

ESTUDO DA SECAGEM DE SISTEMAS MAGNÉTICOS COLOIDAIS BIOCOMPATÍVEIS À BASE DE $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ PARA A CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E NANOESTRUTURAL

L.F. Gamarra^{1,2*}; G.E.S. Brito¹; D.M. Escriba⁴; S.M. Carneiro³; E. Amaro Jr.^{2,5}; W.M. Pontuschka¹

¹ USP, Instituto de Física, CP 66318, 05315-970, São Paulo, SP

² IIEP, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP

³ Instituto Butantan, Laboratório de Biologia Celular, São Paulo, SP.

⁴ USP, Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais, São Paulo, SP

⁵ USP, Instituto de Radiologia InRad, Faculdade de Medicina, São Paulo, SP

Recebido: 31 de Julho, 2005; Revisado: 5 de Setembro, 2006

Palavras-chave: Liofilização, ferrofluido, Endorem, secagem, nanopartículas.

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo propor um método adequado de secagem de sistemas magnéticos coloidais, fundamental para a análise morfológica e estrutural dos ferrofluidos, como os utilizados como agentes de contraste em Imagem por Ressonância Magnética (IRM). Foram empregados três métodos de secagem do ferrofluido: secagem em atmosfera de nitrogênio a 70 °C, secagem em ar a 70 °C e secagem por liofilização. O estudo foi feito com o fármaco EndoremTM-Guerbet um ferrofluido biocompatível, utilizado como marcador em IRM e que se apresenta na forma de suspensão coloidal. O estudo foi realizado através das técnicas de difração de raios X (DRX), para observar as possíveis mudanças físico-químicas dos estabilizantes e evidenciar a provável fase do óxido de ferro e mediante a microscopia eletrônica de transmissão (MET) para analisar a morfologia e distribuição das nanopartículas. Dentre os métodos de secagem utilizados neste estudo, a secagem por liofilização mostrou-se mais adequada para o estudo da morfologia das nanopartículas à base de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, preservando a estrutura das nanopartículas em pó como em suspensão. As secagens realizadas a 70 °C em atmosfera de nitrogênio e no ar levaram à coalescência e crescimento das nanopartículas.

ABSTRACT

The aim of the present work is the proposal of an adequate drying method of colloidal magnetic systems, of fundamental importance for the morphological and structural analysis of ferrofluids applied as contrast agents in Magnetic Resonance Imaging (MRI). Three ferrofluid drying methods were tried: drying in nitrogen atmosphere at 70 °C, drying in air at 70 °C and drying by lyophilization. The study of the drying processes was carried out using the pharmaceutical EndoremTM-Guerbert, a biocompatible ferrofluid, used as a MRI marker in the form of a colloidal suspension. The study was performed using X-ray diffraction (XRD) to observe possible physico-chemical changes of the stabilizers and to

detect the probable presence of the phase of iron oxide, and the transmission electrons microscopy (TEM) for the morphological analysis and study of the nanoparticles distribution. From all drying methods tested in this study, the lyophilization method was shown to be the more adequate for the study of the nanoparticles on the basis of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, that has maintaining its original structure in the form of dry powder an in suspension. The drying methods carried out at 70 °C in nitrogen atmosphere and in air led to coalescence and growth of nanoparticles.

1. INTRODUÇÃO

Fluidos magnéticos ou ferrofluidos são dispersões coloidais, concentradas e estáveis, com uma fase dispersa constituída de nanopartículas magnéticas, geralmente composta de óxidos de ferro ou ferritas. Estas nanopartículas formadas por monodomínios magnéticos estão dispersas numa fase líquida contínua denominada dispersante, de caráter orgânico (álcoois, alquil-benzeno entre outros) ou inorgânico (água). O ferrofluido possui a fluidez de uma solução homogênea e possui alta susceptibilidade magnética [1-4].

Os ferrofluidos estáveis em condições fisiológicas (pH neutro e salinidade de 0,9 % [5,6]) são denominados de ferrofluidos biocompatíveis, cujas partículas magnéticas estão cobertas com uma camada molecular biocompatível para prevenir a formação de grandes agregados, mudanças da estrutura original e biodegeneração quando expostas aos sistemas biológicos [7,8].

As nanopartículas magnéticas representam uma classe alternativa de agentes de contraste para ressonância magnética nuclear, com vantagens do ponto de vista físico, pois destacam o comportamento dos prótons de diferentes tecidos [9-12] permitindo, assim, obter mais detalhes a respeito de órgãos em seres vivos. A susceptibilidade magnética da solução está associada ao tamanho das nanopartículas, especialmente das nanopartículas menores do que 10 nm [13] e tal propriedade está diretamente relacionada ao grau de contraste promovido pelo ferrofluido durante o exame.

* lgamarra@ifig.if.usp.br

Com a recente evolução da nanotecnologia, uma grande variedade de nanopartículas pode ser sintetizada. Estas nanopartículas são utilizadas extensamente em diversas aplicações. Além do seu uso como marcadores de contraste em IRM, também são usados em dispositivos de emissão de luz, catalisadores, células combustíveis, cobertura de materiais, abrasivos, tintas, no sistema da entrega de drogas, entre outros.

O objetivo do presente trabalho é propor um método adequado de secagem de ferrofluidos biocompatíveis, necessário para sua caracterização morfológica e estrutural. Após a realização da síntese do ferrofluido biocompatível e da aquisição de um maior controle sobre as características físico-químicas do material, procurou-se evitar a coalescência das nanopartículas e, conseqüentemente preservar a morfologia e a estrutura do material sem a perda das propriedades biofísicas do ferrofluido[13].

Para o estudo da secagem do ferrofluido à base de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, utilizamos a amostra comercial EndoremTM[14] empregando três métodos: *secagem em atmosfera de nitrogênio a 70 °C*, *secagem em ar a 70 °C* e *secagem por liofilização*, otimizando em cada caso, os parâmetros mais relevantes. Para determinar o melhor método para a secagem, foram realizados estudos através de DRX para evidenciar a provável fase do óxido de ferro e observar as possíveis mudanças físico-químicas dos estabilizantes. O estudo morfológico e de distribuição das nanopartículas foram realizados através da técnica MET e comparados aos valores do fabricante [14].

2. PARTE EXPERIMENTAL.

O material utilizado para encontrar o método adequado de secagem é o fluido magnético AMI-25[14], com um diâmetro médio de 10 nm que tem como princípio ativo nanopartículas de ferro superparamagnéticas (fármaco EndoremTM - Guerbet[14]). Na sua composição, este fármaco contém em 8mL de solução 126,500 mg de nanopartículas de óxido de ferro, 2,714 mg de ácido cítrico e 490,400 mg de $\beta\text{-D}$ -manitol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$). Este é um ferrofluido biocompatível utilizado como marcador em IRM e que se apresenta na forma de suspensão coloidal.

Para a secagem do ferrofluido selecionado foram empregados três métodos: *secagem em atmosfera de nitrogênio a 70 °C*, *secagem em ar a 70 °C* e *secagem por liofilização*.

A *secagem em atmosfera de nitrogênio a 70 °C* foi realizada numa estufa com temperatura controlada, sob atmosfera de nitrogênio, durante 30 minutos. A *secagem em ar a 70 °C* foi efetuada nas mesmas condições do método anterior, em atmosfera do ar ambiente. A *secagem por liofilização* ou desidratação a frio ("freeze drying") é um processo que consiste na desidratação de uma substância por sublimação a vácuo. Na liofilização o fluido magnético foi congelado a uma temperatura abaixo de -20 °C e submetido à pressão de 10^{-3} Torr (vácuo), de modo que o solvente (água) foi sublimado a 0 °C , resultando em um material seco, livre de umidade e capaz de ser re-suspendido pela simples adição de água.

Para determinar a fase cristalina e a estrutura das nanopartículas o pó obtido após cada um dos processos de secagem foi caracterizado por difração de raios X (DRX), com varredura na faixa $10^\circ < 2\theta < 70^\circ$ e passo de $0,05^\circ$ a cada 10s. A linha Cu-K α , $\lambda = 1.5418\text{ \AA}$, foi obtida por meio de um monocromador de Si. Para estudo da morfologia e tamanho, as nanopartículas foram examinadas e micrografadas ao microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss) a 80 kV. Nesta etapa foram utilizadas amostras em forma de pó seco, dispersados sobre grades de cobre, recobertas por parafina e carbono[15].

A polidispersidade em tamanho das nanopartículas foi analisada a partir de micrografias obtidas por MET fazendo uso do programa de análise e processamento de imagem em Java ImageJ v 1.33u [16]. O ajuste numérico foi obtido com a aplicação da função de distribuição log-normal, sugerida por O'Grady e Bradbury[17].

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a obtenção das amostras em pó do ferrofluido comercial pelos três métodos de secagem, estas foram caracterizadas pelas técnicas de DRX e MET.

Para a compreensão do comportamento físico-químico do ferrofluido, no que se refere à secagem, foi analisado primeiramente por DRX, permitindo observar as possíveis mudanças físico-químicas dos estabilizantes e evidenciar a provável fase do óxido de ferro. Além disso, foi estudado o efeito do ar atmosférico durante a secagem e a sua influência físico-química sobre a estrutura.

As alterações dos picos de DRX podem ser observadas segundo o tipo de secagem empregado, nas figuras 1, 2 e 3. Deve-se mencionar ainda que a DRX não é sensível para quantidades menores que 5% em volume, sendo este o caso do ácido cítrico onde não é possível a detecção por esta técnica.

No difratograma de pó, cuja secagem foi realizada em *atmosfera de nitrogênio a 70 °C* (figura 1), pode ocorrer a redução dos estabilizantes. Esta secagem foi feita para evitar reações com o oxigênio e CO_2 do ar. Partículas com dimensões nanométricas apresentam mais átomos formando a superfície do que o corpo destas e apresentam elevada energia de superfície, podendo degradar-se ou mudar de fase e, ainda, catalizar a quebra das moléculas dos estabilizantes. Além disso, esta secagem permitiu que todos os mecanismos que levam à coalescência e crescimento da partículas operem. A DRX evidenciou a existência da fase $\alpha\text{-D}$ -manitol (estrutura ortorrômbica), mostrando a mudança de fase do D-manitol. Os dados foram comparados com espectros obtidos dos cartões ICDD (International Center for Diffraction Data) ficha N° 22-1797. O difratograma evidencia também a existência de óxido de ferro, magnetita e/ou maghemita com picos de baixa intensidade, como era esperado.

O difratograma obtido do pó resultante da secagem em *ar a 70 °C* (figura 2) evidenciou pouca decomposição dos estabilizantes, onde todos mecanismos que levam à coalescência e crescimento de partículas atuam. A DRX evidenciou a existência de duas fases do D-manitol ($\alpha\text{-D}$ -manitol e $\beta\text{-D}$ -

manitol), existindo no espectro de DRX mudança parcial da fase do $\beta\text{-D}$ -manitol. Os dados foram comparados com espectros obtidos dos cartões ICDD fichas N° 22-1797 e 22-1793. Da mesma forma que no espectro anterior, podemos observar traços de óxido de ferro magnetita e/ou maghemita com picos de baixa intensidade.

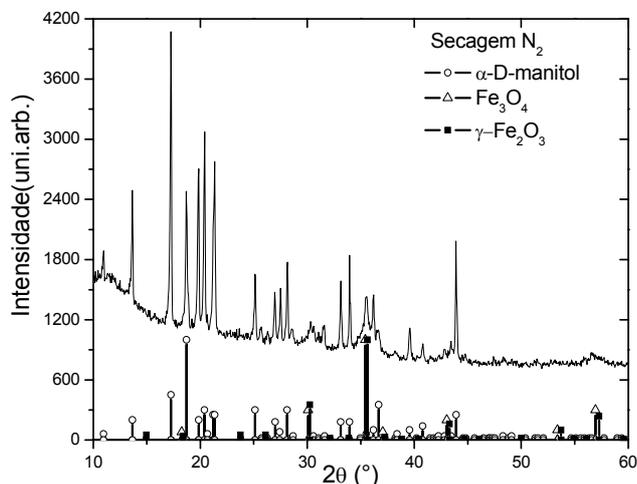


Figura 1 - Difratograma do pó resultante da secagem em atmosfera de N_2 a 70°C , evidenciando a existência da fase $\alpha\text{-D}$ -manitol indicando a possível redução dos estabilizantes.

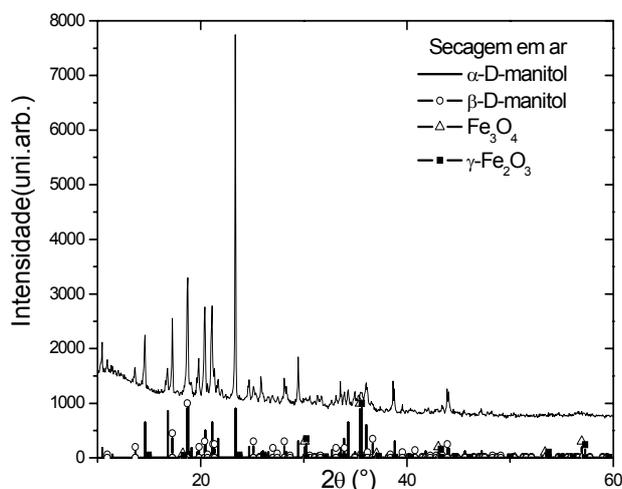


Figura 2 - Difratograma do pó resultante da secagem em ar a 70°C evidenciando a existência de duas fases do D-manitol ($\alpha\text{-D}$ -manitol e $\beta\text{-D}$ -manitol).

No difratograma obtido do pó depois de que a suspensão coloidal foi *liofilizada* (figura 3) observa-se a preservação do estabilizante, mostrando somente os picos correspondentes a $\beta\text{-D}$ -manitol, sem nenhuma mudança de fase do estabilizante. O pó *liofilizado* preserva os estabilizantes do fármaco, as forças capilares são extintas e a taxa da reação de policondensação é negligenciável devido ao seu caráter endotérmico. Assim foi possível “congelar” a estrutura do ferrofluido sem que mudanças físico-químicas interferissem na análise das nanopartículas. Entretanto, como já era de esperar, como

no caso dos espectros anteriores, o difratograma evidencia a presença de óxido de ferro com baixa intensidade.

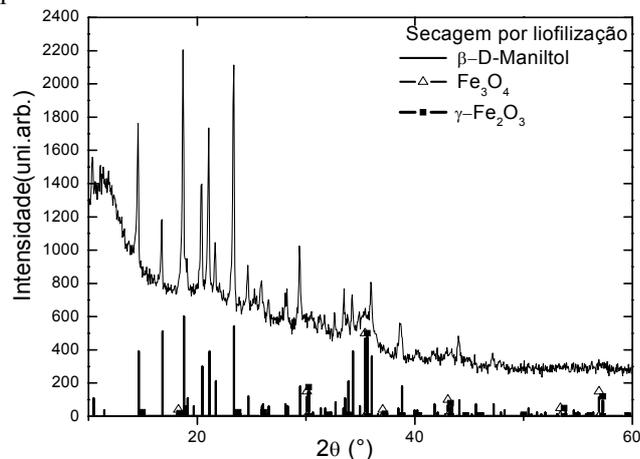


Figura 3 - Difratograma do pó resultante da secagem por liofilização. Evidencia-se a preservação do estabilizante e a presença de picos correspondentes ao $\beta\text{-D}$ -manitol.

A morfologia e distribuição das partículas dos pós resultantes dos três métodos de secagem foram analisadas por MET. As figuras 4 e 5 referem-se às micrografias dos pós obtidos após a secagem a 70°C em atmosfera de N_2 e no ar, respectivamente. Nestas micrografias observa-se que o diâmetro médio das nanopartículas é aproximadamente 20 nm em N_2 e 15 nm no ar. Estes valores são superiores ao valor da referência (10 nm) [14]. Isto significa que as nanopartículas na fase líquida da suspensão coloidal apresentam diâmetros maiores do que o valor médio da referência. O diâmetro maior do que o esperado pode ser justificado pelo fenômeno da coalescência e crescimento das nanopartículas.

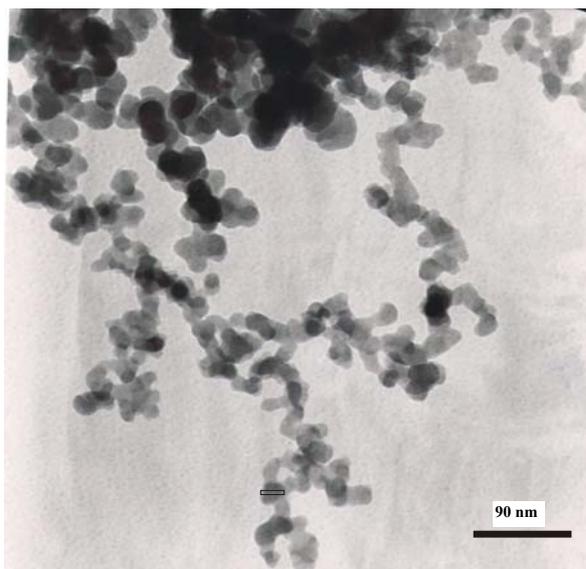


Figura 4 - Micrografia do ferrofluido comercial em pó, após a secagem em atmosfera de nitrogênio a 70°C . MET. 77500X.

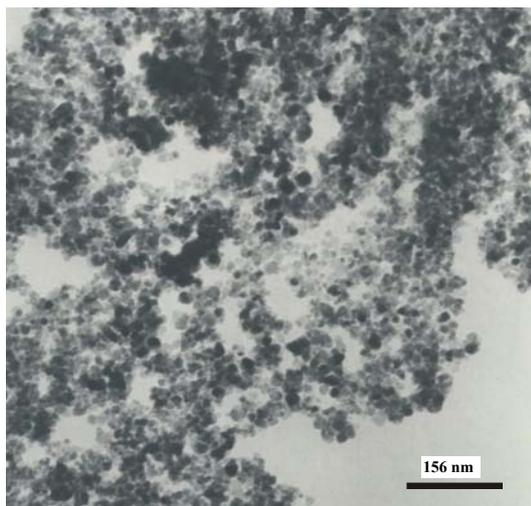


Figura 5 - Micrografia do ferrofluido comercial em pó, após a secagem em ar a 70°C .MET. 77500X.

Na micrografia da amostra do pó liofilizado (figura 6), o diâmetro médio das nanopartículas é de 10 nm correspondente ao valor referenciado pelo fabricante. O histograma mostrado no inset da figura 6 foi obtido a partir da micrografia da figura 6 usando o programa de análise e processamento de imagem Java ImageJ v 1.33u [16]. Nesta figura observa-se a polidispersidade de tamanho das nanopartículas e a distribuição dos tamanhos, ajustada a uma distribuição log-normal [17] com diâmetro médio $\langle D_p \rangle = 10,0nm$ e com largura típica $\sigma_p = 0,27nm$. Para a construção do histograma foram contadas mais de 800 partículas. Nas micrografias da figura 4 e 5 a construção do histograma não é possível, dado à falta de representatividade da morfologia das nanopartículas.

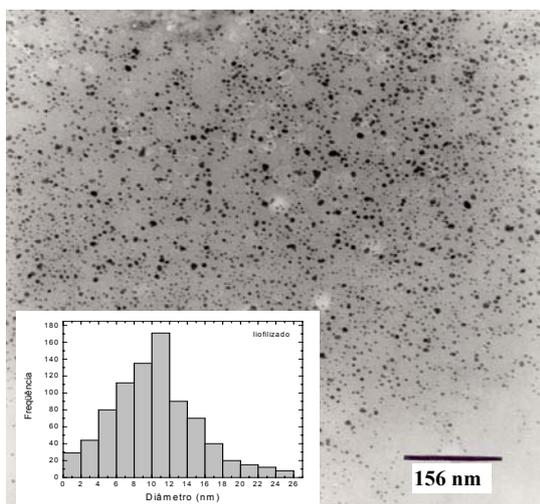


Figura 6 - Micrografia do ferrofluido comercial em pó, após a secagem mediante a liofilização. MET. 77500X. No inset mostra-se o histograma da distribuição dos tamanhos das nanopartículas obtidas a partir da micrografia com aproximação para uma distribuição log-normal com diâmetro médio $\langle D_p \rangle = 10,0nm$ e largura típica $\sigma_p = 0,27nm$.

3. CONCLUSÃO

Mostramos que a técnica de secagem por *liofilização* é a técnica mais adequada para obter o ferrofluido na forma de pó sem que ocorram mudanças físico-químicas na estrutura que interfiram na análise das nanopartículas. As secagens realizadas a 70 °C em *atmosfera de nitrogênio e no ar* levaram à coalescência e crescimento das nanopartículas.

Embora a técnica de DRX não permita identificar a fase formada por óxido de ferro, foi possível identificar a formação de magnetita e/ou maghemita. A DRX evidenciou também a presença dos picos correspondentes ao estabilizante β -D-manitol na amostra liofilizada sem haver mudança de fase no estabilizante, como acontece nos outros métodos de secagem.

A técnica de MET permitiu verificar que o diâmetro médio das partículas foi diferente do valor referenciado pelo fabricante para a secagem a 70° C em atmosfera de N₂ e no ar. Entretanto, na amostra liofilizada o diâmetro médio das nanopartículas foi de 10 nm, igual ao valor de referência mostrando, portanto, que não houve alteração de tamanho.

Dentre os três métodos de secagem estudados, a secagem por liofilização mostrou-se a mais adequada para o estudo morfológico e estrutural de sistemas magnéticos coloidais biocompatíveis, pois manteve a estrutura e morfologia das nanopartículas tanto em pó como em suspensão. Assim, novos trabalhos já publicados [18,19] têm sido elaborados fazendo uso de este método.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Capes, CNPq, IIEP-Hospital Israelita Albert Einstein e Instituto do Milênio de Fluidos Complexos pelo apoio financeiro a este trabalho.

REFERÊNCIAS

- SCHÜTT, W.; GRÜTTNER, C.; HÄFELI, U.; ZBOROWSKI, M.; TELLER, J.; PUTZAR, H.; SCHÜMICHEN, C., *Hybridoma* 16 (1997) 109.
- BATTLE, X.; LABARTA, A., *J. Phys. D: Appl. Phys.* 35 (2002) R15.
- FRENKEL, J.; DORMAN, J., *Nature* 126 (1930) 274.
- BEAN C.P.; LIVINGSTON, J.D., *J. Appl. Phys.* 30 (1959) 120.
- ALBORNOZ, C.; JACOBO, S., *J. Magn. and Magn. Mater.* 305 (2006) 12.
- LANGER, R., *Science* 249 (1990) 249.
- HÄFELI, U.; SCHÜTT, W.; TELLER, J.; ZBOROWSKI, M., *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*. New York, Plenum, 1997.
- DENIZOT, B.; TANGUY, G.; HINDRE, F.; RUMP, E.; LEJEUNE, J.J.; JALLET, P., *Journal of Colloid and Interface Science* 209 (1999) 66.
- BACH-GANSMO, T., *Acta Radiol [Suppl]* 387 (1993) 1.
- REIMER, P.; TOMBACH, B., *Eur Radiol.* 8 (1998) 1198
- GRUBNIC, S.; PADHANI, A.R.; REVELL, P.B.; HUSBAND, J.E., *Am J Roentgenol* 173 (1999) 173.

13. WANG, Y.X.; HUSSAIN, S.M.; KRESTIN, G.P., *Eur Radiol.* 11 (2001) 2319.
14. JUNG, C.W.; JACOBS, P., *Magn Reson Imaging* 13 (1995) 661.
15. www.guerbt.com.br/portugues/endorem.htm
16. LACAVAL, B.M.; AZEVEDO, R.B.; SILVA, L.P.; LACAVAL, Z.G.M. SKEFF NETO, K.; BUSKE, N.; BAKUZIS; A.F. MORAIS, P.C., *Appl. Phys. Lett.* 77 (2000) 1876.
17. RASVAND, W., Image processing and analysis in Java URL <http://rsb.info.nih.gov/ij> 06-10-2004
18. O'GRADY, K.; BRADBURY, A., *J. Magn. and Magn. Mater.* 39 (1983) 91.
19. GAMARRA, L.F.; BRITO, G.E.S.; PONTUSCHKA, W.M.; AMARO, E.; PARMA, A.H.C.; GOYA, G.F., *J. Magn. and Magn. Mater.* 289 (2005) 439.
20. ARELARO, A.D.; BRANDI, A.L.; LIMA Jr., E.; GAMARRA, L.F.; BRITO, G.E.S.; PONTUSCHKA, W.M.; GOYA, G.F., *J. Appl. Phys.* 97 (2005) 10J316.