

Raport științific de etapă
Septembrie – Decembrie 2020
ID Proiect: PN-III-P1-1.1-PD-2019-0804

Evaluarea in vitro a nanoparticulelor de ferită ca noi agenți de hipertermie magnetică

Primul obiectiv al proiectului mai sus menționat îl reprezintă elaborarea de nanoparticule magnetice (NPMag) de magnetită dopate cu ioni ai metalelor de tranziție – denumite ferite – prin intermediul metodei de sinteză poliolică în condiții de temperatură (peste punctul de fierbere al solventului) și presiune ridicată. În realizarea acestui obiectiv am abordat două strategii diferite:

1. *Doparea NPMag de magnetită cu morfologie poliedrică cu ioni de zinc, mangan și cobalt:* Punctul de plecare al proiectului îl constituie un studiu al meu apărut anul acesta în revista *Pharmaceutics*¹, în care am arătat că NPMag poliedrice prezintă proprietăți hipertermice excepționale (SAR superior la 2000 W/g_{Fe}) și o biocompatibilitate ridicată în intervalul de concentrații utilizat (50 – 1000 μg_{NPMag}/mL). De asemenea potențialul acestora de a fi utilizate în hipertermie malignă a fost demonstrat, expunerea la un câmp magnetic alternativ a celulelor canceroase încărcate cu NPMag ducând la moartea celulară a acestora prin creșterea temperaturii (≈50°C). Totuși NPMag poliedrice sunt eficiente din punct de vedere hipertermic începând cu H = 45 kA/m, ceea ce presupune un factor H x f de 16 x 10⁹ A/ms, cu mult peste limita admisă (5 x 10⁹ A/ms). Se impune astfel, o reducere a caracterului feromagnetic al NPMag și o creștere a magnetizării de saturație (M_s). Din acest punct de vedere am demarat studiul cu doparea magnetitei cu ioni de zinc, deoarece acesta migrează în siturile tetraedrice ale magnetitei ducând la creșterea M_s². În elaborarea de NPMag dopate cu zinc, am demarat de la următoarea formulă – un amestec de: 1 mmol de FeCl₃ 6H₂O ~ 270 mg + 2,4 g de NaAc + x (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 și 1,0) mmol de ZnCl₂, a fost dizolvat în 40 mL de PEG200. Amestecul de reacție a fost introdus în cuptor și încălzit treptat, conform schemei următoare: Temp. camerei (25°C) $\xrightarrow[3^{\circ}\text{C}/\text{min}]{90\text{ min}}$ 300°C (staționare 1h). Pentru a simplifica prezentarea rezultatelor am notat NPMag dopate cu zinc în diferite proporții astfel: Zn01, Zn02, Zn04, Zn06, Zn08 și Zn10. Totodată, am decis să menținem în amestecul de reacție 1 mmol de FeCl₃ și să modificăm cantitatea de ZnCl₂ în ideea de a păstra morfologia poliedrică a NPMag. Din păcate, acest lucru nu s-a întâmplat. Conform fig. 1a, prin creșterea cantității de ZnCl₂ de la 0,1 mmol la 1,0 mmol, dimensiunea medie a NPMag scade ceea ce implică o modificare a morfologiei acestora din poliedrică spre cvasi-sferică. NPMag denumite Zn01 – adică sintetizate cu un adaos de 0,1 mmol ZnCl₂ – prezintă încă o formă poliedrică. Odată cu utilizarea a 0,2 mmol de ZnCl₂ în amestecul de reacție, NPMag rezultate nu mai prezintă o morfologie poliedrică foarte bine definită, printre acestea regăsindu-se și NPMag cu o morfologie cvasi-sferică; iar dimensiunea acestora scade (fig. 1b). Procentul de NPMag cu o morfologie cvasi-sferică crește cu dublarea cantității de zinc în amestecul de reacție la 0,4 mmol. NPMag denumite Zn04 au o dimensiune medie vizibil mai mică decât cele din lotul Zn02 (fig. 1c). Creșterea cantității ZnCl₂ peste 0,4 mmoli în amestecul de reacție nu modifică în continuare morfologia NPMag, această rămânând cvasi-sferică cu aproximativ aceeași dimensiune medie (fig. 1d și 1e). NPMag din lotul Zn10, care s-au sintetizat cu un raport molar Fe:Zn de 1:1, au o morfologie sferică și un diametru mediu în jur de 15 nm (fig. 1f). Remarcăm faptul că toate cele șase tipuri de NPMag prezintă un grad de aglomerare ridicat și astfel este foarte greu de realizat o statistică reală. Ultima proba (lotul Zn10 – fig. 1f) arată că NPMag sunt prinse prin intermediul PEG200.

În fig. 1g sunt redată spectrele FT-IR, înregistrate pe cele șapte probe din care prima este magnetită. Se poate observa banda de absorbție datorată vibrației legăturii Fe–O al sitului tetraedric, pentru magnetită această bandă fiind prezentă la 575 cm⁻¹. Cu excepția probei Zn01, pentru toate celelalte 5 probe, se constată că, banda de vibrație se deplasează spre numere de undă mai mici. Această deplasare este progresivă – crescând cantitatea de ZnCl₂ utilizată în amestecul de reacție are loc deplasarea benzii înspre valori mai mici. Conform studiilor din literatură deplasarea acestei benzi spre numere de undă mai mici este o indicație a faptului că zincul este prezent în structura cristalină a NPMag³. Mai mult decât atât, scăderea frecvenței acestei benzi de absorbție, înseamnă o creștere a masei cationilor localizați în siturile tetraedrice (A). Acest lucru este posibil numai prin înlocuirea atomilor de fier din siturile A (55,85 amu) cu atomi de zinc mai grei (65,38 amu)⁴. Cu alte cuvinte ionii de zinc, în urma sintezei, se situează în siturile A, forțând ionii Fe³⁺ să migreze în siturile octaedrice (B) înlocuind cationii Fe²⁺. În plus, se poate observa faptul că în intervalul numerelor de undă 750-1250 cm⁻¹ al spectrelor FT-IR, apar benzi de absorbție atribuite PEG200 (a se compara cu spectrul mov din partea superioară a figurii 4b) – ce mai intensă bandă, cea de la 1085 cm⁻¹ fiind atribuită vibrației de stretching a legăturii C–O–C⁵.

¹ Iacovita C., Fizezan, I. et al. In vitro Intracellular Hyperthermia of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles, Synthesized at High Temperature by a Polyol Process, *Pharmaceutics* 2020, 12,424, 1-25.

² Yang, Y. et al. Synthesis of nonstoichiometric zinc ferrite nanoparticles with extraordinary room temperature magnetism and their diverse applications. *J. Mater. Chem. C*, 2013, 1, 2875-2885.

³ Iacovita, C. et al. Quantitative Analysis of the Specific Absorption Rate Dependence on the Magnetic Field Strength in Zn_xFe_{3-x}O₄ Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 7775.

⁴ Modaresi, N. et al. Magnetic properties of Zn_xFe_{3-x}O₄ nanoparticles: A competition between the effects of size and Zn doping level. *J. Magn. Magn. Mater.* 2019, 482, 206–218.

⁵ Xie, J. et al. Controlled PEGylation of monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles for reduced non-specific uptake by macrophage cells. *Adv. Mater.* 2007, 19, 3163–3166.

Anumite benzi de vibrație ale PEG200 atașat de suprafața NPMag se pot observa și jurul a 3000 cm^{-1} . Banda de absorbție din jurul a 3500 cm^{-1} este datorată grupărilor OH, care pot proveni de la oxidarea PEG-ului (în calitate de derivat al etilen glicolului) în urma sintezei.

În fig. 1h este reprezentată evoluția ratei de absorbție specifică (SAR) a trei tipuri de NPMag dopate cu zinc (Zn01, Zn02 și Zn04) în funcție de amplitudinea câmpului magnetic alternativ aplicat (H) la o frecvență fixă de 355 kHz ⁶. SAR-ul a fost determinat pentru o concentrație a NPMag dispersate în apă de $1\text{ mg}_{\text{Fe}}/\text{mL}$. Concentrație ionilor de Fe^{3+} din NPMag a fost determinată prin intermediul reacției Liebig (vezi ref. 1). SAR-ul a fost calculat pe baza fitării curbilor de încălzire (nu sunt reprezentate) cu funcția Box-Lucas (vezi ref. 1). În cazul lotului Zn01, SAR-ul prezintă cele mai mari valori față de celelalte două loturi (fig. 1h). SAR-ul crește proporțional cu H până la valori ale acestuia de 45 kA/m , după care apare o tendință de saturare spre $450\text{ W/g}_{\text{Fe}}$ la câmpuri mai mari. Această evoluție este apropiată de cea sigmoidală caracteristică NPMag de tip feromagnetic. Valorile SAR-ului furnizate de NPMag din lotul al doilea (Zn02) pentru $H = 5$ și 10 kA/m sunt identice cu cele din lotul 1 (Zn01) dar scad semnificativ începând cu $H = 15\text{ kA/m}$. Diferența dintre SAR-uri crește pe măsură ce H crește – valorile maxime ale SAR-ului fiind de aproximativ $200\text{ W/g}_{\text{Fe}}$. Evoluția SAR-ului cu H este una monotonă și nu aparține nici unei categorii de NPMag - feromagnetice (sigmoidală) sau superparamagnetice (hiperbolică). În cazul NPMag din lotul al treilea (Zn04), se înregistrează o scădere mai pronunțată a SAR-ului. Evoluția SAR-ului cu H este tot una monotonă spre valori maxime de $100\text{ W/g}_{\text{Fe}}$. Constantăm faptul că valorile SAR-ului pentru NPMag dopate cu zinc sunt cu mult inferioare față de cele înregistrate pentru magnetită (ref. 1) – acest lucru se poate datora faptului că morfologia poliedrică se pierde prin dopare, pierdere care duce la o diminuare a magnetizării de saturație și anizotropiei magneto-cristaline. Prin urmare metoda de sinteză trebuie îmbunătățită. Se are în vedere și doparea cu mangan sau cobalt.

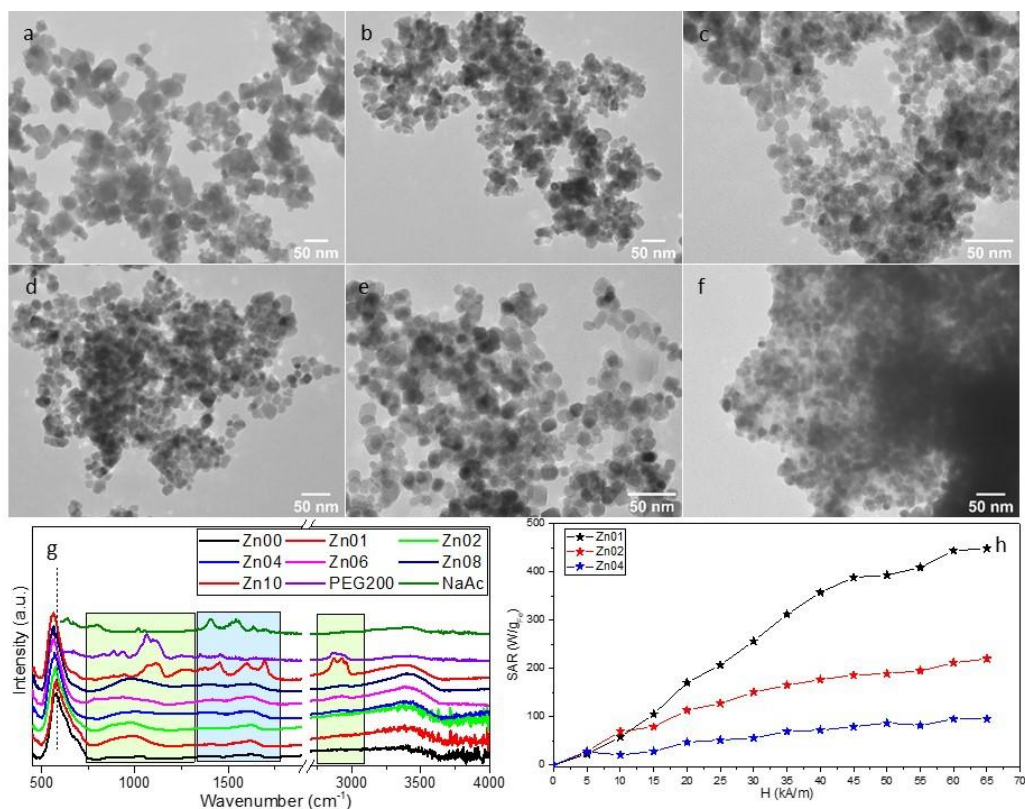


Figura 1. Imagini TEM ale NPMag dopate cu zinc în diferite proporții: a) 9:1 – Zn01, b) 5:1 – Zn02, c) 2,5:1 – Zn04, d) 1,6:1 – Zn06, e) 1,25:1 – Zn08 și f) 1:1 – Zn10. g) Spectrele FT-IR înregistrate pe NPMag dopate cu zinc. Spectrele sunt normalizate la banda de vibrație cea mai intensă și sunt deplasate vertical pentru claritate. Dreptunghiurile galbene și albastre delimitează zone cu benzi de vibrație aparținând PEG-ului și respectiv acetatului. Linia neagră punctată scoate în evidență deplasarea benzii de vibrație Fe-O spre numere de undă mai mici. h) Evoluția SAR-ului în funcție de H ($f = 355\text{ kHz}$) pentru trei loturi de NPMag dopate cu zinc.

2. Elaborare de NPMag de oxid de fier dopate cu zinc, mangan și cobalt în tetraetilenglicol cu precursori magnetice bazați pe compuși ai acetilacetonalului: Din punct de vedere a structurii moleculare nu există o diferență între polietilenglicol 200 și tetraetilenglicol (TEG). Totuși cel din urmă are un punct de

⁶ Iacovita, C. et al. Polyethylene glycol-mediated synthesis of cubic iron oxide nanoparticles with high heating power, Nanoscale Res. Lett., 2015, 10, 1–16.

fierbere mai înalt față de PEG200 (240°C) și anume 325°C, ceea ce conferă metodei de sinteză – realizată la 300°C – o stabilitate ridicată. Astfel, am elaborat o serie de NPMag prin intermediul metodei de sinteză poliolică prezentată mai sus dar utilizând de data aceasta în calitate de precursori magnetici compuși ai acetilacetonatului de fier, zinc, mangan și cobalt. Totodată am păstrat în amestecul de reacție o anumită cantitate

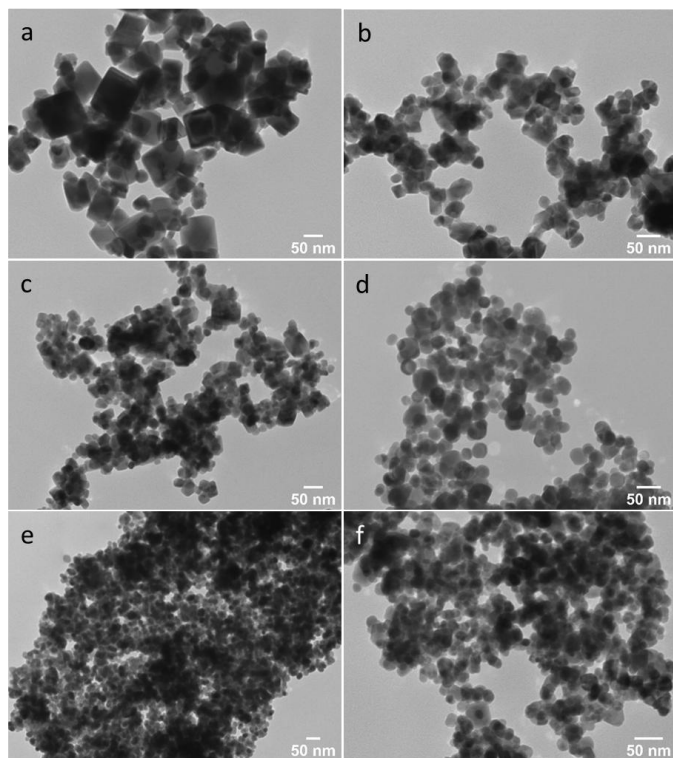


Figura 2. Imagini TEM ale NPMag de: a) magnetite pură și dopate cu zinc în diferite proporții: b) 7:1, c) 5:1, d) 3:1 e) 1:1 și cobalt în proporție de f) 3:1.

de acetat de sodiu (NaAc). În primă fază am sintetizat NPMag de magnetită plecând de la 2 mmol de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ și 1,4 g de NaAc dizolvați în 40 mL de TEG. Conform fig. 2a se formează NPMag fațetate cu o morfologie cubică. Se constată formarea a două populații de NPMag, prima cu dimensiuni peste 50 nm, iar a doua având o dimensiune mai mică. Trebuie să specificăm faptul că fără NaAc în amestec, se formează NPMag cu o morfologie sferică. Așadar acetatul joacă un rol important în fațetarea NPMag prin atașarea de seed-uri (semințe) în procesul de creștere, direcționând dezvoltarea cristalului în anumite direcții cristaline. Pornind de la acest lot de NPMag am continuat cu doparea acestora cu zinc, mangan și cobalt. În fig. 2b sunt prezentate NPMag realizate cu un raport molar Fe:Zn de 7:1 (cantitatea totală de 2 mmol a fost păstrată). Se observă faptul că NPMag își păstrează morfologia cubică (poliedrală) dar prezintă o dimensiune medie mai mică. Aceasta scade mai mult odată cu creșterea cantității de acetilacetonat de zinc în amestecul de reacție (raport molar Fe:Zn de 5:1), unele din NPMag

apărând sferice (fig. 2c). Procesul de NPMag sferice crește considerabil pentru un raport molar Fe:Zn de 3:1 (fig. 2d), dar cu o dimensiune medie mai mare decât în cazul precedent. Morfologia sferică și dimensiunea medie se păstrează dacă în amestecul de reacție se pune acetilacetonat de cobalt (fig. 2f) sau mangan în loc de acetilacetonat de zinc. Precizăm că același tip de NPMag se obține și cu introducerea în amestec a clorurii de cobalt. Pentru un raport molar Fe:Zn de 1:1, NPMag formate au o dimensiune mică (în jur de 10 nm) și sunt aglomerate (fig. 2e). În toate loturile prezentate în fig. 2 se constată faptul că NPMag sunt oarecum prinse între ele prin intermediul TEG-ului. Nu excludem și anumite interacțiuni magnetice datorită caracterului feromagnetic la temperatura camerei a unora dintre acestea. Constatăm, ca în cazul de mai sus, faptul că morfologia NPMag se modifică pe măsură ce proporția de zinc crește în amestec. Ideea a fost elaborarea de NPMag poliedrice și doparea acestora cu diferite metale de tranziție în vedea optimizării magnetismului, cu scopul de a studia efectul proprietăților magnetice asupra celor hipertemice. Din cauză că morfologia NPMag se modifică, nu se poate realiza o comparație între loturile de NPMag care conțin procente diferite de metal de tranziție. Se pare că acest lucru nu se poate realiza prin metodele propuse – adică adăugarea unei cantități crescânde de clorură de zinc la o cantitate constantă de clorură de fier sau împărțirea a 2 mmol de precursor magnetic în proporții diferite între acetilacetonat de fier și zinc sau cobalt sau mangan. Totuși dacă comparăm fig. 2d cu 2f, unde am utilizat acetilacetonat de zinc și de cobalt împreună cu acetilacetonat de fier în același proporții, putem constata că NPMag formate au aceeași morfologie și dimensiune medie. Prin urmare am putea studia efectul naturii metalului de tranziție asupra proprietăților magnetice și implicit hipertemice.

Director de Proiect
Asistent Dr. Ionel FIZEȘAN

Cluj-Napoca
02 decembrie 2020

Fizeșan Ionel