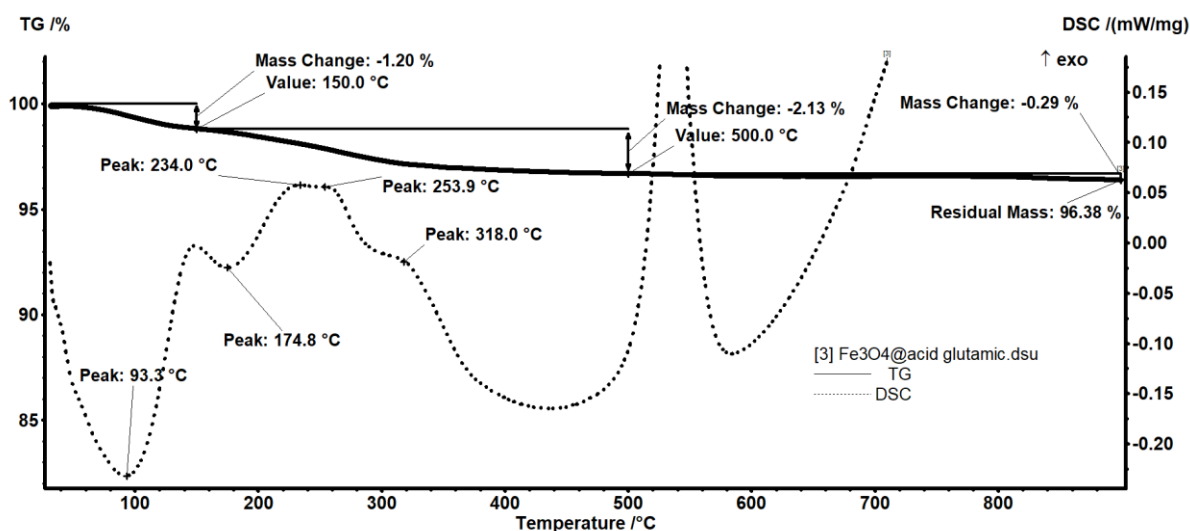


Figura 15. Analiza termică complexă (TG/DSC) obținută pe proba de $Fe_3O_4@Acid$ glutamic

Din punctul de vedere al comportamentului termic, proba de $Fe_3O_4@Acid$ glutamic este asemănătoare cu cea de magnetită simplă, dar există câteva deosebiri totuși: pierderea de masă pare mai lentă în zona $200^\circ C$, iar reziduul este roșcat. Dacă s-a reținut acid glutamic pe magnetită, fie este foarte puțin, fie a înlocuit o parte din apa/-OH adsorbite pe suprafața magnetitei. Altfel, în intervalul $30-150^\circ C$ are loc prima pierdere de masă (1.20%), însoțită de un efect endoterm cu minimul la $93.3^\circ C$. Pierderea de masă este cauzată de eliminarea apei din probă și eventual, a unor grupări -OH de pe suprafața nanoparticulelor.

În intervalul $150-500^\circ C$ pierderea de masă înregistrată este 2.13%, și este însoțită de mai multe efecte, slabe, suprapuse. În principiu se pot degrada resturi rămase din sinteza magnetitei, acid glutamic etc. Tot aici are loc și transformarea magnetitei în maghemită (proces de oxidare). Pe curba DSC se observă un efect slab exoterm la $536.7^\circ C$. Acesta reprezintă o transformare de fază, a maghemitei în hematit. Pe intervalul $500-900^\circ C$ se înregistrează o pierdere de masă de 0.29%. Masa reziduală este 96.38%, de culoare maro-roșcat.

4. Perspective

Studiul se va completa prin sinteza și caracterizarea unor sisteme de tipul Fe_3O_4 @acid glutamic – citostatic hidrofob, utilizat ca sistem de eliberare în terapia cancerului. În vederea realizării unor sisteme eficiente pentru tratamentul canceros, este necesară învelirea suplimentară a structurilor tip core-shell cu citostatice. Date fiind aplicațiile biomedicale vizate, biocompatibilitatea sistemelor obținute reprezintă o caracteristică absolut necesară, ca atare se vor realiza studii de biocompatibilitate și de evaluare a internalizării celulare. Pentru Fe_3O_4 @acid glutamic – Citostatic Hidrofob se va realiza suplimentar o analiză a activității antitumorale.