

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. Vladimir-Lucian ENE

Universitatea POLITEHNICA din București

Septembrie 2018

Cuprins

1. MATERIALE ȘI METODE	2
1.1 SINTEZA Fe_3O_4	2
1.2 SINTEZA $Fe_3O_4@ACID\ TARTRIC\ (Fe_3O_4@AT)$	3
2. TEHNICI SPECIFICE DE CARACTERIZARE	4
2.1 DIFRAȚIA DE RAZE X (XRD)	4
2.2 MICROSCOPIA ELECTRONICĂ DE BALEIAJ (SEM)	5
2.3 SPECTROSCOPIA ÎN INFRAROȘU CU TRANSFORMATĂ FOURIER (FT-IR).....	5
2.4 MAGNETOMETRIE CU PROBĂ VIBRANTĂ (VSM)	6
2.5 MICROSCOPIA ELECTRONICĂ PRIN TRANSMISIE (TEM).....	6
2.6 ANALIZA TERMICĂ COMPLEXĂ (TG/DSC)	6
3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	7
3.1 CARACTERIZAREA PULBERII DE Fe_3O_4	7
3.2 CARACTERIZAREA PULBERII DE $Fe_3O_4@ACID\ TARTRIC$	11
4. CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE	17

1. Materiale și metode

1.1 Sinteza Fe_3O_4

Nanoparticulele de Fe_3O_4 au stârnit interes științific atât pentru proprietățile magnetice cât și pentru faptul că prin funcționalizare permit vectorizarea medicamentelor. Nanoparticulele magnetice au fost sintetizate prin metoda co-precipitării astfel (figura 1):

- Pentru obținerea 1g de magnetită se cântăresc 1,2 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ și 1,4 g FeCl_3 și sunt solubilizați individual în câte 150 mL apă ultrapură, sub agitare magnetică continuă;
- 1,5g NaOH se dizolvă în 200 mL apă ultrapură, asigurând un pH optim obținerii nanoparticulelor magnetice;
- Soluția precursoră de ioni de fier se adaugă peste soluția bazică anterior obținută, în picătură, cu ajutorul unei pompe peristaltice, cu un debit constant;
- Cu ajutorul unui magnet puternic, se efectuează o decantare accelerată a suspensiei de nanoparticule de Fe_3O_4 , prin plasarea paharului Berzelius în care se află suspensia de nanoparticule peste magnet;
- După decantarea completă, menținând magnetul în contact cu paharul, faza limpede a suspensiei este îndepărtată;
- Precipitatul este spălat cu apă ultrapură de trei ori, în vederea îndepărtării materiilor prime nereacționate și obținerea unui pH neutru;
- După spălare, nanoparticulele sunt uscate în etuva cu vid, la temperatura de $60^\circ\text{C}/24\text{h}$.

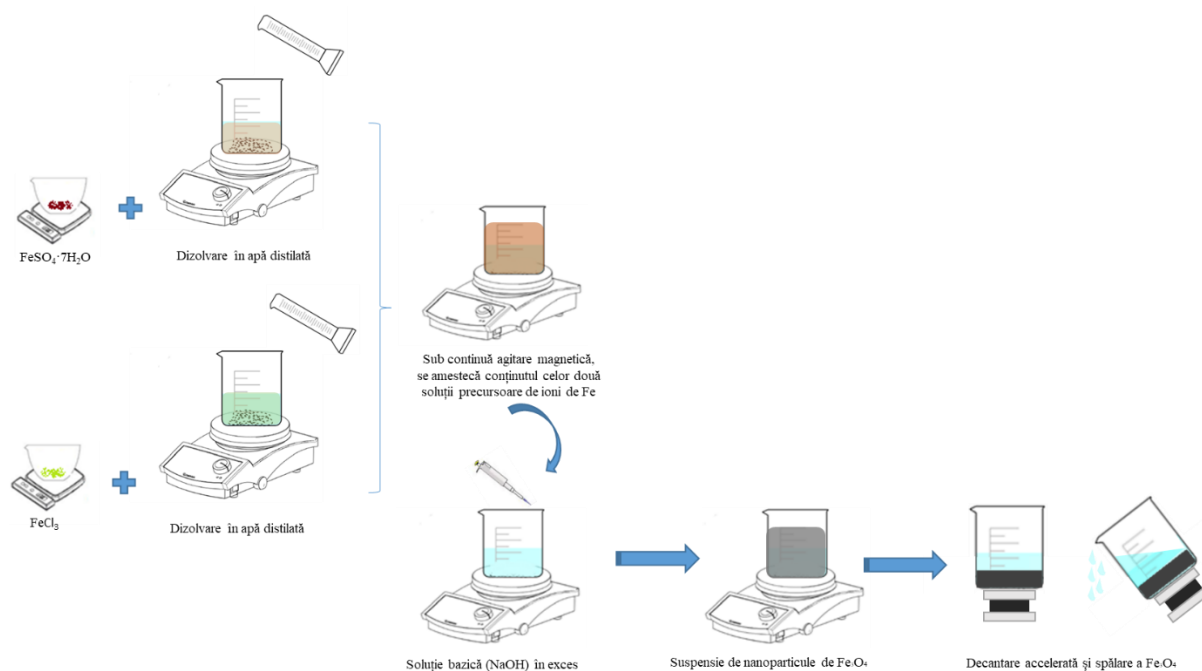


Figura 1. Schema de obținere a nanoparticulelor de magnetită (Fe_3O_4)

1.2 Sinteza Fe_3O_4 @acid tartric (Fe_3O_4 @AT)

Nanoparticulele magnetice acoperite cu acid tartric (figura 2) au fost sintetizate prin metoda co-precipitării modificată astfel (figura 3):

- Pentru obținerea 1g de Fe_3O_4 @acid tartric se cântăresc 1,2 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ și 1,4 g $FeCl_3$ și sunt solubilizați individual în câte 150 mL apă ultrapură, sub agitare magnetică continuă;
- 1,5g NaOH se dizolvă în 200 mL apă ultrapură, asigurând un pH optim obținerii nanoparticulelor magnetice;
- Se dozează acidul tartric ($C_4H_6O_6$) în raport molar 1:2 față de Fe_3O_4 și se solubilizează în soluția bazică anterior obținută.
- Soluția precursoră de ioni de fier se adaugă peste soluția bazică ce conține și acidul tartric, în picătură, cu ajutorul unei pompe peristaltice, cu un debit constant;
- Cu ajutorul unui magnet puternic, se efectuează o decantare accelerată a suspensiei de nanoparticule de Fe_3O_4 , prin plasarea paharului Berzelius în care se află suspensia de nanoparticule peste magnet;
- După dencantarea completă, menținând magnetul în contact cu paharul, faza limpede a suspensiei este îndepărtată;
- Precipitatul este spălat cu apă ultrapură de trei ori, în vederea îndepărtării materiilor prime nereacționate și obținerea unui pH neutru;
- După spălare, nanoparticulele sunt uscate în etuva cu vid, la temperatura de $60^\circ C/24h$.

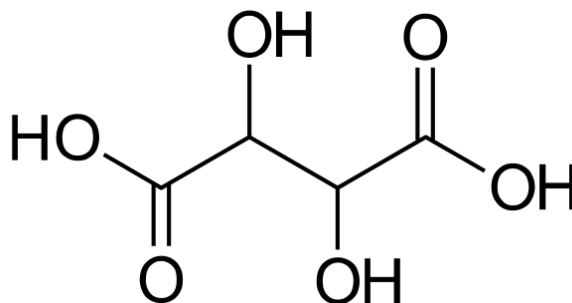


Figura 2. Formula structurală a acidului tartric (AT)

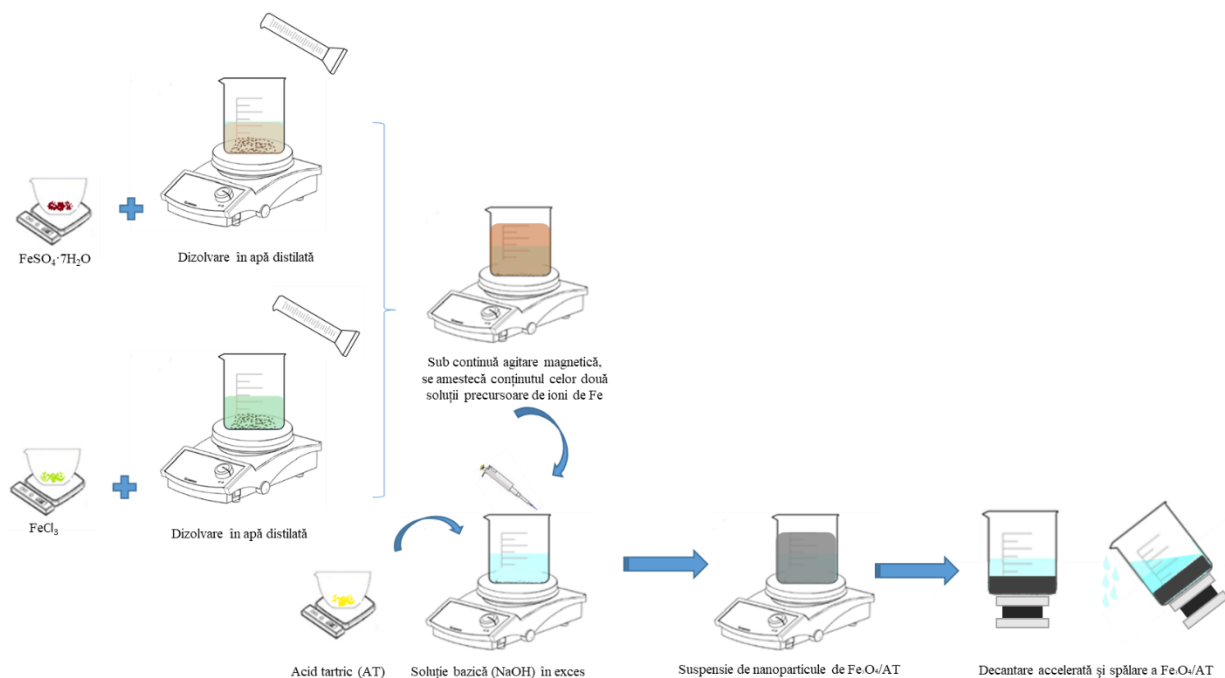


Figura 3. Schema de obținere a nanoparticulelor de Fe_3O_4 @acid tartric (Fe_3O_4 @AT)

2. Tehnici specifice de caracterizare

2.1 Difracția de raze X (XRD)

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 ($\lambda_{\text{CuK}\alpha} = 1.541874 \text{ \AA}$) 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 $10\text{-}80^\circ 2\theta$ cu pas de achiziție de 0.02° și timp de achiziție pe pas de 100s.

Cu ajutorul analizei de Difracție de raze X se poate determina compoziția mineralogică și structura cristalografică a diverselor materiale. Interacția dintre radiația X emisă de un tub catodic (radiație filtrată, colimată și direcționată) și rețeaua cristalină a probei de analizat (imobilizată pe un suport rotativ aflat în incinta difractometrului) determină difracția radiației incidente într-un mod discontinuu și propagarea radiațiilor difractate în funcție de distanța interatomică din celula elementară. Efectul de difracție caracteristic probei investigate este format prin interferarea pozitivă a difracțiilor individuale ale tuturor atomilor rețelei cristalografice, fenomen realizat în conformitate cu legea lui Bragg (aceasta din urmă stabilește o relație de proporționalitate între lungimea de undă asociată radiației

electromagnetice, distanța dintre planele reticulare și valoarea unghiului incident al radiației X, conform relației $n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$).

Analiza XRD a fost realizată în scopul caracterizării materialelor sintetizate din punctul de vedere al cristalinității acestora, precum și al fazelor componente, pentru anticiparea proprietăților corespunzătoare în cazul utilizării lor în cadrul sistemelor de eliberare controlată a medicamentelor.

2.2 Microscopia electronică de baleiaj (SEM)

În cazul sistemelor sintetizate, microscopia electronică de baleiaj s-a realizat cu scopul de a evidenția aspecte referitoare la morfologia, compoziția și topografia acestora. Achiziția de micrografii s-a realizat cu ajutorul unui microscop electronic de baleiaj de înaltă rezoluție, *Inspect F50*, la o valoare a energiei de 30KeV și diverse mărimi.

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.

Tehnica de analiză spectroscopică în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) a fost utilizată pentru investigarea naturii interacțiunilor stabilite între nanoparticulele de magnetită și compușii organici. 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. Spectrele de absorbție sau transmittanță în infraroșu reprezintă instrumente analitice utile în obținerea de informații

calitative (identificare chimică și determinare structurală) și cantitative (asocierea intensității maximelor spectrale cu cantitatea de compus) despre proba analizată.

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 tartric 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 Fe_3O_4

În urma analizei XRD și prelucrării datelor cu ajutorul programului HighScore s-a identificat ca unică fază cristalină Fe_3O_4 (magnetită) conform PDF4+ [01-085-3772], cu structură ortorombică și planele de cristalizare evidențiate în figura 4. Aspectul general al interferențelor de difracție relevă un caracter cristalin al probei și dimensiuni mici de cristalit, cu posibile aglomerări de particule.

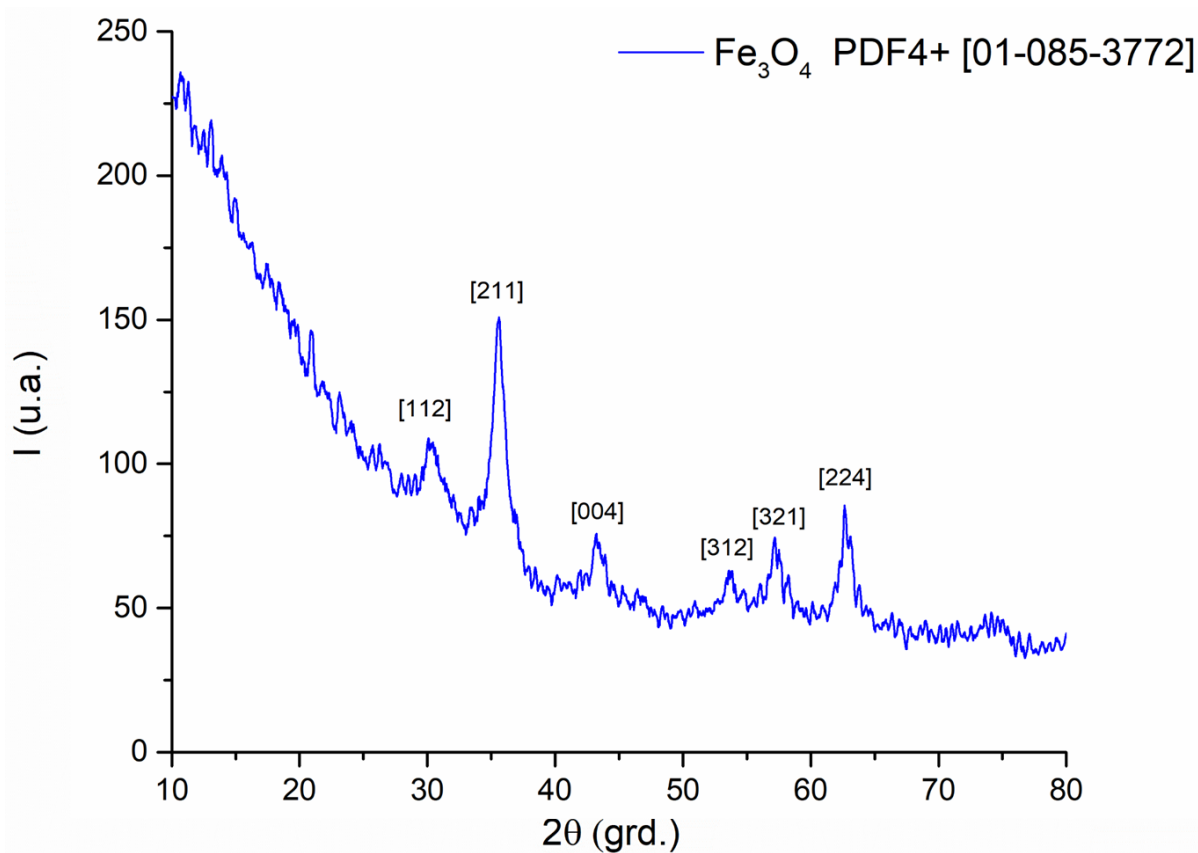


Figura 4. Diffractograma de raze X pentru pulberea de Fe_3O_4 , cu evidențierea planelor de cristalizare

Imaginile de microscopie electronică de baleiaj (SEM) prezentate în figura 5 sunt în concordanță cu informațiile rezultate din spectrul de raze X, evidențiind dimensiunea nanometrică a particulelor de magnetită obținute, cu dimensiuni cuprinse între 3-5 nm. Se poate observa cum, datorită suprafețelor specifice mari asociate dimensiunii reduse, particulele au un grad mare de aglomerare.

Dimensiunile reduse și rezoluția maximală a echipamentului fac greu de precizat forma particulelor, care pare cvasi-sferică. Pentru o caracterizare morfologică amănunțită în vederea stabilirii dimensiunii medii de particulă și forma acestora, s-a recurs la o tehnică mai avansată de caracterizare microscopică, microscopia electronică prin transmisie (TEM).

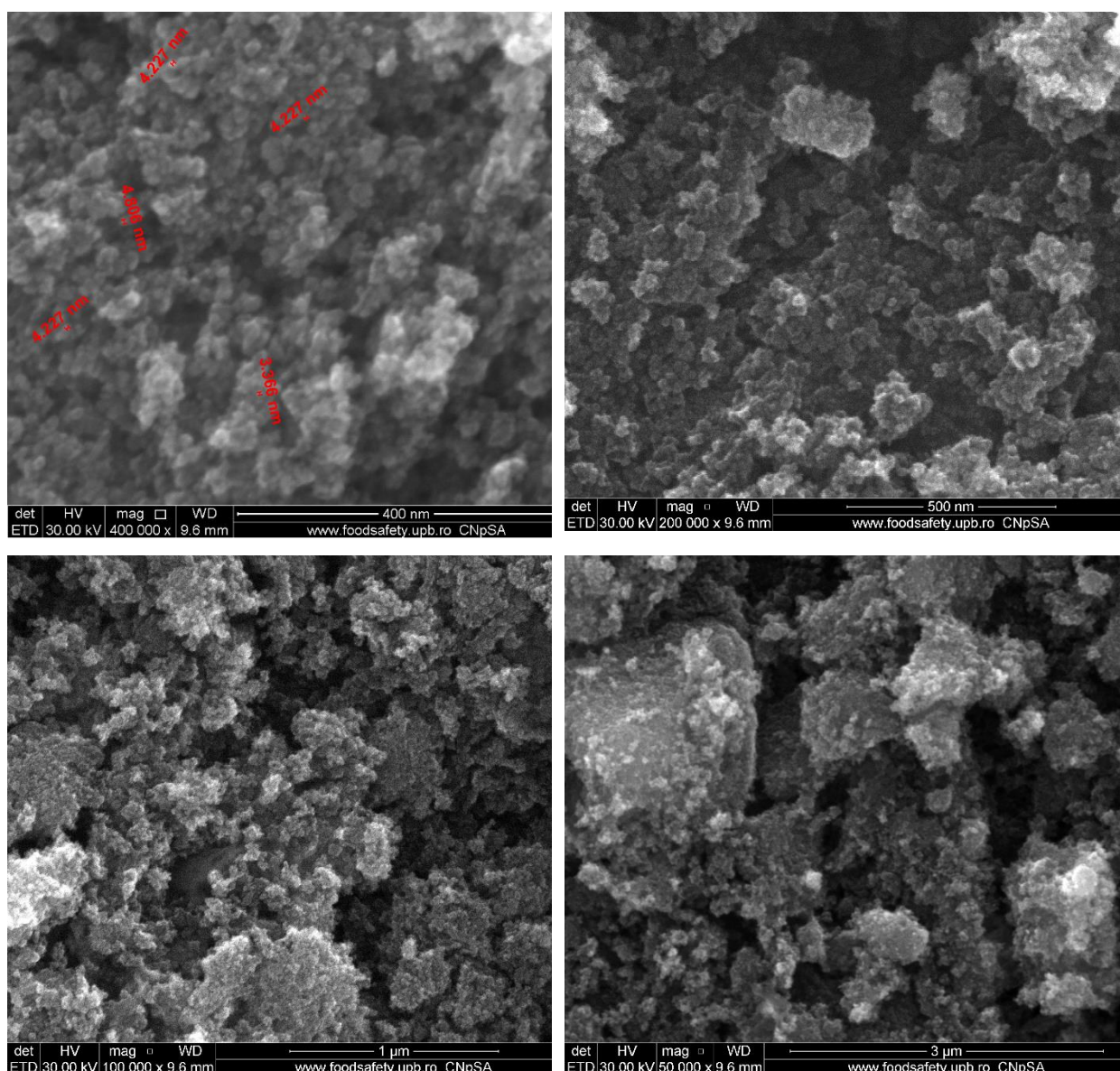


Figura 5. Micrografii SEM pentru pulberea de Fe₃O₄

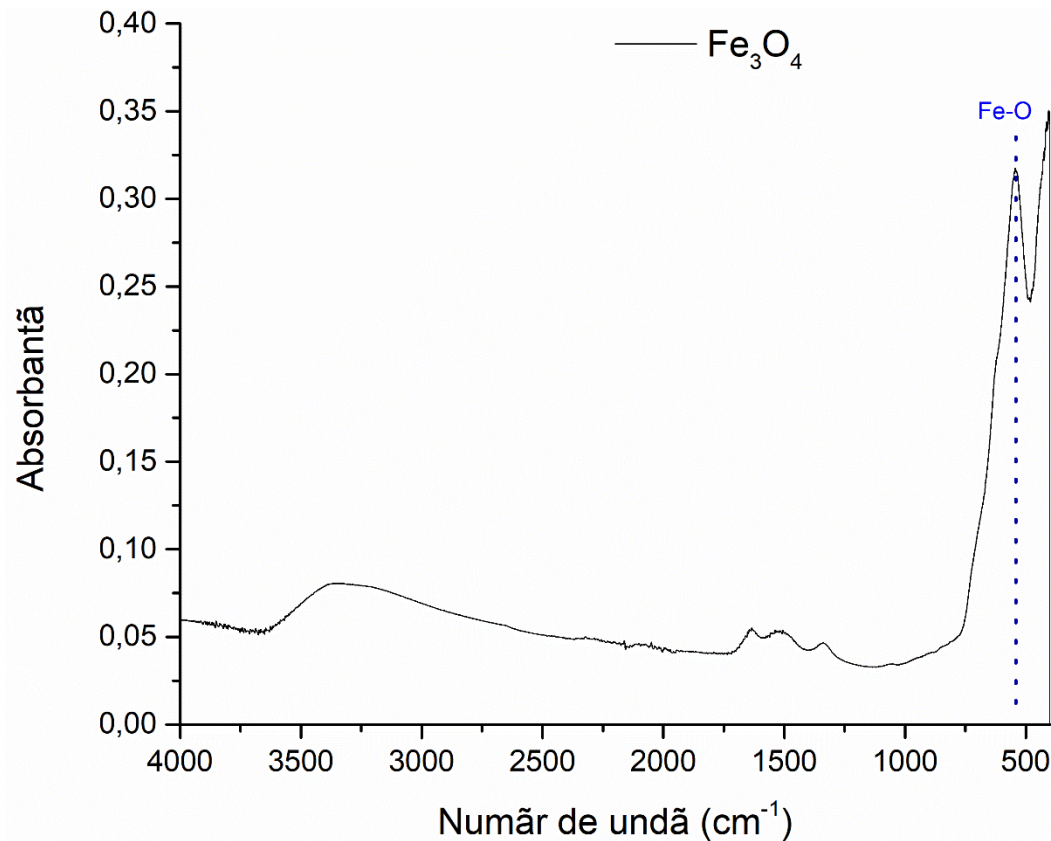


Figura 6. Spectrul FT-IR pentru pulberea de Fe_3O_4

Din spectrul FT-IR prezentat în figura 6 se remarcă banda de vibrație de la 582 cm^{-1} specifică legăturii $Fe^{2+}-O^{2-}$ atribuită magnetitei. Banda largă de la $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ poate fi atribuită grupărilor $-OH$ corespunzătoare apei posibil adsorbită pe suprafața particulelor de magnetită.

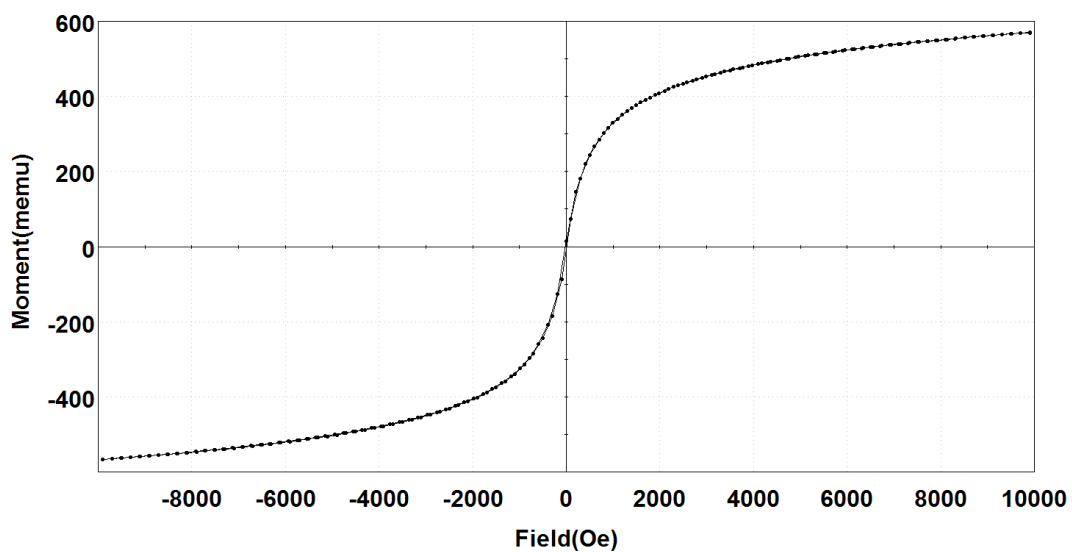


Figura 7. Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe_3O_4 la temperatura de $25^\circ C$

Curba de magnetizare înregistrată la temperatura camerei a particulelor de magnetită neacoperită este prezentată în figura 7. Proba nu prezintă histerezis, indicând astfel natura superparamagnetică a particulelor. Valoarea magnetizării de saturație a fost 59 emu/g pentru nanoparticulele de magnetită, fiind, prin urmare, ușor de separat, cu ajutorul unui magnet, din amestecul de reacție, simplificând astfel protocolul de curățare. Magnetizarea de saturație mare poate conferi, de asemenea, proprietăți de ecranare electromagnetică acoperirilor hibride utilizate în anumite aplicații.

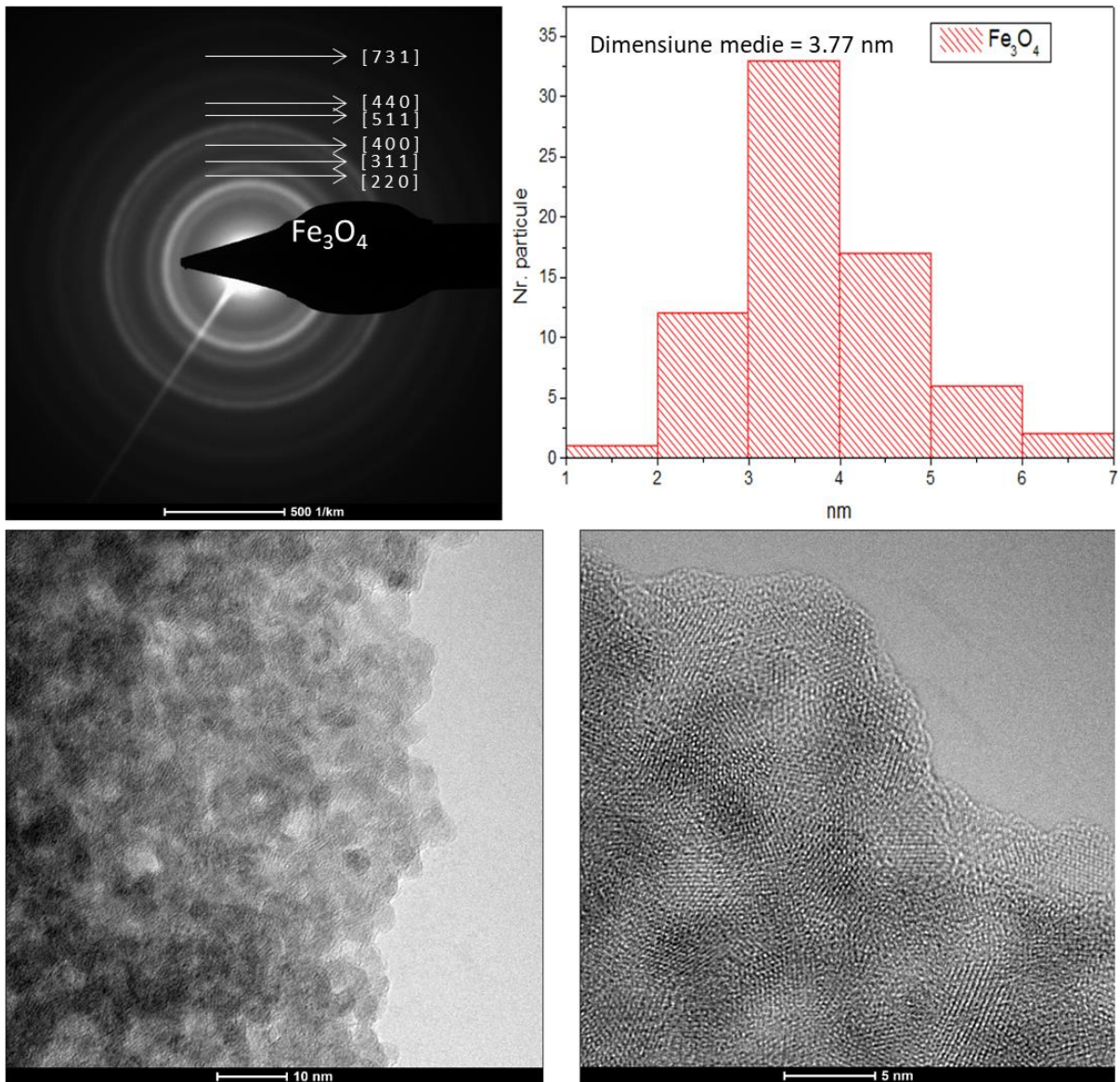


Figura 8. Imagine TEM în câmp luminos, de înaltă rezoluție, difracție de electroni pe arie selectată și distribuție după dimensiune obținute pe proba de Fe₃O₄

În Figura 8 sunt prezentate rezultatele obținute prin microscopia electronică prin transmisie. Din imaginea de microscopie electronică prin transmisie de ansamblu se poate

observa tendința de aglomerare a nanoparticulelor. Morfologia este cvasi-sferică și poliedrală, cu dimensiunea medie de particulă de 3,77 nm și o distribuție monomodală, așa cum demonstrează histograma prezentată 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.

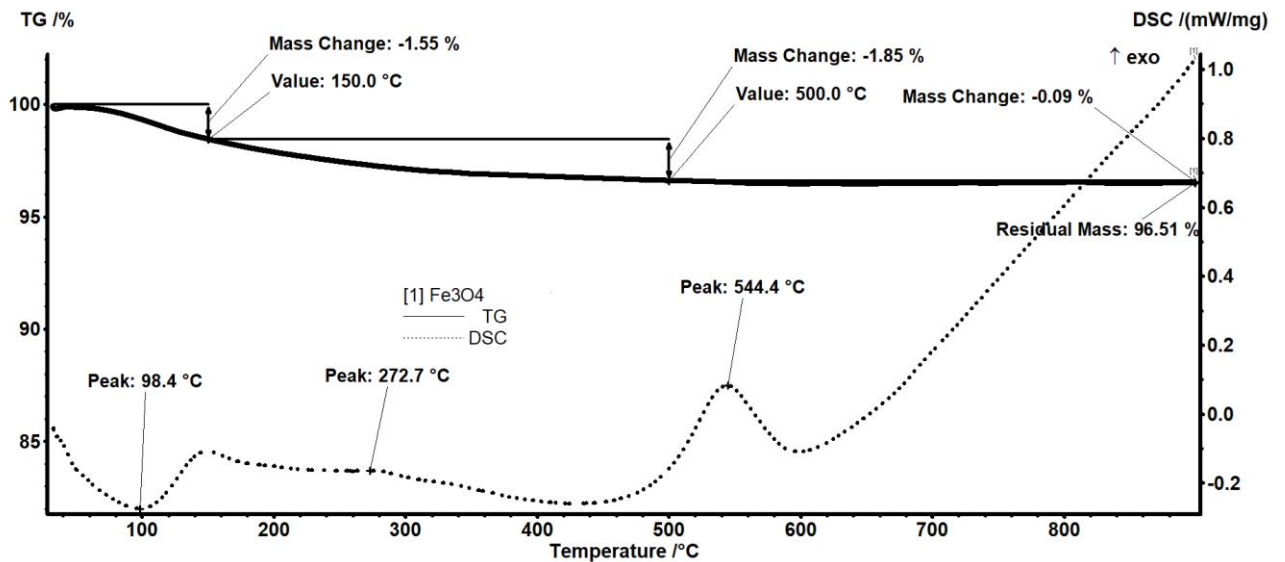


Figura 9. Analiza termică complexă efectuată pe pulberea de Fe_3O_4 (TG/DSC)

Conform analizei termice efectuată pe pulberea de Fe_3O_4 (TG/DSC) și prezentată în figura 9 se poate observa o pierdere de masă inițială de 1,55% datorată eliminării apei adsorbite pe suprafața particulelor, asociată unui efect endoterm în jurul temperaturii de 100 °C. La temperaturi < 400°C au loc eliminări de reziduuri și precursori nereacționați, cu o pierdere de masă totală de 1,85%. În intervalul de temperatură supus analizei se pot observa și cele 2 transformări de fază specifice Fe_3O_4 , magnetită în maghemită (la 330 °C), respectiv maghemită în hematit (la 544 °C). După temperatura de aprox. 500 °C pierderea de masă este subunitară și se poate considera masa constantă.

3.2 Caracterizarea pulberii de Fe_3O_4 @acid tartric

În figura 10 sunt prezentate spectrele de difracție de raze X ale probelor de Fe_3O_4 și Fe_3O_4 @acid tartric. 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, este semnificativ modificată (se remarcă o scădere), ca urmare a existenței compusului organic pe

suprafața nanoparticulelor de magnetită. Prezența acidului tartric se identifică prin cele 2 interferențe de difracție caracteristice la 2θ de 31 și 46 (conform PDF4+[00-031-1911]).

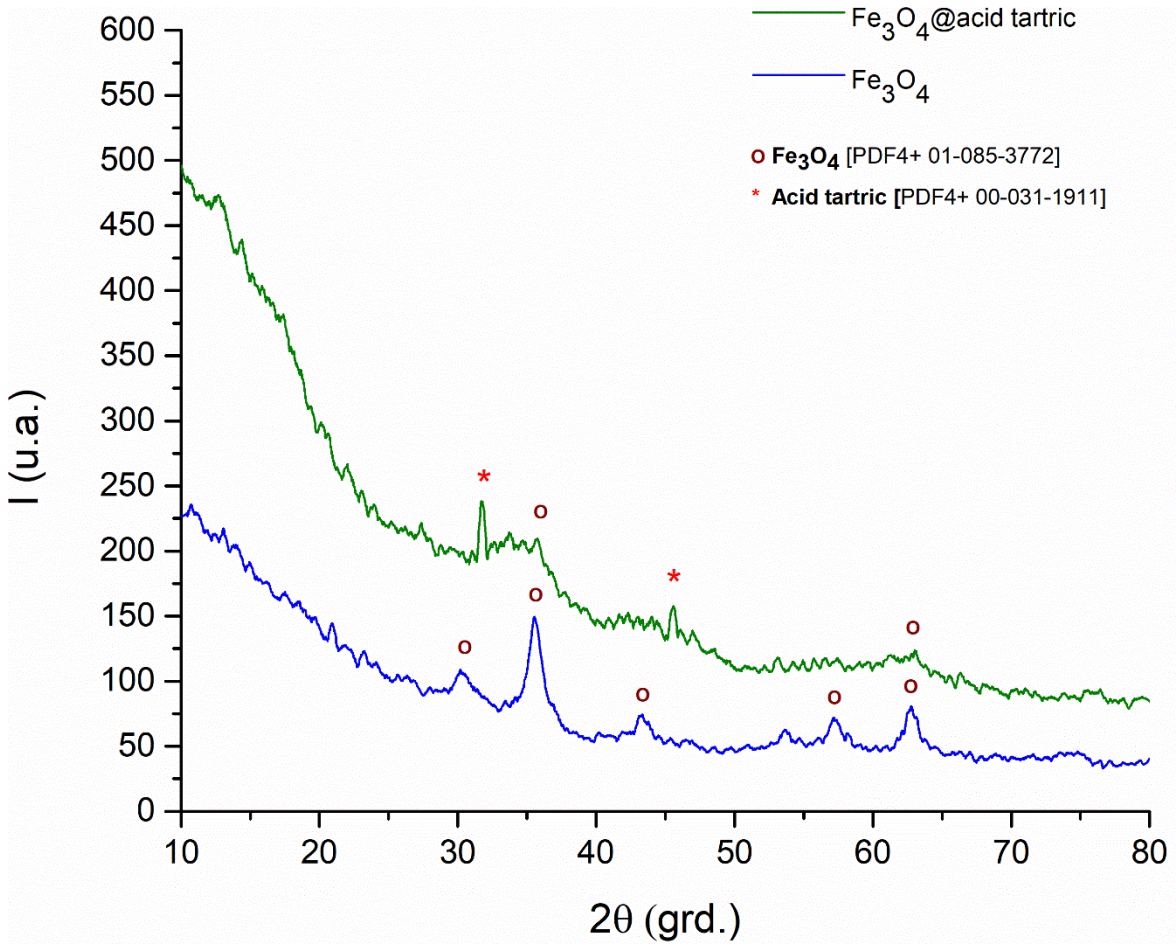
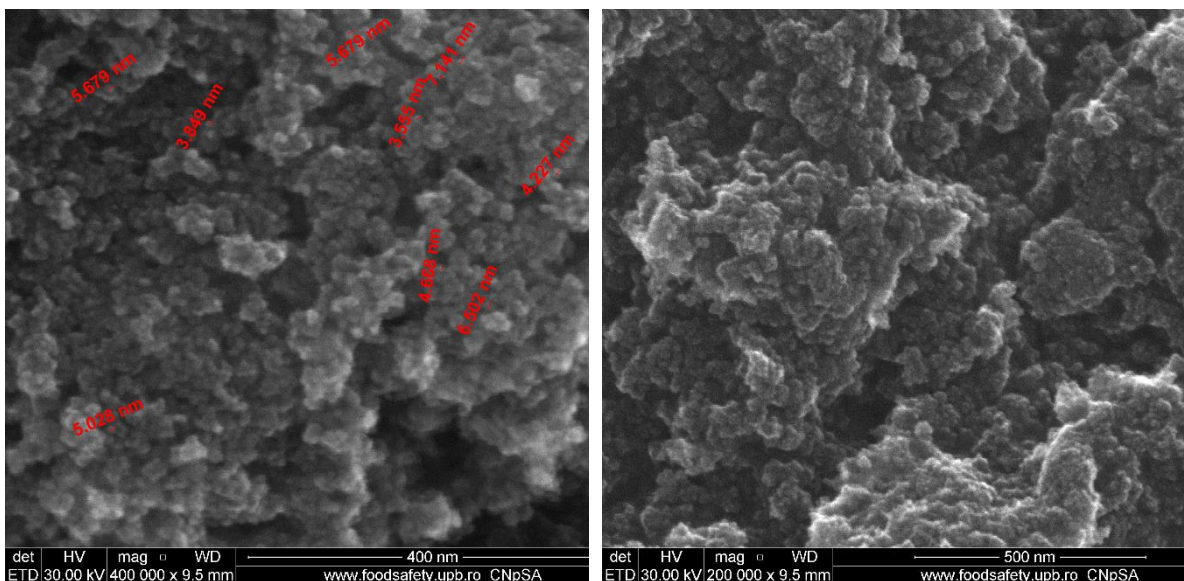


Figura 10. Difractograma de raze X pentru pulberea de Fe_3O_4 @acid tartric și evidențierea diferențelor față de Fe_3O_4



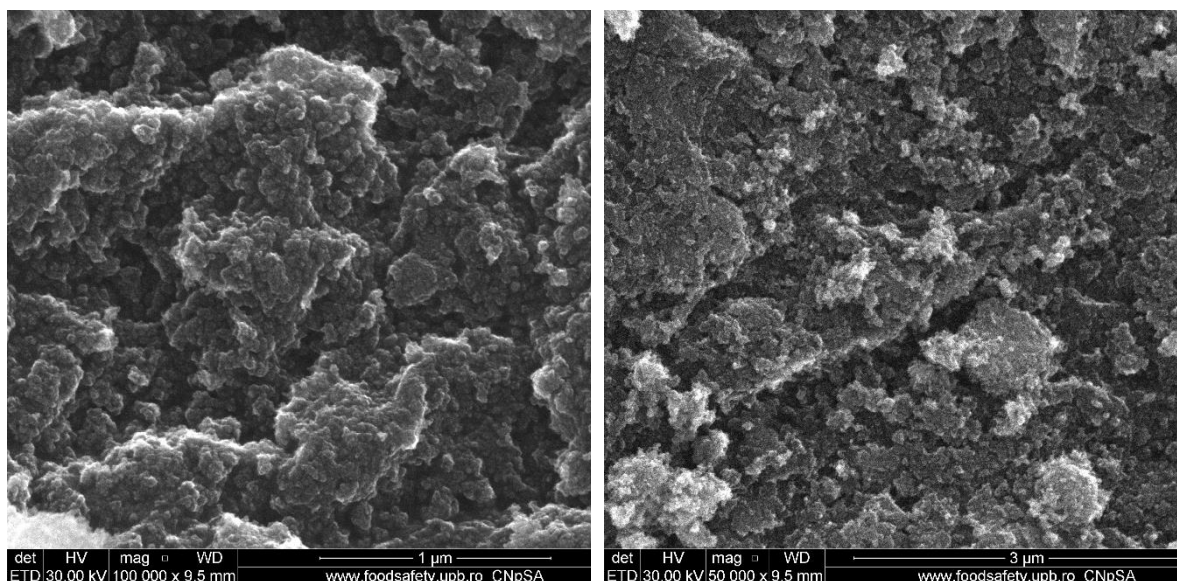


Figura 11. Micrografii SEM pentru pulberea de Fe_3O_4 @acid tartric

Microscopia electronică de baleiaj, evidențiată în figura 11, pune în evidență dimensiunea nanometrică a magnetitei ce conține compusul organic, dispusă sub formă de aglomerări datorită necesității reducerii energiei libere a suprafeței particulelor, prin conglomerări ale acestora cu suprafață redusă. Ca și în cazul magnetitei pure, dat fiind spectrul dimensional aferent, sunt necesare investigații suplimentare cu ajutorul microscopiei electronice prin transmisie.

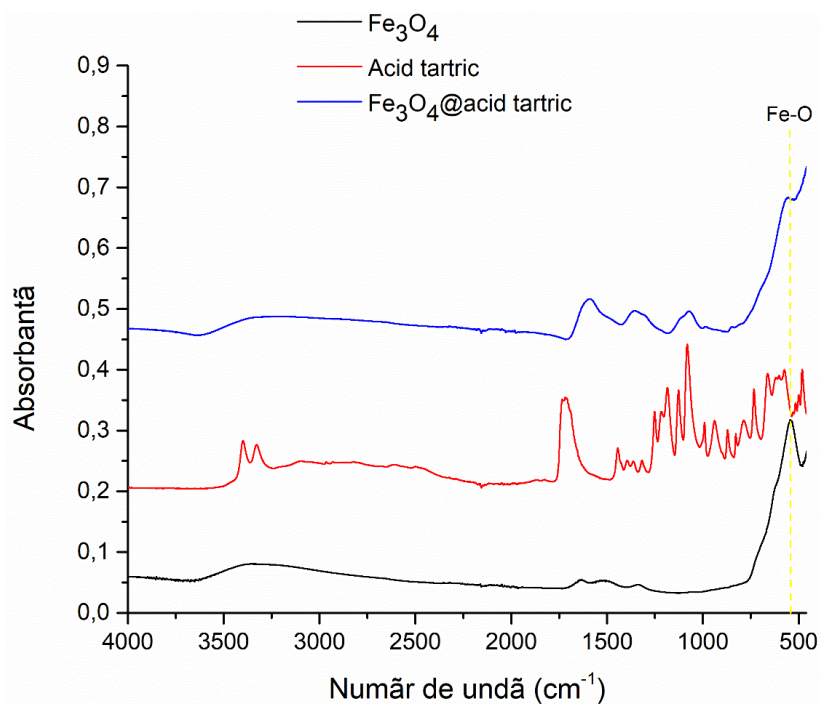


Figura 12. Spectrul FT-IR pentru proba de Fe_3O_4 @acid tartric

În figura 12 sunt prezentate transformatele Fourier ale spectrelor de infraroșu pentru magnetită, compusul organic vizat și magnetita acoperită. Se poate observa că în spectrul celei din urmă sunt prezente atât benzile de absorbție de la 582 cm^{-1} specifice legăturii $\text{Fe}^{2+}-\text{O}^{2-}$ cât și absorbții în zona $1000-1750\text{ cm}^{-1}$ corelate cu legăturile interatomice $-\text{OH}$ din gruparea funcțională $-\text{COOH}$, $\text{C}=\text{O}$ respectiv $\text{C}-\text{O}$, specifice acidului tartric.

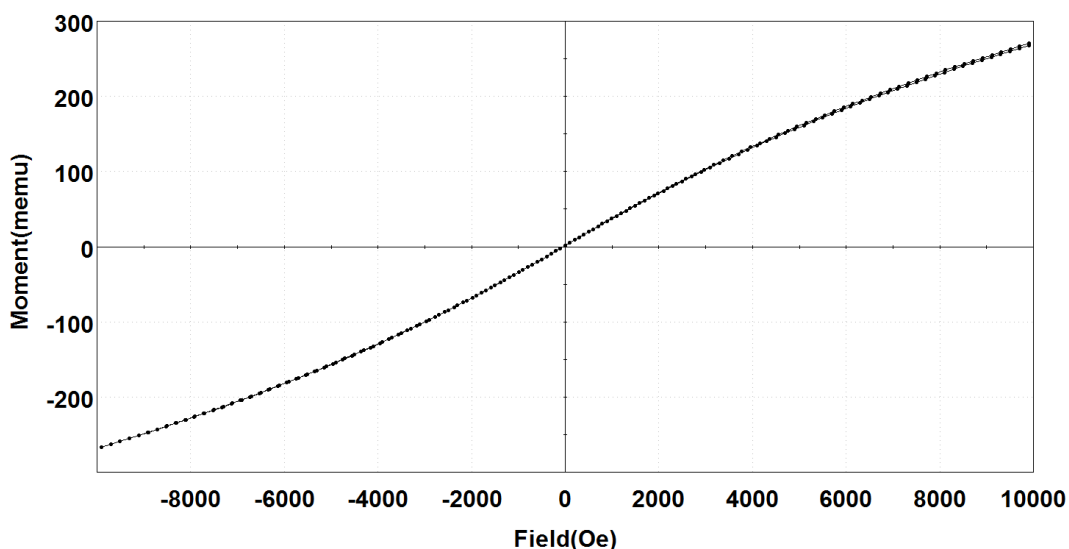


Figura 13. Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe_3O_4 @acid tartric la temperatura de 25°C

Variația magnetizării în funcție de câmpul magnetic aplicat pentru nanoparticulele de Fe_3O_4 @acid tartric la temperatura de 25°C este prezentată în Figura 13. Magnetita acoperită prezintă un caracter superparamagnetic, ce o recomandă pentru aplicații biomedicale. Proba analizată are o magnetizație de saturație de $26,3\text{ emu/g}$, cu $55,4\%$ mai mică decât în cazul magnetitei simple. Această scădere este datorată prezenței materialului de acoperire, implicit a creșterii masei odată cu adăugarea unui al doilea component, lipsit de proprietăți magnetice. Această valoare depășește însă valoarea de 10 emu/g suficientă pentru ca nanoparticulele magnetice să poată fi utilizate ca sisteme cu eliberare controlată.

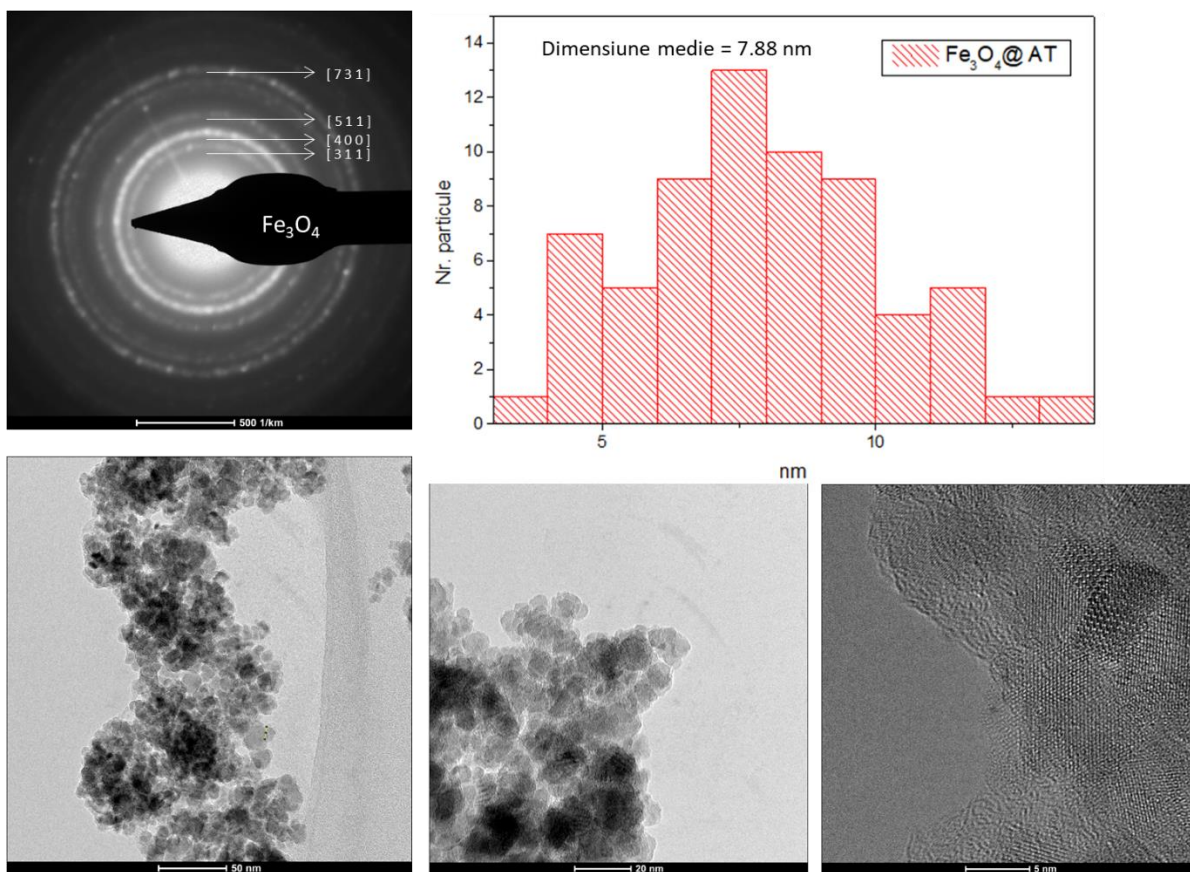


Figura 14. . *Imagine TEM în câmp luminos, difracție de electroni pe arie selectată și distribuție după dimensiune obținute pe proba de $Fe_3O_4@Acid\ tartric$*

Analizele de microscopie electronică prin transmisie prezente în figura 14, realizate pe magnetita acoperită cu acid tartric, pun în evidență reducerea aglomerărilor de magnetită împreună cu creșterea dimensiunii medii ale particulelor de magnetită. Aceste efecte se datorează acoperirii cu acid tartric a particulelor de magnetită care compensează energia liberă a suprafeței celor din urmă.

Din difracția de electroni pe arie selectată se observă inelele de difracție specifice magnetitei (compusul organic este ars în fasciculul de 300 kV, prezența acestuia neputând fi pusă în evidență prin această tehnică).

De altfel, se observă o lărgire a domeniului dimensional al particulelor de magnetită, dimensiunile particulelor variind între 3-15 nm, față de magnetita neacoperită care a relevat prin observație o limită dimensională superioară de 7 nm. Acest fapt se poate explica prin prezența în mediul sintezei a acidului tartric, care pe de o parte, modifică subtil pH-ul reacției de formare a Fe_3O_4 și pe de alta, modifică tensiunea superficială a soluției ce conduce la o morfologie și dimensionalitate particulară variată.

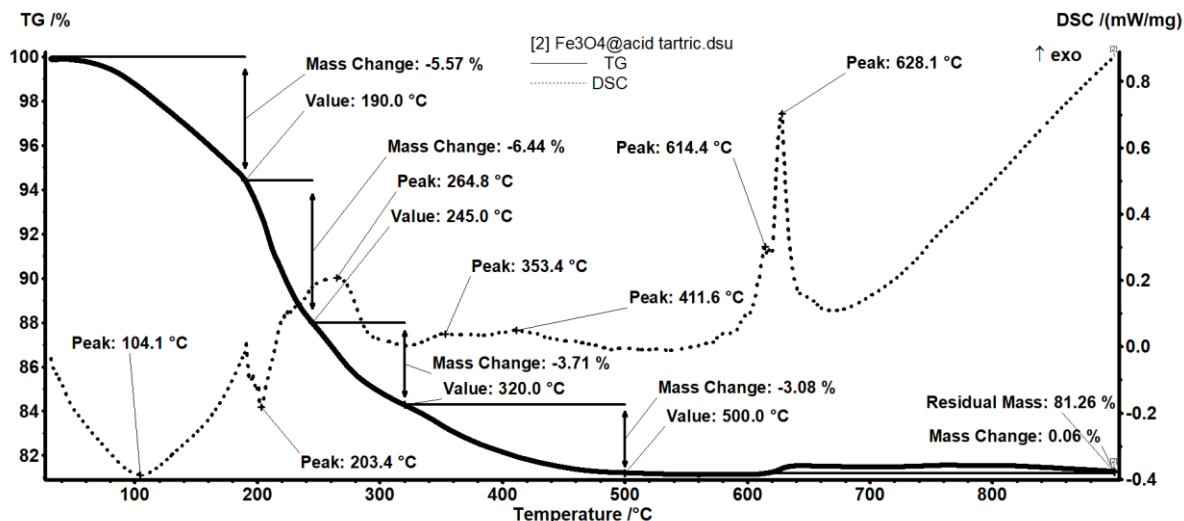


Figura 15. Analiza termică complexă (TG/DSC) obținută pe proba de Fe_3O_4 @Acid tartric

În intervalul 30-190°C are loc prima pierdere de masă (5,57%), însoțită de un efect endoterm cu minimumul la 104,1°C. Pierderea de masă este cauzată de eliminarea apei din probă și eventual, a unor grupări -OH de pe suprafața nanoparticulelor. Întrucât magnetita are pe suprafața sa un strat de acid tartric este posibil să rețină mai multă apă comparativ cu proba de magnetită simplă. Pierderea unei cantități mai mari de apă duce și la modificarea temperaturii la care apare peakul endoterm. În intervalul 190-245°C se înregistrează o pierdere de masă de 6,44%, însoțită de un efect endoterm cu minimumul la 203,4°C. Astfel pierderea de masă înregistrată este o descompunere, cel mai probabil a acidului tartric (în funcție de forma acidului tartric punctul de topire este situat între 140-206°C). Pierderea de masă este continuă în intervalul 245-320°C (3,71%) procesul fiind însoțit de un efect slab exoterm cu maximumul la 264,8°C.

Degradarea oxidativă a reziduuului organic continuă în intervalul 320-500°C, cu o pierdere de masă de 3,08% și efecte slabe exoterme la 353 și 411°C. Se observă apoi o mică creștere de masă între 620-640°C. În urma degradării substanței organice se produce și un reziduu carbonic, care reduce parțial fierul de la suprafața nanoparticulelor. Apoi, după îndepărtarea carbonului, fierul este oxidat la loc la Fe_2O_3 și asta duce la creșterea de masă observată. Pe lângă acest proces exoterm se mai înregistrează și transformarea de fază a maghemitei în hematit. Cele două efecte sunt parțial suprapuse cu maxime la 614 și 628°C. Masa reziduală este 81,26%, de culoare negru-marونیu. Din calcule încărcarea magnetitei cu acid tartric este 15,81%.

4. Concluzii și perspective

Studiul va fi completat prin sinteza și caracterizarea unor sisteme de tipul Fe_3O_4 @acid tartric – Citostatic hidrofil, utilizate ca sistem de eliberare în terapia cancerului. În vederea obținerii unor sisteme eficiente pentru terapia cancerului, este necesară o acoperire suplimentară a structurilor miez-înveliș cu un citostatic (ex. irinotecan, doxorubicină). Pentru un control îmbunătățit al stabilității și penetrabilității membranare ale acestor nanostructuri, polietilenglicol (PEG) cu diferite grade de policondensare va fi folosit alături de citostaticele alese pentru adsorbția pe structura magnetică. Încărcarea cu citostatic hidrofil a nanostructurilor magnetice va fi evaluată prin spectroscopie FTIR și microscopie electronică prin transmisie, iar difracția de raze X împreună cu microscopia electronică prin transmisie vor fi utilizate pentru caracterizarea cristalinității, dimensiunilor și distribuției particulelor. Proprietățile magnetice vor fi evaluate utilizând VSM la temperatură controlată.