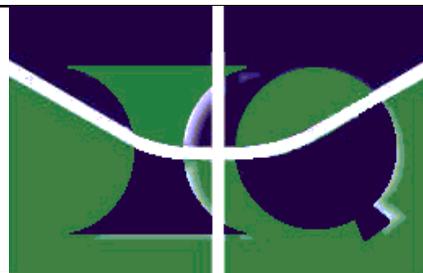


Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Química – IQ

Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ

Laboratório de Pesquisa em Polímeros



**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MAGNÉTICOS
NANOESTRUTURADOS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

TESE DE DOUTORADO

ADRIANA LINHARES DRUMMOND

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Araújo Sales

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa

Brasília - 2012

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Química – IQ
Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ
Laboratório de Pesquisa em Polímeros

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MAGNÉTICOS
NANOESTRUTURADOS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

ADRIANA LINHARES DRUMMOND

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Brasília, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Araújo Sales

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa

Brasília – 2012

***A Deus, por guiar os meus passos, iluminar o meu caminho e ancorar a
luz no meu coração!***

***À minha família, meu sustentáculo, pelo amor incondicional, paciência,
firmeza e por tudo o que já fizeram e ainda fazem por mim e comigo!***

***Às minhas amigas e amigos, irmãos queridos, pela certeza da parceria
sempre firme, pelos ensinamentos e pela luz que são em minha vida!***

***Ao Túlio, meu amor, por simplificar as dificuldades, prolongar as alegrias
e crescer continuamente comigo!***

AGRADECIMENTOS

À professora Maria José Araujo Sales, minha querida orientadora, pelos dez anos de orientação e de carinho. E por fazer parte, diretamente, da minha formação profissional e pessoal, com muita dedicação e sabedoria.

Ao professor Marcelo Henrique Sousa, meu querido co-orientador, pelas muitas oportunidades, pelos ensinamentos e pelo otimismo que sempre atacou o meu excesso de “pés no chão”.

Ao professor Luciano Paulino da Silva, do Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa, mestre querido, pelo exemplo profissional e humano que é. Pela orientação, oportunidades, lições, disponibilidade, carinho e por acreditar em mim.

Ao professor Andris Bakuzis, da Universidade Federal do Goiás, pelas medidas de magnetização e hipertermia magnética, pelas discussões, pelos ensinamentos, pela paciência e pela sua imensa disponibilidade.

À Renata Carvalho e Felipe Coutinho Guimarães, do Instituto de Biologia da UnB, pela incrível disponibilidade na obtenção de imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao professor Julio Lemos de Macedo, pelas aquisições e discussões dos espectros no infravermelho.

Aos professores João Paulo Figueiró Longo e Ricardo Bentes de Azevedo, do Instituto de Biologia da UnB, pelas análises no Zeta Sizer e de citotoxicidade das nanopartículas magnéticas sintetizadas.

Aos alunos de IC que trabalharam comigo: Ana Carolina Campos, Mariana Hitaka, Tiago Rodrigues e Priscilla Peregrino, pela grande contribuição no andamento desse estudo e pelas oportunidades de crescimento no trabalho conjunto.

À sempre parceira de doutorado, Nizamara Simenremis Pereira, por compartilhar crises e soluções desde o princípio e sempre me apontar os caminhos certos.

À Daniela Schlemmer, amiga e parceira de LabPol, pela alegria nas horas de descanso e pelo consolo da certeza do ombro amigo, na cadeira ao lado.

Aos alunos de graduação e pós-graduação que passaram, nesses quatro anos, pelo LabPol, pelo auxílio e pela agradável convivência.

Ao Faustino dos Santos, por sempre resolver os problemas técnicos mais do que prontamente.

Aos funcionários do IQ.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

A quem, por descuido, deixei de mencionar o nome, mas estou grata de coração!

RESUMO

As pesquisas envolvendo a síntese e a aplicação de sistemas magnéticos nanoestruturados em biomedicina se intensificaram nas últimas décadas, devido, em especial, à potencial especificidade desses sistemas. Os estudos, entretanto, se limitavam às formas esféricas, em detrimento das anisotrópicas. Comportamentos diferenciados entre nanopartículas isométricas e anisotrópicas são esperados em meio biológico, de forma que o uso desses sistemas em aplicações biomédicas *in vivo* e *in vitro*, apesar de ainda pouco explorado, tem perspectivas promissoras. O objetivo desse estudo, portanto, é o desenvolvimento de novos sistemas magnéticos nanoestruturados, baseados em nanopartículas alongadas de magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), visando aplicações biomédicas. A síntese das nanopartículas foi realizada por meio da coprecipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio alcalino a 100 °C. A fim de se alcançar o sistema mais adequado para as finalidades propostas, foram investigadas a influência do tempo de reação, natureza dos contra-íons, proporção entre Fe(II) e Fe(III) e natureza da base, nas propriedades das nanopartículas obtidas. Os resultados mostraram que a combinação $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ureia, na proporção de Fe(II):Fe(III) = 1:2 foi a mais apropriada para a obtenção de nanopartículas magnéticas alongadas de magnetita, com formato de bastão. Essas nanopartículas apresentaram comportamento ferromagnético nas curvas M vs H e uma variação de temperatura grande com a aplicação de campos magnéticos altos, nos experimentos de hipertermia. Apesar de não ser o objetivo do estudo, no decorrer dessa investigação, nanopartículas monodispersas esféricas de maghemita, com comportamento superparamagnético nas curvas M vs H , foram obtidas por um procedimento simples, com a mesma combinação de reagentes descrita acima, exceto a ureia, em uma síntese do tipo *one-pot*, em solução amoniacal. Em virtude dos resultados positivos, essas sínteses também foram investigadas. A amostra obtida com seis horas de digestão apresentou uma variação de temperatura grande com a aplicação de campos magnéticos baixos, nos experimentos de hipertermia. Pelos resultados, ambas as amostras possuem potencial para aplicações em hipertermia magnética.

ABSTRACT

The researches involving the synthesis and application of nanostructured magnetic systems in biomedicine have been intensified in recent decades, due to the potential specificity of these systems in particular. The studies, however, were limited to spherical shapes, instead of anisotropic ones. Distinct behavior between anisotropic and isometric magnetic nanoparticles are expected in a biological environment, so that the use of these systems in biomedical applications (*in vivo* and *in vitro*), although poor explored, has interesting perspectives. Therefore, the aim of this study is the development of new nanostructured magnetic systems based on elongated nanoparticles of magnetite (Fe_3O_4) and maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) for biomedical applications. The synthesis of nanoparticles was realized by coprecipitation of Fe^{2+} and Fe^{3+} in alkaline medium at 100 °C. In order to achieve the most appropriate system for the purposes, the influence of reaction time; nature of counter ions; ratio of Fe (II) and Fe (III); and nature of the base on the nanoparticles properties were investigated. The results showed that the combination $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and urea in the proportion of $\text{Fe(II):Fe(III)} = 1:2$ was the most suitable for obtaining rod-shaped elongated magnetite nanoparticles. These nanoparticles showed ferromagnetic behavior in M vs H curves and a large temperature variation with the application of high magnetic fields, in the hyperthermia experiments. Although was not the aim of this study, in the course of this investigation, monodisperse spherical maghemite nanoparticles, showing superparamagnetic behavior in M vs H curves, were obtained by a simple procedure, with the same combination of reagents described above, except urea, in an one-pot synthesis, in ammoniacal solution. Given the positive results, these syntheses were also investigated. The sample obtained with six hours of digestion showed a large temperature variation with the application of low magnetic fields in the experiments of hyperthermia. The results showed that both samples have potential for applications in magnetic hyperthermia.

ÍNDICE

Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de Abreviaturas e Acrônimos.....	xix
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	2
1.1. Introdução	2
1.2. Objetivos	4
1.2.1. OBJETIVO GERAL	4
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Contextualização.....	6
2.2. Parâmetros que Influenciam a Eficiência dos Sistemas Magnéticos Nanoparticulados para Aplicações Biomédicas <i>in Vivo</i>	7
2.2.1. PROPRIEDADES MAGNÉTICAS	8
2.2.2. GEOMETRIA.....	15
2.2.3. TOXICIDADE	22
2.3. Química de Superfície e Biocompatibilidade.....	23
2.4. Aplicações Biomédicas	24
2.4.1. SISTEMA DE CARREAMENTO DE DROGAS.....	24
2.4.2. HIPERTERMIA	27
2.5. As Nanopartículas Magnéticas.....	30
2.5.1. ESTRUTURA CRISTALINA DA MAGNETITA E MAGHEMITA	30
2.5.2. PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DA MAGNETITA E MAGHEMITA.....	33
2.5.3. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ALONGADAS	34
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
3.1. Materiais.....	37
3.2. Metodologia.....	37
3.2.1. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS.....	37
3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	40
3.2.3. REALIZAÇÃO DE ENSAIOS VOLTADOS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICA.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50

4.1.	Sínteses e Caracterizações do Primeiro Grupo	53
4.1.1.	INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REAÇÃO.....	53
4.1.2.	INFLUÊNCIA DOS CONTRA-ÍONS	74
4.1.3.	INFLUÊNCIA DA PROPORÇÃO ENTRE Fe(II) E Fe(III)	90
4.1.4.	INFLUÊNCIA DA BASE UTILIZADA NA ALCALINIZAÇÃO DO MEIO	99
4.2.	Sínteses e Caracterizações do Segundo Grupo	107
4.3.	Realização de Ensaio Voltados para as Aplicações Biomédicas	119
4.3.1.	MAGNETOHIPERTERMIA	119
4.3.2.	FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS.....	124
4.3.3.	ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	126
4.3.4.	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	128
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	132
5.1.	Conclusões.....	132
5.2.	Perspectivas.....	134
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
	ANEXOS	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de síntese das nanopartículas do primeiro grupo.....	39
Tabela 2. Condições de síntese das nanopartículas do segundo grupo.....	40
Tabela 3. Dimensões médias das nanopartículas magnéticas obtidas com a variação do tempo de reação e seus respectivos desvios-padrão.....	57
Tabela 4. Tabela comparativa das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação do tempo de reação, indexadas como magnetita.	61
Tabela 5. Indexação dos picos de DRX para as nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação do tempo de reação.	63
Tabela 6. Cálculo dos parâmetros de cela da fase de magnetita para as nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação do tempo de síntese. ..	65
Tabela 7. Proporção de Fe(II) e Fe(III) nas amostras obtidas com a variação do tempo de reação, determinada por Dicromatometria.	65
Tabela 8. Proporção de Fe(II) e Fe(III) na NP1DI.	66
Tabela 9. Dados obtidos por DRX da amostra NP1DI, indexada como magnetita.....	67
Tabela 10. Indexação dos picos de difração de raios X para a amostra NP1DI.	68
Tabela 11. Perda de massa das amostras NP1A, NP1B e NP1D na etapa de degradação entre 200 e 300 °C.	71
Tabela 12. Propriedades magnéticas das amostras obtidas variando-se o tempo de reação.	72
Tabela 13. Proporção entre os reagentes utilizados na síntese da NP2A, NP1D, NP2B e NP2C.	75
Tabela 14. Dimensões médias das nanopartículas magnéticas obtidas com a variação do tempo de reação e seus respectivos desvios-padrão.....	77
Tabela 15. Indexação dos picos do difratograma da NP2A como hematita.	79
Tabela 16. Tabela comparativa da NP2B e NP2C, indexadas como goethita..	81
Tabela 17. Proporção de Fe(II) e Fe(III) nas amostras obtidas com a variação dos contra-íons, determinada por Dicromatometria.	83
Tabela 18. Propriedades magnéticas das amostras sintetizadas variando-se os contra-íons.	88

Tabela 19. Indexação dos picos de difração de raios X para as nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação proporção de Fe(II) e Fe(III).	92
Tabela 20. Tabela comparativa da NP3A e NP3B, indexadas como magnetita.	93
Tabela 21. Cálculo dos parâmetros de cela para as nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação da proporção entre Fe(II) e Fe(III).	94
Tabela 22. Proporção entre Fe(II) e Fe(III) nas amostras obtidas com a variação da proporção entre Fe(II) e Fe(III), determinada por Dicromatometria.	95
Tabela 23. Propriedades magnéticas das amostras obtidas variando-se a proporção entre Fe(II) e Fe(III).	98
Tabela 24. Dimensões médias das nanopartículas magnéticas obtidas com a variação do tempo de reação e seus respectivos desvios-padrão.	100
Tabela 25. Indexação dos picos dos difratogramas da NP4A como maghemita e da NP1D como magnetita.	102
Tabela 26. Indexação dos picos de DRX da NP4A.	102
Tabela 27. Cálculo do parâmetro de cela da NP4A.	103
Tabela 28. Proporção entre Fe(II) e Fe(III) nas amostras obtidas com a variação da base, determinada por Dicromatometria.	103
Tabela 29. Propriedades magnéticas das amostras obtidas variando-se a base alcalinizante do meio.	105
Tabela 30. Dimensões médias das nanopartículas magnéticas do segundo grupo estimadas por MET e pela Equação de Scherrer, usando os dados de DRX.	110
Tabela 31. Indexação dos picos dos difratogramas das amostras esféricas do segundo grupo como maghemita, exceto a NPS0, indexada como magnetita.	112
Tabela 32. Indexação dos picos de DRX das amostras do segundo grupo ..	113
Tabela 33. Cálculo dos parâmetros de cela para as amostras do segundo grupo.	114
Tabela 34. Proporção entre Fe(II) e Fe(III) nas nanopartículas esféricas do segundo grupo, determinada por Dicromatometria.	115
Tabela 35. Propriedades magnéticas das amostras do segundo grupo.	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Nanopartículas magnéticas em biomedicina. (a) A superfície das nanopartículas magnéticas deve ser biocompatibilizada e funcionalizada antes de sua administração; (b) elas podem ser guiadas até o alvo pela aplicação de um campo magnético externo ou pela aplicação direta na região apropriada. Depois de localizadas no alvo, as propriedades magnéticas das nanopartículas adquirem nova funcionalidade: (c) como agentes de contraste para a obtenção de imagens; (d) como agentes de hipertermia; (e) como carreadores de drogas ou genes; (f) para separação e diagnóstico <i>in vitro</i>	3
Figura 2. Áreas de fronteira em nanotecnologia. <i>Drug delivery</i> (carreamento de drogas) e <i>displays</i> (mostradores).....	6
Figura 3. Terapias de condições patológicas utilizando sistemas magnéticos nanoestruturados, adaptada.....	7
Figura 4. Distribuição eletrônica do átomo de Zn.....	9
Figura 5. Distribuição eletrônica do átomo de Fe.....	10
Figura 6. Representação do alinhamento paralelo dos momentos magnéticos em um material ferromagnético.....	10
Figura 7. Representação do alinhamento antiparalelo dos momentos magnéticos em um material antiferromagnético.....	11
Figura 8. Representação do alinhamento antiparalelo dos momentos magnéticos em um material ferrimagnético.....	11
Figura 9. Representação dos domínios magnéticos dentro de uma amostra, separados pelas paredes de <i>Bloch</i>	12
Figura 10. Curva de magnetização <i>versus</i> campo aplicado, onde FM é ferri/ferromagnético e SPM é superparamagnético.....	13
Figura 11. Ilustração do conceito de superparamagnetismo. Os círculos representam três nanopartículas magnéticas e as setas, a direção da magnetização de rede nessas partículas.....	15
Figura 12. Representação das modalidades de direcionamento das nanopartículas magnéticas para tumores. (a) <i>EPR</i> ; (b) direcionamento molecular; (c) direcionamento magnético.....	16

Figura 13. As partículas tendem a se acumular nas proximidades das paredes dos vasos sanguíneos e se deslocam mais facilmente para os vasos sanguíneos de menor calibre, o que pode aumentar a sua acumulação nessas regiões.....	18
Figura 14. A trajetória de uma partícula esférica e uma elipsoidal em um capilar idealizado sob típicas condições hidrodinâmicas capilares.....	19
Figura 15. Clipes de vídeo-microscopia por <i>time-lapse</i> abrangendo 39 minutos da interação entre macrófagos e micropartículas idênticas de PS não opsonizadas com forma de disco elipsoidal (eixo maior 14 μm e eixo menor 3 μm) em duas orientações diferentes. (A) o macrófago se liga ao longo do maior eixo da micropartícula e a internaliza completamente em 3 min. (B) o macrófago se liga ao lado achatado de uma micropartícula idêntica e se espraia, mas não a internaliza.....	20
Figura 16. Corte transversal do funcionamento de um sistema magnético hipotético de veiculação de drogas	25
Figura 17. Fenômeno da reversão da magnetização para geração de calor sob o efeito de um CMA (H_0 , f). (esquerda) Mecanismo de geração de calor por perda por histerese para nanopartículas ferri e ferromagnéticas. Mecanismo de geração de calor por relaxação de (centro) Néel e (direita) Brown para nanopartículas superparamagnéticas	28
Figura 18. Princípios da MHT.....	29
Figura 19. Estrutura de empacotamento compacto cúbico (ecc).	31
Figura 20. (a) Sítios tetraédricos e octaédricos em um retículo de empacotamento compacto; (b) sítio tetraédrico; e (c) sítio octaédrico.	31
Figura 21. Um segmento da célula unitária de espinélio.....	32
Figura 22. Estrutura cristalina da magnetita	33
Figura 23. Micrografia de transmissão eletrônica de partículas alongadas de (a) hematita, preparadas em presença de íons fosfato; e (b) maghemita, preparadas a partir de tratamento térmico da hematita obtida.....	35
Figura 24. Diagrama do VSM.	42
Figura 25. Produtos isolados da hidrólise de Fe(III), mostrados nas Eq. Quím. 5 e 6, respectivamente	50
Figura 26. Dímero formado a partir dos produtos da hidrólise do $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$	51

Figura 27. Imagens obtidas por MET das nanopartículas sintetizadas com variação de tempo de síntese: (a) NP1A, (b) NP1B, (c) NP1C, (d) NP1D, (e) NP1E e (f) NP1F. Barra de escala = 0,2 μm	54
Figura 28. Histogramas de distribuição de comprimento (1) e largura (2) para a (a) NP1A, (b) NP1B, (c) NP1C, (d) NP1D, (e) NP1E e (f) NP1F.	56
Figura 29. Diagrama de dispersão dos (a) comprimentos e das (b) larguras das nanopartículas sintetizadas variando-se o tempo de reação.....	57
Figura 30. Imagem (a) topográfica e (b) de fase da NP1B, obtidas por MFA em modo dinâmico. Imagem de 2,5 x 2,5 μm	58
Figura 31. Imagem (a) topográfica e (b) de fase da NP1B, obtidas por MFA em modo dinâmico/viscoelástico. Imagem de 156 x 156 nm.	59
Figura 32. Imagem de MFA obtida no modo fase da NP1B em 3D.....	59
Figura 33. Difratogramas das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação de tempo de síntese.	60
Figura 34. Comparação entre os difratogramas da NP1D e da magnetita pura.	61
Figura 35. Comparação entre os difratogramas da NP1A e da goethita pura..	63
Figura 36. Difratograma da amostra NP1DI.	67
Figura 37. Espectros de FTIR das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação de tempo de síntese.	68
Figura 38. Tipos de coordenação dos grupos OH^- superficiais ao Fe	69
Figura 39. Modos de coordenação do sulfato	70
Figura 40. Curvas TG das amostras (a) NP1A, (b) NP1B e (c) NP1D.....	71
Figura 41. Curvas M vs H das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação de tempo de síntese.	72
Figura 42. (a) M_S em função do tempo de reação e (b) M_S em função da quantidade estimada de magnetita em percentual de massa contida nas amostras.....	73
Figura 43. Detalhe do laço de histerese da curva M vs H nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação de tempo de síntese.....	74
Figura 44. Imagens obtidas por MET das nanopartículas sintetizadas com variação dos contra-íons. (a) NP2A, (b) NP1D, (c) NP2B, (d) NP2C. Barra de escala = 0,2 μm	75

Figura 45. Histogramas de distribuição de comprimento (1) e largura (2) para a (a) NP2A, (b) NP1D, (c) NP2B e (d) NP2C.	76
Figura 46. Comparação entre os difratogramas da NP2A e do padrão de hematita.....	79
Figura 47. Comparação entre os difratograma da NP2B, NP2C e goethita pura.	80
Figura 48. Difratogramas das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação do contra-íon.....	82
Figura 49. Espectros de FTIR das nanopartículas sintetizadas, variando-se os contra-íons.	84
Figura 50. Espectro de FTIR dos reagentes utilizados nas sínteses das nanopartículas obtidas, variando-se os contra-íons.....	85
Figura 51. Comparação entre os espectros de FTIR do $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e das amostras NP2B e NP2C.....	86
Figura 52. Modos de coordenação de ligantes à superfície dos óxidos de Fe.	86
Figura 53. Curvas M vs H da NP2A e NP2B.	87
Figura 54. Curva M vs H da NP2C.	88
Figura 55. Detalhe do laço de histerese das curvas M vs H da NP2B e NP2C.	89
Figura 56. Curvas M vs H das nanopartículas magnéticas sintetizadas, variando-se os contra-íons.....	90
Figura 57. Imagens obtidas por MET das nanopartículas sintetizadas variando-se a proporção entre Fe(II) e Fe(III). (a) NP1D, (b) NP3A e (c) NP3B. Barra de escala = 0,2 μm	91
Figura 58. Difratogramas das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação da concentração de Fe(II) e Fe(III).	92
Figura 59. Espectros de FTIR das nanopartículas obtidas variando-se a proporção entre Fe(II) e Fe(III).	96
Figura 60. Curvas M vs H das nanopartículas magnéticas sintetizadas variando-se a proporção entre Fe(II) e Fe(III).	97
Figura 61. Detalhe do laço de histerese das curvas M vs H das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação da proporção entre Fe(II) e Fe(III).....	98
Figura 62. Imagens obtidas por MET das nanopartículas sintetizadas com variação da base utilizada na alcalinização do meio. (a) NP4A e (b) NP1D. Barra de escala = 0,2 μm	99

Figura 63. Histogramas de distribuição de comprimento (1) e largura (2) para a (a) NP4A e (b) NP1D.....	100
Figura 64. Difratomogramas das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação da base alcalinizante em comparação com os padrões de magnetita e maghemita.....	101
Figura 65. Espectros de FTIR das nanopartículas sintetizadas variando-se a base.....	104
Figura 66. Curvas M vs H das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação da base alcalinizante do meio.....	105
Figura 67. Detalhe do laço de histerese das curvas M vs H da NP4A e NP1D.	106
Figura 68. Imagens obtidas por MET das nanopartículas do segundo grupo, sintetizadas variando-se o tempo de reação: (a) NPS0, (b) NPS1, (c) NPS3, (d) NPS6, (e) NPS9. Barra de escala = 100 nm.	108
Figura 69. Histogramas de distribuição de diâmetro para a (a) NPS0, (b) NPS1, (c) NPS3, (d) NPS6 e (e) NPS9.	109
Figura 70. Diagrama de dispersão dos diâmetros das amostras do segundo grupo.	110
Figura 71. Difratomogramas das amostras de nanopartículas esféricas do segundo grupo.	112
Figura 72. Espectros de FTIR das nanopartículas esféricas das amostras do segundo grupo.	116
Figura 73. Espectros Raman das amostras NPS0 e NPS6.....	117
Figura 74. Curvas M vs H das amostras do segundo grupo.....	117
Figura 75. Detalhe do laço de histerese das curvas M vs H das amostras do segundo grupo.	118
Figura 76. Variação da temperatura em função do tempo de medição para a amostra NP1D, variando-se o campo magnético aplicado.....	120
Figura 77. Variação da temperatura em função do tempo de medição para as amostras NP1A e NP1D, aplicando um campo de 267 Oe.	122
Figura 78. Variação da temperatura em função do tempo de medição para a amostra NPS6, variando-se o campo magnético aplicado.	122

Figura 79. Comparação da variação da temperatura em função do tempo de medição entre as amostras NP1D e NPS6, em (a) 169 Oe, (b) 223 Oe, (c) 267 Oe e (d) 312 Oe.	124
Figura 80. Modelo de funcionalização da superfície das nanopartículas via adsorção de polieletrólitos.....	125
Figura 81. Imagens obtidas por MET das nanopartículas da amostra NP1D, cujas superfícies foram funcionalizadas com TPF: (a) decantado e (b) sobrenadante. Barra de escala = 0,2 μm	126
Figura 82. Histograma de distribuição de tamanho hidrodinâmico das nanopartículas da amostra NPS6.....	127
Figura 83. Viabilidade celular das nanopartículas da amostra NP1D funcionalizadas, em uma linhagem celular imortalizada derivada de um adenocarcinoma mamário murino 4T1.....	128
Figura 84. Viabilidade celular das nanopartículas da amostra NPS6 funcionalizadas, em uma linhagem celular imortalizada derivada de um adenocarcinoma mamário murino 4T1.....	129
Figura 85. Imagens obtidas por microscopia de luz da alteração da morfologia celular após o tratamento com nanopartículas. (a) controle; (b) NP1D; (c) NPS6 e (d) NPS6 com concentração de 20×10^{13} partículas/mL.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

BET	Brunauer, Emmet e Teller (método de determinação de área superficial)
cfc	Cúbico de face centrada
CMA	Campo magnético alternado
DRX	Difração de raios X
ecc	Empacotamento compacto cúbico
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (<i>Enhanced Permeability and Retention Effect</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MFA	Microscopia de força atômica
MHT	Magnetohipertermia
MTT	Brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
PS	Poliestireno
ROS	Espécies de oxigênio reativo (<i>Reactive oxygen species</i>)
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
SPM	Superparamagnético
SRE	Sistema reticuloendotelial
TG	Termogravimetria
TPF	Tripolifosfato de sódio
VSM	Magnetômetro de amostra vibrante (<i>Vibrating sample magnetometer</i>)

Capítulo

1

Introdução e Objetivos

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

Os primeiros estudos da aplicação de materiais magnéticos para hipertermia datam do final da década de 50.¹ Porém, foi no final da década de 70, que o primeiro estudo sobre a aplicação de micro e nanopartículas magnéticas para o carreamento de drogas para alvos específicos no organismo, foi reportado.² A partir de então, as pesquisas acerca das aplicações dos sistemas magnéticos nanoestruturados em biomedicina se intensificaram, devido, em especial, à potencial especificidade desses sistemas.

Esse potencial se deve a três fatores principais. O primeiro é relativo à dimensão nanométrica das partículas, que as situa na faixa de dimensão das proteínas (5-50 nm), DNA (10-100 nm) e vírus (20-450 nm), permitindo, além de uma aproximação das estruturas biológicas de interesse, a sua circulação no interior do corpo e o acesso a áreas específicas. O segundo fator refere-se às suas características magnéticas, que as faz responder à aplicação de um campo magnético externo. Uma vez que os campos magnéticos penetram nos tecidos do corpo, elas podem ser manipuladas remotamente, característica explorada no seu transporte e imobilização; além da geração de calor em sítios específicos, quando aplicado um campo magnético alternado (CMA). O terceiro fator está relacionado à facilidade de modificação de sua superfície, característica usada para associar grupos e substâncias de interesse a elas, possibilitando o carreamento de drogas e genes para alvos específicos e também, aumentar ainda mais a sua especificidade. A união e a exploração dessas características permitem a aplicação biomédica desses sistemas com finalidades terapêuticas e diagnósticas (Figura 1).

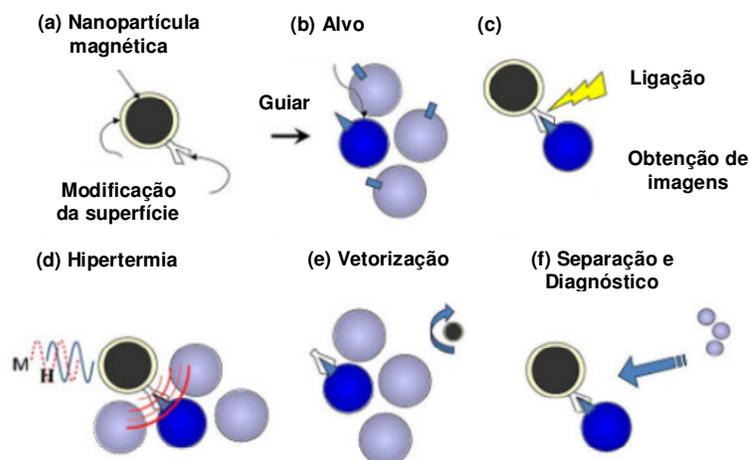


Figura 1. Nanopartículas magnéticas em biomedicina. (a) A superfície das nanopartículas magnéticas deve ser biocompatibilizada e funcionalizada antes de sua administração; (b) elas podem ser guiadas até o alvo pela aplicação de um campo magnético externo ou pela aplicação direta na região apropriada. Depois de localizadas no alvo, as propriedades magnéticas das nanopartículas adquirem nova funcionalidade: (c) como agentes de contraste para a obtenção de imagens; (d) como agentes de hipertermia; (e) como carreadores de drogas ou genes; (f) para separação e diagnóstico *in vitro*.³

A constatação de que nessas aplicações utilizam-se, geralmente, nanopartículas magnéticas esféricas, motivou a proposta desse projeto de pesquisa: a síntese de sistemas magnéticos baseados em nanopartículas magnéticas alongadas. Visto que a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são as partículas magnéticas mais comumente estudadas para essas finalidades, elas foram o foco desse estudo. Espera-se que, em virtude de sua morfologia anisotrópica, elas se comportem de modo diferenciado das nanopartículas esféricas, em relação às suas propriedades magnéticas e ópticas; às interações com as entidades biológicas; e ao seu transporte *in vivo*, o que pode potencializar as aplicações desses sistemas em determinadas situações.

1.2. Objetivos

1.2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver novos sistemas magnéticos nanoestruturados, baseados em nanopartículas alongadas de maghemita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e magnetita (Fe_3O_4), visando à aplicação em biomedicina.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas alongadas de maghemita e magnetita;
- Caracterizar as nanopartículas magnéticas sintetizadas;
- Selecionar as nanopartículas com as propriedades mais adequadas para as finalidades desse estudo para os ensaios biológicos e testes de hipertemia;
- Realizar ensaios de citotoxicidade *in vitro* das nanopartículas selecionadas;
- Efetuar medidas de hipertemia magnética das nanopartículas selecionadas.

Capítulo

2

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contextualização

De maneira simplificada, nanociência e nanotecnologia se referem ao estudo e aplicação, respectivamente, da matéria em escala nanométrica. A interdisciplinaridade é uma característica marcante dessa área de fronteira entre química, física, biologia, medicina, engenharia e informática (Figura 2).

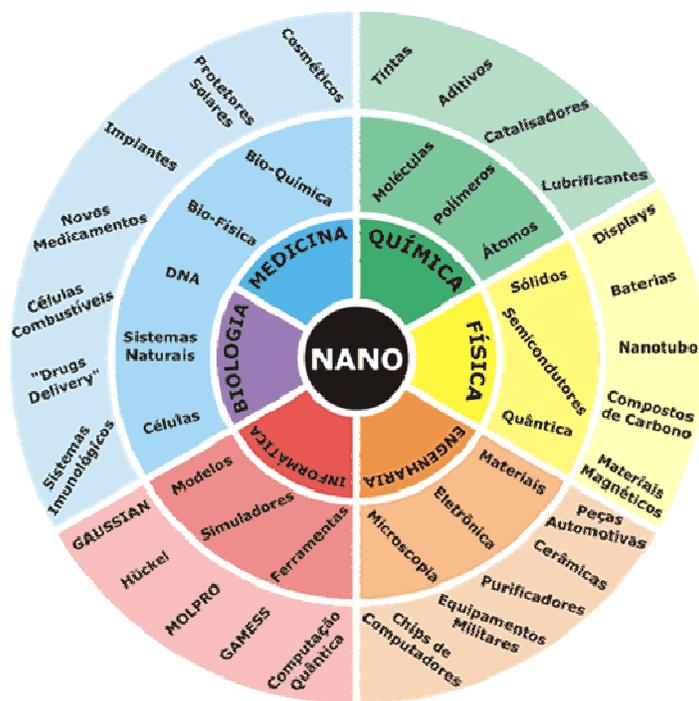


Figura 2. Áreas de fronteira em nanotecnologia.⁴ *Drug delivery* (carreamento de drogas) e *displays* (mostradores).

Um de seus campos em franco desenvolvimento é a nanobiotecnologia, que pode ser definida como a aplicação de conhecimentos em escala nanométrica, para o desenvolvimento de materiais que agreguem valor a produtos/processos biológicos. Nesse contexto, está situado o foco desse estudo, que é o desenvolvimento e aplicação de sistemas magnéticos nanoestruturados para terapia (carreamento de drogas e hipertermia) de condições patológicas (Figura 3), em especial, o câncer.

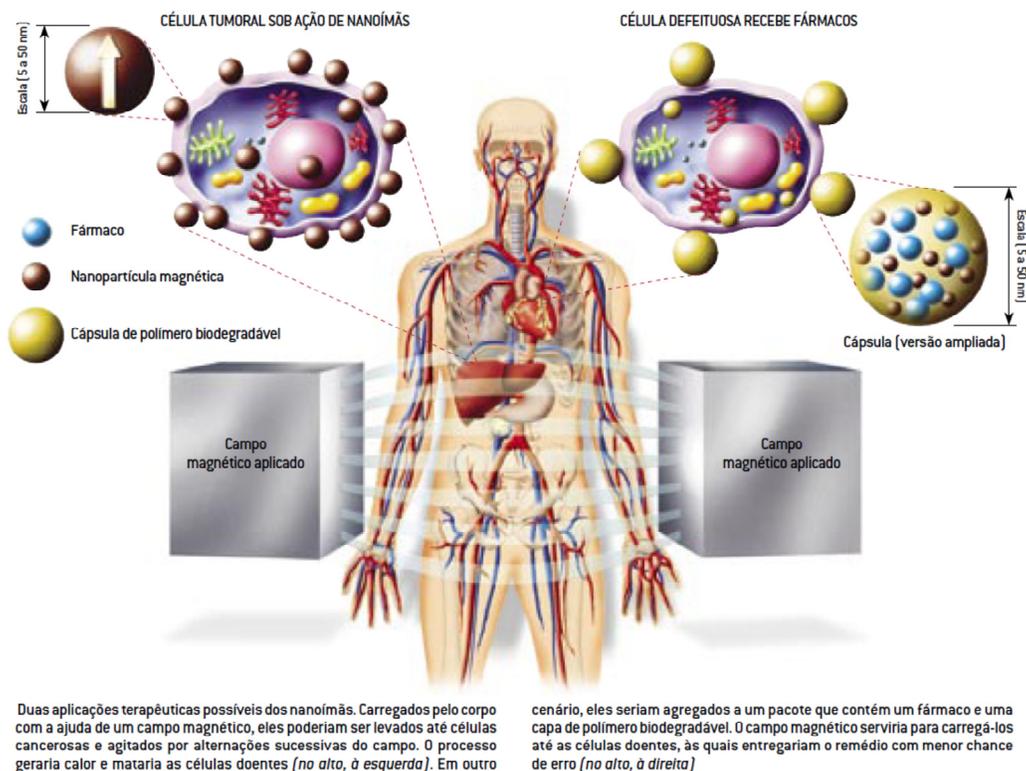


Figura 3. Terapias de condições patológicas utilizando sistemas magnéticos nanoestruturados, adaptada.⁵

2.2. Parâmetros que Influenciam a Eficiência dos Sistemas Magnéticos Nanoparticulados para Aplicações Biomédicas *in Vivo*

As aplicações biomédicas *in vivo* das nanopartículas magnéticas se baseiam, geralmente, no seu transporte passivo até o alvo pretendido pela circulação sanguínea, motivo pelo qual a farmacocinética deve ser considerada no desenvolvimento dos sistemas magnéticos que visam essas aplicações. Assim, para que seja efetiva, fatores relacionados às suas propriedades magnéticas, geometria (dividida didaticamente nesse trabalho em dimensão e forma) e citotoxicidade, além de fatores fisiológicos relacionados à região alvo e ao transporte das nanopartículas até lá, devem ser considerados.

2.2.1. PROPRIEDADES MAGNÉTICAS

As propriedades magnéticas de um material estão relacionadas ao movimento dos elétrons nos átomos e a compreensão da sua dinâmica é fundamental para o entendimento dos mecanismos que regem os sistemas magnéticos nas aplicações biomédicas.

O momento magnético, m , é um parâmetro utilizado para quantificar as propriedades magnéticas de um material.⁶ Em um átomo ou íon livre, ele é originado do *spin* dos elétrons, do seu momento angular orbital em relação ao núcleo e da mudança no momento orbital, induzida por um campo magnético aplicado.^{7,8} Ele não pode ser medido diretamente, mas é dado em função da susceptibilidade magnética molar, χ , segundo a Equação 1:⁶

$$m = 2,83\sqrt{\chi T} \quad \text{(Equação 1)}$$

onde, T é a temperatura absoluta e χ denota a relação entre a magnetização, M (soma dos momentos magnéticos dos átomos da amostra por unidade de volume),^{6,9} sofrida por um material disposto em um campo magnético aplicado, H .

$$M = \chi H \quad \text{(Equação 2)}$$

A unidade utilizada para m é Joule/Tesla, mas utiliza-se também magneton de *Bohr* (MB).

O magneton de *Bohr*, μ_B , é o momento magnético associado ao movimento orbital de um elétron, girando na primeira órbita de *Bohr*. Ele é considerado o momento magnético fundamental⁶ e é dado por:

$$\mu_B = \frac{eh}{4\pi m_e c} = 9,2732 \cdot 10^{-24} \text{J} \cdot \text{T}^{-1} \quad \text{(Equação 3)}$$

onde e e m_e são a carga e a massa do elétron, respectivamente; c é a velocidade da luz; e h é a constante de *Planck*.

Dessa forma, o momento magnético de um átomo é a soma vetorial dos momentos magnéticos associados ao movimento dos elétrons em suas órbitas e ao *spin* de cada um deles. Uma vez que, tanto o momento angular orbital quanto o momento de *spin* são quantizados, o momento magnético também será quantizado.

Considerando a dinâmica de interação entre os momentos magnéticos, podemos distinguir duas situações: magnetismo individual e magnetismo cooperativo.

O magnetismo individual se caracteriza pela ausência de interações magnéticas de longo alcance, de modo que os momentos magnéticos estão orientados aleatoriamente a campo zero. Dentro desse quadro, duas situações são possíveis:

- Diamagnetismo: os momentos magnéticos individuais dos elétrons se cancelam e o átomo não possui momento resultante. A susceptibilidade magnética dessas substâncias é pequena (da ordem de 10^{-6}), negativa e independente da temperatura.⁶ O átomo de zinco (Zn) é um exemplo de diamagnetismo, pois possui 30 elétrons, todos emparelhados, como mostra a Figura 4.

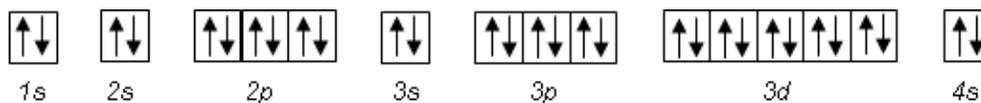


Figura 4. Distribuição eletrônica do átomo de Zn.

- Paramagnetismo: o cancelamento dos momentos magnéticos individuais é parcial, uma vez que existem elétrons desemparelhados e o átomo possui um momento magnético resultante. Assim, a aplicação de um campo magnético promove o alinhamento parcial dos momentos magnéticos paralelamente ao campo. A susceptibilidade magnética está na faixa de 0 a 0,01, é positiva e varia com a temperatura.⁶ O átomo de ferro (Fe) é um exemplo de paramagnetismo, uma vez que apresenta quatro de seus 26 elétrons desemparelhados, como mostra a Figura 5.

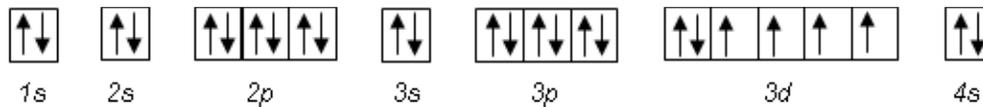


Figura 5. Distribuição eletrônica do átomo de Fe.

No magnetismo cooperativo, os materiais possuem ordenamento magnético proveniente de interações magnéticas de longo alcance entre os momentos magnéticos atômicos, conduzindo a uma magnetização espontânea. Essa situação só ocorre abaixo de uma temperatura crítica, denominada temperatura de *Curie* (T_C), para materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos, e temperatura de *Néel* (T_N), para materiais antiferromagnéticos. Acima dessa temperatura, os efeitos de flutuações térmicas são suficientes para quebrar a ordem e o material se torna paramagnético. Dentro desse quadro, três tipos de ordenamento são possíveis:

- Ferromagnetismo: os momentos magnéticos dos diferentes átomos estão alinhados paralelamente entre si (Figura 6). Esses materiais apresentam um momento magnético resultante e uma alta e positiva susceptibilidade magnética ($0,01 - 10^6$).⁶

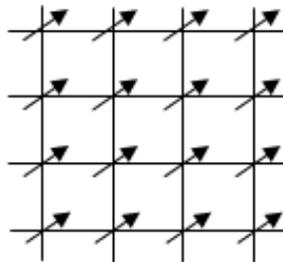


Figura 6. Representação do alinhamento paralelo dos momentos magnéticos em um material ferromagnético.

- Antiferromagnetismo: os momentos magnéticos de igual magnitude dos diferentes átomos estão alinhados antiparalelamente entre si, de modo que se anulam e o momento magnético resultante do material é zero (Figura 7). Eles apresentam uma susceptibilidade magnética pequena e positiva ($0 - 0,1$).⁶

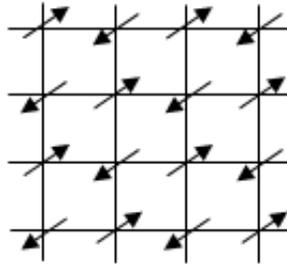


Figura 7. Representação do alinhamento antiparalelo dos momentos magnéticos em um material antiferromagnético.

- Ferrimagnetismo: tal qual no antiferromagnetismo, os momentos magnéticos dos diferentes átomos estão alinhados antiparalelamente entre si. Entretanto, a magnitude desses diferentes momentos magnéticos é desigual, levando a um momento magnético resultante diferente de zero (Figura 8).

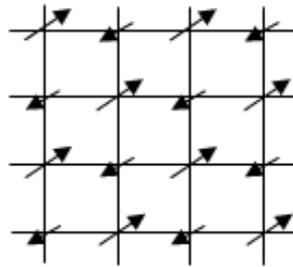


Figura 8. Representação do alinhamento antiparalelo dos momentos magnéticos em um material ferrimagnético.

Em um cristal, portanto, a magnetização é resultado da interação dos momentos magnéticos de muitos átomos. Para que a energia magnetostática desse sistema seja minimizada, ele se subdivide em regiões com diferentes tamanhos e formas, em cujos interiores os momentos magnéticos tendem a se alinhar espontaneamente, em uma mesma direção, gerando momentos magnéticos resultantes opostos. Essas regiões são chamadas de domínios magnéticos e seus limites são as “paredes de Bloch” (Figura 9).

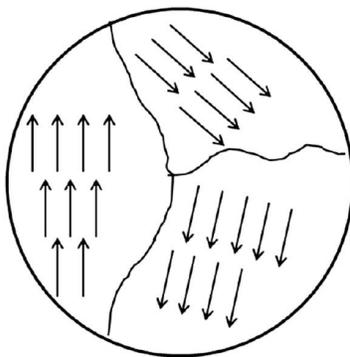


Figura 9. Representação dos domínios magnéticos dentro de uma amostra, separados pelas paredes de Bloch.⁹

O alinhamento espontâneo dos momentos magnéticos se dá segundo direções preferenciais, chamadas de eixos de fácil magnetização ou eixos de magnetização espontânea. Essa preferência na orientação dos momentos magnéticos está associada a uma energia (anisotropia magnética), que é mínima quando os momentos magnéticos estão orientados ao longo destes eixos.

Assim, cada um desses domínios possui um vetor magnetização próprio, oriundo do alinhamento dos momentos magnéticos individuais segundo os eixos de fácil magnetização dentro do domínio. Os vetores magnetização de todos os domínios da amostra podem não estar alinhados, originando uma magnetização menor do que a esperada se todos esses vetores estivessem perfeitamente alinhados. Diminuindo-se o tamanho das partículas, diminui-se o número de domínios até uma dimensão crítica, abaixo da qual se tem um monodomínio magnético.

Aplicando-se um campo magnético H a uma amostra, é possível notar que a sua magnetização M aumenta com o aumento da força do campo aplicado até um valor máximo, denominado magnetização de saturação, M_S (Figura 10). Nessa situação, os momentos magnéticos de todos os domínios estão alinhados. A curva de M versus H mostra um laço de histerese correspondente à magnetização e desmagnetização, porque nem todos os domínios magnéticos da amostra retornam às suas orientações originais, quando o campo magnético aplicado é reduzido, após ter atingido a M_S . Dessa forma, quando H retorna a zero, há uma magnetização remanente, M_R , que pode ser removida pela aplicação de um campo magnético reverso,

denominado campo coercivo, H_C . Materiais com um monodomínio magnético não apresentam laço de histerese, pois eles são superparamagnéticos (SPM).

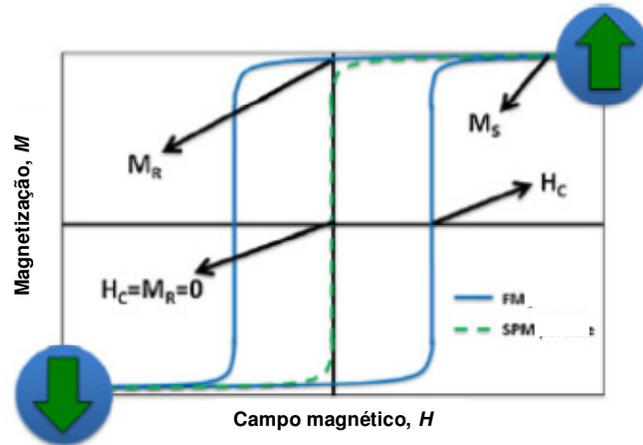


Figura 10. Curva de magnetização *versus* campo aplicado, onde FM é ferri/ferromagnético e SPM é superparamagnético.¹⁰

2.2.1.1. Superparamagnetismo

O fenômeno do superparamagnetismo pode ocorrer em monodomínios magnéticos ou em temperaturas muito elevadas.¹¹

Os fundamentos físicos do superparamagnetismo são baseados numa lei de ativação para o tempo de relaxação τ da partícula, tido como o tempo médio que a partícula leva para passar de um estado de equilíbrio a outro. Dois mecanismos de relaxação são fundamentais e possuem o seu tempo de relaxação característico: relaxação browniana e relaxação de Néel-Brown.

A relaxação browniana corresponde à rotação física das partículas propriamente ditas e o seu tempo de relaxação, τ_B (Equação 4),^{3,12} depende das propriedades hidrodinâmicas do fluido no qual as nanopartículas estão dispersas:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_B}{k_B T} \quad \text{(Equação 4)}$$

onde, η é a viscosidade do meio no qual às partículas estão suspensas; V_B é o volume hidrodinâmico da partícula que inclui qualquer camada não-magnética; k_B é a constante de Boltzmann; e T a temperatura.

Já a relaxação de Néel-Brown diz respeito à rotação dos momentos magnéticos dentro de cada partícula e o seu tempo de relaxação, τ_N (Equação 5)¹², sobre o qual se apoia o superparamagnetismo, é determinada pela energia de anisotropia magnética das nanopartículas superparamagnéticas relativa à energia térmica:

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{K_\alpha V}{k_\beta T}\right) \quad \text{(Equação 5)}$$

onde, τ_0 é tempo de relaxação do *spin* (da ordem de 10^{-9}); K_α é a densidade de energia anisotrópica; V é o volume da partícula. O produto de K_α e V fornece a barreira de energia, E , que separa os dois estados de equilíbrio.¹¹

Uma partícula é dita superparamagnética quando τ_N é menor que o tempo necessário para a realização de uma medida, t_m . Entretanto, se τ_N for maior que t_m , a partícula se encontra no chamado estado “bloqueado”. Assim, se $k_\beta T \gg E$, ou seja, para altas temperaturas ou volumes muito pequenos, τ_N tende a ser menor que t_m , os momentos magnéticos das partículas flutuam livremente e o sistema está no estado superparamagnético. Por outro lado, se $k_\beta T \ll E$, ou seja, em temperaturas mais baixas e para partículas com volume maior, τ_N tende a ser maior que t_m , de modo que o momento da partícula se encontra em um vale durante a medida e o sistema está no estado “bloqueado” (Figura 11). Então, para partículas muito pequenas, ΔE é comparável a $k_\beta T$ à temperatura ambiente, de maneira que elas podem apresentar superparamagnetismo nessa condição. Assim, na ausência de um campo magnético externo, os momentos magnéticos das partículas estão orientados aleatoriamente. Quando um campo magnético é aplicado, os momentos magnéticos tendem a se orientar na direção desse campo, que, a partir de certo valor, conduz todos os momentos magnéticos a se alinharem paralelamente à sua direção, atingindo a magnetização de saturação. Na medida em que o campo é reduzido, não há magnetização remanente e, portanto, não há laço de histerese. Isso evita, por exemplo, que as nanopartículas magnéticas superparamagnéticas se

aglomerem no corpo na ausência de um campo magnético externo, podendo provocar a obstrução de vasos sanguíneos.

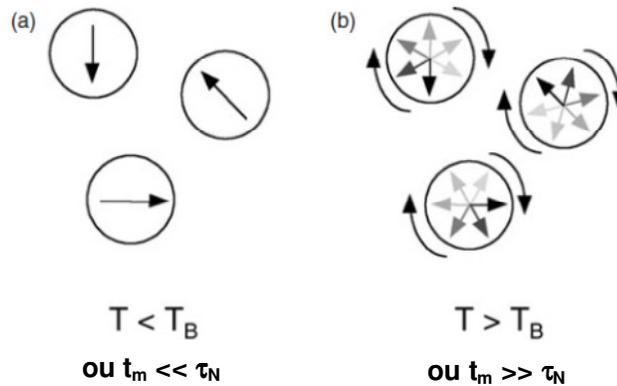


Figura 11. Ilustração do conceito de superparamagnetismo. Os círculos representam três nanopartículas magnéticas e as setas, a direção da magnetização de rede nessas partículas.¹³

2.2.2. GEOMETRIA

A geometria das nanopartículas está intimamente relacionada ao seu tempo de permanência na circulação sanguínea, cujo aumento permite a maior acumulação dos sistemas magnéticos nos tecidos alvo, potencializando a sua efetividade. A rápida remoção desses sistemas da circulação pode reduzir substancialmente a sua funcionalidade biomédica. Dessa forma, a busca pelo aumento do tempo de permanência dos sistemas magnéticos na circulação tem sido um dos desafios no desenvolvimento desses sistemas.

O sistema mononuclear fagocitário (SMF), também conhecido como sistema reticuloendotelial (SRE) é o principal responsável pela remoção das nanopartículas magnéticas da circulação. O SMF atua, dentre outras coisas, na remoção de células velhas, mortas ou alteradas e corpos estranhos, em várias reações inflamatórias e na destruição de micróbios e células tumorais.¹⁴ No processo de remoção das nanopartículas magnéticas, as proteínas do plasma (opsoninas) funcionam como marcadores, se adsorvendo na superfície das nanopartículas, que são então, reconhecidas e removidas da corrente sanguínea pelas células do SMF.

2.2.2.1. Dimensões

As dimensões das nanopartículas influenciam diretamente a sua trajetória no organismo. O limite superior da dimensão das nanopartículas é determinado pelo SMF e o limite inferior, pela filtração renal: nanopartículas maiores que 100 nm são geralmente opsonizadas e eliminadas da circulação via SMF; nanopartículas com 5-6 nm de diâmetro são removidas pela filtração renal e excretadas pela urina.¹⁵ Em geral, quanto maior uma partícula, menor o seu tempo de permanência na circulação sanguínea.¹⁶ Dessa maneira, é geralmente aceito que nanopartículas com diâmetro de 10 –100 nm são farmacodinamicamente apropriadas para aplicações *in vivo*.

Uma das maneiras das nanopartículas alcançarem o alvo é através do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (do inglês *Enhanced Permeability and Retention Effect – EPR*). Esse fenômeno se baseia em anormalidades estruturais nos vasos sanguíneos de certas patologias, como tumores, inflamações ou infecções, ou seja, esses tecidos possuem vasos sanguíneos “vazados” que permitem que certas dimensões de partículas extravasem e se acumulem mais no alvo do que em tecidos normais (Figura 12). Assim, as dimensões das nanopartículas podem ainda ser exploradas no desenvolvimento desses sistemas, visando o aproveitamento desse efeito.

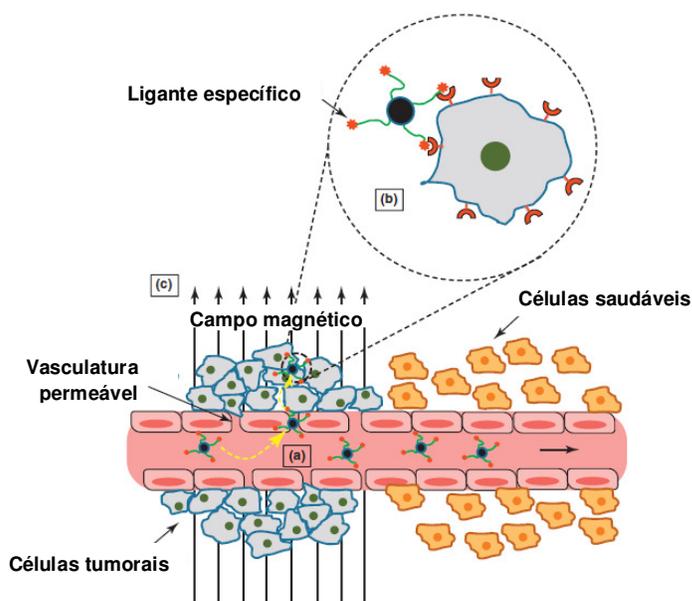


Figura 12. Representação das modalidades de direcionamento das nanopartículas magnéticas para tumores. (a) EPR; (b) direcionamento molecular; (c) direcionamento magnético.¹⁷

2.2.2.2. Forma

Além da dimensão, as propriedades das nanopartículas magnéticas estão relacionadas também à sua forma. Nanopartículas esféricas têm sido a forma clássica estudada e utilizada em aplicações biomédicas, apesar de modelos teóricos terem apontado os benefícios do uso de partículas não-esféricas no carreamento de drogas, baseados na influência da sua forma na internalização celular e nas dinâmicas vasculares.^{18,19} Recentemente, muitos estudos vêm propondo o uso de nanopartículas alongadas para essas finalidades.^{20,21}

Uma vez administradas por via intravascular, as nanopartículas são transportadas pelo fluxo sanguíneo e aderem às paredes dos vasos sanguíneos, em condições apropriadas. A partir daí, elas têm que controlar a internalização celular, evitando-a ou favorecendo-a, dependendo dos objetivos do tratamento. Decuzzi e colaboradores²⁰ dividiram essa trajetória didaticamente em três eventos: dinâmica de marginação, adesão firme e controle da internalização.

Dinâmica de marginação

Marginação é um termo conhecido em fisiologia, convencionalmente utilizado para descrever o deslocamento leucocitário ou plaquetário da porção central do fluxo sanguíneo para a periferia do fluxo, ao longo das paredes endoteliais, em casos inflamatórios. Quando esse conceito é aplicado às nanopartículas, trata-se do processo do seu deslocamento da porção central do fluxo, para as proximidades das paredes endoteliais, onde elas devem se acumular, preferencialmente. Esse acúmulo é desejável por dois motivos principais: (1) com a maior proximidade, a probabilidade das interações entre as nanopartículas e as paredes dos vasos aumenta, possibilitando, dentre outras coisas, o seu extravasamento pelas fenestrações do endotélio e a expressão mais efetiva dos marcadores celulares, quando ligados a elas; (2) as nanopartículas podem passar mais facilmente dos vasos sanguíneos com maior calibre para os de menor calibre, se acumulando na microcirculação.

As hemácias, ao contrário, se concentram na porção central do fluxo sanguíneo, evitando interações com as paredes endoteliais. A consequência

imediate disso é a formação de uma camada livre de hemácias nas proximidades da parede, cuja espessura varia com o calibre do vaso e com a velocidade média do fluxo sanguíneo (Figura 13). As nanopartículas desenvolvidas para circular no fluxo mais marginal tendem a se acumular nessa camada livre de células, onde se observa quase um fluxo laminar linear.

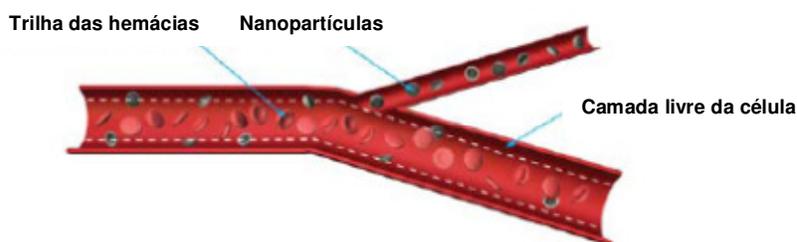


Figura 13. As partículas tendem a se acumular nas proximidades das paredes dos vasos sanguíneos e se deslocam mais facilmente para os vasos sanguíneos de menor calibre, o que pode aumentar a sua acumulação nessas regiões.²⁰

As forças de resistência hidrodinâmica e de empuxo, bem como o torque exercido pelo fluxo sanguíneo, dependem da geometria e da orientação da partícula em relação à direção do fluxo e mudam constantemente. Estudos mostraram que nanopartículas esféricas submetidas a um fluxo laminar linear se movimentando nas proximidades de uma parede em um fluido viscoso, só podem se deslocar lateralmente sob a ação de uma força externa que force esse deslocamento.²² A Figura 14 mostra a trajetória de uma partícula esférica e outra elipsoidal se deslocando em um tubo imitando um capilar. Assim que o fluxo se inicia, a partícula esférica se move para uma distância de equilíbrio da parede e segue o curso nessa linha. Já a partícula elipsoidal roda e translada seguindo o fluxo da corrente, se movimentando lateralmente de um lado para o outro do capilar, explorando as paredes do tubo. Isso porque partículas não-esféricas experimentam movimentos mais complexos que podem ser usados para controlar as dinâmicas de marginação, sem a necessidade da ação de forças externas. Foi mostrado que, para partículas não-esféricas, a velocidade de desvio lateral é diretamente relacionada à sua razão de aspecto, com um máximo entre os dois extremos: a esfera (razão de aspecto unitária) e o disco (razão de aspecto infinita).²³

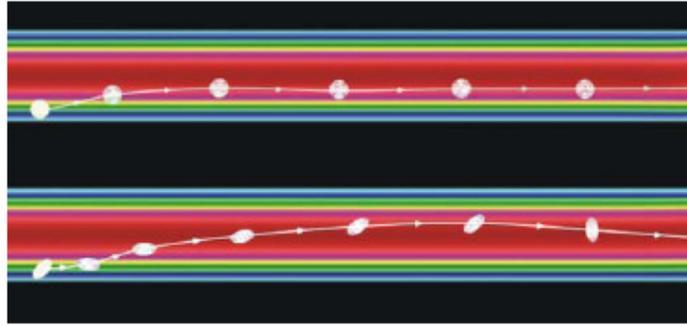


Figura 14. A trajetória de uma partícula esférica e uma elipsoidal em um capilar idealizado sob típicas condições hidrodinâmicas capilares.²⁰

Adesão firme

As partículas se movendo nas proximidades das paredes do vaso sanguíneo podem se aderir firmemente às células endoteliais por meio de interações específicas e não-específicas, em condições apropriadas de cisalhamento hidrodinâmico na parede e de tipo e nível de expressão dos receptores moleculares. Essa etapa é crítica, visto que a adesão deve superar as forças hemodinâmicas exercidas sobre a partícula pelo fluxo sanguíneo, que tende a retirar a partícula do sítio ao qual ela aderiu.

Estudos mostraram que para qualquer forma da partícula, existe um volume ótimo para o qual a força de adesão é máxima e que as partículas achatadas (razão de aspecto > 1) são mais efetivas na adesão a uma superfície sob um fluxo laminar do que as clássicas esféricas (razão de aspecto ≈ 1) em um volume fixo.¹⁸

Controle da internalização

Uma vez aderidas às células endoteliais, as partículas podem ou não ser internalizadas, dependendo do objetivo da sua aplicação. A internalização pelos macrófagos depende não exatamente da forma da partícula como um todo, mas da geometria local no ponto de primeiro contato com o macrófago.²⁴ Isso determinará se ocorrerá a fagocitose ou simplesmente o espraiamento sobre as partículas.

A geometria local varia não só entre diferentes partículas, mas também em pontos diferentes de contato inicial do macrófago em uma mesma partícula, exceto para partículas esféricas. A Figura 15 mostra um exemplo no qual os

macrófagos se ligam às micropartículas com formato de discos elipsoidais de poliestireno (PS) em pontos iniciais de contato com geometria diferente. A internalização ocorre rapidamente (3 min) quando os macrófagos se ligam às micropartículas ao longo do maior eixo (Figura 15-A). A sua membrana envolve todo o comprimento da micropartícula em um movimento único e coordenado. Quando os macrófagos se ligam às mesmas micropartículas ao longo do menor eixo (o lado com menor curvatura), as micropartículas não são internalizadas nem após 2 h (Figura 15-B). O que acontece é o espriamento sobre a superfície em um movimento não sincronizado, com frentes se movendo em direções diferentes, em tempos diferentes. Dessa maneira, micropartículas esféricas são internalizadas mais rapidamente do que partículas não-esféricas, visto que, independente do ponto de contato do macrófago, se dará o mostrado na Figura 15-A. Esse modelo pode ser um ponto de partida para o estudo da influência da forma na internalização de nanopartículas.

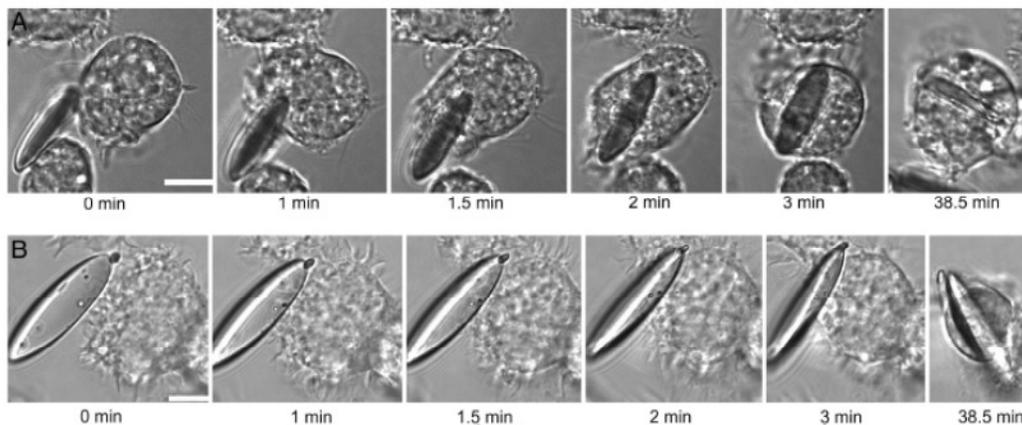


Figura 15. Clipes de vídeo-microscopia por *time-lapse* abrangendo 39 minutos da interação entre macrófagos e micropartículas idênticas de PS não opsonizadas com forma de disco elipsoidal (eixo maior 14 μm e eixo menor 3 μm) em duas orientações diferentes. (A) o macrófago se liga ao longo do maior eixo da micropartícula e a internaliza completamente em 3 min. (B) o macrófago se liga ao lado achatado de uma micropartícula idêntica e se espriam, mas não a internaliza.²⁴

Chithrani e colaboradores²⁵ estudaram a dependência da forma e tamanho de nanopartículas de ouro em sua absorção por células de mamíferos. Eles observaram que nanopartículas esféricas têm maior

probabilidade de entrarem nas células do que nanopartículas alongadas. Geng e colaboradores²⁶ mostraram que as nanopartículas cilíndricas estudadas por eles, as filomicelas, tendem a permanecer mais tempo na corrente sanguínea de camundongos do que as suas equivalentes esféricas, que são eliminadas rapidamente. Dessa maneira, é interessante observar que, a escolha da forma das nanopartículas está diretamente relacionada ao objetivo de sua aplicação.

Além disso, Cribb e colaboradores²⁷ assinalaram outras vantagens em se usar nanopartículas não-esféricas, no caso, nanopartículas cilíndricas, como carreadores de fármacos, em certos contextos fisiológicos, como matriz extracelular, barreiras de muco e fluidos sinoviais. Eles observaram que as nanopartículas cilíndricas utilizadas provocaram a pseudoplasticidade nos meios estudados, em especial no muco, ou seja, elas diminuíram a viscosidade relativa dos meios pelo aumento da tensão de cisalhamento. Apesar dessas nanopartículas experimentarem uma maior resistência, elas também experimentaram uma força motriz maior e, portanto, uma maior tensão de cisalhamento e capacidade de provocar a pseudoplasticidade. Confrontando as duas tendências, os autores notaram que as nanopartículas cilíndricas alcançam velocidade muito superior às nanopartículas esféricas nesses meios com a aplicação de um mesmo campo. Dessa forma, a opção por nanopartículas cilíndricas diminui a necessidade de campos fortes.

2.2.2.2.1. ANISOTROPIA MAGNÉTICA DE FORMA

Em relação às propriedades magnéticas de nanopartículas alongadas, uma das vantagens mais evidentes de seu uso é que elas apresentam anisotropia magnética de forma, ao passo que nanopartículas esféricas são isotrópicas.

A anisotropia magnética de forma é uma propriedade que reflete a existência de uma direção preferencial de magnetização dependente da forma da partícula. Essa anisotropia está relacionada com a energia desmagnetizante, descrita pela Equação 6:²⁸

$$E_d = -\frac{1}{2} \vec{H}_d \cdot \vec{M}_S \quad \text{(Equação 6)}$$

onde, $H_d = N_d M_S$ é o campo desmagnetizante e N_d é o coeficiente de desmagnetização na direção de \vec{M}_S . Para uma partícula elipsoidal, com eixo maior a , a Equação 6 assume a forma da Equação 7:²⁸

$$E_d = \frac{1}{2} M_S^2 N_a + \frac{1}{2} (N_b - N_a) M_S^2 \sin^2 \theta \quad \text{(Equação 7)}$$

na qual, N_a e N_b são os fatores desmagnetizantes e θ é o ângulo entre a magnetização e o eixo de fácil magnetização. Assim, E_d é anisotrópica com relação à forma externa do cristal, que determina a separação dos pólos de superfície para diferentes orientações de magnetização. Ela é uniaxial, com o eixo fácil de magnetização sendo paralelo ao eixo maior, isto é, para $\theta = 0^\circ$ ou $\theta = 180^\circ$.

Dessa forma, os momentos magnéticos de nanopartículas esféricas estão dispostos aleatoriamente e tendem a se cancelar, diluindo a força do sinal magnético. Já nas nanopartículas elipsoidais, eles tendem a se orientar segundo o seu eixo longo, de modo que eles estarão sempre apontados para dois sentidos possíveis, dentro de uma mesma direção. Assim, a força do sinal magnético é potencializada. Ou seja, partículas alongadas experimentam uma maior força quando comparadas às partículas esféricas de mesmo volume.

Rebolledo e colaboradores²⁹ citaram ainda algumas outras situações em que se espera um comportamento diferenciado entre nanopartículas anisotrópicas e isotrópicas, em meio biológico. São elas: em aplicações de imagens por ressonância magnética e tratamento de câncer por hipertermia, em que se esperam diferenças nos tempos de relaxação; em sistemas transportadores de drogas e de genes, nos quais a vetorização magnética tende a ser favorecida, visto que o gene também tem forma anisotrópica.

2.2.3. TOXICIDADE

Apesar do número de publicações sobre materiais nanoparticulados ter crescido significativamente nos últimos anos, o foco da maior parte delas está na síntese e desenvolvimento de novos materiais e menos de 1% tratam dos

seus impactos biológicos.³⁰ Uma vez que as aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas envolvem o uso em humanos e animais, faz-se necessária a avaliação da toxicidade desses sistemas.

Um dos paradigmas para o uso de nanopartículas *in vivo* é a toxicidade derivada da produção de excesso de espécies de oxigênio reativo (*ROS*).^{30,31,32} Acredita-se que as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro catalisam a geração de *ROS* por meio da reação de Fenton:³²



ROS são fisiologicamente necessárias e, em níveis moderados, desempenham papéis específicos no organismo. Entretanto, o excesso dessas espécies é um indicativo de estresse oxidativo e pode danificar as células pela peroxidação de lipídeos, alteração de proteínas, ruptura do DNA, interferência em funções de sinalização e modulação da transcrição gênica.³⁰

Os métodos de análise *in vitro* são importantes no estudo da toxicidade de materiais nanoparticulados porque têm baixo custo e geram resultados rapidamente e com boa reprodutibilidade, sem o uso de animais.³⁰ A interação desses sistemas com o sistema biológico *in vivo* é dinâmica e complexa, de maneira que os testes *in vivo* são indispensáveis em momentos posteriores aos testes *in vitro*, com caráter preliminar.

2.3. Química de Superfície e Biocompatibilidade

O recobrimento da superfície das nanopartículas é uma estratégia utilizada para reduzir ou eliminar alguns comportamentos indesejáveis nas aplicações biomédicas. O seu intuito é aumentar a biocompatibilidade das nanopartículas. Eles são utilizados, dentre outras finalidades, para estabilizar as partículas e prevenir a aglomeração; retardar internalização celular das nanopartículas ou facilitar, dependendo dos objetivos do seu uso; modificar a carga ou a composição da superfície, influenciando a sua biodistribuição e a geração de *ROS*; prevenir a sua dissolução e a liberação de íons tóxicos.

Muitos grupos de materiais têm sido utilizados para modificar a química de superfície de nanopartículas magnéticas, visando aplicações biomédicas:

- Polímeros biocompatíveis: dextrana, amido, quitosana, polietileno glicol, poliésteres alifáticos derivados de ácidos lático e glicólico;
- Surfactantes orgânicos: oleato de sódio, dodecilamina;
- Metais: ouro;
- Óxidos inorgânicos: sílica;
- Moléculas e estruturas bioativas: lipossomos, peptídeos, ligante/receptor.

2.4. Aplicações Biomédicas

As nanopartículas magnéticas são aplicadas com finalidades terapêuticas e diagnósticas em biomedicina, sendo que vários sistemas têm sido desenvolvidos para integrar as duas funções, o que deu origem ao termo “função teranóstica”.^{17,32} Dentre as aplicações terapêuticas, iremos nos concentrar nos sistemas de carreamento de drogas e no tratamento contra o câncer por hipertemia.

2.4.1. SISTEMA DE CARREAMENTO DE DROGAS

As maiores desvantagens do tratamento convencional contra o câncer com quimioterápicos são os efeitos adversos provenientes da não-especificidade desse tratamento. Uma vez que a via de administração dos agentes terapêuticos é intravenosa, a sua distribuição é sistêmica e a natureza não-específica dessas drogas leva, portanto, ao ataque não somente de células tumorais, que são os alvos primários, como também de células normais e saudáveis, resultando nos tão conhecidos efeitos adversos da quimioterapia. Os estudos de sistemas magnéticos nanoparticulados para esse fim se baseiam no potencial de redução dos efeitos adversos do tratamento com agentes quimioterápicos convencionais pela redução da sua distribuição sistêmica, bem como pela possibilidade de administração de doses menores,

porém mais acuradas dos agentes terapêuticos, visto que serão liberadas diretamente e somente no alvo.

Os primeiros estudos do uso de micro e nanopartículas magnéticas como carreadores de drogas para alvos específicos no corpo datam do final da década de 70.^{2,33,34} Os autores desses estudos desenvolveram e testaram *in vivo* micro e nanopartículas magnéticas às quais agentes terapêuticos podem se ligar. Desde então, vários grupos têm realizado pesquisas visando ao desenvolvimento e às aplicações biomédicas de sistemas magnéticos nanoparticulados.^{21,35,36,37}

Esses sistemas, cujos núcleos são nanopartículas magnéticas às quais, de modo resumido, estão ligadas drogas, são, em geral, administrados por via intravascular e transportados pelo fluxo sanguíneo. O diferencial desse tratamento é a especificidade advinda da aplicação de um campo magnético externo, usado para guiar e reter os sistemas magnéticos em um alvo específico (Figura 16). Esses sistemas podem, alternativamente, ser injetados diretamente na área de interesse. Só após alcançarem e se concentrarem no alvo, as drogas são liberadas, ou pela atividade enzimática ou por mudanças nas condições fisiológicas, levando a uma maior absorção dos fármacos pelas células-alvo. Dessa forma, doses menores de droga podem ser administradas, sem sobrecarregar o organismo com as doses massivas utilizadas na quimioterapia convencional.

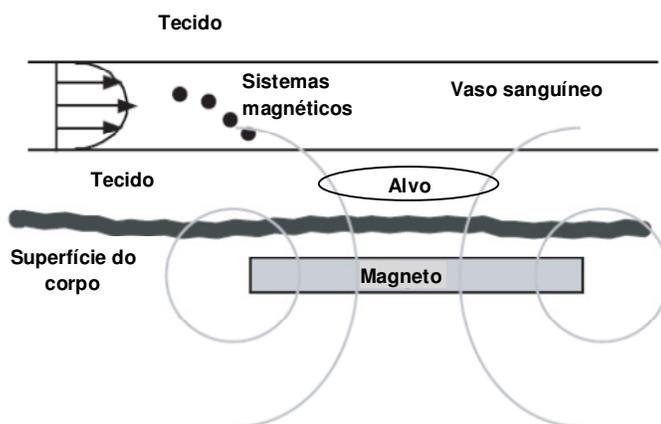


Figura 16. Corte transversal do funcionamento de um sistema magnético hipotético de veiculação de drogas.¹³

Os princípios físicos que fundamentam a dispersão das nanopartículas magnéticas *in vivo* baseiam-se na força exercida por um gradiente de campo magnético externo sobre uma nanopartícula superparamagnética, de acordo com a Equação 8:¹³

$$F_m = V_m \Delta\chi \nabla \left(\frac{B^2}{2\mu_0} \right) \quad \text{(Equação 8)}$$

onde, F_m é a força magnética; V_m é o volume da partícula; $\Delta\chi = \chi_m - \chi_w$ é a susceptibilidade magnética efetiva da partícula em relação à água; B é a indução magnética; e μ_0 é a permeabilidade do espaço livre. Assim, os sistemas magnéticos são separados da solução circundante por meio de sua imobilização pela força magnética F_m ao passarem por uma região onde existe uma gradiente de campo magnético. Essa força deve superar a força de resistência hidrodinâmica, F_d , atuando na partícula magnética na solução fluente, ou seja, $F_m > F_d$, para que haja dispersão (Equação 9):¹³

$$F_d = 6\pi\eta R_m \Delta v \quad \text{(Equação 9)}$$

na qual, η é a viscosidade do meio circundante da célula; R_m é o raio da partícula magnética; e $\Delta v = v_m - v_w$ é a diferença entre as velocidades dos meios de diferentes viscosidades (da célula e da água).⁵

Widder e colaboradores³⁸ foram os primeiros a utilizar carreadores magnéticos para levar drogas citotóxicas (doxorrubicina) a sarcomas implantados na cauda de ratos. Eles conseguiram que 77% dos animais aos quais a droga foi administrada por sistemas magnéticos tivessem remissão total do sarcoma com apenas uma sessão de terapia, ao passo que nenhuma remissão ou regressão foi observada nos ratos tratados com sistemas não-magnéticos.

Lübbe e colaboradores³⁹ reportaram, em 1996, o primeiro experimento clínico realizado em humanos. A droga epirrubicina, ligada a carreadores magnéticos, foi administrada a pacientes que apresentavam diferentes tipos de câncer em estágio avançado. Eles já haviam sido tratados por quimioterápicos

convencionais, porém sem resultados satisfatórios. Os autores concluíram que o tratamento pareceu ser seguro, mas que ajustes necessitavam ser feitos para, dentre outras coisas, torná-lo mais efetivo.

Os sistemas magnéticos nanoparticulados podem carrear, além de drogas, genes, na chamada terapia gênica: o tratamento de doenças baseado na transfecção de material genético. A transfecção mediada por nanopartículas magnéticas, chamada de magnetofecção, foi demonstrada pela primeira vez, *in vitro*, em 2000, por pesquisadores da Universidade da Flórida,⁴⁰ com resultados promissores, visto que aumenta a especificidade e eficiência da transfecção. Desde então, tem sido estudada para a retificação de desordens genéticas, tratamentos contra cânceres, infecções virais ou para a produção de agentes que possam estimular o sistema imune.^{41,42,43}

2.4.2. HIPERTERMIA

Outro procedimento terapêutico utilizado no tratamento contra o câncer é a hipertermia induzida. Ela se baseia no aumento da temperatura de uma determinada região do corpo que esteja afetada por uma neoplasia para 41 – 46 °C,^{3,44} preferencialmente 42 – 44 °C,^{17,45} visando causar a lise de suas células tumorais, visto que elas são, em geral, mais sensíveis ao calor do que células normais. Esse procedimento é, frequentemente, utilizado em conjunto com outros procedimentos terapêuticos, como quimioterapia e radioterapia,⁴⁶ sobretudo por potencializar a ação dos agentes terapêuticos utilizados nesses tratamentos, sem aumentar o seu potencial citotóxico.⁴⁷

A hipertermia pode ser alcançada pela aplicação de laser, radiofrequência, microondas, ultrassom, infravermelho⁴⁸ ou implantes ferromagnéticos.⁴⁹ Um dos obstáculos desses métodos, entretanto, é a dificuldade em aquecer uniforme e especificamente a região do tumor à temperatura pretendida, sem, contudo, danificar as células normais vizinhas. As nanopartículas magnéticas surgem, então, como agentes de hipertermia alternativos para aquecer especificamente o alvo e assim, preservar os tecidos saudáveis. Esse método se baseia no fato de que partículas magnéticas, quando submetidas a um campo magnético alternado (CMA), são aquecidas

por processos de perda magnética. Nesses casos, o tratamento é chamado de magnetohipertermia (MHT) ou magnetotermocitolise.

Essas perdas magnéticas ocorrem durante o processo de reversão da magnetização no sistema das partículas magnéticas e podem ocorrer por diferentes mecanismos, mostrados na Figura 17: histerese, em materiais de multidomínios magnéticos; e relaxação browniana (Equação 4) e de Néel-Brown (Equação 5), em materiais superparamagnéticos de monodomínio. Em comparação às perdas magnéticas, a circulação de correntes parasitas induzidas em partículas magnéticas pequenas é desprezível.

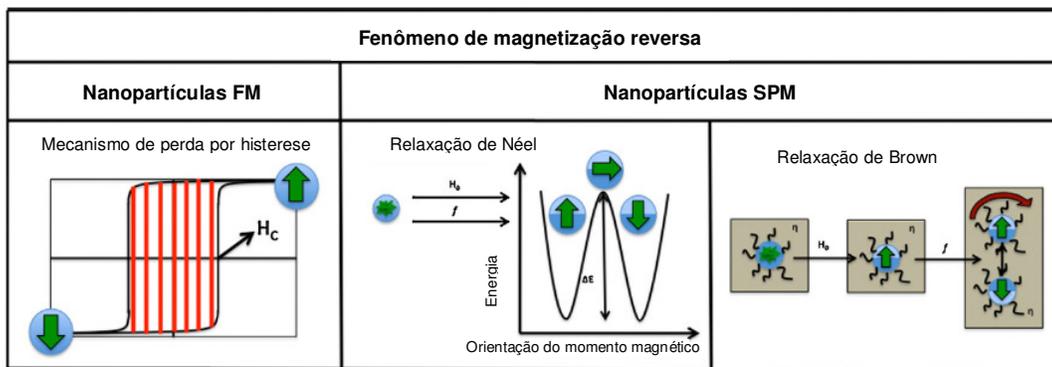


Figura 17. Fenômeno da reversão da magnetização para geração de calor sob o efeito de um CMA (H_0 , f). (esquerda) Mecanismo de geração de calor por perda por histerese para nanopartículas ferri e ferromagnéticas. Mecanismo de geração de calor por relaxação de (centro) Néel e (direita) Brown para nanopartículas superparamagnéticas.¹⁰

Para induzir a hipertermia especificamente no alvo, as nanopartículas magnéticas são guiadas e retidas na região tumoral por um gradiente de campo magnético externo (Figura 16), após a administração, como descrito na seção anterior. Aplica-se, então um CMA, de força e frequência tal, que a magnetização das partículas seja continuamente revertida, gerando calor necessário para causar a lise das células tumorais, que é liberado para as células vizinhas (Figura 18). Se essa temperatura puder ser mantida na faixa preferencial de 42 – 44 °C por 30 min ou mais,^{10,13} o câncer pode ser destruído. A minimização dos danos aos tecidos normais circunvizinhos faz da MHT uma técnica promissora para o tratamento de cânceres diversos.^{3,50,51,52,53,54}

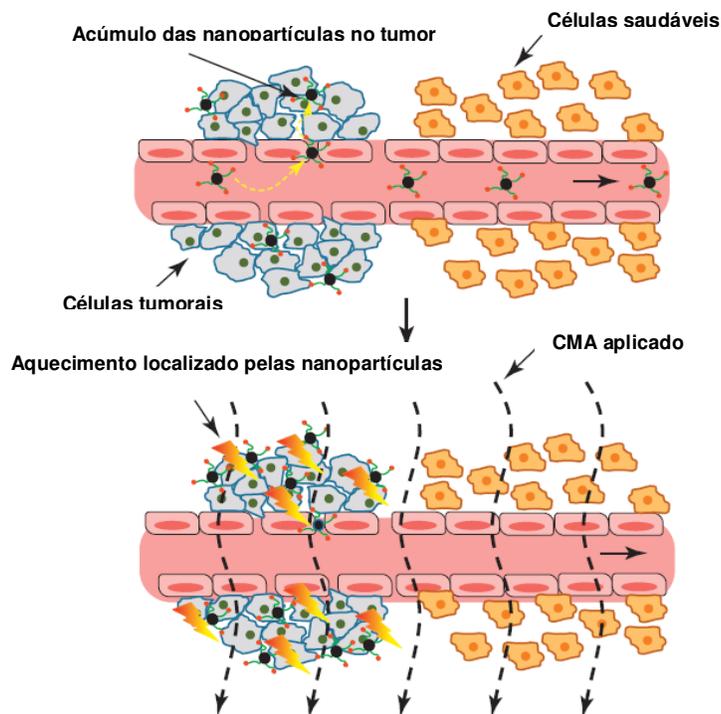


Figura 18. Princípios da MHT.¹⁷

A vasta possibilidade de biofuncionalização da superfície das nanopartículas pode ser explorada para afinar a sua capacidade de reconhecimento químico e, portanto, a sua especificidade pelas células tumorais.^{3,17} Quanto maior for a especificidade das nanopartículas por essas células, menor é o aquecimento das células normais e, portanto, os efeitos colaterais. O transporte das nanopartículas via sistema vascular, permite ainda que o tratamento por MHT possa ser realizado em tecidos mais profundos, que não poderiam ser tratados por hipertermia de outra maneira.

Gilchrist e colaboradores¹ foram os primeiros a propor o uso de nanopartículas de óxido de ferro no tratamento contra o câncer por hipertermia em 1957. Os estudos para aplicação dessa técnica em seres humanos, entretanto, se iniciaram com Jordan e colaboradores⁵⁵ apenas em 2001, quando eles apresentaram um novo sistema de terapia com campo magnético alternado para aplicação clínica da MHT utilizando fluidos magnéticos, visando aplicações no tratamento de glioblastomas e carcinoma de próstata. Esses estudos culminaram com o estudo de Maier-Hauff e colaboradores,⁵⁶ em 2007, que reportou o primeiro caso da aplicação de nanopartículas magnéticas para o tratamento de câncer por hipertermia em humanos.

A pesquisa envolveu 14 pacientes com glioblastoma multiforme, que foram tratados com uma combinação de radioterapia e sessões de MHT. As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foram injetadas em regiões de tumor, detectadas por imagens de ressonância magnética. Cada tumor recebeu de 0,1 a 0,7 mL do fluido magnético e foram, então, expostos a um campo magnético alternado de 100 kHz e 3,8 a 13,5 kA m⁻¹. Esse estudo mostrou que essas nanopartículas podem ser utilizadas com segurança para os pacientes no tratamento desse tipo de tumor cerebral, sendo depositadas nos alvos planejados e lá mantidas por semanas; e que as temperaturas de hipertermia podem ser atingidas. Contudo, não foram feitas considerações acerca da sobrevivência dos pacientes e do controle do tumor.

2.5. As Nanopartículas Magnéticas

Nanopartículas de óxido de ferro, em especial a magnetita (Fe₃O₄) e a maghemita (γ-Fe₂O₃), são as nanopartículas magnéticas mais usadas em aplicações biomédicas, devido às suas propriedades magnéticas e à sua toxicidade relativamente baixa no corpo humano. A Fe₃O₄ foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o uso como agente de contraste em imagem por ressonância magnética.⁵⁷

2.5.1. ESTRUTURA CRISTALINA DA MAGNETITA E MAGHEMITA

A estrutura cristalina da magnetita pode ser descrita em termos da estrutura do espinélio (MgAl₂O₄), classificada como empacotamento compacto cúbico (ecc) , esquematizado na Figura 19.

(Figura 20b). Em muitos sólidos, esses sítios são ocupados por outros átomos, sendo que os sítios octaédricos podem acomodar esferas de raio não superior a $0,414r$ e os sítios tetraédricos, esferas de raio não superior a $0,225r$, onde r é a relação entre os raios dos ânions.^{8,59}

As estruturas relacionadas ao espinélio podem ser dadas pela fórmula geral AB_2O_4 e consistem em um arranjo cúbico de face centrada (cfc) dos íons O^{2-} , no qual os íons A habitam em um oitavo dos sítios tetraédricos e os íons B, em metade dos sítios octaédricos (Figura 21). Ela geralmente é representada por $A[B_2]O_4$, com o colchete identificando a espécie localizada nos interstícios octaédricos.⁸

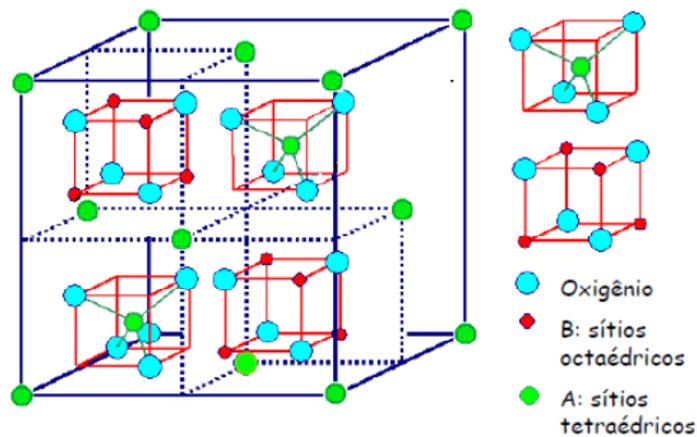


Figura 21. Um segmento da célula unitária de espinélio.⁵⁸

A estrutura da magnetita é do tipo espinélio invertido, no qual a distribuição geral dos íons é $B[AB]O_4$ (Figura 22). Assim, os sítios octaédricos são ocupados por A (Fe^{2+}) e B (Fe^{3+}), enquanto os sítios tetraédricos são ocupados por B (Fe^{3+}). Sua célula unitária possui 32 íons O^{2-} arranjados em cfc, com arestas de 0,839 nm, gerando 64 sítios tetraédricos, dos quais 8 estão ocupados por Fe^{3+} , e 32 sítios octaédricos, dos quais 16 estão ocupados por Fe^{2+} ou Fe^{3+} .^{6,8,59}

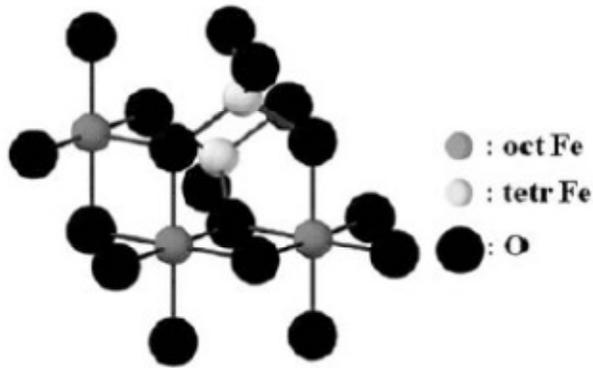


Figura 22. Estrutura cristalina da magnetita.⁹

A maghemita possui estrutura cristalina similar à magnetita, diferenciando-se pela ausência (ou diminuição) de Fe^{2+} no retículo cristalino, gerando vacâncias ou lacunas. Idealmente, há apenas cátions Fe^{3+} ocupando aleatoriamente 8 dos sítios tetraédricos e 16 dos sítios octaédricos gerados pelo arranjo em cc dos íons O^{2-} . A célula unitária possui arestas de 0,834 nm e é composta por 32 íons O^{2-} ; 21,33 cátions Fe^{3+} ; e 2,33 vacâncias, localizadas nos sítios octaédricos.⁶

2.5.2. PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DA MAGNETITA E MAGHEMITA

A magnetita ideal é ferrimagnética à temperatura ambiente e tem uma T_C de 577 °C. Os sítios tetraédricos e octaédricos em sua estrutura originam subredes magnéticas. Abaixo da T_C , os *spins* dos íons nos sítios tetraédricos e octaédricos são antiparalelos. Além disso, na célula unitária desse óxido, 8 dos 64 sítios da subrede tetraédrica estão ocupados por Fe^{3+} , e 16 dos 32 sítios octaédricos estão ocupados por Fe^{2+} ou Fe^{3+} , podendo, o arranjo de *spin* ser descrito como $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]\text{O}_4$, no qual os íons entre colchetes se localizam nos sítios octaédricos. A origem da magnetização se dá, portanto, pela diferença numérica de íons nas duas subredes e pela diferença de magnitude dos momentos magnéticos dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} . Nessa ferrita, o eixo de fácil magnetização é o (111).⁶

Tal qual a magnetita, a maghemita é ferrimagnética à temperatura ambiente. A T_C desse óxido é de difícil determinação, pois ele é instável em

temperaturas elevadas e se transforma em hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), sua forma polimórfica, acima de 440 °C. Contudo, ela foi estimada entre 547 e 713 °C.

2.5.3. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ALONGADAS

2.5.3.1. Métodos de Síntese de Nanopartículas Alongadas

Uma das metodologias utilizadas para a síntese das nanopartículas alongadas é a hidrólise forçada de sais de ferro na presença de certos ânions que influenciam a forma das partículas. Nesse procedimento, aproveita-se a vantagem de que cátions hidratados de ferro são desprotonados em soluções aquosas a temperaturas próximas de 100 °C. Dois dos ânions utilizados para essa finalidade são o fosfato (PO_4^{3-}) e o sulfato (SO_4^{2-}). Por meio de sua adsorção específica às faces da hematita paralelas ao eixo *c*, eles retardam o crescimento do cristal na direção normal a esse eixo, originando partículas alongadas.⁶⁰

Ozaki e colaboradores⁶¹ foram os primeiros a realizar essa síntese, de maneira que muitos estudos posteriores foram desenvolvidos, utilizando a mesma metodologia para a obtenção de partículas de hematita nesse formato.^{62,63,64,65,66} Eles desenvolveram dois procedimentos para a síntese de nanopartículas alongadas de hematita. No primeiro método, soluções aquosas ou etanol/água contendo cloreto de ferro (FeCl_3) e fosfato ou hipofosfito de sódio (NaH_2PO_4 ou NaH_2PO_2 , respectivamente) foram envelhecidas a 100 °C por diferentes períodos de tempo. O segundo método consistiu em, primeiramente, precipitar hidróxido de ferro pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) a uma solução de nitrato de ferro ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$), com subsequente adição de ácido clorídrico (HCl) e NaH_2PO_4 , seguido por envelhecimento a 100 °C. Os autores observaram que a adição de pequenas quantidades de íons fosfato ou fosfito levou a alteração na forma das partículas resultantes, tornando-as alongadas. Um ano depois, os autores publicaram um estudo no qual obtiveram maghemita a partir da hematita sintetizada, por tratamento térmico. As partículas obtidas mantiveram o formato das precursoras (Figura 23).⁶⁷

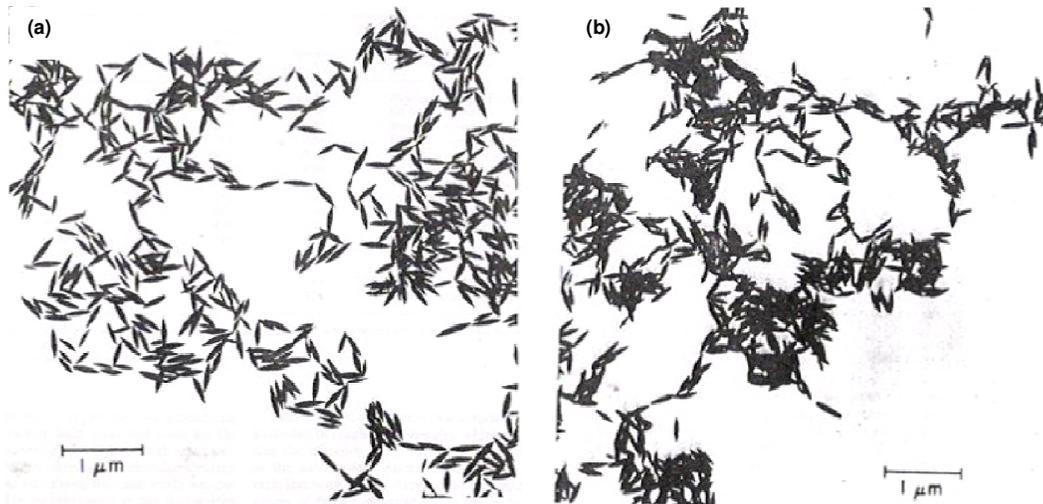


Figura 23. Micrografia de transmissão eletrônica de partículas alongadas de (a) hematita, preparadas em presença de íons fosfato; e (b) maghemita, preparadas a partir de tratamento térmico da hematita obtida.⁶⁷

Além dessa metodologia, Sugimoto e colaboradores⁶⁸ prepararam partículas alongadas de hematita, utilizando o método sol-gel, com adição de PO_4^{3-} e SO_4^{2-} . Ocaña e colaboradores⁶⁹ obtiveram nanopartículas de hematita pela precipitação de perclorato de ferro (III) ($\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$), na presença de ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) e PO_4^{3-} . É sabido que a ureia libera íons hidróxido, quando aquecida à sua temperatura de decomposição em solução aquosa, alcalinizando o meio.⁷⁰

Compostos orgânicos também foram utilizados para conferir a forma elipsoidal a essas partículas,⁷¹ tais como citratos,⁷² glicina⁷³ e asparagina.⁷⁴

As maiores dificuldades encontradas para a síntese de nanopartículas são o controle de sua forma e dispersão.

Capítulo

3

Parte Experimental

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

- Acetona, C_3H_6O , VETEC – Química Fina LTDA;
- Ácido clorídrico, HCl , P.A., VETEC – Química Fina LTDA;
- Ácido fosfórico, H_3PO_4 , 85%, P.A, VETEC – Química Fina LTDA;
- Ácido sulfúrico, H_2SO_4 , 95/97%, P.A., F. Maia S/A Ind.;
- Água Milli-Q;
- Dicromato de potássio, $K_2Cr_2O_7$, P.A., Quimiobrás – Indústrias Químicas Limitada;
- Difenilamina, $(C_6H_5)_2NH$, pureza $\geq 99\%$, Aldrich;
- Cloreto de mercúrio (II), $HgCl_2$, Merck;
- Cloreto estanoso dihidratado, P.A., $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, VETEC – Química Fina LTDA;
- Cloreto férrico hexahidratado, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, P.A., VETEC - Química Fina LTDA;
- Cloreto ferroso tetrahidratado, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, Merck;
- Hidróxido de amônia, NH_4OH , P.A., InLab.
- Sulfato ferroso hexahidratado, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Carlo Erba do Brasil;
- Sulfato férrico, $Fe_2(SO_4)_3 \cdot nH_2O$, Carlo Erba do Brasil;
- Tripolifosfato de sódio, $Na_5P_3O_{10}$, Sigma-Aldrich Co..

3.2. Metodologia

3.2.1. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

A síntese das nanopartículas foi realizada por coprecipitação em meio alcalino de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução aquosa a temperatura de ebulição, sob refluxo e agitação vigorosa. Alguns parâmetros foram variados com o objetivo de estudar as suas influências nas partículas resultantes e, assim, alcançar o sistema mais adequado para os fins desse estudo. Eles foram: tempo de reação, natureza dos contra-íons, proporção entre $Fe(II)$ e $Fe(III)$ e natureza da

base utilizada na alcalinização do meio, dando origem ao primeiro grupo de nanopartícula sintetizadas.

1. Tempo de reação: utilizando 1,5 mmol de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 20 mmol de ureia, para a alcalinização do meio, os tempos de reação das nanopartículas estudados foram:

- NP1A: 1 hora;
- NP1B: 2 horas e trinta minutos;
- NP1C: 4 horas;
- NP1D: 6 horas;
- NP1E: 8 horas;
- NP1F: 12 horas.

Diante dos resultados satisfatórios obtidos para a amostra NP1D, as próximas sínteses foram realizadas com seis horas de duração e, essa amostra, inserida em cada um dos grupos de sínteses, para fins de comparação.

2. Natureza dos contra-íons: utilizando 1,5 mmol de Fe(II), 3 mmol de Fe(III) e 20 mmol de ureia, para a alcalinização do meio, em uma síntese com seis horas de duração, variou-se a natureza dos contra-íons da seguinte maneira:

- NP2A: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- NP2B: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$;
- NP2C: $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$.

3. Proporção entre Fe(II) e Fe(III): utilizando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como reagentes e 20 mmol de ureia, para a alcalinização do meio, em uma síntese com seis horas de duração, variou-se a proporção entre Fe(II) e Fe(III):

- NP3A: 1,5 mmol de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,5 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$;
- NP3B: 3 mmol de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,5 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

4. Natureza da base utilizada na alcalinização do meio: utilizando 1,5 mmol de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, em uma síntese com seis horas de duração, a natureza da base utilizada para a alcalinização do meio foi variada, mantendo-se a sua concentração relativa:

- NP4A: 40 mmol de NH_4OH .

A Tabela 1 resume as amostras sintetizadas no primeiro grupo:

Tabela 1. Condições de síntese das nanopartículas do primeiro grupo.

Amostra	Tempo de reação (hora)	Natureza dos contra-íons	Proporção entre Fe(II):Fe(III)	Natureza da base
NP1A	1	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	Ureia
NP1B	2:30	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	Ureia
NP1C	4	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	Ureia
NP1D	6	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	Ureia
NP1E	8	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	Ureia
NP1F	12	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	Ureia
NP2A	6	Cl^- e Cl^-	1:2	Ureia
NP2B	6	SO_4^{2-} e SO_4^{2-}	1:2	Ureia
NP2C	6	Cl^- e SO_4^{2-}	1:2	Ureia
NP3A	6	SO_4^{2-} e Cl^-	1:1	Ureia
NP3B	6	SO_4^{2-} e Cl^-	2:1	Ureia
NP4A	6	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	NH_4OH

Todas as amostras foram resfriadas naturalmente, lavadas com água Milli-Q até pH neutro, centrifugadas e secas em estufa a 70 °C.

Após a caracterização desse grupo de nanopartículas, a síntese na qual se variou a natureza da base utilizada na alcalinização do meio (NP4A), foi selecionada para ser investigada paralelamente aos objetivos desse estudo, devido aos resultados satisfatórios obtidos. Assim, além da síntese do primeiro grupo de nanopartículas, que visou à obtenção de nanopartículas magnéticas alongadas de óxido de ferro, foi sintetizado um segundo grupo de nanopartículas de óxido de ferro, nesse caso esféricas, utilizando NH_4OH como base na alcalinização do meio.

Para as sínteses das nanopartículas do segundo grupo, foram adicionados 40 mmol de NH_4OH a uma solução aquosa contendo 1,5 mmol de

$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 3,0 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, lentamente e sob agitação suave à temperatura ambiente. A mistura resultante foi aquecida a temperatura de ebulição, sob refluxo e agitação vigorosa. A fim de se alcançar o sistema mais adequado para aplicações biomédicas, o tempo de reação foi variado:

- NPS0: 0 hora (a mistura não foi aquecida);
- NPS1: 1 hora;
- NPS3: 3 horas;
- NPS6: 6 horas;
- NPS9: 9 horas.

A Tabela 2 resume as amostras sintetizadas no segundo grupo:

Tabela 2. Condições de síntese das nanopartículas do segundo grupo.

Amostra	Tempo de reação (hora)	Natureza dos contra-íons	Proporção entre Fe(II):Fe(III)	Natureza da base
NPS0	0	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	NH_4OH
NPS1	1	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	NH_4OH
NPS3	3	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	NH_4OH
NPS6	6	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	NH_4OH
NPS9	9	SO_4^{2-} e Cl^-	1:2	NH_4OH

Todas as amostras foram resfriadas naturalmente, lavadas com água Milli-Q até pH neutro, centrifugadas e secas em estufa a 70 °C.

3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

As amostras sintetizadas foram caracterizadas pelas técnicas descritas a seguir.

3.2.2.1. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das amostras sintetizadas e dos reagentes utilizados foram obtidos em um espectrômetro da Nicolet, Modelo 6700, com 128 varreduras, em uma resolução de 4 cm^{-1} . Todos os materiais preparados

foram diluídos em KBr, com 1% em massa das amostras (1 mg da amostra para 100 mg de KBr). Os *softwares* Origin 6.0 e OriginPro 8 foram utilizados para a obtenção das figuras apresentadas nesse estudo.

3.2.2.2. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos utilizando um microscópio inVia Raman da marca Renishaw, equipado com microscópio óptico Leica com objetiva de 50x, na faixa de 100 cm^{-1} – 3200 cm^{-1} . Um laser de He-Ne (632,8 nm) foi utilizado para excitação das amostras. A resolução espectral foi de 5 cm^{-1} . O *software* OriginPro 8 foi utilizado para a obtenção das figuras apresentadas nesse estudo.

3.2.2.3. Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas das amostras foram obtidos em um difratômetro de pó da Bruker, modelo D8 Focus, com radiação $\text{CuK}\alpha = 1,5406\text{ \AA}$ a 40 kV e 30 mA. A varredura foi realizada a $0,5^\circ\text{ min}^{-1}$ e os valores de 2θ foram analisados na região de 20 a 70° .

A *Lei de Bragg* (Equação 10) foi utilizada para o cálculo das distâncias interplanares:

$$\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{(Equação 10)}$$

onde λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d é a distância interplanar e θ é o ângulo de incidência da radiação.

Uma vez que o objetivo da síntese é a obtenção de magnetita e maghemita, a equação para o cálculo de d em sistemas cúbicos (Equação 11) foi utilizada para a indexação dos picos, por meio da comparação entre os valores experimentais de d e os seus respectivos índices hkl do banco de dados PDF. Os ajustes dos picos dos difratogramas foram feitos com o *software* Origin 6.0, que, juntamente ao OriginPro 8, foi usado para a obtenção das figuras apresentadas nesse estudo.

$$d_{hkl} = a/\sqrt{h^2 + k^2 + l^2} \quad \text{(Equação 11)}$$

Essa equação também foi usada para calcular os parâmetros de cela das nanopartículas de magnetita e maghemita sintetizadas.

3.2.2.4. Medidas de Propriedades Magnéticas

As propriedades magnéticas das amostras foram obtidas a temperatura ambiente e em regime quase-estático, por meio de um magnetômetro de amostra vibrante (*Vibrating Sample Magnetometer, VSM*), modelo EV9, fabricado pela empresa ADE-MAGNETICS (Figura 24), na Universidade Federal de Goiás (UFG). A precisão de medidas desse VSM é de 10^{-6} emu. As bobinas são resfriadas com água e podem atingir um campo magnético de até 2 T.

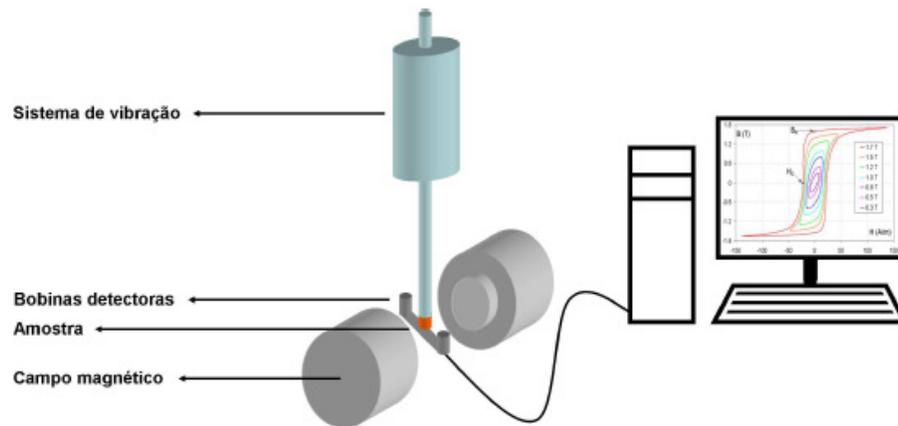


Figura 24. Diagrama do VSM.

Os valores de M_S , M_R e H_C foram obtidos graficamente utilizando o *software* OriginPro 8, que, juntamente ao Origin 6.0, foi utilizado para a obtenção das figuras apresentadas nesse estudo.

3.2.2.5. Microscopia de Força Atômica (MFA)

As imagens por MFA foram obtidas utilizando-se um microscópio de força atômica Shimadzu SPM-9600, na Embrapa Recursos Genéticos e

Biotecnologia, operado em modo dinâmico, obtendo-se sinal de aquisição de topografia e fase, simultaneamente. A ponteira utilizada foi a PPP-NCHR da Nanosensors™, recoberta com Al, com raio de curvatura < 10 nm, constante de mola de 42 N m⁻¹ e frequência de ressonância de, aproximadamente, 330 kHz. Para preparação das amostras, as nanopartículas foram dispersas em H₂O Milli-Q, com auxílio de um banho de ultrassom, depositadas em substrato de muscovita e secas a temperatura ambiente.

Os *softwares* utilizados para o processamento das imagens foram o SPM 9600 *off-line* e o WSxM versão 5.0. Foi realizada a correção de plano automática 2D e o ajuste horizontal das imagens.

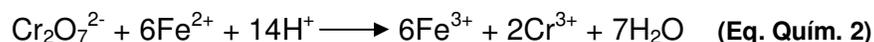
3.2.2.6. Microscopia de Transmissão (MET)

As imagens por MET foram obtidas, utilizando-se um microscópio de transmissão JEOL 1011, operando a 80 kV, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB). Para preparação das amostras, as nanopartículas foram dispersas em H₂O Milli-Q, com auxílio de um banho de ultrassom, depositadas em tela de cobre de 300 malhas cobertas com Formvar 0,4% e secas a temperatura ambiente, por 24 h em papel filtro.

As partículas foram medidas, utilizando o *software* ImageJ, versão 1.43. A partir desses resultados, os histogramas de distribuição de dimensões foram feitos com o auxílio do *software* OriginPro 8, utilizando a medição de 100 partículas.

3.2.2.7. Determinação de Fe(II) e Ferro Total pelo Método de Dicromatometria

A determinação de Fe(II) e ferro total foi realizada pelo método da Dicromatometria. Nesse método, o Fe(II) é dosado, de acordo com a reação de óxido-redução, descrita pela Equação Química 2:



Para a determinação de ferro total, Fe(II) + Fe(III), as amostras foram “abertas” com ácido clorídrico (HCl) e todo o ferro foi reduzido a Fe(II), com o auxílio de uma solução de cloreto estanoso (SnCl₂). O excesso do Sn(II) em solução, um interferente do método, foi oxidado a Sn(IV), utilizando uma solução de cloreto de mercúrio (II) (HgCl₂), que não interfere no método. Uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e fosfórico (H₃PO₄) 1:1 foi adicionada ao sistema, a fim de se adequar a concentração hidrogeniônica e regular o potencial do sistema Fe(II)/Fe(III), para facilitar a visualização no ponto de viragem do indicador difenilamina. Feito isso, a amostra foi titulada com uma solução padrão de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇). A determinação de Fe(II) foi feita pelo mesmo processo, porém sem a adição de SnCl₂ e HgCl₂. A concentração de Fe(III) foi calculada pela diferença ferro total – Fe(II).

3.2.2.8. Caracterização das Propriedades Texturais

As propriedades texturais da amostra NP1D foram caracterizadas em um equipamento *Particle Characterization* da Quantachrome Instruments, modelo NOVA 2200e, utilizando o método Brunauer, Emmet e Teller (BET) com nitrogênio como gás de análise (adsorbato). A análise foi efetuada sob vácuo e em baixa temperatura (amostra imersa em N₂ líquido), após a amostra ter sido seca em vácuo a 100 °C.

3.2.2.9. Análise Termogravimétrica (TG)

As curvas TG foram obtidas em um analisador simultâneo termogravimétrico e termodiferencial DTG-60H da Shimadzu, utilizando cerca de 5,0 mg de amostra, em cadinho de platina. Os ensaios foram realizados em atmosfera de nitrogênio (30 mL min⁻¹) a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, da temperatura ambiente até 500 °C.

3.2.3. REALIZAÇÃO DE ENSAIOS VOLTADOS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Após a caracterização das amostras obtidas pelas técnicas citadas na seção 3.2.2., foram selecionadas duas amostras (uma de cada grupo), que apresentaram as propriedades mais coerentes com os objetivos desse estudo, para realização de ensaios mais focados em aplicações biomédicas. Dessa forma, as amostras NP1D e NPS6 foram selecionadas para as etapas seguintes.

3.2.3.1. Magnetohipertermia

Os experimentos de hipertermia foram realizados na UFG, utilizando o sistema do equipamento comercial de hipertermia da Ambrell, modelo EasyHeat, que opera em campos de elevada amplitude e de baixa frequência de campo magnético alternado (CMA). Nesse estudo, a frequência utilizada foi de 300 kHz. Além disso, a amplitude do CMA foi obtida a partir de medições utilizando uma sonda de CMA adquirida da AMF *Life Systems*. Elas variaram de 169 a 312 Oe. As correntes utilizadas também variaram de 53 a 98 A. As massas das amostras em pó utilizadas foram as mesmas ($0,0070 \pm 0,0002$ g). Um sistema de fibra óptica operando na região do infravermelho foi usado para medição da temperatura das amostras.

3.2.3.2. Funcionalização da Superfície das Amostras Selecionadas

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, foi realizada a dispersão (ou peptização) das nanopartículas em água, a fim de se formar uma suspensão coloidal estável, por meio da funcionalização da superfície das nanopartículas com um agente promotor de estabilização: o tripolifosfato de sódio (TPF). Para tanto, após a síntese, as amostras foram lavadas com H₂O Milli-Q até o pH 7. Feito isso, o sobrenadante foi descartado e o pH foi ajustado para 3,5, utilizando-se uma solução de HCl 0,1 M. Foram adicionados, então, 4 mL de uma solução de TPF 0,15 M e a mistura foi mantida sob agitação por 20 h. Terminada a agitação, o pH da mistura foi ajustado para 8, utilizando uma

solução de HCl 0,1 M. A mistura foi decantada e o sobrenadante, descartado. Posteriormente, adicionaram-se 10 mL de acetona à mistura que foi agitada por 10 m, decantada e o sobrenadante descartado. Essa etapa foi repetida. A mistura foi mantida sob agitação, adicionando-se o mínimo de água, até a evaporação total da acetona e formação da suspensão coloidal.

Os experimentos descritos a seguir foram realizados com as suspensões coloidais das nanopartículas das amostras NP1D e NPS6.

3.2.3.3. Distribuição do Diâmetro Hidrodinâmico das Nanopartículas

As medidas de distribuição de diâmetro das nanopartículas foram feitas pela medida do espalhamento dinâmico da luz das suspensões. A técnica consiste na passagem de um feixe de luz por uma amostra, adicionada a uma cubeta de plástico e posicionada no aparelho Zetasizer ZS90 (Malvern®). O cálculo é baseado no espalhamento da luz laser, quando as nanopartículas passam através de um movimento aleatório pela frente da fonte de luz. O espalhamento da luz devido a esta sobreposição de partículas confere o seu tamanho médio. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3.4. Cultura de Células

A linhagem celular imortalizada, derivada de um adenocarcinoma mamário murino 4T1, foi utilizada como modelo biológico para avaliar o potencial citotóxico das suspensões de nanopartículas sobre esta linhagem celular. A escolha de uma linhagem tumoral se deve ao fato da potencial aplicação das suspensões de nanopartículas contra tumores malignos, quando aplicadas na magnetohipertermia. As culturas celulares foram mantidas em meio de cultura DMEM (GIBCO-BRL), suplementado com soro fetal bovino a 10% e Penicilina / Estreptomicina a 10.000 µg/mL (Gibco, USA), na proporção 1 mL do antibiótico para cada 100 mL de meio, em pH 7,4. Os frascos de cultura foram mantidos a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 80% de umidade.

3.2.3.5. Citotoxicidade das Nanopartículas Seleccionadas sobre Sistemas de Culturas Celulares de Mamíferos

O potencial de citotoxicidade das nanopartículas NP1D e NPS6 foi avaliado sobre as células 4T1. Para a execução dos ensaios, 24 h antes dos tratamentos, células 4T1 foram transferidas para placas de cultura de 96 poços, em uma densidade celular de 10^4 células/200 μ L/poço de cultura. Esse procedimento visa permitir a adesão das células transferidas ao fundo do poço da placa de cultura. Após esse período inicial, as células foram tratadas com diferentes concentrações das nanopartículas NP1D (0; $8,0 \times 10^{12}$; $16,0 \times 10^{12}$; $24,0 \times 10^{12}$; $32,0 \times 10^{12}$; $40,0 \times 10^{12}$ partículas/mL) e NPS6 (0; $4,0 \times 10^{13}$; $8,0 \times 10^{13}$; $12,0 \times 10^{13}$; $16,0 \times 10^{13}$; $20,0 \times 10^{13}$ partículas/mL). Cada concentração experimental foi aplicada em quatro poços de cultura diferentes (quadruplicata).

Após 24 h de exposição celular às suspensões de nanopartículas, foi realizado um ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT. Este ensaio de citotoxicidade é um teste colorimétrico, estabelecido por Mosmann,⁷⁵ que quantifica a redução do reagente MTT (brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) em um composto conhecido como formazan, pela ação de desidrogenases mitocondriais. A presença de desidrogenases mitocondriais ativas é um indicativo de viabilidade celular. Os cristais do corante roxo formazan, formados pela redução do MTT, são quantificados por técnicas de espectrofotometria. Assim, o meio de cultura foi substituído por um meio adicionado com solução estoque de MTT (5 mg/mL) na proporção 20 μ L/180 μ L de meio de cultura. Após 3 h de incubação com o meio de cultura adicionado com o corante MTT, este meio foi removido e adicionado 200 μ L de DMSO para a solubilização das estruturas celulares. Após 3 min, os cristais de formazan foram dissolvidos e a quantificação deste produto foi realizada em leitora de placa (Espectra M2) em comprimento de onda 600 nm.

3.2.3.6. Visualização da Alteração da Morfologia Celular após o Tratamento com Nanopartículas

Para a avaliação das possíveis alterações morfológicas, após o tratamento com as suspensões de nanopartículas, as células 4T1 foram transferidas para placas de cultura de 6 poços, em uma densidade celular de 10^5 células/2mL de meio/poço de cultura. Após um período de sedimentação de 24 h, as células foram tratadas com suspensões de nanopartículas em uma concentração de $16,0 \times 10^{12}$, para a NP1D, e $8,0 \times 10^{13}$, para a NPS6. Após 24 h de exposição às suspensões de nanopartículas, as células foram processadas para análise de microscopia de luz.

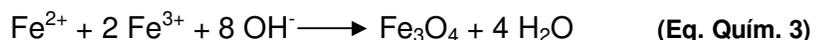
Capítulo

4

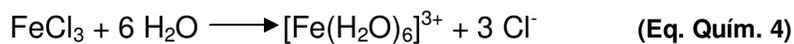
Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das metodologias mais utilizadas para a síntese de nanopartículas esféricas de magnetita é a coprecipitação de Fe(II) e Fe(III) em meio alcalino.^{76,77,78,79} Ela pode ser descrita, resumidamente, pela Eq. Quím. 3.^{78,80}



Os mecanismos relacionados a essa reação envolvem a dissociação de sais de Fe(III) para a formação de hexaquoíons octaédricos:



O íon complexo formado, exceto em pH muito baixo (<1), sofre hidrólises sucessivas, de acordo com as Eq. Quím. 5 e 6, formando espécies como as mostradas na Figura 25:

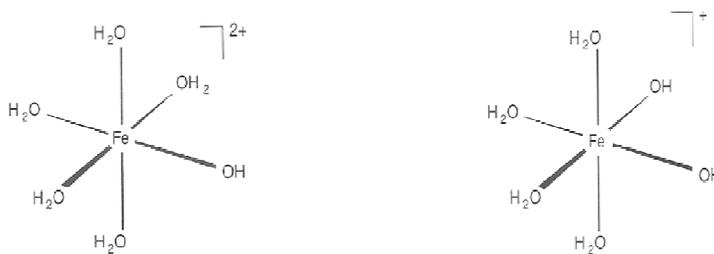
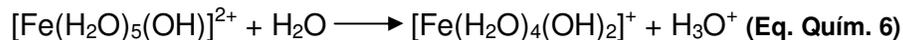
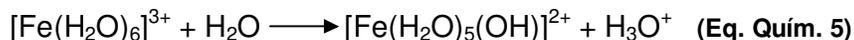


Figura 25. Produtos isolados da hidrólise de Fe(III), mostrados nas Eq. Quím. 5 e 6, respectivamente.⁸

As hidrólises podem ser potencializadas pela adição de uma base, pelo aquecimento (hidrólise forçada), ou pela diluição da solução.⁶ Tais condições podem levar também à polimerização dos íons resultantes da hidrólise do

$[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, devido à capacidade dos grupos hidroxila formarem pontes entre íons metálicos.^{6,8}

Os produtos da polimerização, tais como dímero $[\text{Fe}_2\text{O}(\text{H}_2\text{O})_{10}]^{2+}$ (Figura 26), favorecem reações hidrolíticas adicionais pela disponibilização de grupos hidroxos extras, que por sua vez podem formar mais pontes entre os metais, aumentando a cadeia. Os termos “hidroxo” e “oxo” são freqüentemente utilizados para denominar sistemas complexos com pontes M-(OH)-M e M-O-M, respectivamente.

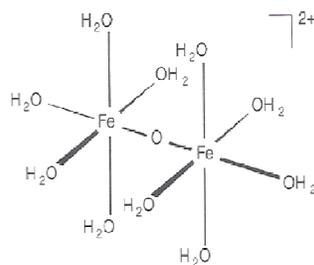


Figura 26. Dímero formado a partir dos produtos da hidrólise do $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$.⁸

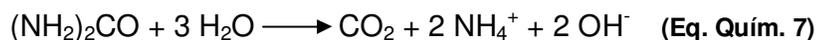
Uma seqüência de reações de condensação hidrolítica, chamadas de *olações* ou *oxolações*, dependendo do tipo de pontes formadas, levam estes hidroxopolímeros coloidais a precipitados, por mecanismos que envolvem processos de nucleação e crescimento cristalino. Nessa etapa, podem ser formados subprodutos da reação, como hidróxidos e óxidos amorfos não desejáveis.⁶

No caso da formação da magnetita, ocorre a coprecipitação de Fe(II) e Fe(III), com formação de cristal misto. Estes mesmos íons, que podem estar coordenados octaédricamente ou tetraédricamente por moléculas de água, formam entre si pontes hidroxo e oxo à medida que o pH é alterado, de forma que, em condições limítrofes, uma estrutura do tipo espinélio pode surgir.

A proposta de síntese das nanopartículas magnéticas do primeiro grupo foi realizada com o intuito de solucionar a questão dos gradientes locais de pH, originados pela adição de bases fortes ao meio. Isso influencia diretamente o produto resultante nesse tipo de síntese, pois a formação dos cristais é muito rápida, sendo complexo o controle das características morfológicas. Algumas tentativas já foram realizadas nesse sentido, como a utilização de bases mais

fracas, ou a tentativa de uma agitação mais homogênea. Lian e colaboradores⁸¹ sintetizaram nanobastões de magnetita por coprecipitação homogênea de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, utilizando ureia como agente precipitante. Segundo os autores, as partículas obtidas apresentaram diâmetro de 40-50 μm e comprimento de 1 μm . Quanto às propriedades magnéticas, elas apresentaram M_S de 67,55 emu/g e coercividade de 114 Oe.

A hidrólise da ureia se processa lentamente em temperaturas próximas a 100 °C e pode ser representada pela Eq. Quím. 7:



Dessa forma, ela é muito empregada para a geração homogênea de íons OH^- na precipitação a partir de uma solução homogênea. Nesse processo, o precipitado é formado pela geração do agente precipitante de forma homogênea em toda a solução, por meio de uma reação química lenta. Uma vez que o agente precipitante – o íon OH^- , no caso da ureia – é formado lenta e homogênea, ele reage imediatamente com o analito em cada ponto da solução, não havendo excessos localizados deste e mantendo a supersaturação relativa baixa.⁸² Assim, os gradientes locais de pH gerados pela adição de bases fortes podem ser contornados, resultando, entre outras coisas, em uma provável maior homogeneidade do precipitado obtido. A influência da ureia, como base utilizada na síntese das nanopartículas magnéticas, foi uma das variáveis avaliadas no primeiro grupo de nanopartículas sintetizadas nesse estudo.

Outra variável avaliada nas sínteses do primeiro grupo foi a utilização do íon SO_4^{2-} para a obtenção de partículas anisotrópicas. Sabendo que esses íons retardam o crescimento do cristal de hematita na direção normal ao eixo c , resultando em partículas alongadas, a sua influência na síntese proposta foi estudada.

4.1. Sínteses e Caracterizações do Primeiro Grupo

O intuito das sínteses do primeiro grupo foi a obtenção de nanopartículas magnéticas alongadas de óxidos de ferro, de acordo com o objetivo desse estudo. Alguns parâmetros foram variados a fim de se alcançar o sistema mais apropriado para as aplicações biomédicas visadas.

4.1.1. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE REAÇÃO

As imagens de MET das nanopartículas obtidas variando-se o tempo de reação mostraram que todas elas possuem dimensões nanométricas e formato alongado, como pode ser observado na Figura 27.

Por meio da análise das imagens da Figura 27, foram obtidos histogramas de distribuição de comprimento (Figura 28-1) e largura (Figura 28-2) para as nanopartículas sintetizadas nessa etapa do estudo. Os histogramas mostraram uma larga distribuição dos comprimentos e uma distribuição mais estreita das larguras das nanopartículas sintetizadas. Apesar disso, as dimensões das nanopartículas se encontram, majoritariamente, entre 10-100 nm. De acordo com alguns autores, as nanopartículas cujas dimensões se enquadram nessa faixa são farmacodinamicamente apropriadas para aplicações biomédicas *in vivo*.¹⁷ Nanopartículas menores que 10 nm estão sujeitas a extravazamento para tecidos subjacentes e filtração renal, ao passo que nanopartículas maiores que 100 nm tendem a ser rapidamente opsonizadas e removidas pelo SMF. Além disso, o *EPR* permite que nanopartículas com dimensões dentro dessa faixa, se acumulem preferencialmente nos tumores.³

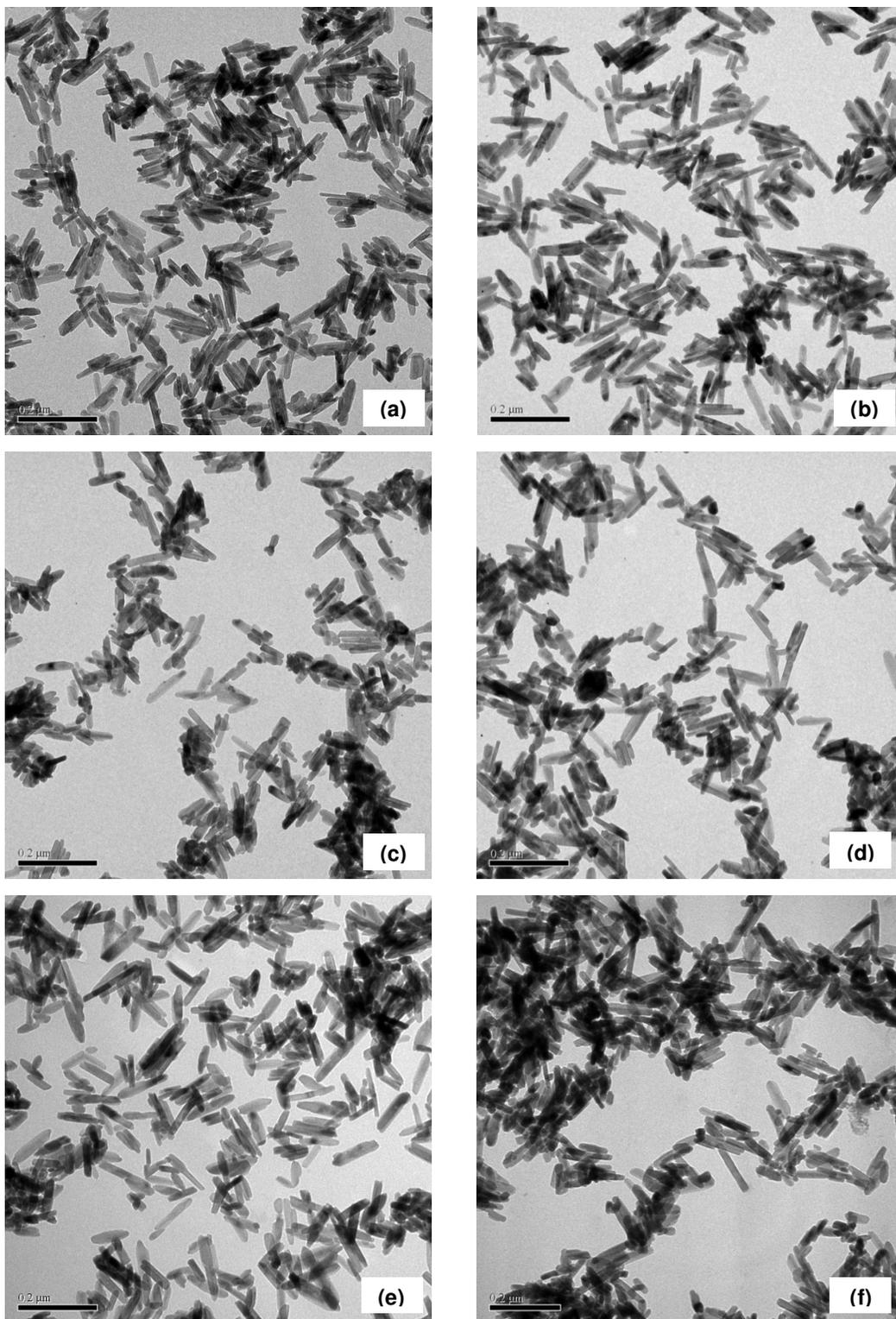
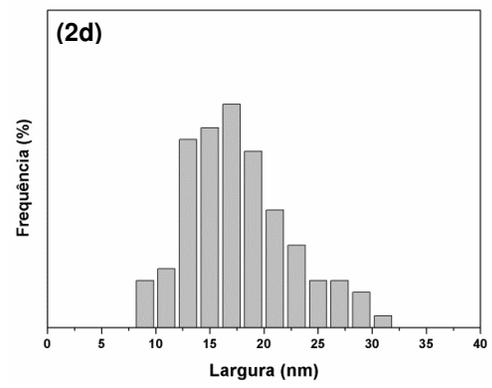
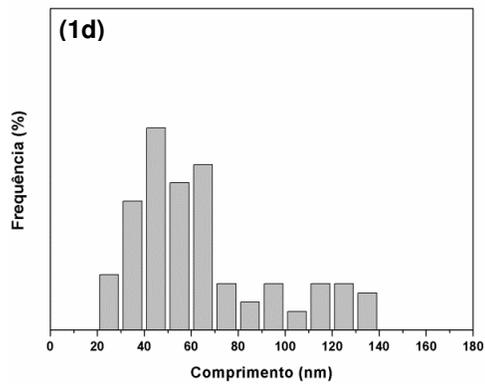
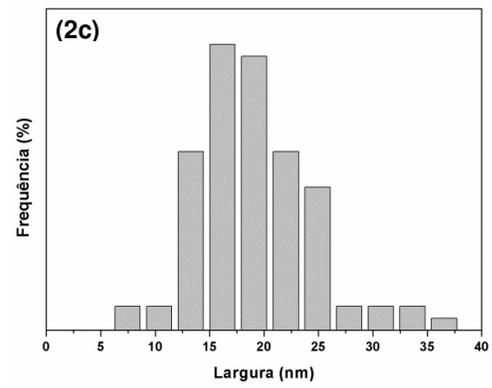
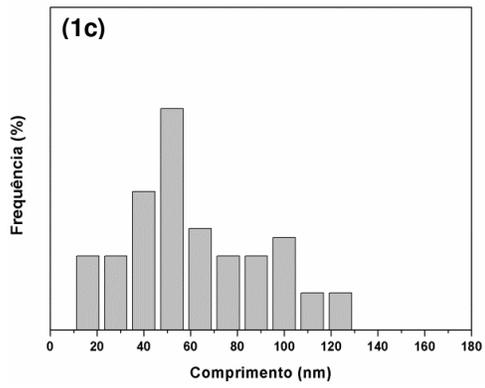
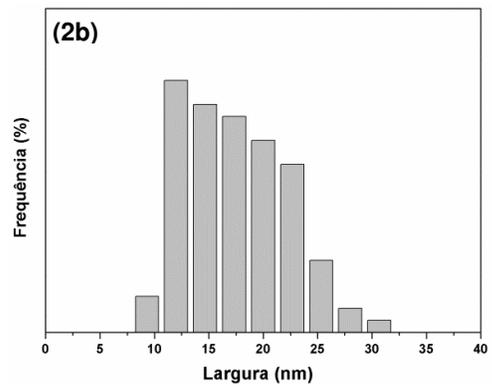
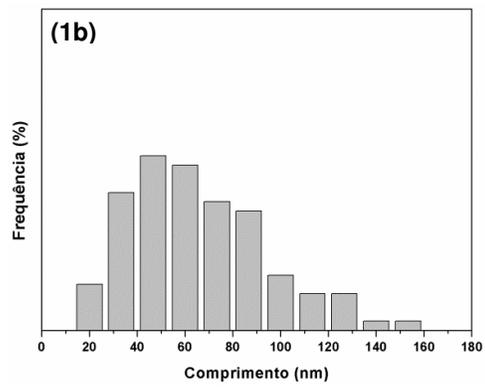
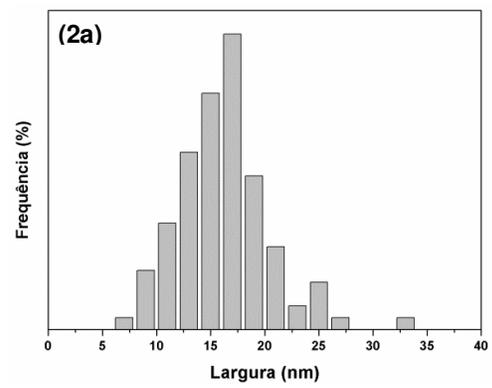
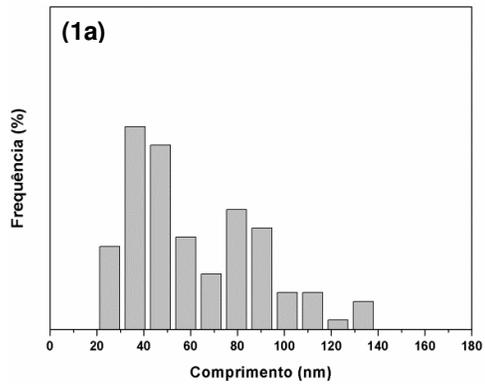


Figura 27. Imagens obtidas por MET das nanopartículas sintetizadas com variação de tempo de síntese: (a) NP1A, (b) NP1B, (c) NP1C, (d) NP1D, (e) NP1E e (f) NP1F. Barra de escala = 0,2 μm.



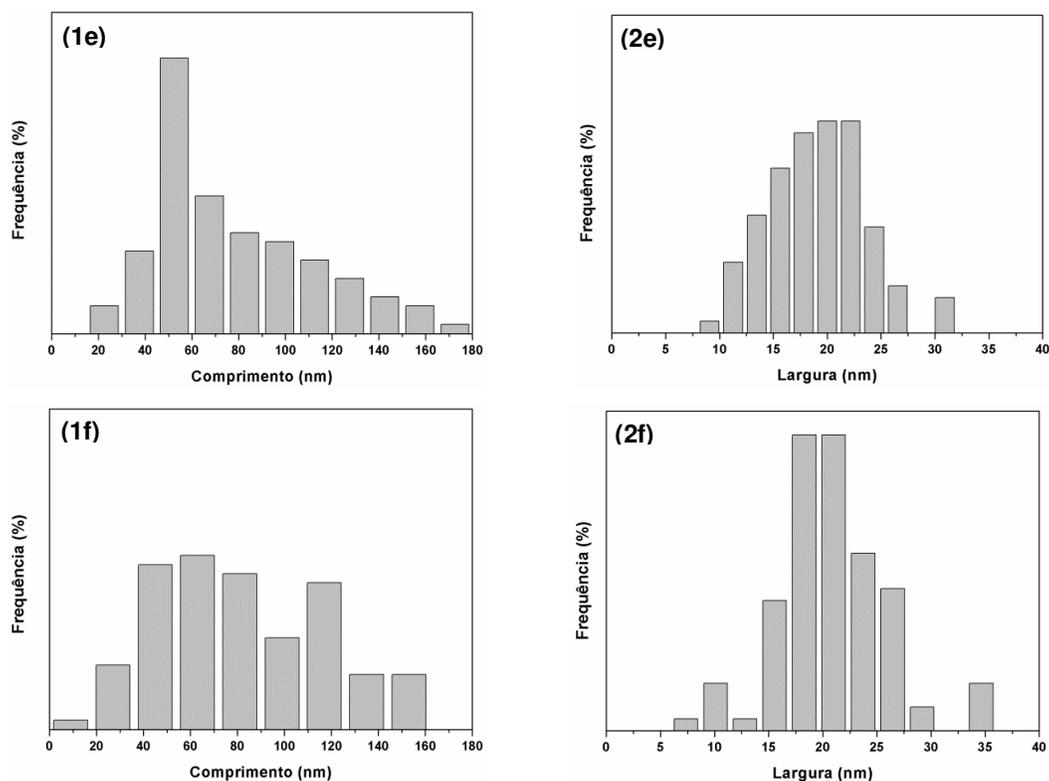


Figura 28. Histogramas de distribuição de comprimento (1) e largura (2) para a (a) NP1A, (b) NP1B, (c) NP1C, (d) NP1D, (e) NP1E e (f) NP1F.

Observando os valores da Tabela 3 e os diagramas de dispersão mostrados na Figura 29, observa-se que as dimensões médias das nanopartículas aumentam com o tempo de reação. Linhas de tendência polinomial de ordem 2 e linear, com um valor de R^2 de aproximadamente 0,8, podem ser obtidas para os diagramas de dispersão dos comprimentos médios e das larguras médias, respectivamente. Essas tendências mostram que o aumento observado tende a ser mais acentuado para os comprimentos do que para as larguras. Em 12 h de reação, o comprimento médio aumentou em 50%, enquanto a largura média aumentou em 25%.

Tabela 3. Dimensões médias das nanopartículas magnéticas obtidas com a variação do tempo de reação e seus respectivos desvios-padrão.

Amostra	Comprimento médio (nm)	Largura média (nm)
NP1A	41,3 ± 2,5	15,9 ± 0,2
NP1B	58,4 ± 2,6	16,7 ± 0,9
NP1C	50,1 ± 1,5	18,2 ± 0,4
NP1D	49,9 ± 2,0	16,5 ± 0,3
NP1E	55,0 ± 2,2	19,0 ± 0,3
NP1F	79,4 ± 6,5	20,3 ± 0,4

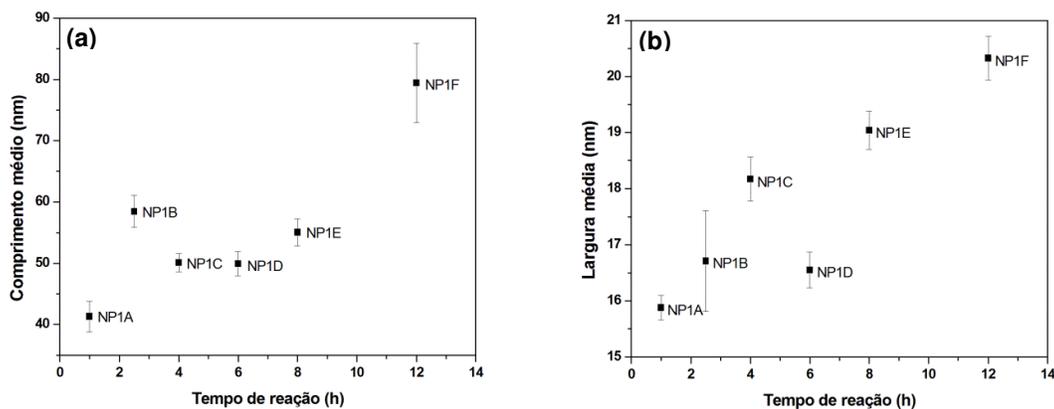


Figura 29. Diagrama de dispersão dos (a) comprimentos e das (b) larguras das nanopartículas sintetizadas variando-se o tempo de reação.

A observação das imagens topográfica e de fase obtidas por MFA da NP1B, mostradas na Figura 30, permitem a diferenciação das nanopartículas alongadas que compõem os agregados.

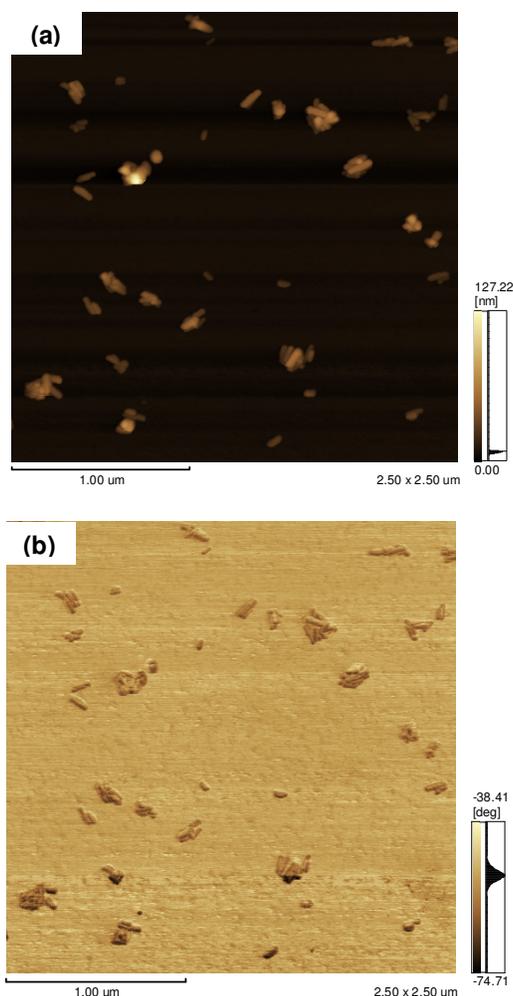


Figura 30. Imagem (a) topográfica e (b) de fase da NP1B, obtidas por MFA em modo dinâmico. Imagem de 2,5 x 2,5 μm .

A Figura 31 mostra a magnificação de duas nanopartículas mostradas na Figura 30. Comparando-se as imagens topográfica e de fase dessa figura, observa-se que as diferenças nas superfícies das nanopartículas podem ser atribuídas à topografia, ou seja, a superfície das nanopartículas apresenta irregularidades. Essas irregularidades podem resultar em uma maior área superficial, sendo atraente para a ligação de grupos de interesse. A área superficial da amostra NP1D foi obtida pelo método BET, resultando em 18,89 m^2/g , coerente com o valor descrito na literatura de 10 a 100 m^2/g .⁶

Nota-se ainda, que o formato dessas estruturas difere. Isso leva a crer que houve a formação de estruturas heterogêneas, como pode ser notado pela observação das extremidades dessas nanopartículas.

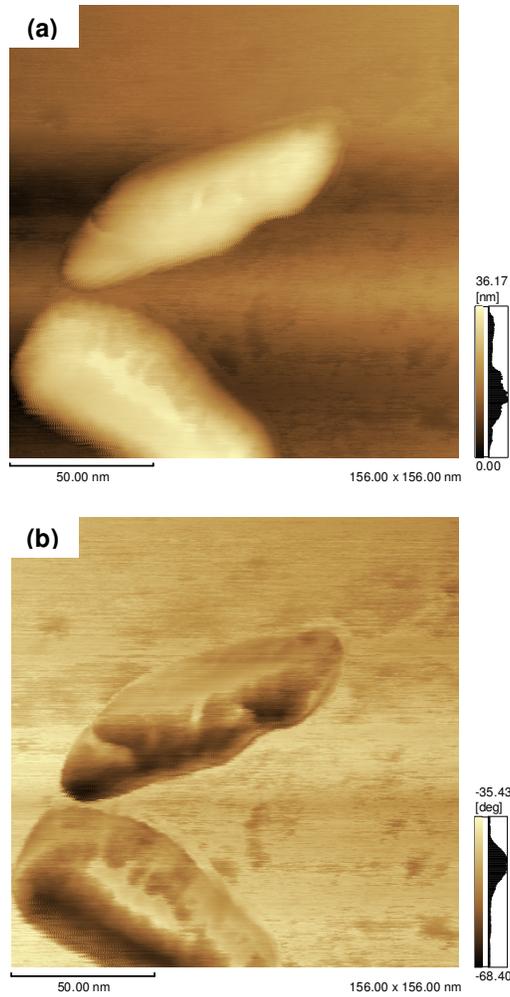


Figura 31. Imagem (a) topográfica e (b) de fase da NP1B, obtidas por MFA em modo dinâmico/viscoelástico. Imagem de 156 x 156 nm.

A Figura 32 mostra a imagem tridimensional das nanopartículas.

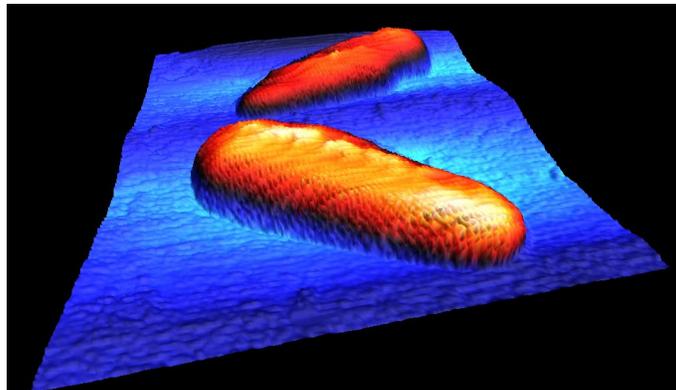


Figura 32. Imagem de MFA obtida no modo fase da NP1B em 3D.

A partir dos difratogramas obtidos das amostras, é possível calcular, utilizando a Lei de Bragg (Equação 9), as distâncias interplanares, d_{hkl} , relacionadas a cada pico e, comparando-as com o banco de dados PDF, identificá-los. O perfil dos difratogramas obtidos por DRX das amostras dessa etapa do estudo (Figura 33) revela que, exceto a NP1A, todas apresentam a estrutura do espinélio.

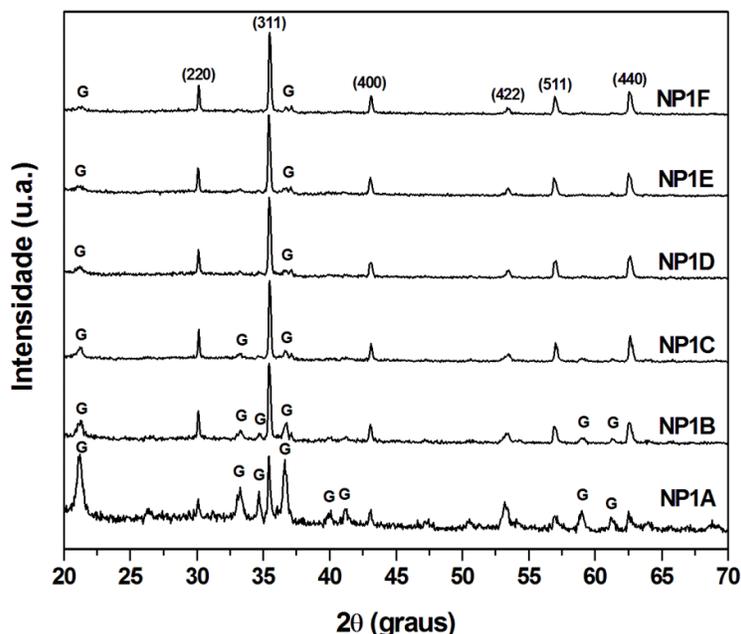


Figura 33. Difratogramas das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação de tempo de síntese.

Observando-se a Figura 34, é possível relacionar o perfil geral dessas amostras ao padrão da magnetita. Isso se torna ainda mais claro com os dados das Tabelas 4 e 5, que mostram a comparação dos picos dos difratogramas entre as amostras obtidas nessa etapa e os valores do banco de dados para o padrão de magnetita. Os resultados revelaram uma aproximação excelente, o que permite a indexação desses picos como magnetita. Nota-se, entretanto, a presença, em todas as amostras, de um pico em, aproximadamente, $2\theta = 21^\circ$ e de outro pico em $2\theta = 36,64^\circ$, que não pertencem à magnetita, marcado como goethita (G) (α -FeOOH) nos espectros. Esses picos também podem ser observados no difratograma da magnetita sintetizada por Lian e

colaboradores,⁸¹ apesar dos autores afirmarem que não foram observados picos de impureza.

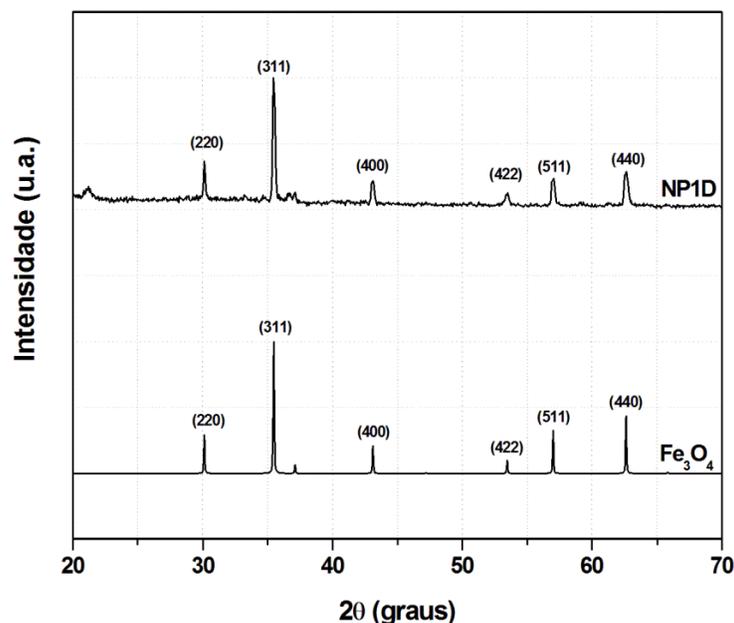


Figura 34. Comparação entre os difratogramas da NP1D e da magnetita pura.

Tabela 4. Tabela comparativa das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação do tempo de reação, indexadas como magnetita.

Pico 1							
Amostra	Largura	2θ	d _{exp} (nm)	d _{teo} (nm)	IR _{exp}	IR _{teo}	hkl
NP1A	0,1930	30,0840	0,2968	0,2967	25,5	30	220
NP1B	0,1436	30,1010	0,2966	0,2967	33,9	30	220
NP1C	0,1183	30,1350	0,2963	0,2967	36,0	30	220
NP1D	0,1475	30,1200	0,2965	0,2967	28,0	30	220
NP1E	0,1458	30,0900	0,2968	0,2967	30,6	30	220
NP1F	0,1328	30,1400	0,2963	0,2967	32,5	30	220
Pico 2							
Amostra	Largura	2θ	d _{exp} (nm)	d _{teo} (nm)	IR _{exp}	IR _{teo}	hkl
NP1A	0,1502	35,4390	0,2531	0,2532	100,0	100	311
NP1B	0,1671	35,4620	0,2529	0,2532	100,0	100	311
NP1C	0,1445	35,4940	0,2527	0,2532	100,0	100	311
NP1D	0,1677	35,4770	0,2528	0,2532	100,0	100	311
NP1E	0,1601	35,4420	0,2531	0,2532	100,0	100	311
NP1F	0,1469	35,4980	0,2527	0,2532	100,0	100	311

Pico 3							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP1A	0,1741	43,0660	0,2099	0,2099	23,0	20	400
NP1B	0,1938	43,0860	0,2098	0,2099	20,2	20	400
NP1C	0,1673	43,1290	0,2096	0,2099	19,6	20	400
NP1D	0,2323	43,1070	0,2097	0,2099	20,4	20	400
NP1E	0,1952	43,0840	0,2098	0,2099	18,4	20	400
NP1F	0,1683	43,1250	0,2096	0,2099	21,3	20	400

Pico 4							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP1A	0,4519	53,2530	0,1719	0,1715	38,1	10	422
NP1B	0,4620	53,3400	0,1716	0,1715	11,2	10	422
NP1C	0,4700	53,4240	0,1714	0,1715	7,5	10	422
NP1D	0,2844	53,4680	0,1712	0,1715	8,8	10	422
NP1E	0,2304	53,4540	0,1713	0,1715	7,1	10	422
NP1F	0,2441	53,4740	0,1712	0,1715	5,5	10	422

Pico 5							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP1A	0,3288	57,0280	0,1614	0,1616	17,6	30	511
NP1B	0,2503	56,9910	0,1615	0,1616	20,2	30	511
NP1C	0,2289	57,0650	0,1613	0,1616	21,8	30	511
NP1D	0,2368	57,0210	0,1614	0,1616	22,5	30	511
NP1E	0,2588	56,9770	0,1615	0,1616	18,9	30	511
NP1F	0,2374	57,0230	0,1614	0,1616	19,4	30	511

Pico 6							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP1A	0,3800	62,5930	0,1483	0,1485	25,4	40	440
NP1B	0,2966	62,5820	0,1483	0,1485	25,6	40	440
NP1C	0,2616	62,6590	0,1481	0,1485	28,5	40	440
NP1D	0,2899	62,6110	0,1482	0,1485	27,2	40	440
NP1E	0,2734	62,5670	0,1483	0,1485	26,1	40	440
NP1F	0,2543	62,6140	0,1482	0,1485	26,4	40	440

Tabela 5. Indexação dos picos de DRX para as nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação do tempo de reação.

	NP1A	NP1B	NP1C	NP1D	NP1E	NP1F
<i>hkl</i>	$(d/di)_{teo}$	$(d/di)_{exp}$	$(d/di)_{exp}$	$(d/di)_{exp}$	$(d/di)_{exp}$	$(d/di)_{exp}$
220	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
311	1,173	1,173	1,173	1,173	1,173	1,172
400	1,414	1,414	1,414	1,414	1,414	1,414
422	1,732	1,729	1,729	1,729	1,731	1,730
511	1,837	1,837	1,837	1,837	1,837	1,838
440	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	1,999

Na Figura 35, a amostra NP1A foi comparada ao padrão de goethita, a fim de se observar a presença desse óxido/hidróxido de ferro na amostra com o menor tempo de reação. O pico em $2\theta = 21^\circ$ pode ser indexado como o pico (110) – de maior intensidade – e o pico em $2\theta = 37^\circ$, como o pico (111) – segundo pico de maior intensidade – da goethita, sugerindo que ele é um intermediário provável dessa reação. A diminuição da intensidade desses picos com o aumento do tempo de reação é um indicativo de que a goethita formada evolui para a formação de magnetita, o que resulta em uma maior pureza da magnetita sintetizada. Isso é corroborado pelas análises dos outros picos dos difratogramas das nanopartículas que não podem ser indexados como magnetita.

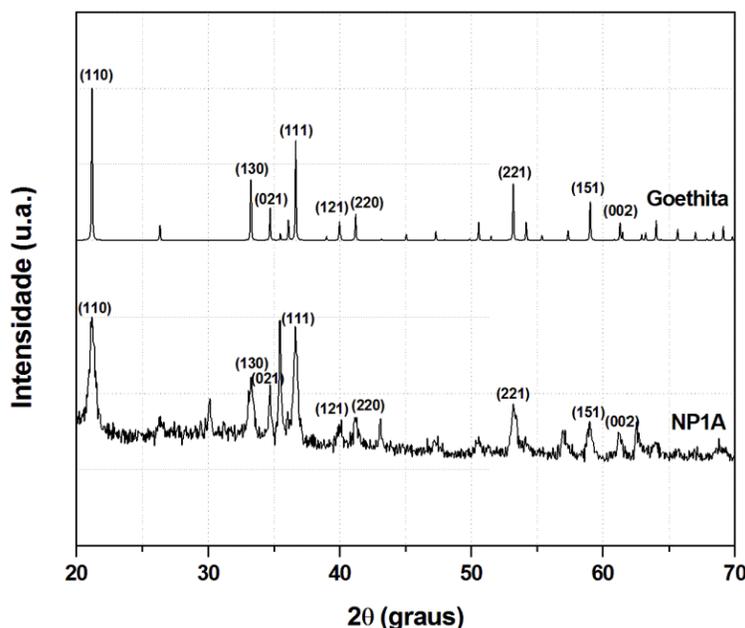
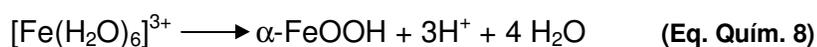


Figura 35. Comparação entre os difratogramas da NP1A e da goethita pura.

Os picos não pertencentes à magnetita presentes no difratograma da amostra NP1A foram indexados como goethita na Figura 35. Todos esses picos diminuem à medida que o tempo de reação aumenta, de maneira que a sua distinção nas nanopartículas sintetizadas com tempo de reação igual ou superior a 6 h é complexa, exceto para os picos (110) e (111), que são os picos de maior intensidade da goethita discutido anteriormente. O pico (221) da goethita se sobrepõe ao pico (422) da magnetita e, como se esperava, houve uma redução significativa em sua área nas amostras NP1D, NP1E e NP1F.

Relacionando esses resultados com o mecanismo de formação da magnetita por coprecipitação de Fe(II) e Fe(III), pode-se afirmar que a hidrólise do hexaquoíon de Fe(III) ocorre até a formação de goethita e que a magnetita é obtida a partir desse intermediário.⁸¹



Uma vez que a morfologia básica do cristal de goethita é acicular,⁶ supõe-se que a forma das partículas de goethita obtidas como intermediários são preservadas, durante a sua conversão para magnetita.

Para se obter um grau de pureza satisfatório das nanopartículas de magnetita, observou-se que a síntese deve ser realizada com, no mínimo 6 h de reação, para que a conversão seja tal que a quantidade de goethita seja reduzida.

Sabendo-se então, que a fase de magnetita das partículas sintetizadas pertence ao sistema cúbico (espinélio), foi utilizada a Equação 11 para calcular os parâmetros de cela dessa fase, sendo que o valor de aresta obtido corresponde à média dos valores obtidos para cada pico. Os resultados estão expostos na Tabela 6.

Tabela 6. Cálculo dos parâmetros de cela da fase de magnetita para as nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação do tempo de síntese.

	a_{exp} (nm)	a_{teo} (nm)
NP1A	0,839	0,839
NP1B	0,839	0,839
NP1C	0,838	0,839
NP1D	0,839	0,839
NP1E	0,839	0,839
NP1F	0,838	0,839

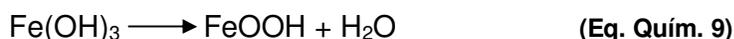
Como no sistema cúbico $a = b = c$,⁸³ a cela unitária da fase de magnetita das amostras obtidas com variação do tempo de síntese, possui arestas de 0,839 nm, valor próximo ao descrito na literatura para esse óxido.⁶ Esse resultado é um indicativo de que as estruturas cristalinas dessa fase das amostras se assemelham estreitamente à magnetita.

A determinação de Fe(II) e ferro total nas amostras por Dicromatometria, cujos resultados estão expostos na Tabela 7, mostrou que em nenhuma amostra a proporção inicial entre o Fe(II) e o Fe(III) se manteve constante, fato já esperado. Como a reação foi realizada em atmosfera oxidante, parte do Fe(II) deve ter sido oxidado a Fe(III) durante a reação.

Tabela 7. Proporção de Fe(II) e Fe(III) nas amostras obtidas com a variação do tempo de reação, determinada por Dicromatometria.

Amostra	Fe(II) (mol)	Fe(III) (mol)
NP1A	1,00	22,53
NP1B	1,00	6,14
NP1C	1,00	6,12
NP1D	1,00	3,46
NP1E	1,00	3,17
NP1F	1,00	3,32

A proporção mais discrepante foi apresentada pela amostra NP1A. Uma vez que os K_{ps} do hidróxido de ferro (II) ($Fe(OH)_2$) e hidróxido de ferro (III) ($Fe(OH)_3$) são 2×10^{-39} e $4,1 \times 10^{-15}$, respectivamente, infere-se que o $Fe(OH)_3$ precipita primeiro e evolui para goethita, segundo a Eq. Quím. 9.⁸¹



A precipitação do Fe(OH)_2 só ocorre após a formação de mais íons hidroxila. Assim, justifica-se a proporção encontrada para essa amostra, pois como o K_{ps} do Fe(OH)_3 é bem menor que o K_{ps} do Fe(OH)_2 , provavelmente, 1 h de reação não foi suficiente para que a precipitação do Fe(OH)_2 atingisse o desejável. Esse resultado é coerente com os de DRX, que indicam que essa amostra é composta, dentre outras fases, por goethita.

Essa razão diminui com o aumento do tempo de reação, como esperado. Todavia, mesmo após 12 h de reação, não se chega a uma proporção de $\text{Fe(II):Fe(III)} = 1:2$. Buscando solucionar essa questão, alguns pesquisadores retiram o ar das misturas, antes da reação,^{78,79} ou utilizam proporções entre Fe(II) e Fe(III) menores que 1:2 na síntese.⁸⁴

A fim de avaliar a influência da atmosfera oxidante nas nanopartículas sintetizadas, foi realizada uma síntese nas mesmas condições da NP1D, porém em atmosfera inerte, borbulhando nitrogênio na mistura durante as 6 h de reação. Essa amostra foi denominada de NP1DI. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos para a determinação de Fe(II) e ferro total por Dicromatometria para essa amostra.

Tabela 8. Proporção de Fe(II) e Fe(III) na NP1DI.

Amostra	Fe(II) (mol)	Fe(III) (mol)
NP1DI	1,00	5,51

A proporção entre $\text{Fe(II):Fe(III)} = 1:5,5$, foi ainda maior do que a obtida para a amostra NP1D. Esse resultado vai de encontro ao esperado, podendo ser atribuído às variações no acondicionamento da amostra e no tempo em que ela ficou armazenada antes da realização das medidas, uma vez que a oxidação continua com o tempo, em uma taxa mais lenta, porém não determinada nesse estudo. Assim, apesar desse método ser validado para esses fins, é sugerido que mais estudos sejam feitos para sanar essa questão. De qualquer forma, o difratograma dessa amostra (Figura 36) não apresentou variações significativas, em relação às outras amostras já apresentadas. Os dados das Tabelas 9 e 10 corroboram essa afirmação. Como essa diferença

não foi expressiva, as sínteses continuaram sendo realizadas em atmosfera oxidante, a fim de se alcançar o procedimento mais simples para a obtenção das nanopartículas.

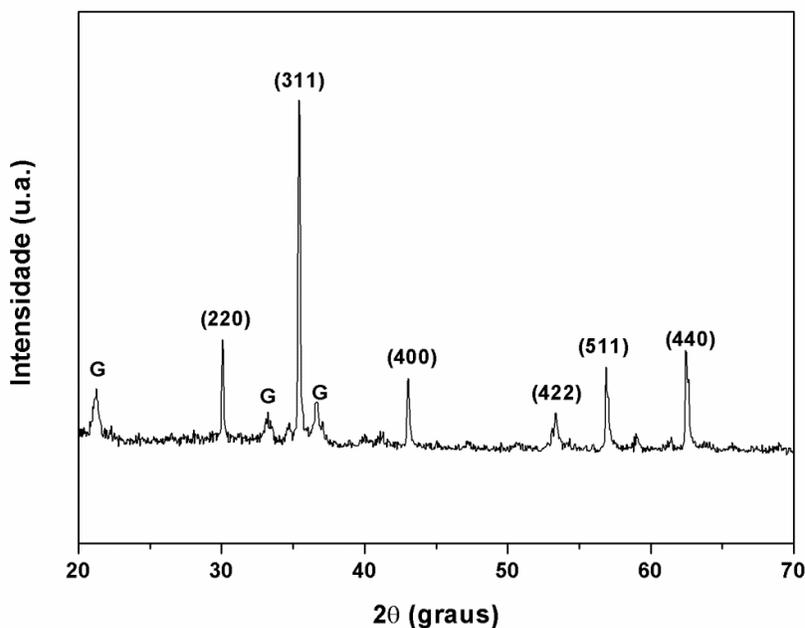


Figura 36. Difratoograma da amostra NP1DI.

Tabela 9. Dados obtidos por DRX da amostra NP1DI, indexada como magnetita.

Largura	2θ	d _{exp} (nm)	d _{teo} (nm)	IR _{exp}	IR _{teo}	hkl
Pico 1						
0,1204	30,0760	0,2969	0,2967	28,8	30	220
Pico 2						
0,13924	35,43	0,2532	0,2532	100,0	100	311
Pico 3						
0,16279	43,052	0,2099	0,2099	19,1	20	400
Pico 4						
0,35477	53,351	0,1716	0,1715	7,5	10	422
Pico 5						
0,20892	56,94	0,1616	0,1616	19,7	30	511
Pico 6						
0,24032	62,534	0,1484	0,1485	25,6	40	440

Tabela 10. Indexação dos picos de difração de raios X para a amostra NP1DI.

NP1DI		
<i>hkl</i>	$(d/di)_{teo}$	$(d/di)_{exp}$
222	1,000	1,000
311	1,173	1,173
400	1,414	1,414
422	1,732	1,730
511	1,837	1,837
440	2,000	2,000

Os espectros de FTIR das nanopartículas sintetizadas variando-se o tempo de reação (Figura 37), exceto a NP1D, apresentam uma banda de absorção em 3128 cm^{-1} , atribuída à vibração da ligação O-H estrutural, presente na goethita e em outros óxidos/hidróxidos de ferro. Embora em pequena escala, os grupo OH também podem estar presentes nas pontes Fe-OH-Fe dos óxidos de ferro.

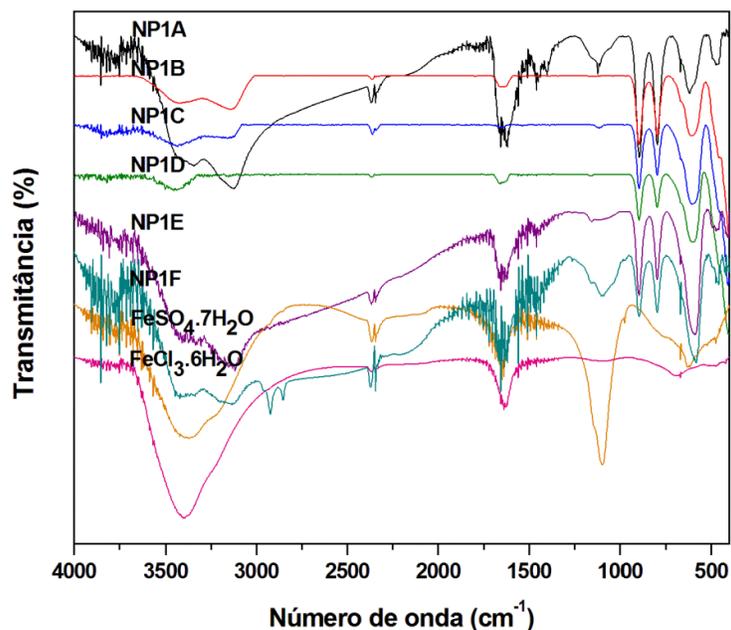


Figura 37. Espectros de FTIR das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação de tempo de síntese.

Nessa região, podem-se ter ainda bandas de absorção deslocadas para comprimentos de ondas maiores, relacionadas à vibração dos grupos OH da superfície. Os átomos de ferro são considerados sítios ácidos, segundo a

definição de Lewis, e, em meio aquoso, adsorvem ânions hidroxila ou moléculas de água. É importante notar a contribuição da água em 3000 cm^{-1} . As moléculas de água adsorvidas, geralmente, se dissociam, resultando em uma superfície coberta por OH^- . Esses ânions são os grupos funcionais dos óxidos de ferro em meio aquoso. Para removê-los da superfície dos óxidos, é necessário o tratamento térmico a temperaturas elevadas o suficiente, sendo que, mesmo após a desidroxilação, caso sejam expostos à umidade, o processo pode ocorrer novamente. Esses íons são capazes de se coordenar ao Fe de maneiras diferentes (Figura 38), gerando deslocamentos das bandas de vibração. Dessa forma, era esperado que a superfície das nanopartículas magnéticas sintetizadas nesse estudo estivesse recoberta por ânions OH^- , mesmo após a secagem, visto que foram sintetizadas em meio aquoso.

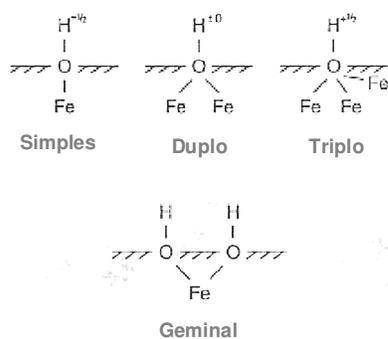


Figura 38. Tipos de coordenação dos grupos OH^- superficiais ao Fe.⁶

As bandas de absorção em 1645 cm^{-1} , presentes nos espectros de todas as amostras, se referem à deformação HOH. Essa água pode ser relacionada à umidade adsorvida no KBr utilizado para fazer as pastilhas, bem como à água adsorvida à superfície das amostras.

As bandas em 897 e 798 cm^{-1} são relacionadas às deformações da ligação O-H.^{6,85,86,87} Como essas duas bandas são características desse óxido hidróxido, esses resultados não apenas confirmam os dados obtidos por DRX, como também mostram que a amostra sintetizada com 12 h de reação apresenta goethita em sua composição.

Outro aspecto notável desses espectros é o aumento da intensidade relativa da banda de estiramento da ligação Fe-O, em 600 cm^{-1} , com o

aumento do tempo de reação. Desse resultado, podemos inferir que há um aumento do número de pontes Fe-O-Fe com o aumento do tempo de reação. Esse aumento pode ser resultado do crescimento dos cristais, confirmando a tendência de aumento da área das partículas com o aumento do tempo de reação, mostrada na Tabela 3. Além disso, comparando-se essa banda com a correspondente da goethita (630 cm^{-1}), é possível assinalar um deslocamento para comprimentos de onda menores, situadas na região dos óxidos de ferro, indicando a mistura de fases nessas amostras.

O espectro do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, um dos reagentes utilizados nessas sínteses, apresenta uma banda larga e forte em 1095 cm^{-1} com um ombro em 1144 cm^{-1} , atribuída à vibração do SO_4^{2-} . Esse ânion é um ligante de elevada simetria e, dependendo do modo como ele se coordena ao metal, a sua simetria é reduzida, resultando na degeneração das bandas de absorção (Figura 39).⁸⁸ Visto o perfil dessa banda no espectro do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pode-se admitir a hipótese de sobreposição de bandas. O mesmo ocorre nas amostras NP1A, NP1E e NP1F, pois, embora menos intensas, a sua forma sugere a sobreposição. Ainda nesses espectros, é possível observar uma banda na região de 469 cm^{-1} , também associada à vibração do SO_4^{2-} , que aparece somente como um ombro no espectro das outras amostras. Isso pode ser um indicativo de mudança do modo de coordenação desse íon. No espectro do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, há uma banda larga na região de $942\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$, centrada em 623 cm^{-1} , com indícios de sobreposição de uma banda nessa região.

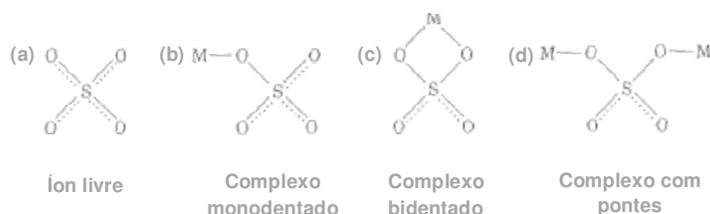


Figura 39. Modos de coordenação do sulfato.⁸⁸

As curvas termogravimétricas (TG) das amostras NP1A, NP1B e NP1D (Figura 40) mostram uma perda de massa com T_d (temperatura na qual a taxa de variação de massa é máxima) em, aproximadamente $250\text{ }^\circ\text{C}$. A perda de

massa entre 200 e 300 °C é atribuída à perda do OH estrutural, pela reação de desidroxilação (Eq. Quím. 10):^{6,85}



A perda de massa nessa etapa diminui com o aumento do tempo de reação, como mostrado na Tabela 11. Isso é mais um indício da diminuição da fase de goethita nas amostras.

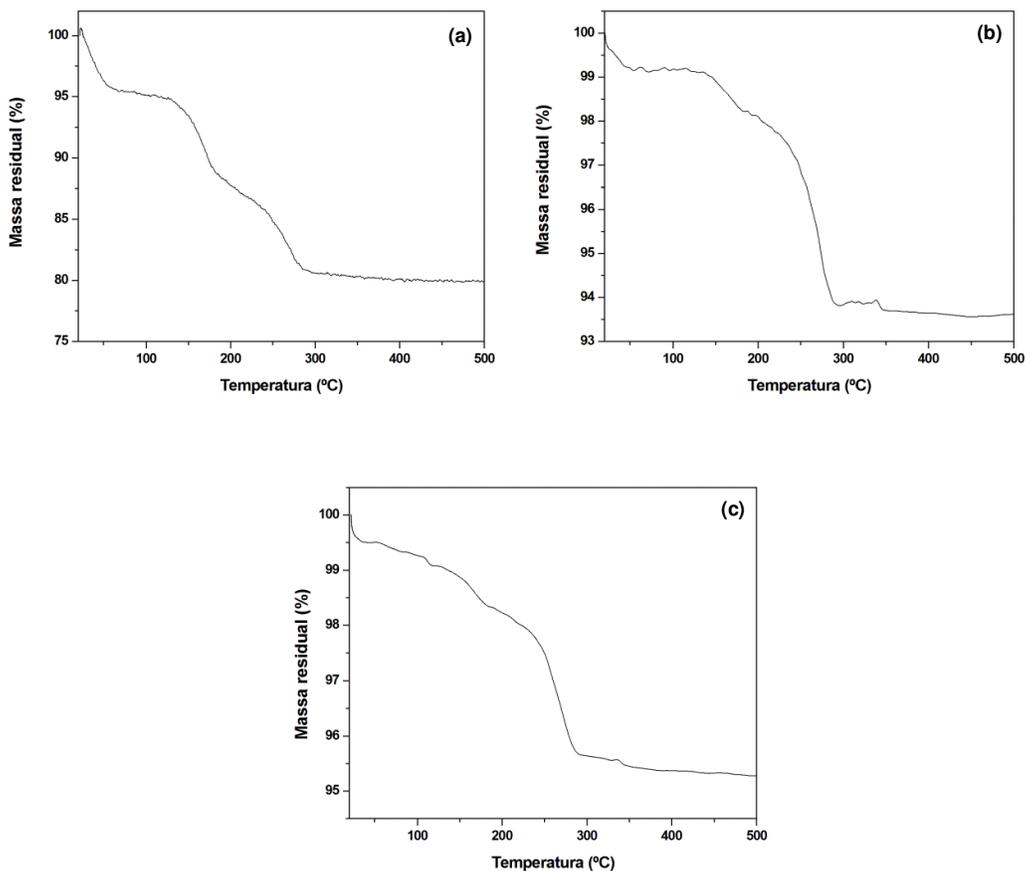


Figura 40. Curvas TG das amostras (a) NP1A, (b) NP1B e (c) NP1D.

Tabela 11. Perda de massa das amostras NP1A, NP1B e NP1D na etapa de degradação entre 200 e 300 °C.

Amostras	Perda de Massa (%)
NP1A	8
NP1B	4
NP1D	3

Além disso, as perdas de massa entre 100 e 200 °C são associadas à água adsorvida nas amostras. Dessa forma, as curvas TG evidenciam a presença tanto de água adsorvida, quanto de grupos OH estruturais.⁶

As curvas M vs H das nanopartículas obtidas nessa etapa do estudo (Figura 41) mostraram que todas as amostras atingiram a saturação magnética. Os valores de M_S dessas amostras, bem como os valores de H_C e M_R estão expostos na Tabela 12.

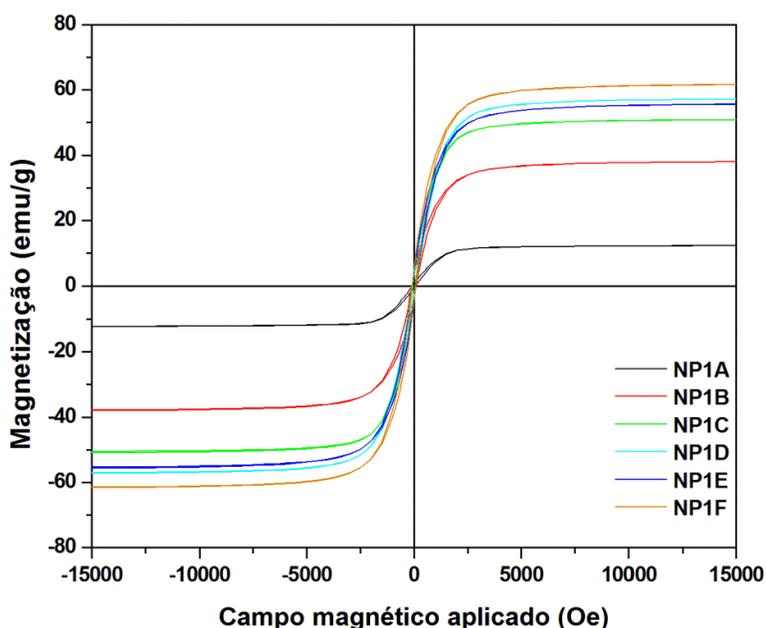


Figura 41. Curvas M vs H das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação de tempo de síntese.

Tabela 12. Propriedades magnéticas das amostras obtidas variando-se o tempo de reação.

Amostra	M_S (emu/g)	H_C (Oe)	M_R (emu/g)
NP1A	12,3	79,6	0,7
NP1B	37,8	93,4	3,2
NP1C	50,8	57,0	3,0
NP1D	56,9	71,5	3,1
NP1E	55,5	82,1	4,1
NP1F	60,9	79,5	4,6

É possível notar que os valores de M_S aumentam com o aumento do tempo de reação, isto é, com o aumento da quantidade de magnetita, como mostrado na Figura 42-a. A grande diferença observada entre as M_S das

amostras NP1A e NP1F pode ser explicada pela composição de cada uma delas, baseando-se nos difratogramas e nas dosagens, que evidenciam o aumento da fase ferromagnética (ou ferrimagnética) de magnetita, em detrimento da diminuição da fase pouco magnética de goethita, com o aumento do tempo de reação. A Figura 42-b mostra a M_S em função da quantidade estimada de magnetita contida nas amostras. Ajustando-se os dados experimentais, é possível estimar a M_S em 100%, isto é, para magnetita pura, em 85 emu/g, próximo ao valor da M_S da magnetita maciça descrita na literatura de 92 – 100 emu/g.⁶

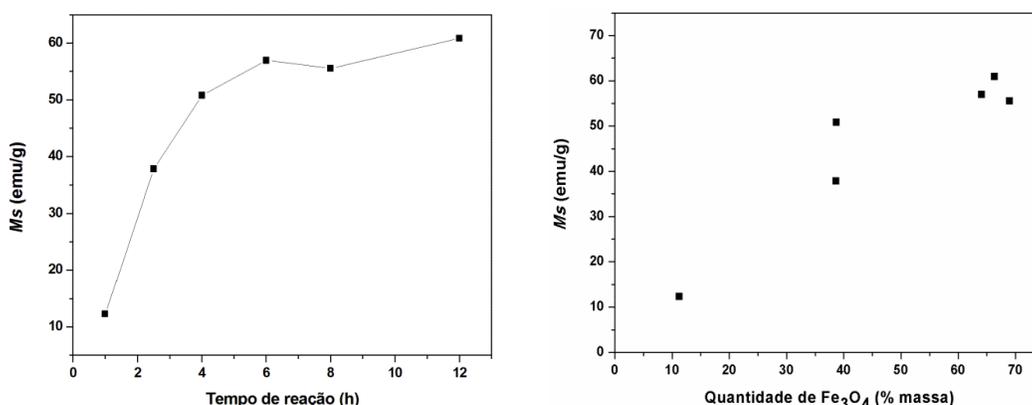


Figura 42. (a) M_S em função do tempo de reação e (b) M_S em função da quantidade estimada de magnetita em percentual de massa contida nas amostras.

A Figura 41 e a Tabela 12, juntamente com a Figura 43, que mostra o detalhe do laço de histerese dessas amostras, permitem observar que todas elas exibem comportamento ferromagnético, nessas situações. Os valores de M_R são baixos, apesar do campo relativamente alto, necessário para reverter essa magnetização.

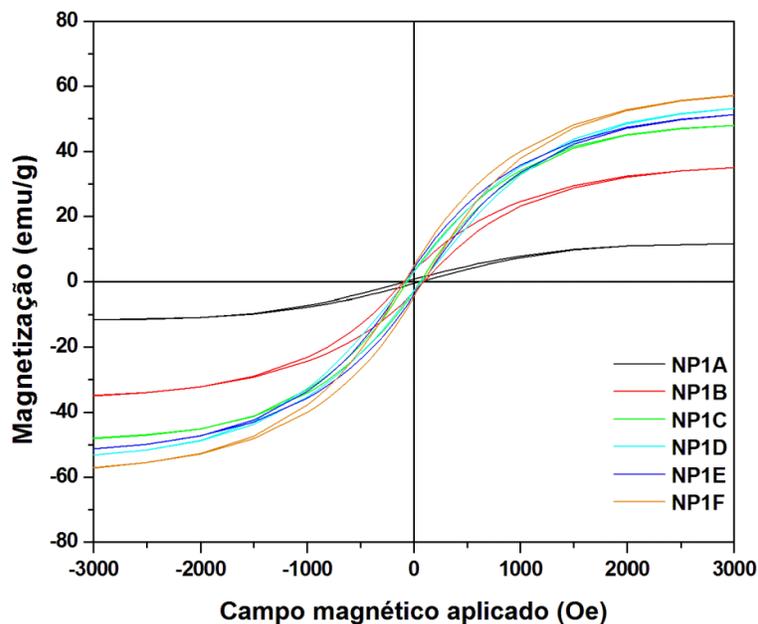


Figura 43. Detalhe do laço de histerese da curva M vs H nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação de tempo de síntese.

Apesar da amostra NP1F apresentar a maior M_S , optou-se por dar continuidade aos estudos com a amostra NP1D, visto a diferença na M_S vir acompanhada de uma menor M_R e H_C . Além disso, a amostra NP1D apresenta dimensões inferiores às da amostra NP1F, e um perfil de distribuição de comprimento e largura que sugerem uma dispersão menor, aumentando o seu potencial em certas aplicações biomédicas. Os outros resultados apresentados não mostraram diferenças significativas entre as amostras NP1D e NP1F, de modo que essa seleção foi baseada nos fatores já mencionados e em 6 h a menos de reação para obtê-los, o que torna essa síntese mais viável. Assim, as sínteses das outras etapas foram realizadas com esse tempo de reação, não descartando a possibilidade de retomar os estudos com outras amostras desse grupo mais adiante, se for julgado interessante.

4.1.2. INFLUÊNCIA DOS CONTRA-ÍONS

Nessa etapa, a influência dos contra-íons nas nanopartículas sintetizadas foi avaliada. A Tabela 13 foi desenvolvida visando a uma melhor visualização da proporção entre os reagentes utilizados nas sínteses.

Tabela 13. Proporção entre os reagentes utilizados na síntese da NP2A, NP1D, NP2B e NP2C.

Amostra	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$
NP2A	1	-	2	-
NP1D	-	1	2	-
NP2B	-	1	-	2
NP2C	1	-	-	2

As imagens de MET das amostras obtidas com variação dos contra-íons mostraram as diferenças nos formatos e dimensões dessas nanopartículas, como pode ser observado nas Figuras 44 e 45 e na Tabela 14.

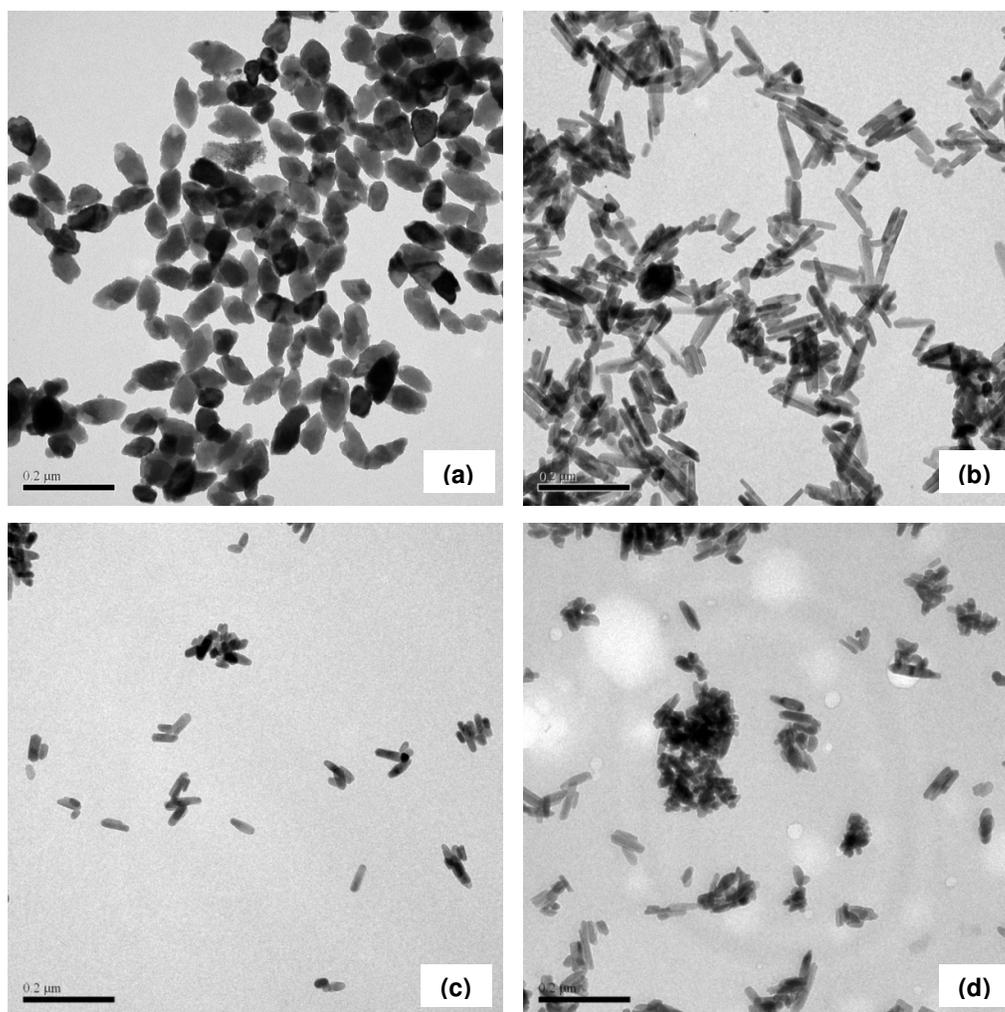


Figura 44. Imagens obtidas por MET das nanopartículas sintetizadas com variação dos contra-íons. (a) NP2A, (b) NP1D, (c) NP2B, (d) NP2C. Barra de escala = 0,2 μm.

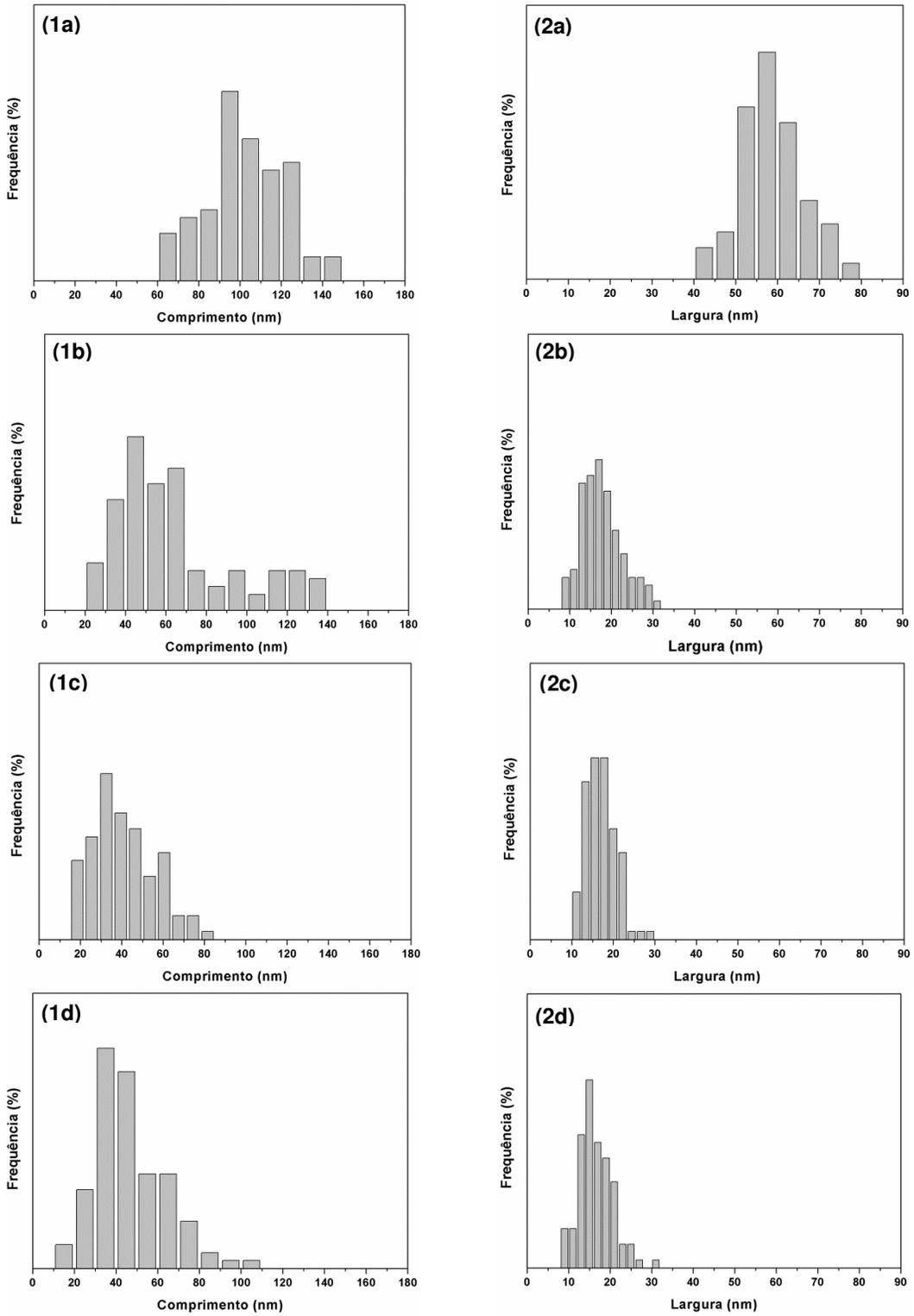


Figura 45. Histogramas de distribuição de comprimento (1) e largura (2) para a (a) NP2A, (b) NP1D, (c) NP2B e (d) NP2C.

Tabela 14. Dimensões médias das nanopartículas magnéticas obtidas com a variação do tempo de reação e seus respectivos desvios-padrão.

Amostra	Comprimento médio (nm)	Largura média (nm)
NP2A	102,6 ± 3,3	57,7 ± 0,5
NP1D	49,9 ± 2,0	16,5 ± 0,3
NP2B	36,0 ± 2,2	16,5 ± 0,3
NP2C	40,6 ± 1,6	15,9 ± 0,4

Considerando-se apenas os contra-íons, a amostra NP2A foi sintetizada utilizando-se somente Cl^- , o que resultou em nanopartículas com o formato mostrado na Figura 44a e dimensões superiores às das outras amostras (aproximadamente, 2 vezes o comprimento e 3,5 vezes a largura da NP1D). O formato dessas partículas é alongado, porém não se assemelham ao formato das nanopartículas sintetizadas com reagentes contendo SO_4^{2-} . Alguns estudos foram feitos para entender a influência do Cl^- na formação de óxidos de ferro. Musić e colaboradores⁸⁹ realizaram a hidrólise de FeCl_3 em soluções contendo ureia a elevadas temperaturas. Eles observaram que o produto hidrolítico principal é a akaganeita ($\beta\text{-FeOOH}$), rapidamente convertida em hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). De acordo com Sugimoto,⁶⁰ os íons Cl^- produzem hematita pseudocúbica, pelo retardamento do crescimento da fase (012), em sistemas sol-gel altamente condensados. Segundo Cornell,⁶ o íon Cl^- favorece à formação de lepidocrocita ($\gamma\text{-FeOOH}$). Foi sugerido que ele retarda a formação de magnetita, impedindo a condensação de grupos OH vizinhos, para a formação das pontes Fe-O-Fe.

No presente estudo, o alongamento das partículas da amostra NP2A indica que não só a precipitação homogênea influencia na morfologia dessas nanopartículas, mas também a formação de um intermediário alongado, uma vez que não houve a adição de SO_4^{2-} . Dessa forma, é provável que essa síntese tenha passado pela akaganeita como intermediário, cujas morfologias básicas são somatóide e bastão. A possibilidade de formação de outro intermediário poderia explicar as diferenças de morfologia e composição das nanopartículas formadas.

Em contra-partida, a adição de SO_4^{2-} mesmo em pequena proporção (NP1D), conduz à formação de nanopartículas alongadas com formato de bastões, provavelmente, como descreve a literatura.⁶⁰ pela adsorção específica

desses ânions às faces do cristal paralelas ao eixo *c*, suprimindo o crescimento do cristal na direção normal a esse eixo. É interessante ressaltar que as nanopartículas que não tiveram a adição de SO_4^{2-} (NP2A) apresentaram largura 3,5 vezes superior a maior largura obtida nesse grupo de sínteses (NP1D), corroborando a hipótese da adsorção específica desses ânions. Além disso, o SO_4^{2-} induz à formação de goethita,⁶ cuja morfologia básica é acicular. Assim, o formato das nanopartículas sintetizadas com esse contra-íon pode ser resultado tanto da adsorção específica do SO_4^{2-} , quanto da transformação topotática do provável intermediário goethita em magnetita.

Em relação à amostra NP2B, o que mais chama a atenção é a redução de sua polidispersão, ou seja, a variação das dimensões dessas nanopartículas é menor do que das amostras sintetizadas com Cl^- . Assim, pode-se supor que esse ânion interfere na polidispersão das nanopartículas. Além disso, as amostras NP2B e NP2C apresentaram comprimento médio um pouco menor do que das nanopartículas já discutidas.

Os difratogramas das nanopartículas sintetizadas variando-se o contra-íon, bem como os cálculos de d_{hkl} , apresentaram diferenças significativas, de maneira que eles foram estudados separadamente.

O difratograma da NP2A apresentou estreita relação com o difratograma do padrão de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), como mostra a Figura 46. Os resultados da Tabela 15 comprovam essa proximidade.

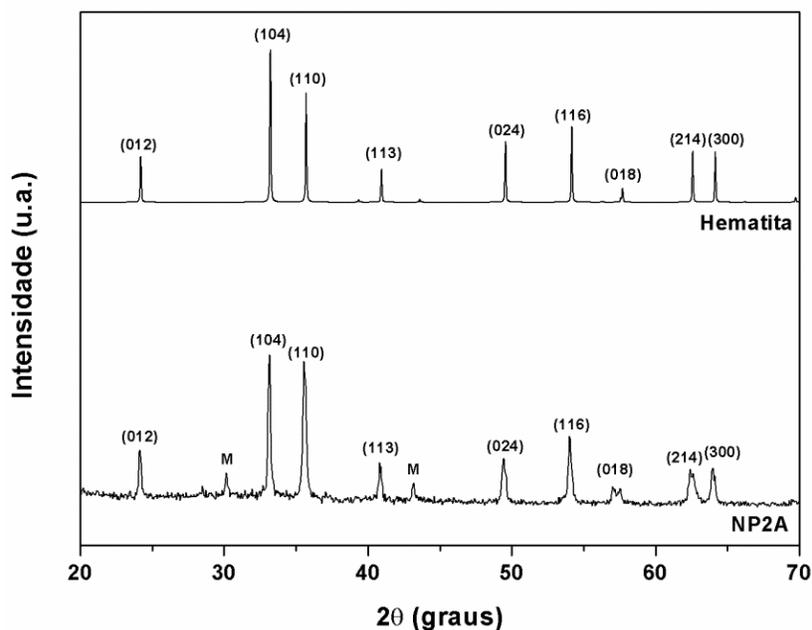


Figura 46. Comparação entre os difratogramas da NP2A e do padrão de hematita.

Tabela 15. Indexação dos picos do difratograma da NP2A como hematita.

Pico	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
1	0,1626	24,1390	0,3684	0,3660	33,4	25	012
3	0,1690	33,1400	0,2701	0,2690	100,0	100	104
4	0,2430	35,5800	0,2521	0,2510	93,2	50	110
5	0,2234	40,8490	0,2207	0,2201	25,3	30	113
7	0,2519	49,4420	0,1842	0,1838	30,9	40	024
8	0,2261	54,0430	0,1695	0,1690	44,7	60	116
10	0,3118	57,4740	0,1602	0,1596	9,0	16	018
11	0,4214	62,5160	0,1485	0,1484	21,7	35	214
12	0,2779	63,9820	0,1454	0,1452	24,0	35	300

A formação dos óxidos mistos, todavia, acontece. A presença de picos não indexados como hematita, marcados como “M” na Figura 46, podem ser indexados como o (220), (400) e (511) do espinélio. O d_{hkl} desses picos está entre o da magnetita e o da maghemita cúbica, de modo que podemos supor que se trata de uma fase intermediária, devido à oxidação parcial de Fe(II) a Fe(III). Além desses picos, nota-se que o pico indexado como (110) da NP2A apresenta intensidade relativa quase duas vezes superior ao da hematita pura. Esse pico se encontra na mesma região do (311) do espinélio, inferindo-se que o pico da NP2A pode ser resultado da soma do (110) da hematita com o (311)

do espinélio. Do difratograma da NP2A conclui-se, portanto, que essa amostra contém no mínimo duas fases, a hematita e a fase intermediária entre magnetita e maghemita, sendo a primeira, a provável fase principal. Esse resultado está coerente com a literatura, que diz que o Cl^- induz a formação de hematita⁸⁹ e tende a retardar a formação de magnetita.⁶

Os difratogramas da NP2B e NP2C (Figura 47) apresentaram um perfil mais complexo. Os cálculos de d_{hkl} , mostrados na Tabela 16, confrontados aos dados da goethita, mostraram semelhanças entre eles. O difratograma da NP2B apresenta picos estranhos à goethita, relacionados aos picos do espinélio e marcados com “M” nessa Figura.

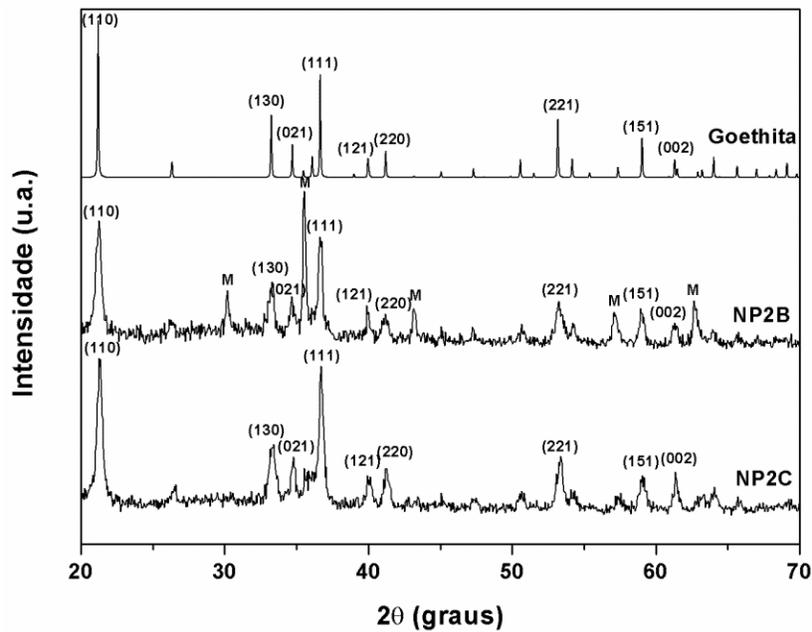


Figura 47. Comparação entre os difratograma da NP2B, NP2C e goethita pura.

Tabela 16. Tabela comparativa da NP2B e NP2C, indexadas como goethita.

Pico 1							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP2B	0,3749	21,2230	0,4183	0,4183	100,0	100	110
NP2C	0,3495	21,3000	0,4168	0,4183	100,0	100	110
Pico 2							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP2B	0,3613	33,2410	0,2693	0,2693	45,2	35	130
NP2C	0,4808	33,3130	0,2687	0,2693	41,6	35	130
Pico 3							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP2B	0,2950	34,6940	0,2584	0,2583	22,7	12	21
NP2C	0,2581	34,7720	0,2578	0,2583	29,3	12	21
Pico 4							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP2B	0,2563	36,6570	0,2450	0,2450	85,3	50	111
NP2C	0,2836	36,7200	0,2446	0,2450	84,2	50	111
Pico 5							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP2B	0,1692	39,9620	0,2254	0,2253	24,2	14	121
NP2C	0,4015	40,0600	0,2249	0,2253	20,4	14	121
Pico 6							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP2B	0,5322	41,1550	0,2192	0,2190	23,2	18	140
NP2C	0,4204	41,2680	0,2186	0,2190	26,2	18	140
Pico 7							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP2B	0,4625	53,2830	0,1718	0,1719	31,3	20	221
NP2C	0,4325	53,3280	0,1717	0,1719	35,5	20	221
Pico 8							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP2B	0,3671	59,0210	0,1564	0,1564	30,6	10	151
NP2C	0,5091	59,0890	0,1562	0,1564	24,3	10	151
Pico 9							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP2B	0,4533	61,3180	0,1511	0,1509	21,0	8	2
NP2C	0,2698	61,3840	0,1509	0,1509	22,6	8	2

Tal como na amostra NP2A, o d_{hkl} dos picos marcados com “M” está entre o da magnetita e o da maghemita cúbica, de modo que deve se tratar de uma fase intermediária, devido à oxidação parcial de Fe(II) a Fe(III). Essa amostra, sintetizada apenas com SO_4^{2-} , é uma mistura de pelo menos essas duas fases, com aparente predominância da goethita. Esses picos não são identificados na NP2C, o que é um resultado interessante, visto que essa amostra foi sintetizada com os ânions Cl^- e SO_4^{2-} como a NP1D. Entretanto, essa última é composta majoritariamente por magnetita. É sabido que o $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ é instável e facilmente oxidado, o que pode justificar a diferença de composição da NP2C e NP1D, pois, provavelmente, não havia Fe^{2+} em solução para que ocorresse a formação do cristal misto. De qualquer modo, esses resultados indicam que, como mencionado anteriormente, o SO_4^{2-} induz a formação de goethita.⁶

A Figura 48 mostra a comparação entre os difratogramas das amostras obtidas nessa etapa do estudo. Dela, infere-se que a influência dos contra-íons (e dos reagentes) ultrapassa a morfologia das partículas, afetando a sua composição.

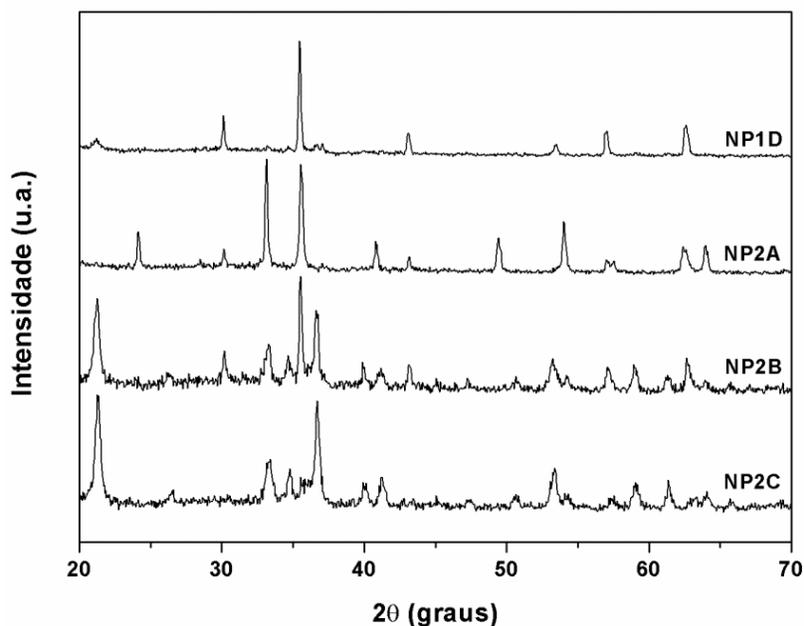


Figura 48. Difratogramas das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação do contra-íon.

A Tabela 17 mostra os resultados da determinação de Fe(II) e ferro total nessas amostras, aonde pode-se observar que as amostras sintetizadas com $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ apresentaram uma maior quantidade de Fe(III), especialmente a NP2C. Uma vez que no difratograma dessa amostra não foi possível identificar picos de espinélio, esses resultados são coerentes entre si, mostrando que na NP2C houve larga oxidação de Fe(II) a Fe(III).

Tabela 17. Proporção de Fe(II) e Fe(III) nas amostras obtidas com a variação dos contra-íons, determinada por Dicromatometria.

Amostra	Fe(II) (mol)	Fe(III) (mol)
NP2A	1,00	20,15
NP2B	1,00	14,85
NP2C	1,00	53,53
NP1D	1,00	3,46

Visto que a reação é realizada em atmosfera oxidativa, os íons Fe(II) do $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ podem ter sido amplamente oxidados a Fe(III) durante a reação, devido à instabilidade desse sal. Esses resultados estão coerentes com os apresentados por DRX, que mostram que a única amostra cuja fase principal é magnetita é a NP1D, cuja proporção Fe(II)/Fe(III) é razoável.

A banda de absorção na região acima de 3000 cm^{-1} , nos espectros de FTIR das amostras NP2B e NP2C (Figura 49), possui um perfil diferente das amostras NP2A e NP1D. Essa banda, nas amostras NP2B e NP2C, pode ser considerada como a sobreposição de ao menos quatro bandas: (i) a banda em 3447 cm^{-1} pode ser associada às vibrações dos grupos OH superficiais, adsorvidos do meio aquoso, aonde foi realizada a síntese, ou do ambiente; (ii) a banda em 3352 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração da ligação N-H, oriunda da ureia utilizada; e (iii) a banda de absorção em 3200 cm^{-1} , pode ser relacionada à vibração de estiramento da ligação O-H estrutural. A presença da banda em 3200 cm^{-1} é coerente com o resultado obtido por DRX, que mostrou que essas amostras são compostas, principalmente por goethita. Essa banda não pode ser identificada nos espectros das amostras NP1D e NP2A. Como discutido previamente, a amostra NP1D é composta, principalmente, por magnetita, contendo traços de goethita, que não devem ser expressivos o suficiente, para que essa banda seja visível. Já a amostra NP2A, é majoritariamente composta

por hematita, com traços de magnetita. Ambos os óxidos de ferro, teoricamente, não contém OH estrutural. Ruan e colaboradores⁹⁰ mostraram que hematita com excesso de OH⁻, chamada de hidrohematita, pode ser formada a partir da goethita.

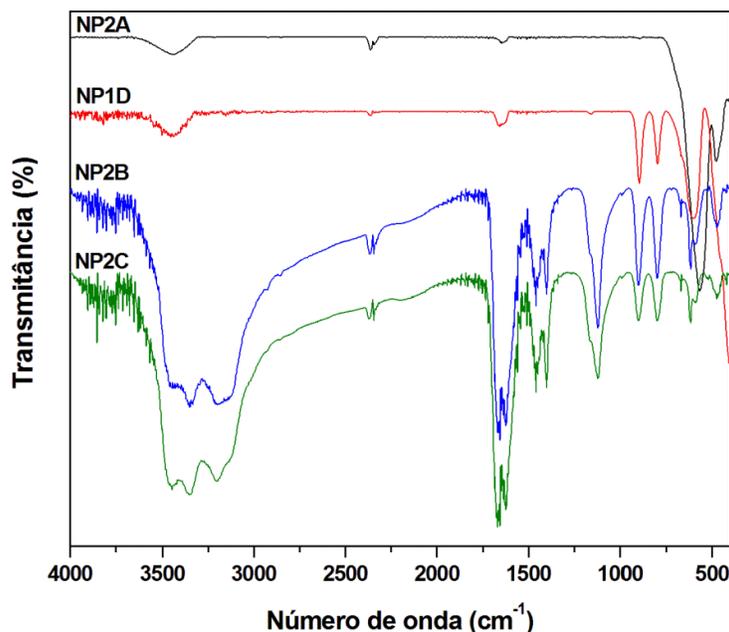


Figura 49. Espectros de FTIR das nanopartículas sintetizadas, variando-se os contra-íons.

As bandas de absorção relativas à deformação HOH continuam presentes nos espectros tanto das amostras, quanto dos reagentes utilizados (Figuras 49 e 50) na região de 1660-1630 cm⁻¹. Como mencionado anteriormente, ela pode ser relacionada à umidade adsorvida no KBr utilizado para fazer as pastilhas, bem como à água adsorvida à superfície das amostras. Nas amostras NP2B e NP2C, entretanto, essa banda se dividiu em duas, centradas em 1662 e 1623 cm⁻¹. A divisão das bandas de deformação HOH é descrita na literatura e atribuída ao forte acoplamento entre os diferentes modos vibracionais desse grupo.⁹¹

Outro aspecto interessante dos espectros dessas duas amostras é o aparecimento de duas bandas em 1463 e 1400 cm⁻¹, atribuídas à absorção da ligação N-H, dos grupos oriundos da ureia, concordando com a banda em 3352 cm⁻¹. Isso sugere a presença desses grupos, que de alguma forma ficaram adsorvidos e não foram liberados como amônia.

O espectro do $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Figuras 50 e 51) apresenta quatro bandas em 1225 , 1144 , 1067 e 994 cm^{-1} , relacionadas à vibração do SO_4^{2-} . De acordo com discussão prévia, pode-se concluir que o SO_4^{2-} se coordena como um ligante bidentado (Figura 39c e 39d)⁸⁸ nesse sal. As bandas em 675 , 587 e 499 cm^{-1} também são atribuídas à absorção desse ânion.

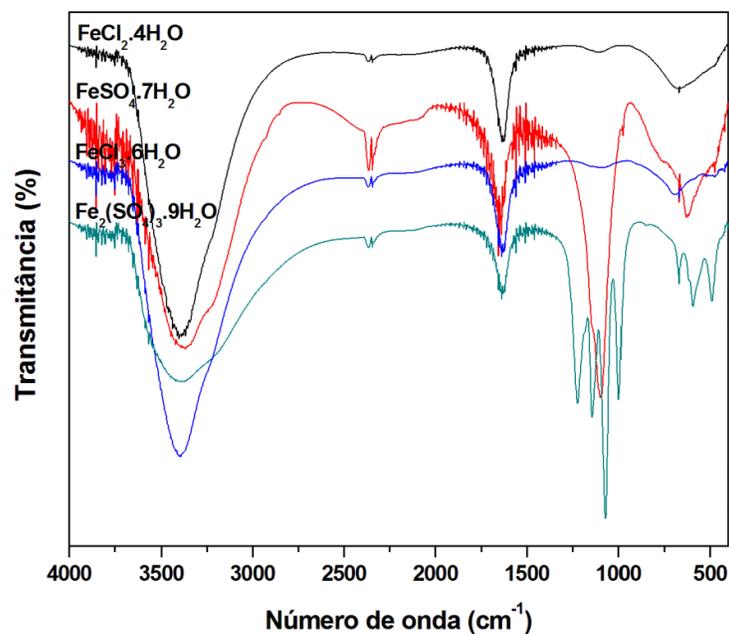


Figura 50. Espectro de FTIR dos reagentes utilizados nas sínteses das nanopartículas obtidas, variando-se os contra-íons.

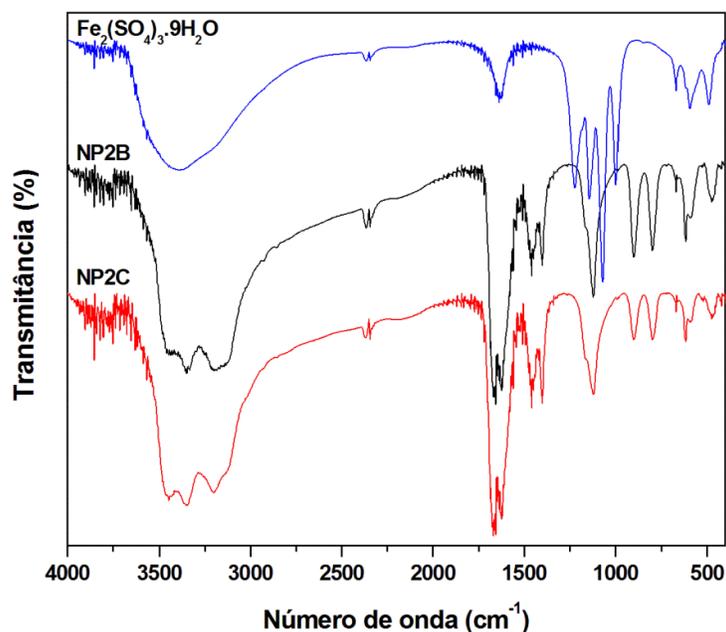


Figura 51. Comparação entre os espectros de FTIR do $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e das amostras NP2B e NP2C.

Os espectros das amostras NP2B e NP2C apresentam uma banda em 1116 cm^{-1} com um ombro em 1170 cm^{-1} , semelhante ao perfil do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e diferente do perfil do $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Porém, elas também apresentaram as bandas em 675, 587 e 499 cm^{-1} de maneira idêntica ao $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Relacionando esses dados às imagens obtidas por MET dessas nanopartículas, observa-se que elas possuem formato semelhante, porém dimensões levemente reduzidas, quando comparadas à NP1D. Dessa forma, supõe-se que o sulfato se coordenou às nanopartículas NP2B e NP2C de maneira tal, que o número de sítios acessíveis para o crescimento adicional do cristal foi reduzido, levando a partículas menores.⁹² A Figura 52 mostra os modos de coordenação possíveis de ligantes à superfície dos óxidos de ferro.⁶ Suspeita-se, portanto, que esse ânion pode se coordenar de maneiras distintas nessas amostras, porém mais análises precisariam ser feitas para aprofundar essa discussão.

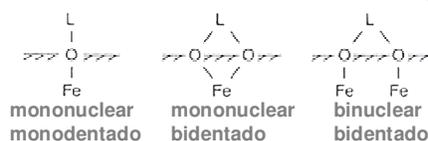


Figura 52. Modos de coordenação de ligantes à superfície dos óxidos de Fe.⁶

Tal como os espectros das nanopartículas obtidas com variação do tempo de síntese, a NP2B e NP2C também possuem duas bandas em 897 e 798 cm^{-1} , relacionadas às deformações da ligação O-H.^{6,85,86,90}

Ruan e colaboradores⁹⁰ atribuem as bandas de vibração abaixo de 700 cm^{-1} às vibrações do retículo octaédrico de FeO_6 . No espectro da amostra NP2A, a banda em 564 cm^{-1} é característica da hematita e associada à vibração Fe-O. Pode-se observar o deslocamento dessa banda para comprimentos de onda maiores na amostra NP1D (600 cm^{-1}) e NP2B e NP2C (620 cm^{-1}), em concordância com as regiões dessa vibração na magnetita e na goethita, respectivamente.⁶ Esses resultados corroboram a hipótese de que a fase principal formada na NP2A é hematita, na NP1D é magnetita e nas NP2B e NP2C é goethita.

As curvas M vs H das nanopartículas obtidas variando-se os contra-íons foram mostradas separadamente, visto a discrepância em suas respostas ao campo magnético aplicado.

Na Figura 53, as curvas M vs H das amostras NP2A e NP2B, mostram que essas amostras atingem a saturação magnética. Esse resultado preliminar concorda com os resultados de DRX, que assinalam a presença de magnetita ou maghemita nessas amostras, visto que hematita e goethita não se saturam em campos de 1-2 T.

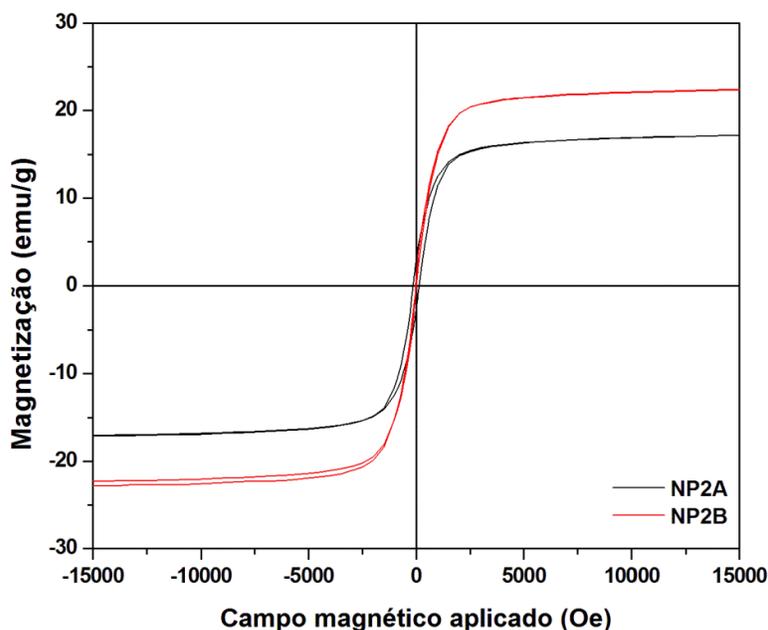


Figura 53. Curvas M vs H da NP2A e NP2B.

A M_S da NP2B é maior que da NP2A (Tabela 18), resultado coerente com os apresentados até aqui. Foi mostrado anteriormente que essas amostras apresentam proporções próximas de Fe(II):Fe(III), sendo que a NP2B possui mais Fe(II), o que sugere uma maior quantidade de magnetita nessa amostra, aumentando, portanto, a sua M_S . Esses valores para a goethita e a hematita descritos na literatura são 0,01-1 emu/g e 0,3 emu/g,⁶ respectivamente, o que fortalece a suspeita da presença de outra fase, visto que os valores de M_S das amostras são superiores a esses.

Tabela 18. Propriedades magnéticas das amostras sintetizadas variando-se os contra-íons.

Amostra	M_S (emu/g)	H_C (Oe)	M_R (emu/g)
NP2A	17,1	143,6	2,7
NP2B	22,4	4,4	0,8
NP2C	-	70,8	0,4
NP1D	57,0	71,5	3,1

Na curva M vs H da NP2C (Figura 54), observa-se, primeiramente, que essa amostra não atinge a saturação magnética. O seu valor de magnetização máxima em campos altos é 3,15 emu/g. Todos os resultados mostrados até aqui confirmam a suspeita de que essa amostra, provavelmente, não contém espinélio e deve ser composta por goethita e outras fases pouco magnéticas.

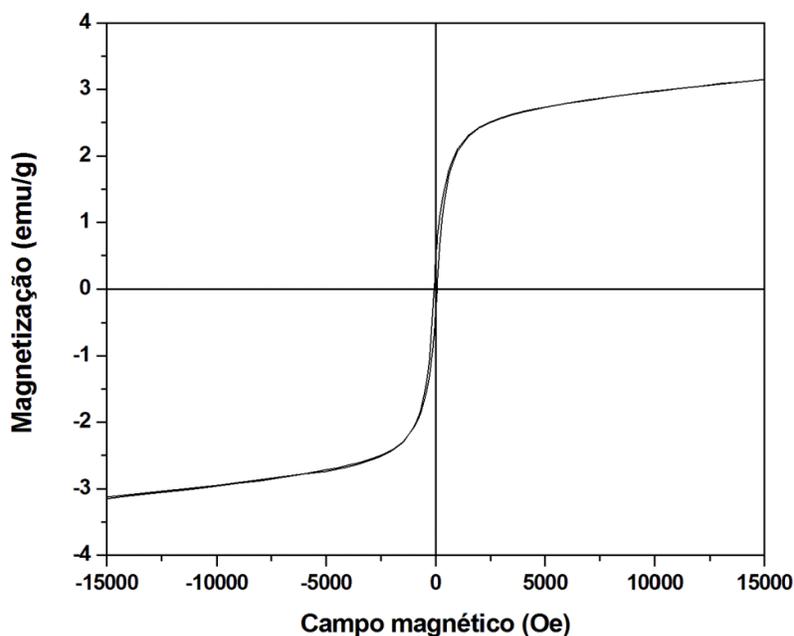


Figura 54. Curva M vs H da NP2C.

A Figura 55 mostra o detalhe do laço de histerese correspondente à magnetização e desmagnetização das amostras, da qual se conclui que elas apresentam comportamento ferromagnético ou ferrimagnético, nessas condições. Os valores de M_R , contudo, são muito baixos. Um resultado interessante é o elevado valor de coercividade da NP2A, indicando que apesar da magnetização remanente ser baixa, é necessário um campo relativamente alto para revertê-la, ou seja, os momentos dessa amostra resistem à desmagnetização.

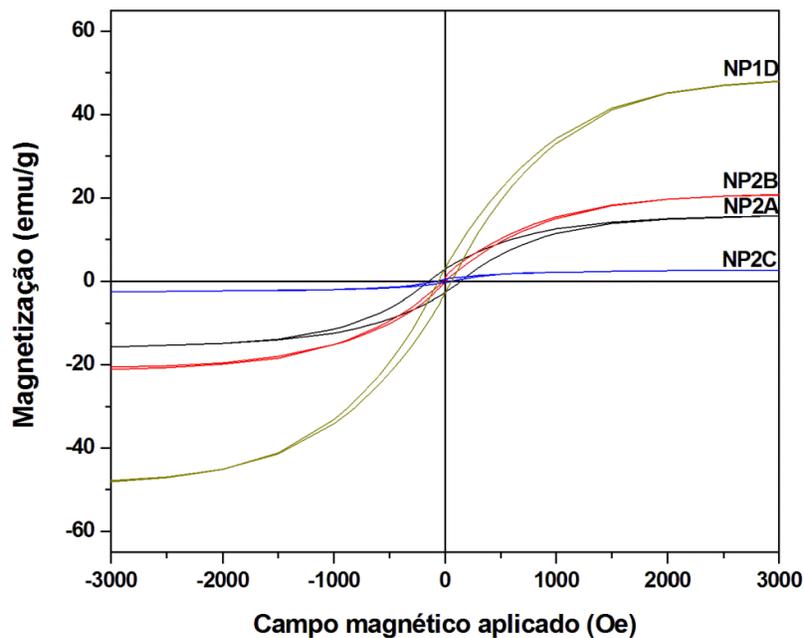


Figura 55. Detalhe do laço de histerese das curvas M vs H da NP2B e NP2C.

A Figura 56 compara as curvas M vs H de todas as amostras dessa etapa, mostrando a influência dos contra-íons nas propriedades magnéticas das nanopartículas obtidas.

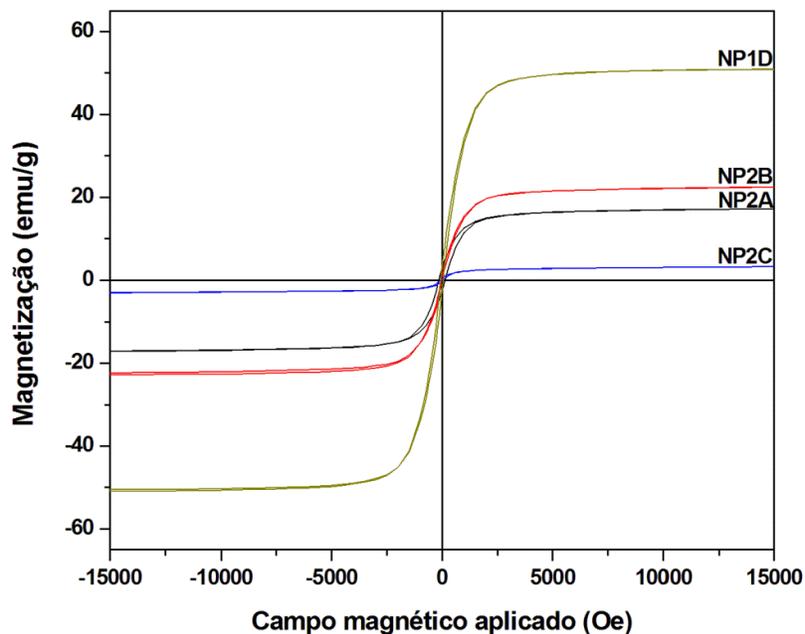


Figura 56. Curvas M vs H das nanopartículas magnéticas sintetizadas, variando-se os contra-íons.

A união de todos os resultados das amostras obtidas com variação dos contra-íons mostrou que a combinação de contra-íons que mais atende aos objetivos desse estudo é a da amostra NP1D.

4.1.3. INFLUÊNCIA DA PROPORÇÃO ENTRE Fe(II) E Fe(III)

De acordo com a reação de formação da magnetita (Eq. Quím. 3), é necessário uma razão molar inicial de $\text{Fe(II)/Fe(III)} = 1:2$, para a formação desse óxido misto. Nessa etapa, foi estudada a influência dessa proporção no produto obtido.

As imagens obtidas por MET das nanopartículas sintetizadas variando-se a proporção entre Fe(II) e Fe(III) (Figura 57) mostraram que a morfologias das amostras NP3A e NP3B diferem, consideravelmente, da morfologia da amostra NP1D. Elas apresentaram formato indefinido, entre o esférico e o pseudocúbico e, aparentemente, uma forte tendência para formarem aglomerados nessas condições. Além disso, é importante notar que o filme de Formvar das telinhas de cobre usadas como substrato foi danificado no preparo das amostras NP3A e NP3B. Essas sínteses e caracterizações, contudo, foram

repetidas, alcançando-se os mesmos resultados, assegurando que as nanopartículas obtidas por essa síntese de fato possuem esse aspecto. A imagem da amostra NP3A utilizada se refere à repetição dessa caracterização e por isso, o fundo está normal. Já a imagem selecionada da amostra NP3B, se refere ao primeiro ensaio e foi selecionada para esse trabalho, porque se mostrou a mais representativa da amostra, mesmo com o fundo prejudicado.

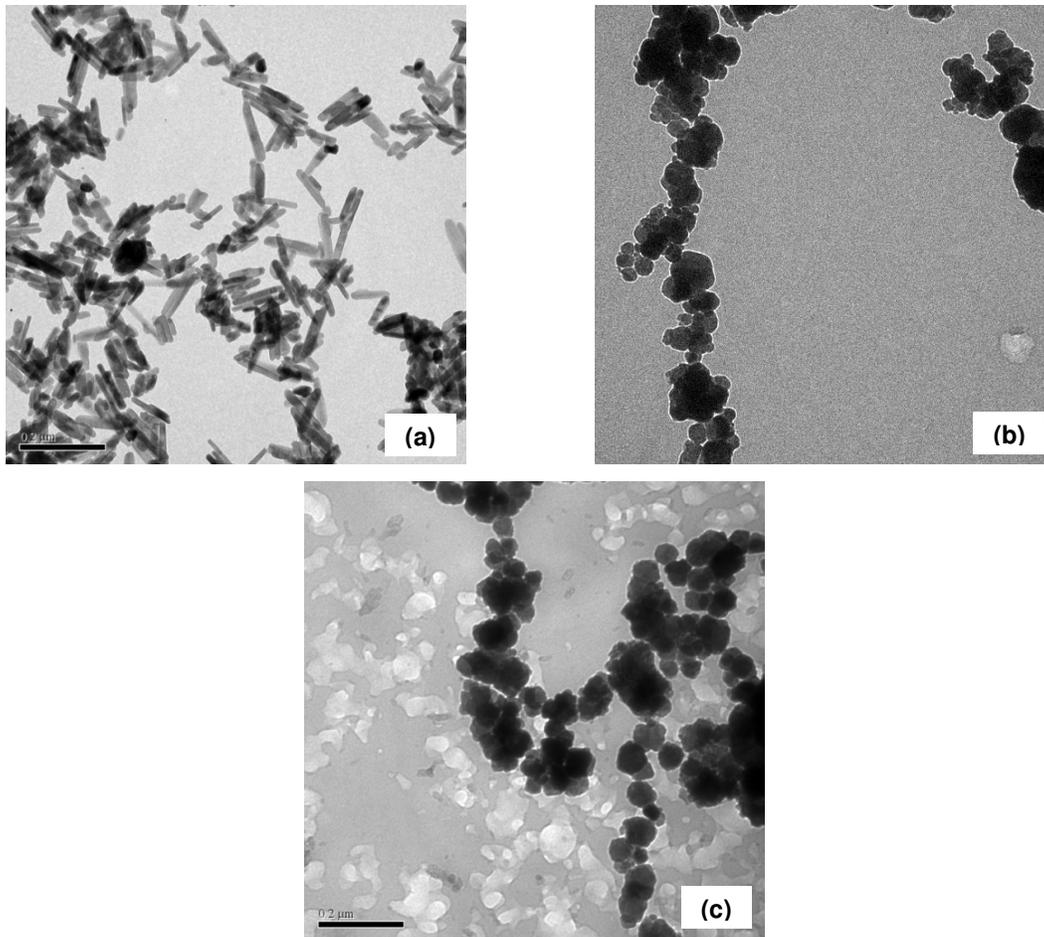


Figura 57. Imagens obtidas por MET das nanopartículas sintetizadas variando-se a proporção entre Fe(II) e Fe(III). (a) NP1D, (b) NP3A e (c) NP3B. Barra de escala = 0,2 μm .

Os difratogramas obtidos dessas amostras (Figura 58), bem como os cálculos e comparações com valores padrão de d_{hkl} correspondente a cada pico (Tabelas 19 e 20), mostraram que com as proporções estudadas, as amostras sintetizadas possuem a estrutura do espinélio e d_{hkl} entre os valores de magnetita e maghemita cúbica.

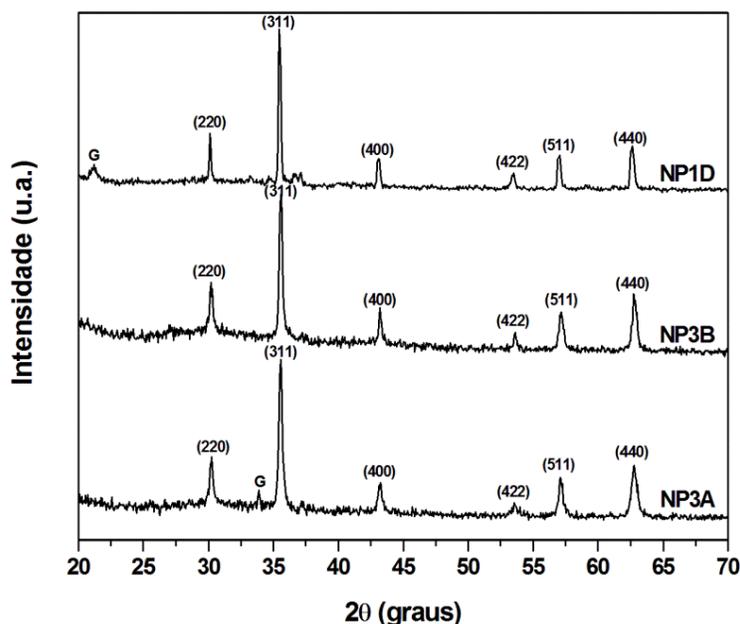


Figura 58. Difratogramas das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação da concentração de Fe(II) e Fe(III).

Sabendo-se que a maghemita e a magnetita possuem estrutura cristalina similar e que a diferença entre elas reside na ausência (idealmente) de Fe(II) no retículo cristalino, gerando vacâncias, supõe-se que nessas amostras ocorreu a oxidação parcial de Fe(II) a Fe(III), gerando vacâncias no retículo cristalino, tal como ocorreu em outras amostras já discutidas. Portanto, essa fase pode ser tratada como uma fase de transição entre os dois óxidos.

Tabela 19. Indexação dos picos de difração de raios X para as nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação proporção de Fe(II) e Fe(III).

<i>hkl</i>	$(d/di)_{teo}$	NP3A	NP3B	NP1D
		$(d/di)_{exp}$	$(d/di)_{exp}$	$(d/di)_{exp}$
220	1,000	1,000	1,000	1,000
311	1,173	1,172	1,173	1,173
400	1,414	1,413	1,414	1,414
422	1,732	1,730	1,732	1,731
511	1,837	1,835	1,837	1,837
440	2,000	1,998	2,000	2,000

Tabela 20. Tabela comparativa da NP3A e NP3B, indexadas como magnetita.

Pico 1									
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} Fe₃O₄ (nm)	d_{teo} γ-Fe₂O₃ (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl	
NP3A	0,2559	30,2110	0,2956	0,2967	0,2953	30,4	30	220	
NP3B	0,2357	30,1980	0,2957	0,2967	0,2953	30,0	30	220	
NP1D	0,1475	30,1200	0,2965	0,2967	0,2953	28,0	30	220	
Pico 2									
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} Fe₃O₄ (nm)	d_{teo} γ-Fe₂O₃ (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl	
NP3A	0,2669	35,5520	0,2523	0,2532	0,2518	100,0	100	311	
NP3B	0,2354	35,5730	0,2522	0,2532	0,2518	100,0	100	311	
NP1D	0,1677	35,4770	0,2528	0,2532	0,2518	100,0	100	311	
Pico 3									
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} Fe₃O₄ (nm)	d_{teo} γ-Fe₂O₃ (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl	
NP3A	0,3227	43,2100	0,2092	0,2099	0,2089	20,0	20	400	
NP3B	0,2228	43,2180	0,2092	0,2099	0,2089	21,7	20	400	
NP1D	0,2323	43,1070	0,2097	0,2099	0,2089	20,4	20	400	
Pico 4									
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} Fe₃O₄ (nm)	d_{teo} γ-Fe₂O₃ (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl	
NP3A	0,4780	53,6000	0,1708	0,1715	0,1704	6,8	10	422	
NP3B	0,1935	53,6210	0,1708	0,1715	0,1704	10,6	10	422	
NP1D	0,2844	53,4680	0,1712	0,1715	0,1704	8,8	10	422	
Pico 5									
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} Fe₃O₄ (nm)	d_{teo} γ-Fe₂O₃ (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl	
NP3A	0,3134	57,1450	0,1611	0,1616	0,1607	25,6	30	511	
NP3B	0,3457	57,1770	0,1610	0,1616	0,1607	26,2	30	511	
NP1D	0,2368	57,0210	0,1614	0,1616	0,1607	22,5	30	511	
Pico 6									
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} Fe₃O₄ (nm)	d_{teo} γ-Fe₂O₃ (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl	
NP3A	0,4175	62,7630	0,1479	0,1485	0,1476	33,4	40	440	
NP3B	0,3271	62,7850	0,1479	0,1485	0,1476	35,9	40	440	
NP1D	0,2899	62,6110	0,1482	0,1485	0,1476	27,2	40	440	

Comparando esses resultados com os da amostra NP1D, é possível notar, ao contrário das amostras obtidas com variação do tempo de reação, a ausência do pico (110) da goethita, nas amostras NP3A e NP3B. Entretanto, na NP3A, pode-se identificar um pico em $2\theta = 33,865$ ($d_{hkl} = 0,2645$ nm), que não pertence ao espinélio. Esse pico se aproxima do $d_{hkl} = 0,2693$ nm, (130) da goethita, entretanto, não se pode afirmar que se trata dele. De qualquer

maneira, a amostra NP3B não apresenta picos estranhos ao espinélio, indicando que se invertendo a proporção entre Fe(II) e Fe(III), essa estrutura é obtida, porém com morfologia indefinida e com forte tendência a se aglomerar. Isso sugere que além da influência dos ânions SO_4^{2-} e do processo de precipitação homogênea provocado pela hidrólise da ureia, a proporção entre os metais também influencia na morfologia das partículas. Com a ausência do pico (110) da goethita, supõe-se que, quando a proporção dos metais é variada, a síntese não passa por esse intermediário, o que poderia justificar a forma não alongada da NP3A e NP3B, assumindo que a influência dos ânions SO_4^{2-} não é suficiente para induzir, individualmente, as partículas ao alongamento, nessas condições.

Uma vez que a NP3A e a NP3B foram classificadas no sistema cúbico, a Equação 11 foi utilizada para calcular os seus parâmetros de cela, cujos resultados estão expostos na Tabela 21.

Tabela 21. Cálculo dos parâmetros de cela para as nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação da proporção entre Fe(II) e Fe(III).

	a_{exp} (nm)	$a_{\text{teo Fe}_3\text{O}_4}$ (nm)	$a_{\text{teo } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$ (nm)
NP3A	0,837	0,839	0,835
NP3B	0,836	0,839	0,835
NP1D	0,839	0,839	0,835

Dentre as amostras sintetizadas com a variação da proporção entre Fe(II) e Fe(III), a NP1D apresentou o resultado mais próximo ao da magnetita pura. Já as amostras NP3A e NP3B, como esperado, apresentaram valor de aresta entre o da magnetita e o da maghemita, fortalecendo a hipótese de que são uma fase intermediária desses dois óxidos.

A determinação de Fe(II) e ferro total por Dicromatometria (Tabela 22) mostrou que, utilizando uma maior quantidade inicial de Fe(II), obtém-se uma proporção mais razoável no produto final, caso este fosse identificado como magnetita. Os resultados, entretanto, não estão coerentes com os obtidos por DRX, os quais evidenciaram que a fase principal na amostra NP1D é magnetita e nas NP3A e NP3B, é uma fase intermediária entre magnetita e maghemita,

obtida pela oxidação de Fe(II) a Fe(III). A proporção entre Fe(II) e Fe(III) nessas amostras deveria, portanto, ser inferior à obtida para a NP1D.

Tabela 22. Proporção entre Fe(II) e Fe(III) nas amostras obtidas com a variação da proporção entre Fe(II) e Fe(III), determinada por Dicromatometria.

Amostra	Fe(II) (mol)	Fe(III) (mol)
NP3A	1,00	5,06
NP3B	1,00	2,62
NP1D	1,00	3,46

O que se observa nos resultados de Dicromatometria é que a amostra NP3B contém uma maior proporção Fe(II)/Fe(III), o que indicaria, a princípio, que essa amostra contém mais Fe(II) em sua estrutura e, portanto, o seu difratograma deveria apresentar maiores semelhanças com o da magnetita.

Como discutido anteriormente, quando a coprecipitação de Fe(II) e Fe(III) é realizada em atmosfera oxidativa, o Fe(II) é oxidado a Fe(III), sendo muito difícil manter a proporção Fe(II)/Fe(III) = 1:2 durante a precipitação. Para sanar esse problema, Maity e colaboradores⁸⁴ realizaram a coprecipitação de Fe(II) e Fe(III) com NH₄OH, utilizando razão molar inicial de Fe(II):Fe(III) ≥ 1:2, tal como foi feito nesse estudo. Apesar do objetivo dessas sínteses ter sido a formação de magnetita, os autores observaram que mesmo utilizando maiores quantidades de Fe(II), a fase principal formada em todas as razões Fe(II)/Fe(III) utilizadas foi a maghemita, devido à oxidação de Fe(II) em Fe(III), contendo um pouco de ε-Fe₂O₃ e traços de magnetita.

Os espectros de FTIR das amostras obtidas variando-se a proporção entre Fe(II) e Fe(III) (Figura 59) evidenciam a presença da banda relacionada à vibração do SO₄²⁻ na região de 1200-1000 cm⁻¹. Pode-se notar a provável sobreposição de outras bandas, de maneira que esse ligante deve se coordenar das formas (b), (c) ou (d) da Figura 39.

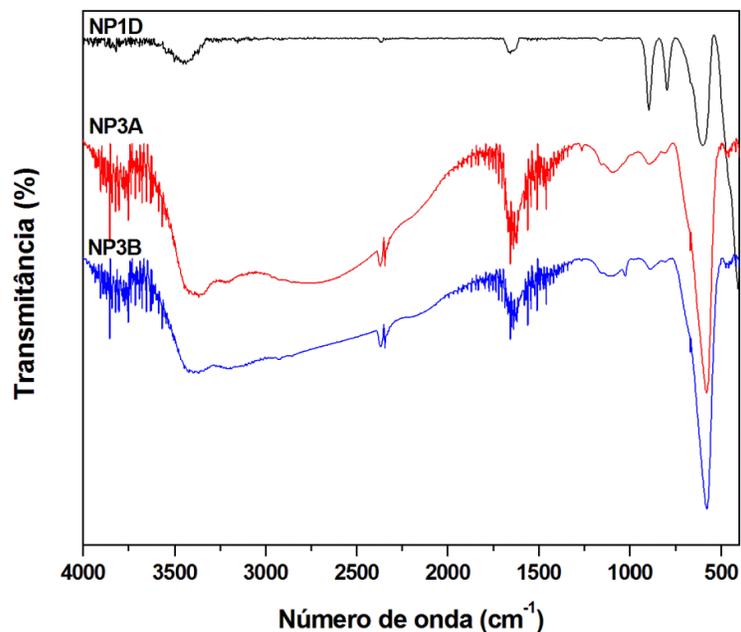


Figura 59. Espectros de FTIR das nanopartículas obtidas variando-se a proporção entre Fe(II) e Fe(III).

É possível observar também, uma diminuição significativa das bandas de deformação O-H em 897 e 798 cm^{-1} , características da goethita, concordando com os resultados obtidos por DRX.

Outro aspecto interessante nesses espectros é o deslocamento da banda do Fe-O para comprimentos de onda menores (581 cm^{-1}), em relação à NP1D (600 cm^{-1}). Esse deslocamento pode estar associado às vacâncias geradas pela oxidação parcial do Fe(II) a Fe(III), confirmando os resultados de DRX.

As curvas M vs H das amostras obtidas nessa etapa (Figura 60) mostram que essas amostras atingem a saturação magnética. Os valores de M_S estão expressos na Tabela 23.

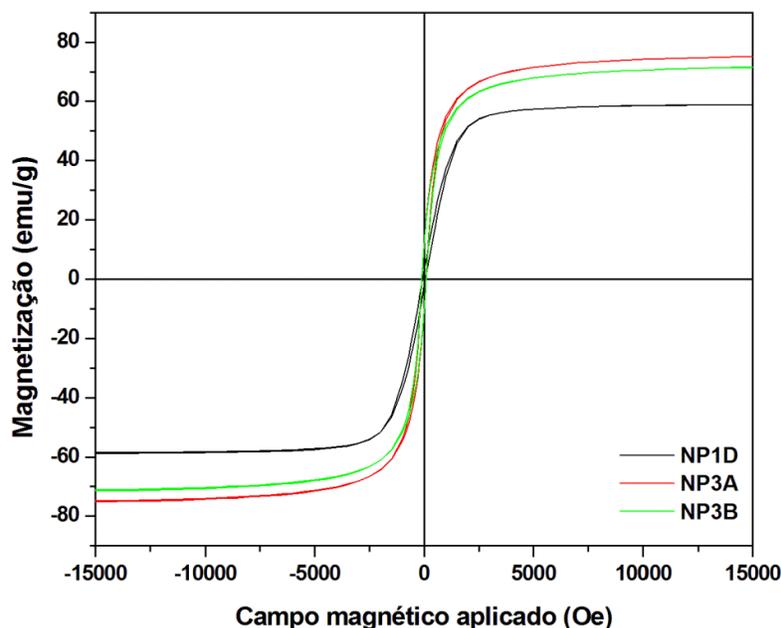


Figura 60. Curvas M vs H das nanopartículas magnéticas sintetizadas variando-se a proporção entre Fe(II) e Fe(III).

Os valores de M_S das amostras NP3A e NP3B são próximos e maiores que os da amostra NP1D. De fato, foi possível observar por DRX que as amostras NP3A e NP3B não possuem os picos indexados como goethita, de modo que elas são compostas majoritariamente por espinélio. Além disso, elas possuem morfologia bem diferente da amostra NP1D, fatores aos quais podem estar associados essa maior M_S .

Essas amostras foram relacionadas a fases intermediárias entre a magnetita e a maghemita. A M_S da maghemita descrita na literatura é 60 – 80 emu/g,⁶ em concordância com os valores obtidos. Então, apesar da amostra NP1D ser composta principalmente por magnetita, a sua M_S é inferior à das amostras NP3A e NP3B, compostas por uma fase intermediária entre magnetita e maghemita, que deveriam ser, supostamente, menos magnéticas, devido, provavelmente, à fase de goethita presente e à sua morfologia.

Tabela 23. Propriedades magnéticas das amostras obtidas variando-se a proporção entre Fe(II) e Fe(III).

Amostra	M_S (emu/g)	H_C (Oe)	M_R (emu/g)
NP3A	74,94	97,18	11,09
NP3B	71,40	102,19	11,26
NP1D	56,95	71,52	3,10

A Figura 61 mostra o detalhe do laço de histerese correspondente à magnetização e desmagnetização dessas amostras, da qual se conclui que as amostras apresentam comportamento ferromagnético ou ferrimagnético, nessas condições. Os valores de M_R e H_C (Tabela 23) das amostras NP3A e NP3B são superiores ao da NP1D, o que faz sentido, uma vez que a M_S dessas amostras também é superior. Esse resultado pode ser relacionado à maior tendência aparente que essas nanopartículas têm em se aglomerar, comparando-as com a NP1D, mostrado pelas imagens de MET.

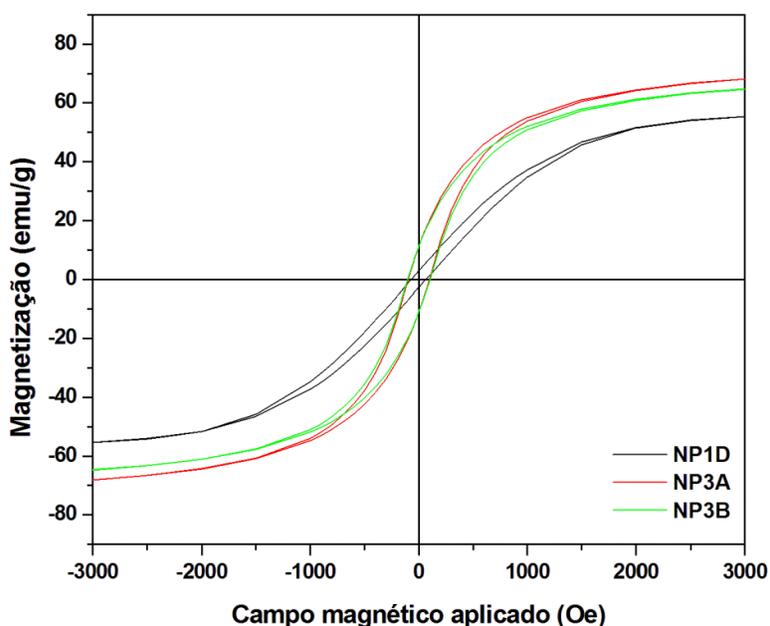


Figura 61. Detalhe do laço de histerese das curvas M vs H das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação da proporção entre Fe(II) e Fe(III).

Os resultados dessa etapa mostraram que apesar da obtenção de amostras supostamente mais puras e com M_S maior, o uso de proporções Fe(II)/Fe(III) > 0,5 levou à morfologias indesejáveis nesse estudo e a um valor

relativamente alto de magnetização remanente e coercividade. Assim, a amostra NP1D se mostrou a mais apropriada para os objetivos desse estudo, de maneira que foi selecionada nessa etapa.

4.1.4. INFLUÊNCIA DA BASE UTILIZADA NA ALCALINIZAÇÃO DO MEIO

Pela observação das imagens obtidas por MET das amostras sintetizadas variando-se a base utilizada na alcalinização do meio (Figura 62), notaram-se diferenças significativas no formato e dimensões das nanopartículas sintetizadas, dependendo da base utilizada.

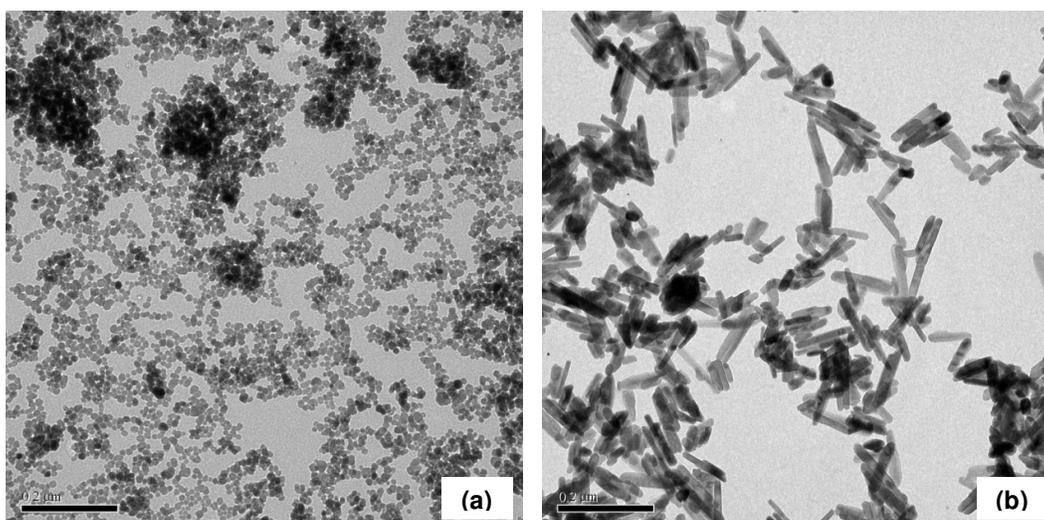


Figura 62. Imagens obtidas por MET das nanopartículas sintetizadas com variação da base utilizada na alcalinização do meio. (a) NP4A e (b) NP1D. Barra de escala = 0,2 μm.

A Figura 62a mostra que, utilizando-se NH_4OH , foram obtidas nanopartículas esféricas monodispersas com dimensões reduzidas, quando comparadas às nanopartículas sintetizadas utilizando-se ureia (Figura 62b). Os histogramas de distribuição de comprimento e largura, mostrados na Figura 63, assim como a Tabela 24, evidenciam diferenças significativas entre as dimensões das nanopartículas sintetizadas (os histogramas da amostra NP4A são os mesmos, mudando-se somente a escala para fins de comparação, uma vez que essas nanopartículas são esféricas).

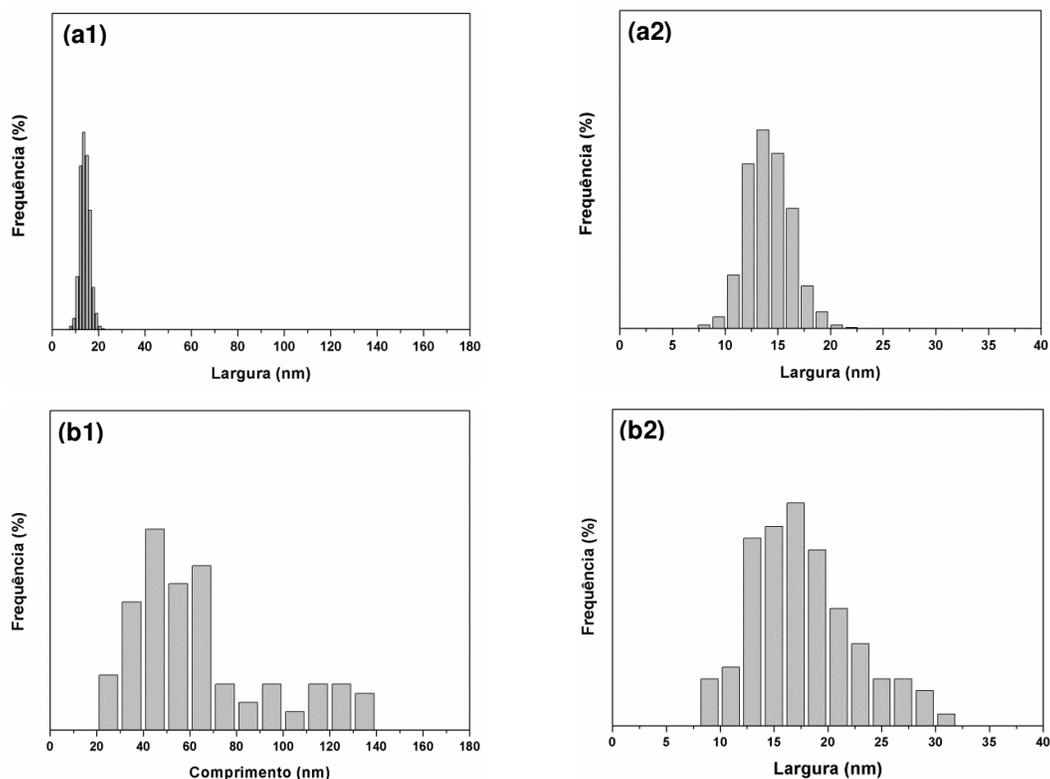


Figura 63. Histogramas de distribuição de comprimento (1) e largura (2) para a (a) NP4A e (b) NP1D.

Tabela 24. Dimensões médias das nanopartículas magnéticas obtidas com a variação do tempo de reação e seus respectivos desvios-padrão.

Amostra	Comprimento médio (nm)	Largura média (nm)
NP4A	$14,1 \pm 0,1$	$14,1 \pm 0,1$
NP1D	$49,9 \pm 2,0$	$16,5 \pm 0,3$

O primeiro fator observado nessas figuras é a notável diferença na dispersão das amostras NP4A e NP1D. Na síntese dessa amostra, o NH_4OH foi adicionado a frio, lentamente, sob agitação, e então, aquecido a $100\text{ }^\circ\text{C}$, sob refluxo, por 6 h. Mesmo com a adição lenta dessa base, ocorreu, provavelmente, a elevação da supersaturação relativa, resultando em um aumento significativo da velocidade da etapa de nucleação, de maneira que ela constituiu o mecanismo de precipitação principal e um grande número de partículas pequenas com dimensões semelhantes foi formado.⁸² Já na síntese da NP1D, a precipitação ocorreu a partir da geração homogênea de íons hidróxido, de maneira que a supersaturação relativa foi, provavelmente,

mantida baixa durante toda a precipitação, favorecendo a velocidade de crescimento das partículas, em detrimento da nucleação adicional. Sabendo-se que os íons SO_4^{2-} se adsorvem especificamente nos núcleos, o crescimento das partículas ocorreu na direção do eixo c , de maneira que a largura média das nanopartículas da NP1D se aproxima das dimensões da NP4A. Segundo Itoh e colaboradores,⁹³ a adsorção dos íons sulfato ocorre lentamente. Dessa maneira, a técnica de precipitação utilizada pode influenciar a forma das nanopartículas obtidas, uma vez que permite essa adsorção.

A Figura 64 revela que os picos do difratograma da NP4A estão levemente deslocados para a direita, se sobrepondo aos picos do padrão de maghemita. Esse deslocamento é confirmado pelos dados da Tabela 25, que mostra as comparações das amostras NP4A e NP1D com os valores padrão de d_{hkl} para a magnetita e maghemita correspondentes a cada pico. Esses resultados sugerem que a NP4A é maghemita.

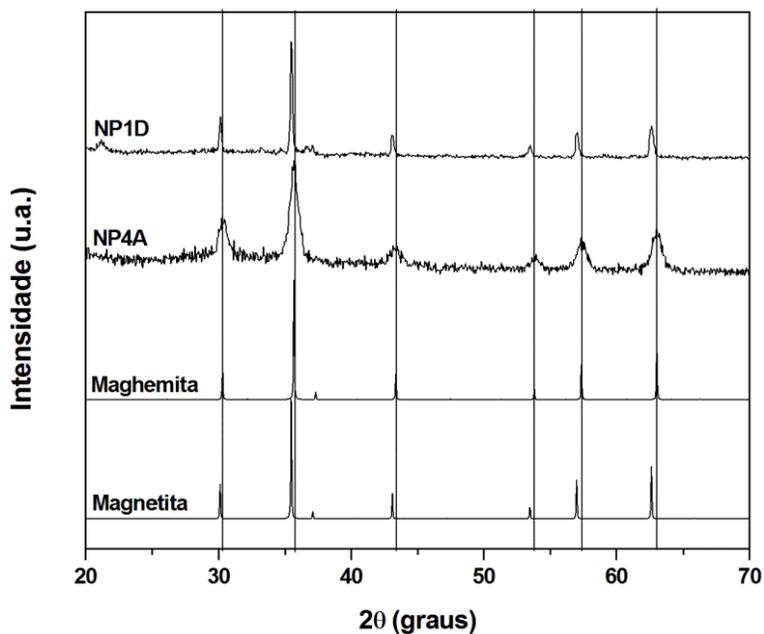


Figura 64. Difratogramas das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação da base alcalinizante em comparação com os padrões de magnetita e maghemita.

Tabela 25. Indexação dos picos dos difratogramas da NP4A como maghemita e da NP1D como magnetita.

Pico 1							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP4A	0,6691	30,3310	0,2944	0,2953	39,4	35	220
NP1D	0,1475	30,1200	0,2965	0,2967	28,0	30	220
Pico 2							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP4A	0,6189	35,6750	0,2515	0,2518	100,0	100	311
NP1D	0,1677	35,4770	0,2528	0,2532	100,0	100	311
Pico 3							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP4A	1,2304	43,3280	0,2087	0,2089	27,0	16	400
NP1D	0,2323	43,1070	0,2097	0,2099	20,4	20	400
Pico 4							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP4A	0,8222	53,8600	0,1701	0,1704	14,3	10	422
NP1D	0,2844	53,4680	0,1712	0,1715	8,8	10	422
Pico 5							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP4A	0,7699	57,3710	0,1605	0,1607	29,8	24	511
NP1D	0,2368	57,0210	0,1614	0,1616	22,5	30	511
Pico 6							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NP4A	0,7109	62,9920	0,1474	0,1476	42,0	34	440
NP1D	0,2899	62,6110	0,1482	0,1485	27,2	40	440

Tabela 26. Indexação dos picos de DRX da NP4A.

hkl	NP4A		NP1D
	(d/di)_{teo}	(d/di)_{exp}	(d/di)_{exp}
220	1,000	1,000	1,000
311	1,173	1,171	1,173
400	1,414	1,411	1,414
422	1,732	1,731	1,731
511	1,837	1,835	1,837
440	2,000	1,997	2,000

A síntese de nanopartículas por coprecipitação em meio alcalino utilizando NH₄OH é geralmente realizada a frio, resultando em nanopartículas

esféricas de magnetita, sendo realizada a digestão posterior, em alguns casos.^{78,79} Nesse estudo, ela foi realizada a 100 °C, para que o único parâmetro variado fosse a base utilizada. Sabendo-se que o produto formado foi maghemita, supõe-se que o produto inicialmente obtido foi magnetita, porém as 6 h de aquecimento aceleraram a oxidação do Fe(II) a Fe(III) nesse óxido, levando a sua conversão em maghemita.

Comparando-se o difratograma obtido, com o difratograma da amostra NP1D, podemos observar a ausência do pico (110) da goethita, sugerindo, tal como para as amostras NP3A e NP3B, que essa síntese não passa por esse intermediário.

Como a magnetita e a maghemita obtida pertencem ao sistema cúbico, a Equação 11 foi utilizada para calcular os parâmetros de cela dessas amostras mostrados na Tabela 27. A maior proximidade da aresta da NP4A à maghemita é mais um indício da composição dessa amostra.

Tabela 27. Cálculo do parâmetro de cela da NP4A.

	a_{exp} (nm)	a_{teo} Fe ₃ O ₄ (nm)	a_{teo} γ -Fe ₂ O ₃ (nm)
NP4A	0,834	0,839	0,835
NP1D	0,839	0,839	0,835

Os resultados obtidos por Dicromatometria (Tabela 28) concordam com os obtidos por DRX, que mostram que a fase principal da NP4A é maghemita. A proporção Fe(II)/Fe(III) muito pequena, indica que grande parte do Fe(II) foi oxidado durante a síntese, levando à formação de maghemita.

Tabela 28. Proporção entre Fe(II) e Fe(III) nas amostras obtidas com a variação da base, determinada por Dicromatometria.

Amostra	Fe(II) (mol)	Fe(III) (mol)
NP4A	1,00	37,10
NP1D	1,00	3,46

No espectro de FTIR da amostra NP4A, mostrado na Figura 65, a banda larga acima de 3000 cm⁻¹ está relacionada aos grupos OH estruturais ou de superfície e a banda em 1645 cm⁻¹, à deformação HOH da água estrutural ou de superfície, não sendo possível distingui-las. O aparecimento da banda fraca

em 868 cm^{-1} , no lugar das bandas de deformação O-H em 897 e 798 cm^{-1} , características da goethita, atribuída ainda à deformação desses grupos, é um indício da presença de OH estrutural nessa amostra, uma vez que a síntese foi realizada em meio aquoso.

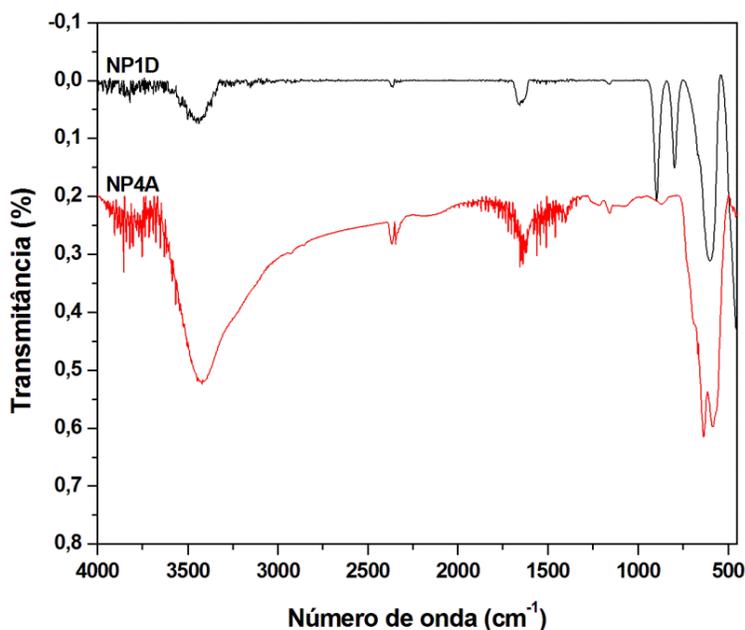


Figura 65. Espectros de FTIR das nanopartículas sintetizadas variando-se a base.

O aspecto mais interessante nesse espectro é, contudo, a divisão da banda referente às vibrações Fe-O, gerando duas bandas centradas em 634 e 587 cm^{-1} . De acordo com a literatura,^{94,95} essas bandas são um reflexo da desordem das vacâncias no cristal de maghemita.

A curva M vs H da NP4A mostra que essa amostra atinge a saturação magnética, apesar do seu perfil de curva ser diferente do perfil da amostra NP1D (Figura 66). O valor de $65,7\text{ emu/g}$ encontrado para a amostra NP4A está em ótima concordância com o descrito na literatura para a maghemita ($60 - 80\text{ emu/g}$),⁶ como mostra a Tabela 29.

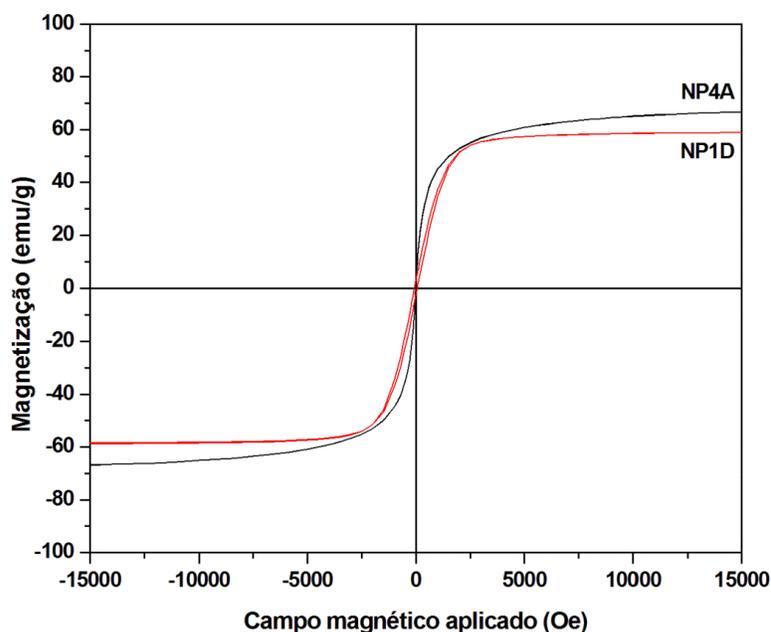


Figura 66. Curvas M vs H das nanopartículas magnéticas sintetizadas com variação da base alcalinizante do meio.

Tabela 29. Propriedades magnéticas das amostras obtidas variando-se a base alcalinizante do meio.

Amostra	M_S (emu/g)	H_C (Oe)	M_R (emu/g)
NP4A	65,70	0	0
NP1D	56,95	71,52	3,10

As diferenças observadas entre os valores de M_S obtidos para a amostra NP1D e NP4A podem ser associadas a diversos fatores. Apesar da M_S teórica da magnetita ser superior à da maghemita, o que se tem nesse caso, em especial para a amostra NP1D, comprovado previamente, é uma mistura de óxidos de ferro. Na amostra NP1D, a goethita presente reduz a M_S esperada, caso esse material fosse magnetita pura. Na amostra NP4A, não foi claramente diferenciada nenhuma outra fase, o que leva a crer na maior pureza dessa amostra. Adicionalmente, é importante considerar o tamanho médio inferior das nanopartículas da amostra NP4A. Ao reduzir as dimensões de uma partícula, se reduz também os domínios magnéticos dessa partícula. E, por fim, deve-se levar em conta o formato diferente dessas nanopartículas, que afetará diretamente as suas propriedades magnéticas.

O detalhe do laço de histerese dessas curvas (Figura 67) e os valores mostrados na Tabela 29 indicam que a amostra NP4A apresenta um comportamento superparamagnético nessas condições, motivo pelo qual o perfil de curva dessas duas amostras é diferente. Assim, apesar de não possuírem o formato alongado, essas nanopartículas apresentaram boa dispersão e pureza. Além disso, pelas curvas de magnetização, elas apresentaram comportamento magnético adequado para certas aplicações biomédicas, tendo potencial para essas finalidades.

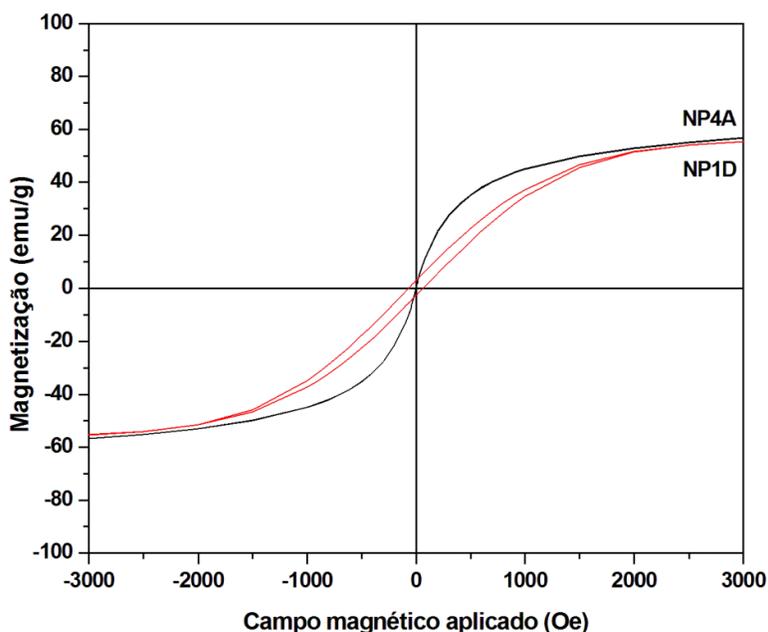


Figura 67. Detalhe do laço de histerese das curvas M vs H da NP4A e NP1D.

Os resultados das caracterizações das amostras obtidas variando-se a base mostraram que a ureia influencia diretamente a morfologia das nanopartículas obtidas. O interessante nessa etapa, entretanto, foi que as nanopartículas obtidas com NH_4OH , sob as mesmas condições, apesar de não serem o alvo primário desse estudo, apresentaram grande potencial para aplicações biomédicas. Por esse motivo, foi realizado, paralelamente ao objetivo geral desse trabalho, um estudo mais aprofundado acerca desse grupo de nanopartículas, chamado de segundo grupo de sínteses, que será apresentado a seguir.

Acerca do primeiro grupo de nanopartículas sintetizadas, apresentado até aqui, é interessante notar que nanopartículas com diferentes formatos, dimensões, composição e propriedades magnéticas foram obtidas. A ideia inicial era selecionar apenas uma amostra para dar continuidade aos estudos. Entretanto, as nanopartículas esféricas da amostra NP4A surpreenderam e foram selecionadas para um estudo mais aprofundado e para ensaios focados nas aplicações biológicas. Essa seleção não exclui a potencialidade de aplicação de outras amostras sintetizadas nesse grupo. Como já discutido, existem inúmeras possibilidades de aplicações biomédicas *in vivo* e *in vitro* para as quais, algumas dessas amostras sintetizadas podem ser interessantes. Entretanto, para tornar esse estudo viável e, considerando-se os objetivos iniciais, apenas uma das amostras alongadas foi selecionada (NP1D) e, excepcionalmente, uma amostra das nanopartículas esféricas que será escolhida após o estudo apresentado a seguir.

4.2. Sínteses e Caracterizações do Segundo Grupo

As sínteses do segundo grupo foram realizadas em função dos excelentes resultados obtidos no primeiro grupo, ao se estudar a influência da base utilizada na alcalinização do meio. Nanopartículas esféricas monodispersas superparamagnéticas de maghemita foram obtidas em uma síntese do tipo *one-pot*. O intuito das sínteses do segundo grupo foi o estudo e otimização dessa síntese, a fim de se obter o sistema mais apropriado para as aplicações biomédicas. O único parâmetro variado foi o tempo de reação.

As imagens obtidas por MET (Figura 68) mostraram que aumentando o tempo de reação, a forma esférica das nanopartículas obtidas torna-se mais definida e, aparentemente, diminui a tendência a se formarem aglomerados.

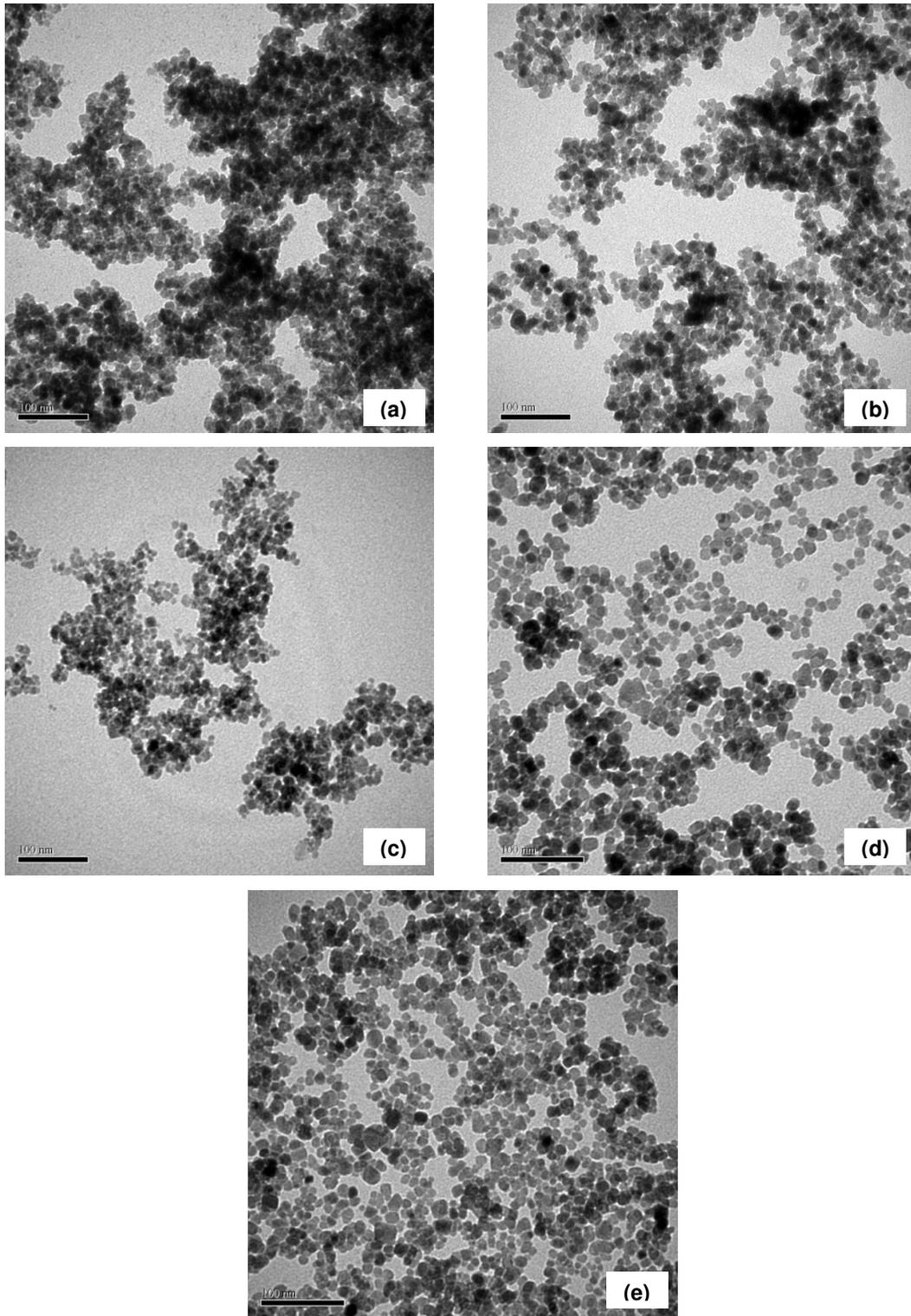


Figura 68. Imagens obtidas por MET das nanopartículas do segundo grupo, sintetizadas variando-se o tempo de reação: (a) NPS0, (b) NPS1, (c) NPS3, (d) NPS6, (e) NPS9. Barra de escala = 100 nm.

Na Figura 69, é possível observar um estreitamento dos histogramas de distribuição de diâmetro obtidos para essas amostras, exceto para NPS9, revelando uma tendência à diminuição da polidispersão das nanopartículas com o aumento do tempo de reação.

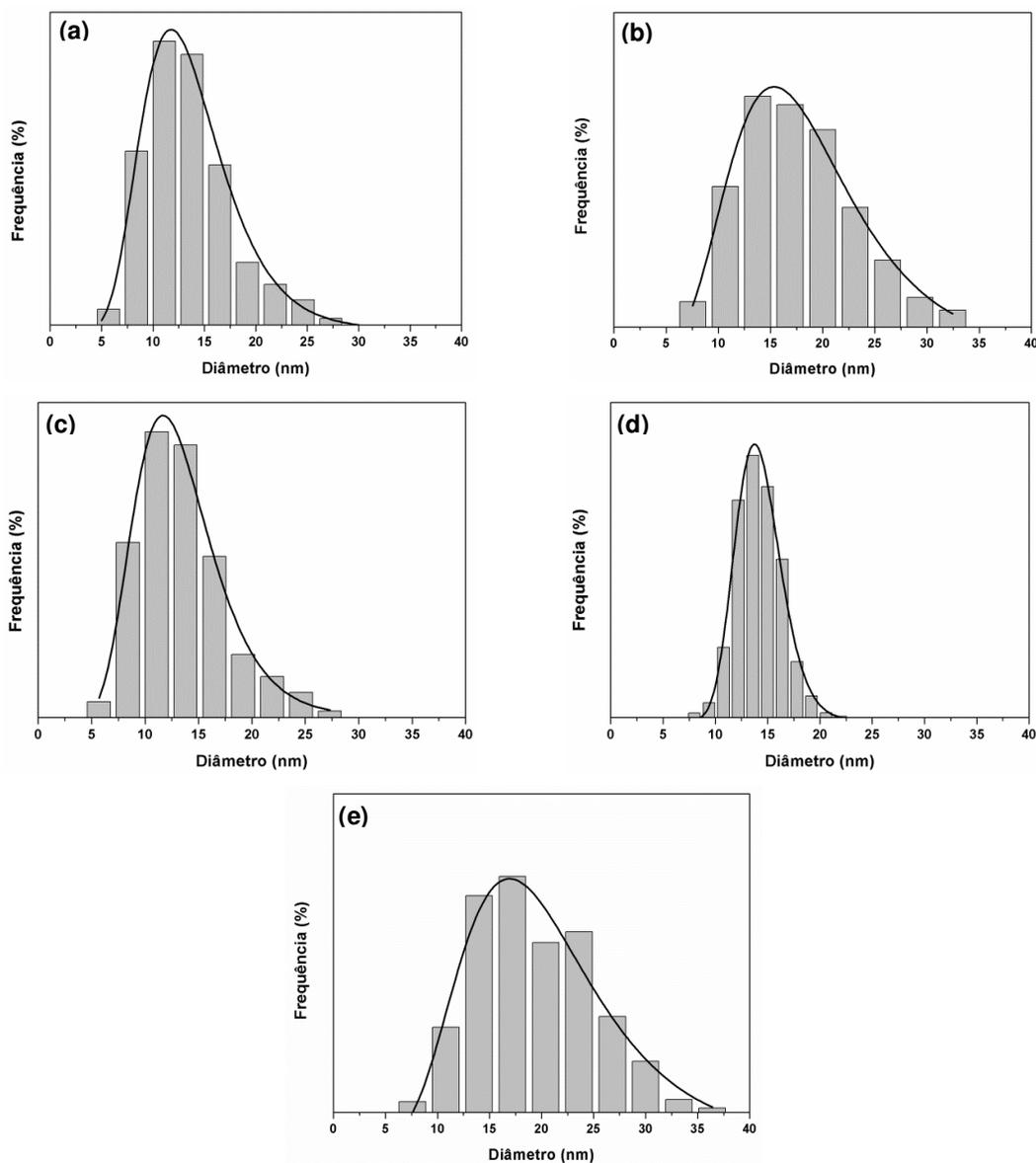


Figura 69. Histogramas de distribuição de diâmetro para a (a) NPS0, (b) NPS1, (c) NPS3, (d) NPS6 e (e) NPS9.

Os diâmetros médios obtidos por meio do ajuste desses histogramas com uma curva log normal estão expressos na Tabela 30. O diagrama de dispersão dos diâmetros médios dessas amostras (Figura 70) possibilita uma

melhor visualização do comportamento do produto obtido com o aumento do tempo de reação. O valor discrepante da amostra NPS1 pode ser resultado de um ajuste não tão adequado, visto que a maior frequência obtida nesse histograma se encontra entre 12,5 e 15 nm, que se encaixaria melhor no diagrama de dispersão, seguindo uma tendência de crescimento exponencial. De qualquer maneira, observa-se que o diâmetro médio das nanopartículas aumenta com o tempo de reação.

Tabela 30. Dimensões médias das nanopartículas magnéticas do segundo grupo estimadas por MET e pela Equação de Scherrer, usando os dados de DRX.

Amostra	MET - Diâmetro médio (nm)	DRX - Diâmetro médio (nm)
NPS0	11,5 ± 0,3	11,0
NPS1	17,6 ± 0,4	11,9
NPS3	12,8 ± 0,2	10,7
NPS6	14,1 ± 0,1	13,1
NPS9	19,4 ± 0,9	12,6

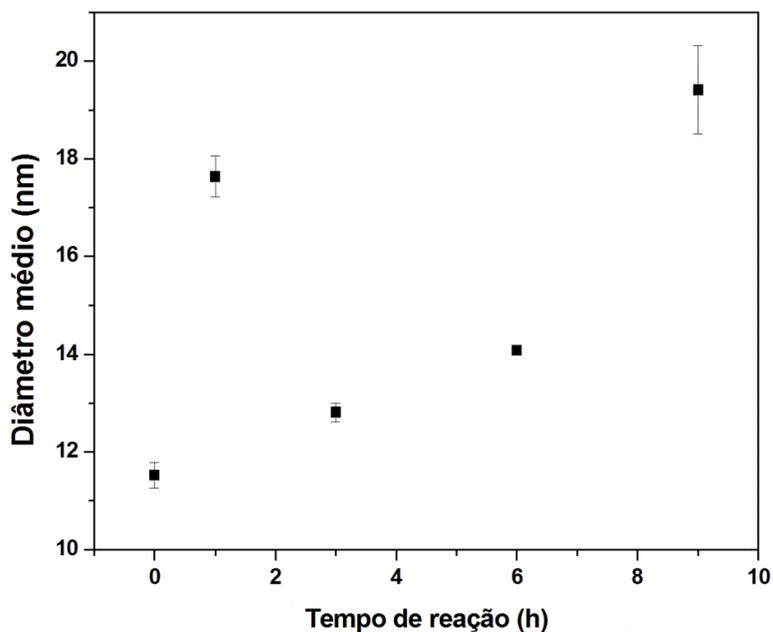


Figura 70. Diagrama de dispersão dos diâmetros das amostras do segundo grupo.

A Tabela 30 também mostra o diâmetro médio de cristal calculado pelos resultados das análises de DRX por meio da Equação de Scherrer (Equação

11), visto que as nanopartículas obtidas possuem formato, aproximadamente, esférico:

$$d = k\lambda / \beta \cos \theta \quad \text{(Equação 11)}$$

onde d é o diâmetro médio das partículas; k é a constante de proporcionalidade que depende da forma das partículas, assumida como esférica ($k = 0,9$); λ é o comprimento de onda da radiação do Cu ($1,5406 \text{ \AA}$); e β é a largura a meia altura do pico.

Alguns valores de diâmetro médio de partícula estimados pela Equação de Scherrer diferem daqueles determinados pela análise das imagens obtidas por MET. Para esse tipo de comparação, deve-se ponderar que o DRX considera apenas a parte cristalina das partículas e que, provavelmente, existem espécies em sua superfície, que podem ser medidas pelas imagens obtidas por MET, que não são cristalinas. Assim, esses resultados podem ser um indicativo de que não necessariamente cada partícula individual seja um cristal isolado.

Os valores de pH medidos ao final das reações variam de, aproximadamente, 10 (NPS0) para 7 – 8 (NPS9) e auxiliam na elucidação dos processos envolvidos nas sínteses. Devido ao tempo prolongado de aquecimento, a base evapora e, em novas condições (meio mais ácido) e em elevadas temperaturas, as partículas menores são mais susceptíveis à dissolução. O Fe^{3+} oriundo desse processo, provavelmente, se incorpora às partículas que não se dissolveram, em um processo de reprecipitação,⁹⁶ visto que a concentração de Fe detectada no sobrenadante ao término da reação é pequena. Essa hipótese pode justificar a tendência de aumento do diâmetro médio das nanopartículas, nos valores obtidos por meio das análises das imagens de MET.

Os difratogramas das amostras do segundo grupo, expostos na Figura 71, mostraram que os picos do difratograma da amostra NPS0 estão deslocados para a esquerda, se aproximando do padrão de magnetita. Na medida em que o tempo de reação aumenta, os picos se deslocam para a direita, se sobrepondo ao padrão de maghemita. Esse deslocamento é sutil,

mas pode ser visualizado com clareza, confrontado os valores de espaço interplanar, obtidos para as amostras e os valores das fichas dos óxidos em questão. Na Tabela 31, os valores experimentais obtidos foram comparados aos valores padrão de magnetita – amostra NPS0 – e de maghemita – amostras NPS1, NPS3, NPS6 e NPS9.

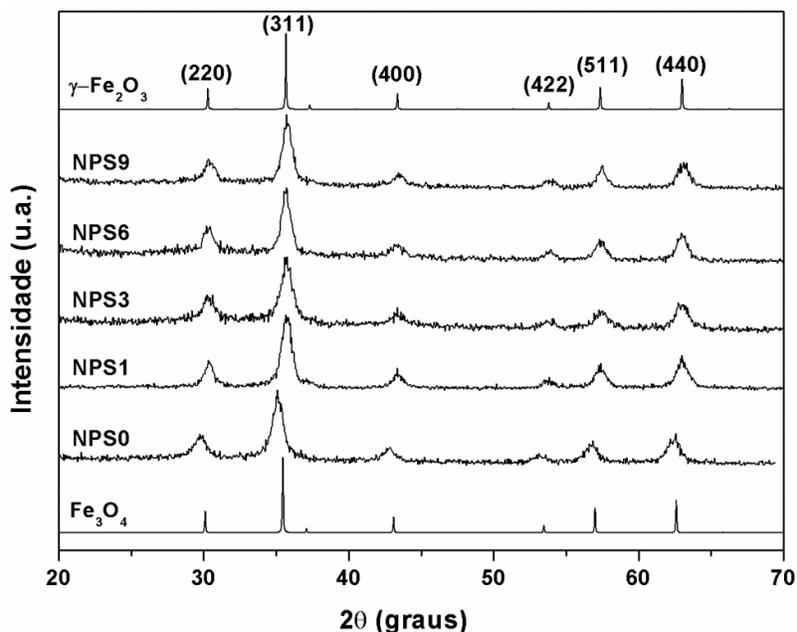


Figura 71. Difratomogramas das amostras de nanopartículas esféricas do segundo grupo.

Tabela 31. Indexação dos picos dos difratogramas das amostras esféricas do segundo grupo como maghemita, exceto a NPS0, indexada como magnetita.

Pico 1							
Amostra	Largura	2θ	d _{exp} (nm)	d _{teo} (nm)	IR _{exp}	IR _{teo}	hkl
NPS0	0,8270	29,701	0,3005	0,2967	33,7	35	220
NPS1	0,6015	30,365	0,2941	0,2953	32,0	35	220
NPS3	0,7484	30,346	0,2943	0,2953	37,7	35	220
NPS6	0,6696	30,331	0,2944	0,2953	38,9	35	220
NPS9	0,6649	30,415	0,2937	0,2953	31,2	35	220

Pico 2							
Amostra	Largura	2θ	d _{exp} (nm)	d _{teo} (nm)	IR _{exp}	IR _{teo}	hkl
NPS0	0,7553	35,057	0,2558	0,2532	100,0	100	311
NPS1	0,7019	35,724	0,2511	0,2518	100,0	100	311
NPS3	0,7792	35,718	0,2512	0,2518	100,0	100	311
NPS6	0,6357	35,675	0,2515	0,2518	100,0	100	311
NPS9	0,6611	35,763	0,2509	0,2518	100,0	100	311

Pico 3							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NPS0	0,8612	42,772	0,2112	0,2099	20,9	16	400
NPS1	0,6634	43,384	0,2084	0,2089	18,2	16	400
NPS3	0,8521	43,368	0,2085	0,2089	17,0	16	400
NPS6	0,8310	43,311	0,2087	0,2089	16,6	16	400
NPS9	0,7443	43,460	0,2081	0,2089	18,9	16	400

Pico 4							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NPS0	1,4175	53,138	0,1722	0,1715	18,0	10	422
NPS1	1,1666	53,778	0,1703	0,1704	16,2	10	422
NPS3	1,3096	53,771	0,1703	0,1704	16,9	10	422
NPS6	0,7392	53,863	0,1701	0,1704	12,7	10	422
NPS9	1,2993	53,89	0,1700	0,1704	20,9	10	422

Pico 5							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NPS0	0,7388	56,698	0,1622	0,1616	28,2	24	511
NPS1	0,7580	57,369	0,1605	0,1607	27,0	24	511
NPS3	0,8639	57,421	0,1604	0,1607	26,5	24	511
NPS6	0,7662	57,371	0,1605	0,1607	29,3	24	511
NPS9	0,5655	57,458	0,1603	0,1607	29,0	24	511

Pico 6							
Amostra	Largura	2θ	d_{exp} (nm)	d_{teo} (nm)	IR_{exp}	IR_{teo}	hkl
NPS0	0,8850	62,364	0,1488	0,1485	38,7	34	440
NPS1	0,7685	63,016	0,1474	0,1476	36,7	34	440
NPS3	0,9055	62,985	0,1475	0,1476	43,1	34	440
NPS6	0,6798	62,991	0,1474	0,1474	40,6	34	440
NPS9	0,8076	63,077	0,1473	0,1476	37,6	34	440

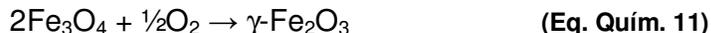
Tabela 32. Indexação dos picos de DRX das amostras do segundo grupo .

	NPS0	NPS1	NPS3	NPS6	NPS9
hkl	(d/di)_{teo}	(d/di)_{exp}	(d/di)_{exp}	(d/di)_{exp}	(d/di)_{exp}
220	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
311	1,173	1,171	1,171	1,172	1,171
400	1,414	1,412	1,411	1,412	1,411
422	1,732	1,728	1,727	1,728	1,731
511	1,837	1,833	1,833	1,835	1,835
440	2,000	1,996	1,996	1,996	1,997

Tabela 33. Cálculo dos parâmetros de cela para as amostras do segundo grupo.

	a_{exp} (nm)	$a_{\text{teo Fe}_3\text{O}_4}$ (nm)	$a_{\text{teo } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$ (nm)
NPS0	0,844	0,839	0,835
NPS1	0,834	0,839	0,835
NPS3	0,834	0,839	0,835
NPS6	0,834	0,839	0,835
NPS9	0,832	0,839	0,835

Esses resultados corroboram a discussão iniciada na sessão 4.1.4, na qual foi sugerido que o produto inicial dessa síntese (antes do aquecimento – NPS0) é magnetita, como descrito na literatura.^{78,79} O aquecimento posterior acelerou a oxidação de Fe(II) a Fe(III), levando a sua conversão em maghemita. Segundo a reação que descreve a formação da magnetita (Eq. Quím. 3), uma razão molar inicial de $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+} = 2:1$ é necessária para a formação desse óxido. Entretanto, quando a síntese é realizada em atmosfera oxidante, é difícil manter essa razão, pois o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} e a magnetita é convertida em maghemita, de acordo com a Eq. Quím. 11:



Os resultados da dosagem dessas amostras (Tabela 34) confirmaram essa hipótese. Eles mostram que a divergência da razão molar $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ aumenta com o aumento do tempo de reação. Essa razão para a amostra NPS0 é consistente com a magnetita. O aumento do tempo de reação acelera a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} , até uma razão de $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+} = 58,50$, obtida pra amostra NPS9, na qual o Fe^{2+} deve estar praticamente ausente e a estrutura mais plausível é a da maghemita. Isso é consistente com resultados prévios, nos quais a magnetita foi convertida a maghemita em atmosfera oxidante durante a digestão das amostras.⁹⁷

Tabela 34. Proporção entre Fe(II) e Fe(III) nas nanopartículas esféricas do segundo grupo, determinada por Dicromatometria.

Amostra	Fe(II) (mol)	Fe(III) (mol)
NPS0	1,00	3,07
NPS1	1,00	30,00
NPS3	1,00	40,33
NPS6	1,00	37,10
NPS9	1,00	58,50

Nos espectros de FTIR das amostras do segundo grupo (Figura 72), duas regiões chamam a atenção: a região de 1285 a 945 cm^{-1} e a região de 772 a 492 cm^{-1} . Na primeira (1285 a 945 cm^{-1}), observa-se o desaparecimento da banda centrada em 1070 cm^{-1} e o surgimento de três bandas em, aproximadamente, 1215, 1154 e 1054 cm^{-1} , com o aumento do tempo de reação. De acordo com Nakamoto⁸⁸, essas três bandas se associam ao grupo SO_4^{2-} se ligando ao metal como um ligante bidentado, como mostrado na Figura 39-c. Dessa maneira, é possível que com o aumento do tempo de reação, e constatado nesse estudo a partir de 6 h (NPS6), o modo de coordenação do grupo SO_4^{2-} muda, gerando uma mudança em sua simetria local.

Na segunda região (772 a 492 cm^{-1}), já discutida na seção 4.1.4, a divisão da banda, atribuída às vibrações Fe-O, em outras duas, centradas em 634 e 587 cm^{-1} , foi associada à desordem das vacâncias dos cátions no cristal de maghemita, de acordo com a literatura.^{94,95} Morales e colaboradores⁹⁸ utilizaram a espectroscopia no infravermelho com sucesso para estudar às características de ordem-desordem na estrutura da maghemita. Essas características se referem ao ordenamento das vacâncias octaédricas que geram várias simetrias cristalinas. Foi sugerido que as vacâncias podem ser distribuídas de três formas: aleatoriamente (grupo espacial $Fd\bar{3}m$); como o cátion de lítio em LiFe_5O_8 (grupo espacial $P4_132$); e com uma distribuição ordenada com simetria tetragonal (grupo espacial $P4_32_12$). A partir das 6 h de reação, nota-se que a banda em 634 cm^{-1} , que até então era menos intensa que a banda em 587 cm^{-1} , se tornou mais intensa nas amostras NPS6 e NPS9. Segundo os autores, isso é um indício do aumento do grau de ordenamento das vacâncias. Outro ponto interessante a ser observado é a mudança do perfil

da banda em 587 cm^{-1} na amostra NPS9, que sugere o início da divisão dessa banda. Ainda segundo os autores, múltiplas bandas de absorção nessa região estão associadas a um maior grau de ordenamento, fortalecendo a hipótese levantada anteriormente.

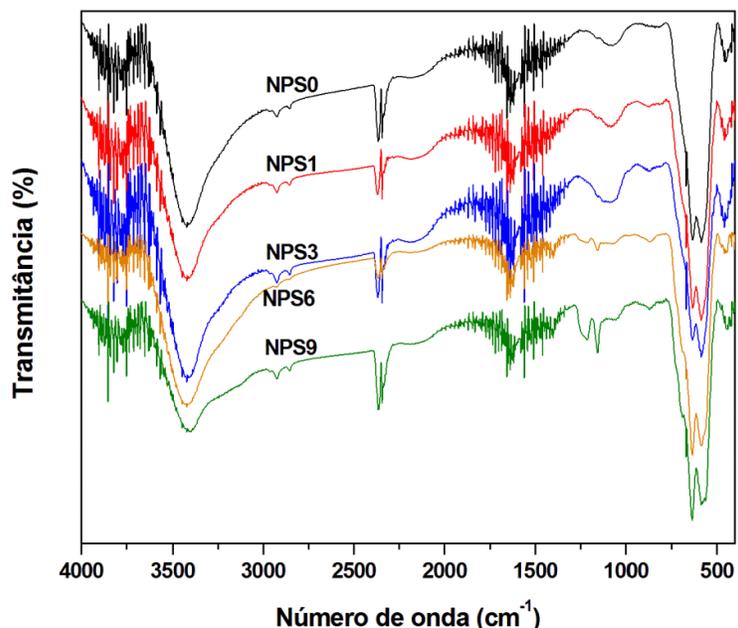


Figura 72. Espectros de FTIR das nanopartículas esféricas das amostras do segundo grupo.

Devido às similaridades entre os difratogramas da magnetita e da maghemita, a espectroscopia Raman foi utilizada como uma técnica para se distinguir diferentes fases nas nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Figura 73). No espectro da amostra NPS0, as bandas largas em 302, 560 e 662 cm^{-1} foram atribuídas aos fônons associados aos modos A_{1g} e E_g da magnetita. Além disso, as bandas largas em, aproximadamente 710, 500 e 370 cm^{-1} mostradas no espectro da amostra NPS6 podem ser associadas à oxidação parcial do Fe^{2+} em Fe^{3+} , levando à transformação de magnetita em maghemita.^{79,99,100} Dessa forma, os espectros dessas amostras obtidas por espectroscopia Raman confirmaram as discussões realizadas até esse ponto acerca da composição das amostras desse grupo.

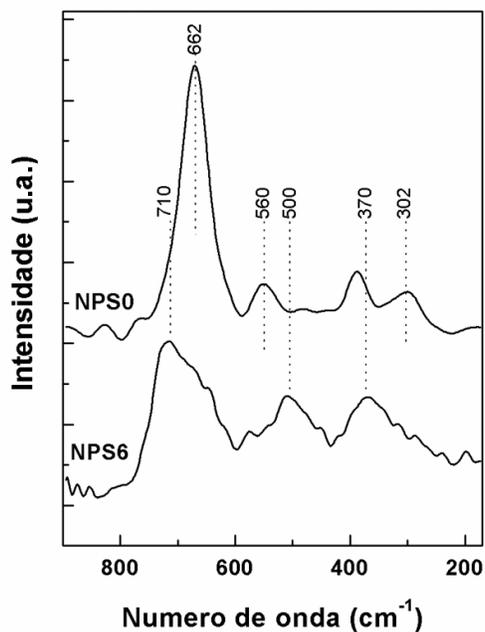


Figura 73. Espectros Raman das amostras NPS0 e NPS6.

As curvas M vs H das amostras do segundo grupo (Figura 74) mostram que todas as amostras atingem a saturação magnética.

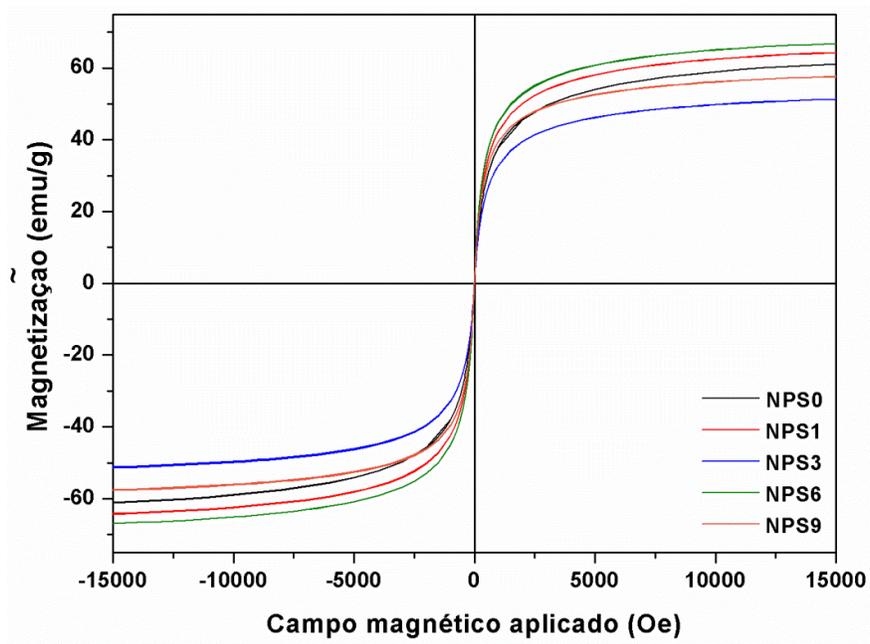


Figura 74. Curvas M vs H das amostras do segundo grupo.

Esperava-se que houvesse uma diminuição na M_S das nanopartículas com o aumento do tempo de reação, visto que a M_S teórica da magnetita

inicialmente gerada é maior do que a M_S teórica da maghemita, obtida a partir da oxidação desse produto. Entretanto, os valores de M_S obtidos (Tabela 35) variam bastante, não sendo possível estabelecer uma relação entre eles. A maior M_S obtida foi a da amostra NPS6.

Tabela 35. Propriedades magnéticas das amostras do segundo grupo.

Amostra	M_S (emu/g)	H_C (Oe)	M_R (emu/g)
NPS0	60,50	0,00	0,00
NPS1	63,74	0,00	0,00
NPS3	50,70	0,00	0,00
NPS6	65,70	0,00	0,00
NPS9	56,95	0,00	0,00

A Tabela 35, juntamente com o laço de histerese das curvas M vs H (Figura 75), também mostra que as amostras do segundo grupo apresentam comportamento superparamagnético nessas condições, como observado na seção 4.1.4.

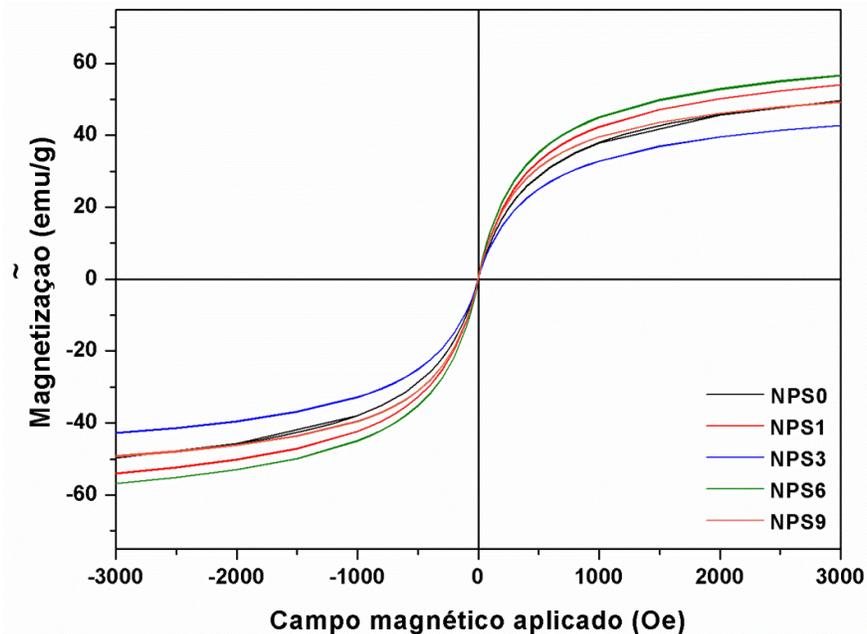


Figura 75. Detalhe do laço de histerese das curvas M vs H das amostras do segundo grupo.

Dessa forma, utilizando um procedimento simples, nanopartículas magnéticas esféricas superparamagnéticas nessas condições de análise, com

diâmetro variando de 11,5 a 19 nm e com uma distribuição de tamanho reduzida foram obtidas. Uma vez que não foram utilizados reagentes tóxicos durante essa síntese e nem para a oxidação das partículas, e, levando-se em consideração as características interessantes alcançadas, as nanopartículas obtidas apresentaram potencial para aplicações biomédicas.

Para dar sequência aos estudos, a amostra NPS6 foi selecionada para as análises envolvendo possíveis aplicações biomédicas, devido às propriedades serem satisfatórias com um tempo de reação razoável.

4.3. Realização de Ensaio Voltados para as Aplicações Biomédicas

Após as caracterizações das nanopartículas sintetizadas, uma amostra de cada grupo foi selecionada para dar continuidade aos estudos, focando nos experimentos relacionados diretamente com as aplicações biomédicas. Baseando-se em discussões prévias, as nanopartículas alongadas da amostra NP1D e as nanopartículas esféricas da amostra NPS6 foram selecionadas.

4.3.1. MAGNETOHIPERTERMIA

As propriedades de magnetohipertermia das amostras NP1D e NPS6 foram investigadas. A Figura 76 mostra curvas de variação da temperatura em função do tempo de medição, variando-se a amplitude do campo magnético aplicado, para a amostra NP1D.

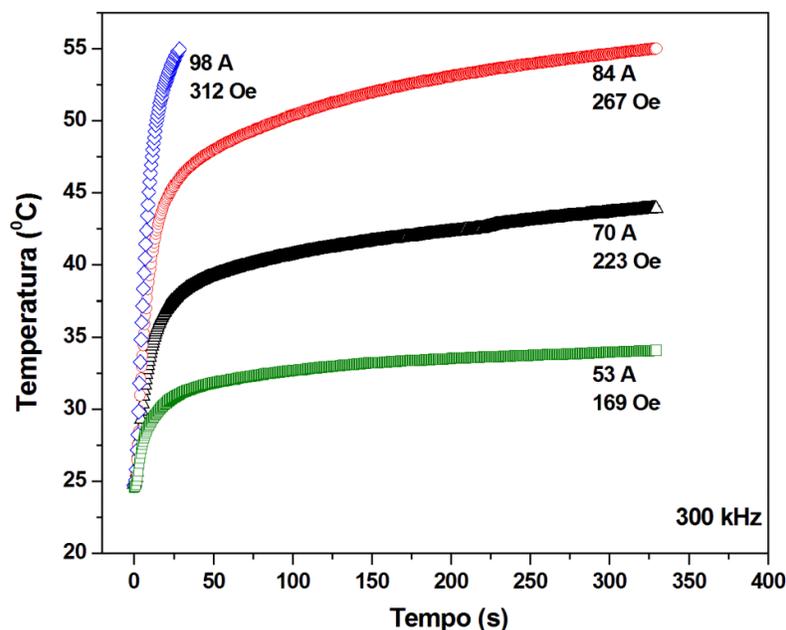


Figura 76. Variação da temperatura em função do tempo de medição para a amostra NP1D, variando-se o campo magnético aplicado.

Nessa figura, observa-se que quanto maior o campo magnético, maior a variação de temperatura para essas amostras. Partindo-se da temperatura ambiente, o início da faixa de temperatura preferencial de hipertermia (42-44 °C)^{17,45} foi atingido após, aproximadamente, 3 min, quando um campo de 223 Oe foi aplicado. A variação de temperatura continua aumentando com o tempo, apesar de ser de maneira mais suave, chegando aos 44 °C, em cerca de 6 min. Fazendo uma projeção simples pelo perfil da curva, após o tempo requerido para causar a lise das células tumorais (cerca de 30 min), a temperatura terá aumentado, aproximadamente, 20 °C, o que poderia causar danos irreversíveis para as células normais circunvizinhas nesse caso. Isso trata de outro aspecto interessante dessas curvas, que é o aumento de sua inclinação com o aumento do campo magnético aplicado, ou seja, um aumento da taxa de aquecimento. Em um perfil de curva ideal, a temperatura de hipertermia seria atingida rapidamente e mantida estável durante o tempo requerido. Dessa maneira, se teria um gráfico com duas inclinações: a primeira, referente à variação de temperatura inicial, com a maior inclinação possível; e a segunda, um patamar na temperatura desejada. Nesse caso, a temperatura aumenta rapidamente no início (primeira inclinação) e depois de certo ponto, continua aumentando,

porém com uma taxa menor que no início (segunda inclinação). O aumento da primeira inclinação mostra que, com o aumento do campo magnético aplicado, a variação da temperatura inicial é mais rápida, o que de certo modo é desejável. O aumento mais suave da segunda inclinação pode estar associado a fatores experimentais e não necessariamente às características das nanopartículas, como por exemplo, o aquecimento da bobina dentro da qual as medidas são realizadas.

A influência da composição das nanopartículas nas propriedades de magnetohipertermia também foi investigada. A Figura 77 mostra a comparação entre as curvas de variação de temperatura em função do tempo de medição para as amostras NP1A e NP1D, compostas, majoritariamente por goethita e magnetita, respectivamente. As duas amostras investigadas mostraram um aumento da temperatura em função do tempo, sendo que a NP1A apresentou o menor aumento. Observando os perfis das duas curvas, que fazem parte das nanopartículas do primeiro grupo, sintetizadas variando-se o tempo de reação, pode-se inferir que a diminuição do percentual de goethita, cujas propriedades magnéticas são inferiores, e o aumento do percentual de magnetita nas amostras levou a um aumento significativo na taxa de aquecimento, como ocorreu com a M_s , já discutido anteriormente. É importante observar que o aumento da quantidade de magnetita vem acompanhado de um aumento de cerca de 8 nm nas dimensões dessas nanopartículas, o que pode também ter influenciado as propriedades de magnetohipertermia.

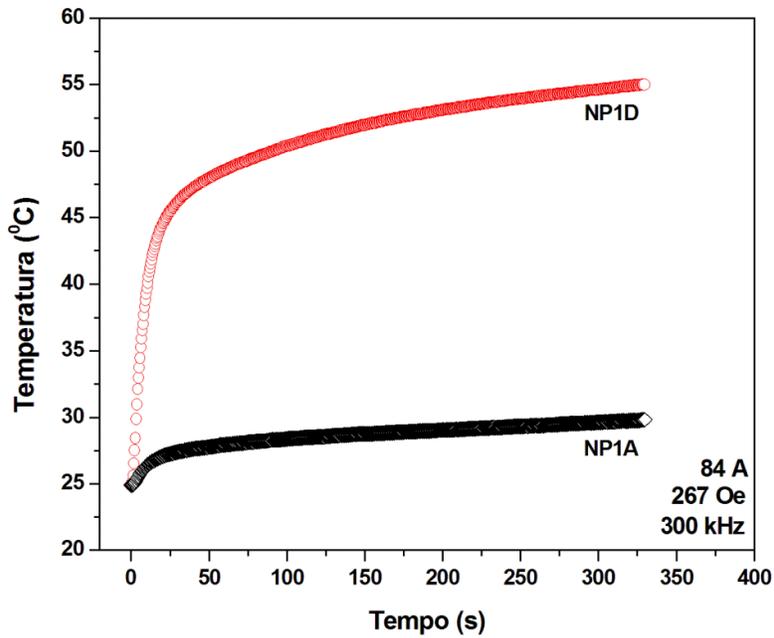


Figura 77. Variação da temperatura em função do tempo de medição para as amostras NP1A e NP1D, aplicando um campo de 267 Oe.

A Figura 78 mostra curvas de variação da temperatura em função do tempo de medição, variando-se a amplitude do campo magnético aplicado, para a amostra NPS6.

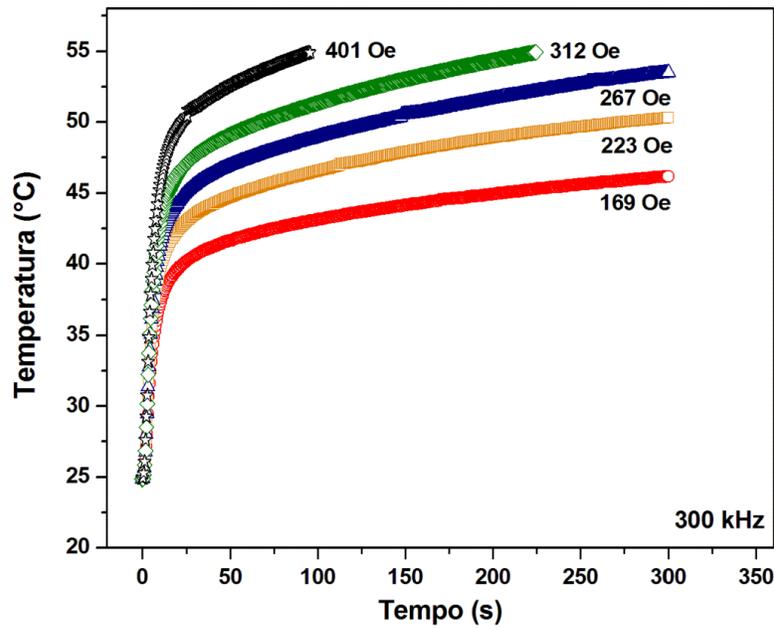


Figura 78. Variação da temperatura em função do tempo de medição para a amostra NPS6, variando-se o campo magnético aplicado.

Assim como na Figura 76, quanto maior o campo magnético aplicado, maior a variação de temperatura para essas amostras. Comparando-se esses resultados com os resultados obtidos para a amostra NP1D (Figura 79), nota-se que as nanopartículas da amostra NPS6 aquecem melhor a baixos campos do que as nanopartículas da amostra NP1D, até um campo crítico (223 Oe). A partir desse campo, as curvas se cruzam e a situação se inverte, ou seja, as nanopartículas da amostra NP1D passam a se aquecer mais com o campo aplicado. Esse fenômeno pode ser compreendido a partir da constante de anisotropia das nanopartículas.

Pelas curvas de magnetização, realizadas em frequência quase estática (Figura 66), observou-se que as nanopartículas da amostra NPS6 apresentaram comportamento superparamagnético nessas condições, em contraposição com as nanopartículas da amostra NP1D que apresentaram laço de histerese. Dessa forma, é esperado que a constante de anisotropia da amostra NPS6 seja menor. Uma menor constante de anisotropia responde melhor a baixos campos, um dos motivos pelo qual a amostra NPS6 aquece melhor nessas circunstâncias. O aquecimento, contudo, depende da área da histerese. Após romper a barreira energética que estava impedindo a rotação dos spins na amostra NP1D em baixos campos, ela se aquece muito mais, devido a sua maior constante de anisotropia. O baixo aquecimento visualizado nessa amostra a baixos campos, provavelmente, deve-se à rotação dos spins das partículas menores, visualizadas no histograma de distribuição de tamanhos (Figura 45-b). Esse mesmo comportamento foi descrito previamente na literatura para outras partículas.^{101,102}

De qualquer maneira, os resultados preliminares obtidos nessa etapa do estudo foram positivos, indicando que as nanopartículas estudadas têm potencial para aplicações magnetohipertermia.

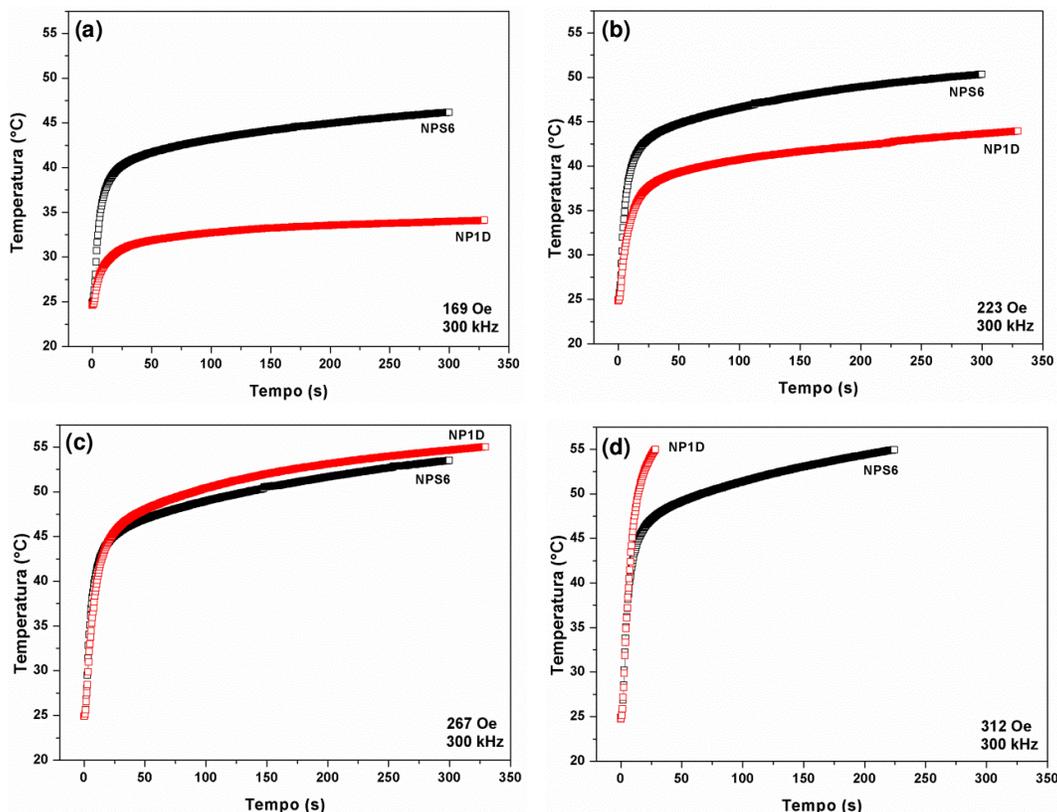


Figura 79. Comparação da variação da temperatura em função do tempo de medição entre as amostras NP1D e NPS6, em (a) 169 Oe, (b) 223 Oe, (c) 267 Oe e (d) 312 Oe.

4.3.2. FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS

Em uma suspensão coloidal de nanopartículas magnéticas, há um sutil equilíbrio de forças, principalmente, a força gravitacional, que compete com a agitação térmica (movimento Browniano), que mantém as nanopartículas suspensas; e as forças atrativas de *van der Waals* e de dipolo magnético. Em geral, esse balanço é desfavorável à peptização do coloide e forças repulsivas devem ser introduzidas à superfície das partículas, para favorecer esse equilíbrio. Podem ser empregadas várias estratégias para introduzir essa repulsão no sistema, dentre elas a funcionalização química e a introdução de cargas elétricas.

Na funcionalização, em geral, um impedimento estérico entre as nanopartículas é gerado por meio da adsorção de agentes tensoativos em suas superfícies, contrapondo-se a floculação devido às forças atrativas. Já na introdução de cargas, cria-se uma densidade superficial de carga elétrica nas

nanopartículas pela formação de uma dupla camada elétrica, por meio da adsorção de íons em sua superfície. Isso dá origem a uma repulsão eletrostática que se contrapõe às forças atrativas de *van der Waals* e de dipolo magnético. Há, ainda, a possibilidade de combinar ambas as estratégias, em especial com a adsorção de polieletrólitos, que gera um impedimento ao mesmo tempo estérico e eletrostático (Figura 80). Essa foi a estratégia adotada nesse estudo com a funcionalização das superfícies com TPF, que é um polieletrólito de baixa toxicidade, possibilitando a preparação de suspensões coloidais mais biocompatíveis.

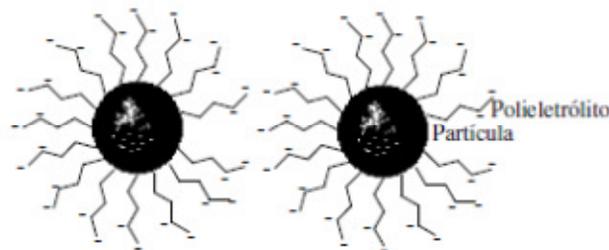


Figura 80. Modelo de funcionalização da superfície das nanopartículas via adsorção de polieletrólitos.

Após funcionalização das nanopartículas magnéticas com TPF, em especial da amostra NP1D, o sol formado não se mostrou estável ao longo do tempo. Um percentual não determinado, se decantava, indicando desequilíbrios entre as forças citadas anteriormente. Nesse momento, duas fases eram originadas: o decantado (fase preta) e o sobrenadante (fase amarelada). Imagens obtidas por MET de cada uma dessas fases são mostradas na Figura 81.

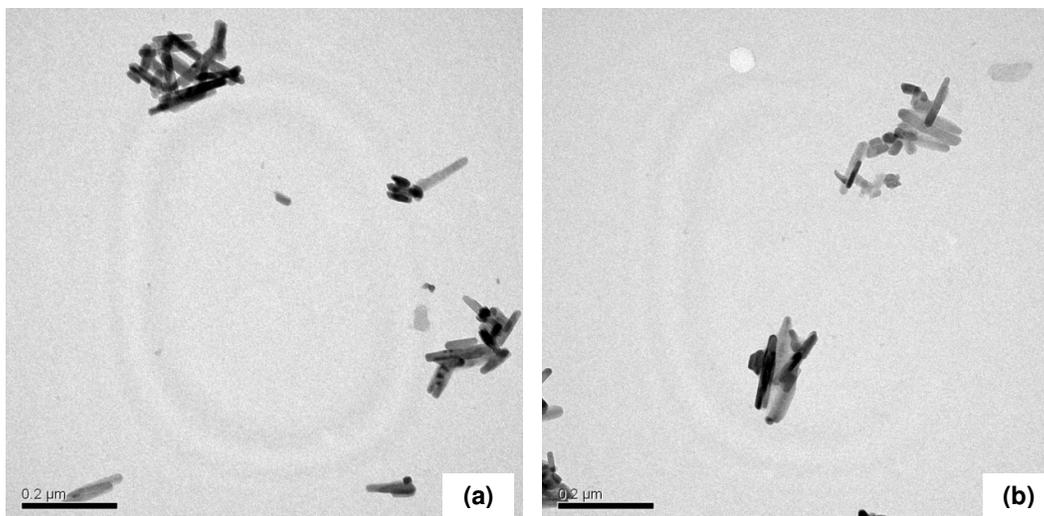


Figura 81. Imagens obtidas por MET das nanopartículas da amostra NP1D, cujas superfícies foram funcionalizadas com TPF: (a) decantado e (b) sobrenadante. Barra de escala = 0,2 μm .

É possível observar que, na imagem do sobrenadante, há uma cobertura sobre os aglomerados, em um cinza mais claro, que não é visualizado na imagem do decantado. Essa cobertura pode ser associada ao TPF, que se adsorveu melhor a essas partículas ou que ficou em excesso. É importante ressaltar a polidispersão da amostra NP1D, com 16% das nanopartículas acima de 100 nm. Trata-se, portanto, de uma amostra com um percentual razoável de nanopartículas grandes, o que gera dificuldades de mantê-las em suspensão – o tamanho ideal gira em torno de 10 nm.

Observou-se também que essas suspensões apresentaram propriedades tixotrópicas. Após certo tempo, elas adquiriram aspecto de gel, que se alterava pela agitação da suspensão, levando a um fluido com menor viscosidade.

De qualquer maneira, foram essas as amostras utilizadas nas etapas seguintes.

4.3.3. ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

A distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas das amostras NP1D e NPS6 funcionalizadas foram obtidas por espalhamento de luz dinâmico. Entretanto, os cálculos realizados pelo próprio equipamento para obtenção desses resultados, basearam-se em nanopartículas com o formato

esférico (ou aproximadamente, esférico). Para a obtenção de resultados confiáveis para as nanopartículas alongadas da amostra NP1D por meio desse equipamento, seria necessária a introdução de outras bases de cálculos, apropriadas para partículas com o formato em questão. Dessa maneira, os cálculos realizados para as nanopartículas alongadas da amostra NP1D não foram reportados nesse estudo, por não apresentarem confiabilidade.

A Figura 82 mostra os resultados obtidos para a amostra NPS6.

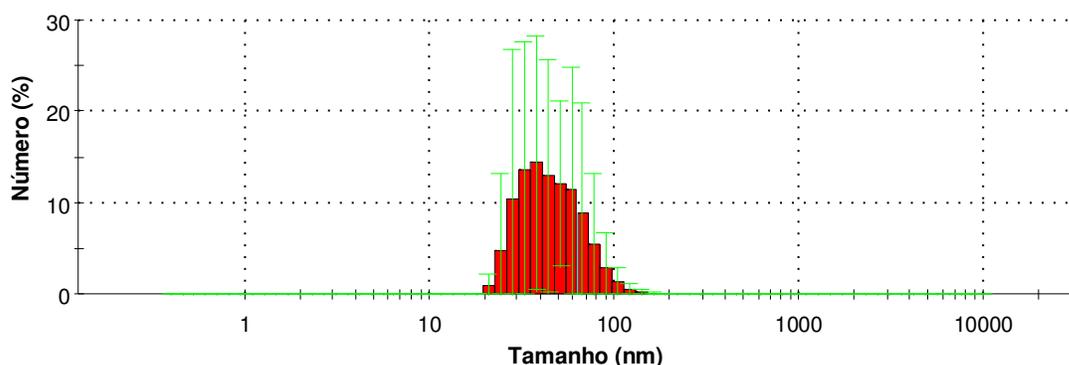


Figura 82. Histograma de distribuição de tamanho hidrodinâmico das nanopartículas da amostra NPS6.

Observa-se que a maioria das partículas possui de 24 a 80 nm, aproximadamente, sem levar em consideração o elevado desvio-padrão dessas medidas. Comparando-se esse resultado com o histograma de distribuição de tamanho obtido por MET para as nanopartículas cujas superfícies não foram funcionalizadas (Figura 69-d), nota-se o deslocamento do histograma para a direita. Esse fato pode ser atribuído a dois fatores distintos. O primeiro diz respeito à funcionalização da superfície das nanopartículas com TPF, como mencionado na seção anterior. Assim, esperava-se que a superfície das nanopartículas fosse recoberta com íons, como ilustrado na Figura 80, que mostra o *core* da partícula e o *shell*, no caso a partícula de maghemita e os íons do TPF, respectivamente. Portanto, esse aumento no tamanho médio das nanopartículas pode estar associado ao *shell* das nanopartículas, quando dispersas em um líquido. O segundo fator associa-se à aglomeração das nanopartículas, cujas superfícies foram funcionalizadas com TPF, quando dispersas em água.

Apesar da discussão acima, o elevado desvio-padrão dessas medidas não permitem conclusões. Mais experimentos são necessários para a obtenção de resultados com mais reprodutibilidade, que permitiriam conclusões parciais.

4.3.4. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os resultados preliminares dos ensaios de viabilidade celular por MTT para as amostras NP1D e NPS6 estão expressos nas Figuras 83 e 84, respectivamente. Esses gráficos não podem ser comparados diretamente, visto a diferença nas concentrações de nanopartículas utilizadas. Essas concentrações foram obtidas após a realização dos testes, partindo-se das diluições utilizadas e da pesagem da massa da solução coloidal e do pó, após secagem em estufa a 50 °C.

Os resultados obtidos para a amostra NP1D mostram que, na faixa de concentração utilizada, essas nanopartículas apresentam baixa toxicidade. Além disso, é possível observar que a viabilidade celular se mantém, aproximadamente, constante em cerca de 70% com o aumento da concentração. Isso é um indicativo de que a toxicidade das nanopartículas da amostra NP1D não é dose-dependente nessa faixa de concentração utilizada.

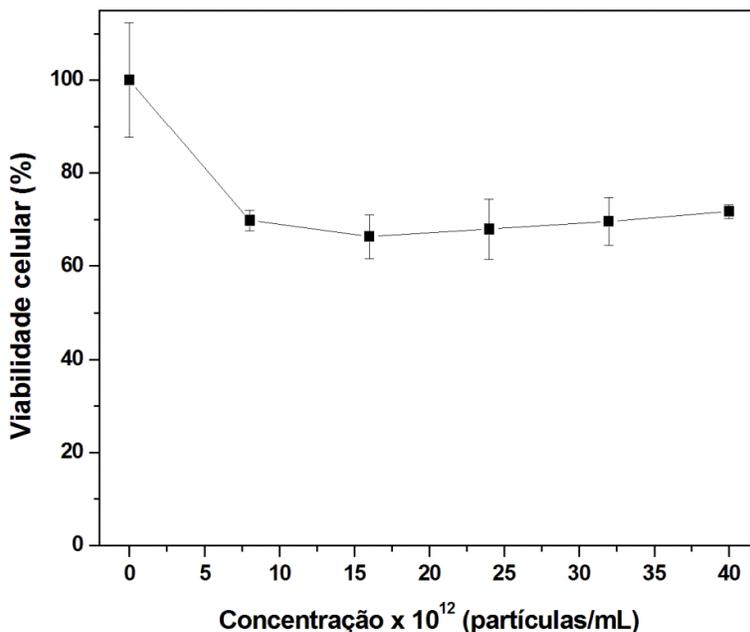


Figura 83. Viabilidade celular das nanopartículas da amostra NP1D funcionalizadas, em uma linhagem celular imortalizada derivada de um adenocarcinoma mamário murino 4T1.

Já na faixa de concentração utilizada nos ensaios da amostra NPS6 (Figura 84), a toxicidade parece ser dose-dependente. Adicionalmente, observa-se que a viabilidade celular diminui drasticamente de 75% para 43% com o aumento da concentração de 16×10^{13} partículas/mL para 20×10^{13} partículas/mL.

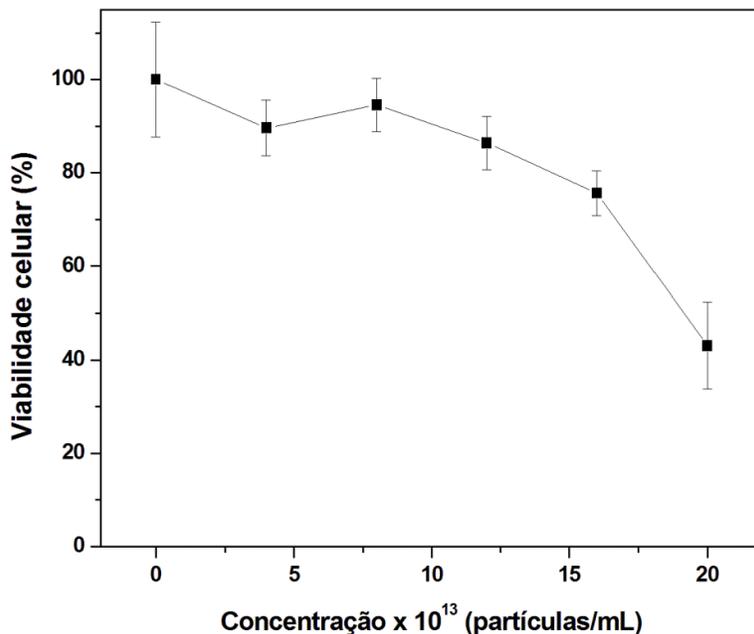


Figura 84. Viabilidade celular das nanopartículas da amostra NPS6 funcionalizadas, em uma linhagem celular imortalizada derivada de um adenocarcinoma mamário murino 4T1..

A Figura 85 permite avaliar alterações na morfologia celular, após 24 h de tratamento com as nanopartículas nas células 4T1. Nesse ensaio, não foi observado morte celular em nenhum dos dois casos. Nota-se que, mesmo nas imagens em que as células estão carregadas de fluido, ainda assim as células se mantêm viáveis.

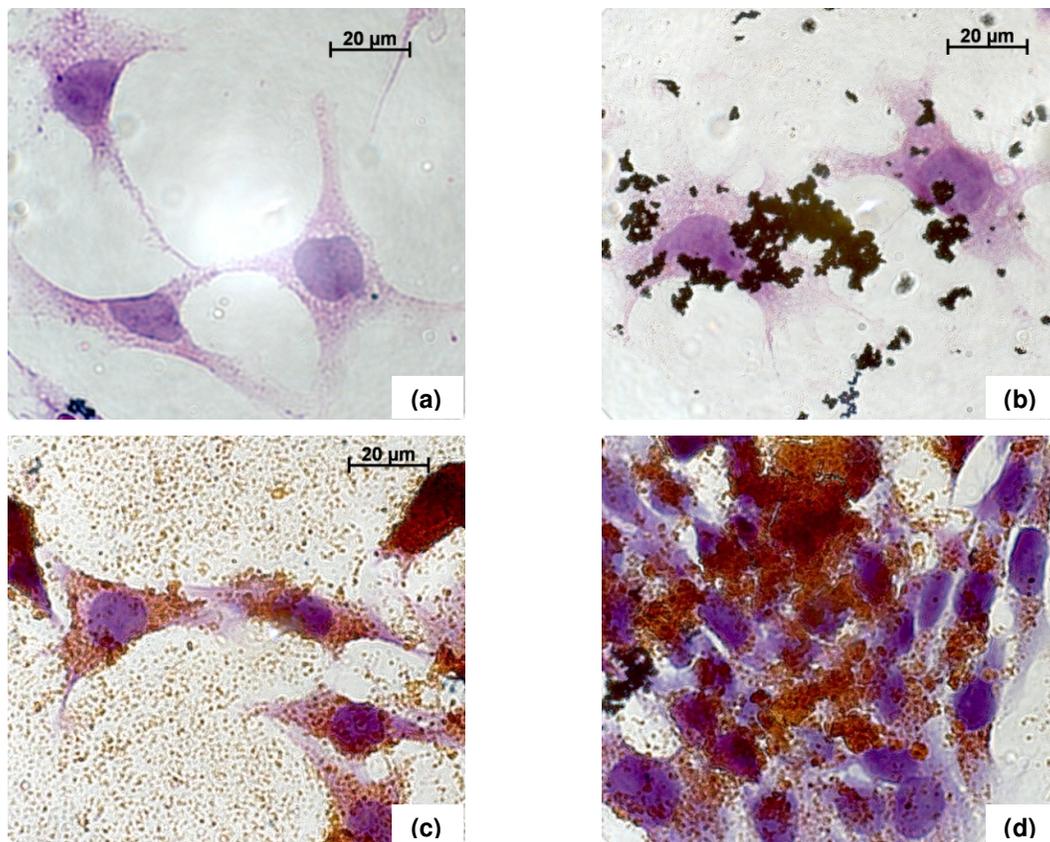


Figura 85. Imagens obtidas por microscopia de luz da alteração da morfologia celular após o tratamento com nanopartículas. (a) controle; (b) NP1D; (c) NPS6 e (d) NPS6 com concentração de 20×10^{13} partículas/mL.

Esses são ensaios preliminares a respeito da citotoxicidade dessas nanopartículas. Os experimentos devem ser ajustados, bem como o processo de funcionalização da superfície das nanopartículas, que pareceu não ser eficiente para as finalidades propostas. Contudo, esses resultados são um indicativo de que essas suspensões têm baixo potencial de citotoxicidade nas concentrações e nas células utilizadas.

Capítulo

5

Conclusões e Perspectivas

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1. Conclusões

- O formato alongado das nanopartículas magnéticas sintetizadas utilizando-se $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ureia como reagentes, na proporção de $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$ de 1:2, está relacionado à presença do SO_4^{2-} (e, provavelmente, à sua adsorção específica aos cristais) e da ureia (cuja termólise leva à geração homogênea de íons hidróxido em solução). Além disso, deve-se considerar a influência do formato acicular da goethita, que é o intermediário das sínteses utilizando esses reagentes.
- As nanopartículas obtidas utilizando-se $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ureia como reagentes (NP2A) diferiram das nanopartículas obtidas utilizando-se os reagentes $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ureia (NP1D) em formato, dimensão e composição. As primeiras, compostas majoritariamente por hematita, apresentaram dimensões, aproximadamente, 2 vezes o comprimento e 3,5 vezes a largura da amostra NP1D, com formato alongado, porém com largura aumentada. A troca do reagente $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pelo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, na amostra NP1D, não apenas mudou o formato, levando à formação de nanobastões, como também influenciou a composição das amostras obtidas, gerando magnetita, preferencialmente.
- A variação da proporção $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$ para 1:1 (NP3A) e 2:1 (NP3B), levou a obtenção nanopartículas magnéticas compostas por uma fase intermediária entre a magnetita e a maghemita cúbica. O formato predominante dessas nanopartículas não foi alongado, como objetivou esse estudo. Isso pode ter relação com o intermediário das sínteses nessas proporções, que pode não ter sido a goethita (formato acicular), visto não haver vestígios de sua presença nas amostras. Além disso, as M_S dessas amostras foram superiores à da amostra NP1F ($\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+} = 1:2$), porém com maiores de M_R e H_C , indicando uma maior tendência a formação de aglomerados.
- Dentre as amostras de nanopartículas magnéticas alongadas sintetizadas, a amostra selecionada para a realização de ensaios mais focados nas aplicações biomédicas foi a amostra NP1D, obtida com 6 h de reação. A

escolha dessa amostra em detrimento da amostra com 12 h de reação (NP1F) foi pautada, principalmente, na maior viabilidade da síntese, em contraste com as diferenças entre as propriedades das amostras. Essa seleção não descarta a retomada da amostra NP1F para realização dos ensaios citados, a fim de se observar e comparar o seu comportamento.

- A utilização da ureia, ao invés do NH_4OH (mais convencional), influencia diretamente o formato das nanopartículas nas condições de síntese descritas, pela priorização da etapa de crescimento cristalino, em detrimento da nucleação, conduzindo a formação de nanopartículas alongadas, em contraste com a formação de nanopartículas esféricas.
- Com a variação dos tempo de reação, contra-íons, proporções entre Fe^{2+} e Fe^{3+} e base utilizada na alcalinização do meio, foi possível obter nanopartículas de óxidos de ferro com diferentes dimensões, formatos, composições e propriedades magnéticas. Apesar de apenas duas amostras serem selecionadas para dar continuidade a esse estudo, uma gama de opções de partículas foram delineadas para estudos posteriores. Como já discutido, existem inúmeras possibilidades de aplicações biomédicas *in vivo* e *in vitro* para as quais, algumas dessas amostras sintetizadas podem ser interessantes.
- Apesar de não ser o objetivo desse estudo, utilizando um procedimento simples, nanopartículas esféricas monodispersas superparamagnéticas de maghemita, com diâmetro médio variando de 11,5 a 19 nm, foram obtidas. Isso foi atingido por meio de uma síntese do tipo *one-pot*, onde o Fe^{2+} e o Fe^{3+} foram precipitados em solução amoniacal, levando a formação de nanopartículas de magnetita, cuja oxidação a maghemita foi acelerada por uma etapa de digestão hidrotérmica. Como não foram utilizados reagentes tóxicos nem passos adicionais para reduzir a dispersão ou oxidar a magnetita a maghemita, as nanopartículas obtidas apresentam potencial para aplicações terapêuticas no campo biomédico. A amostra obtida com seis horas de reação (NPS6) foi selecionada para as próximas etapas do estudo utilizando os mesmos critérios de seleção da amostra NP1D. Da mesma forma, essa seleção não descarta a retomada da amostra NPS9 para realização dos ensaios citados, a fim de se observar e comparar o seu comportamento.

- Os experimentos de hipertermia mostraram que, para ambas as amostras analisadas (NP1D e NPS6), a variação de temperatura aumenta com o aumento do campo magnético aplicado. A amostra NPS6 aquece melhor em baixos campos, devido à sua menor constante de anisotropia, até o campo crítico de 223 Oe, a partir do qual ocorre uma inversão, e a amostra NP1D passa a aquecer mais, devido à sua maior constante de anisotropia. De qualquer modo, as duas amostras apresentaram potencial para aplicações em magnetohipertermia.
- A funcionalização da superfície das nanopartículas NP1D e NPS6 com TPF não se mostrou eficiente para as finalidades propostas. As soluções coloidais obtidas não se mostraram estáveis ao longo do tempo, em especial da amostra NP1D, cujas nanopartículas são maiores, gerando dificuldades para mantê-las em suspensão.
- Os resultados preliminares de citotoxicidade *in vitro* das amostras NP1D e NPS6 pelo método do MTT indicaram que essas nanopartículas apresentaram baixa toxicidade nas concentrações utilizadas nas células 4T1. Esses resultados, contudo, devem ser tomados com cautela, visto a instabilidade das soluções coloidais com que eles foram feitos.

5.2. Perspectivas

Para dar continuidade a esse estudo, algumas sugestões são propostas:

- Reduzir a dispersão de tamanhos das nanopartículas alongadas, sintetizadas utilizando-se $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e ureia como reagentes, na proporção de $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$ de 1:2;
- Buscar a metodologia mais adequada para a funcionalização das superfícies das nanopartículas alongadas e esféricas selecionadas com TPF e com polímeros hidrofílicos biocompatíveis;
- Buscar outros tipos de recobrimentos biocompatíveis para as nanopartículas alongadas;
- Aprofundar os estudos de citotoxicidade e biocompatibilidade das nanopartículas selecionadas;

- Investigação das propriedades ópticas das nanopartículas magnéticas selecionadas;
- Aprofundar os estudos de hipertermia magnética, em especial das nanopartículas alongadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gilchrist, R. K.; Medal, R.; Shorey, W. D.; Hanselman, R. C.; Parrott, J. C.; Taylor, C. B.; *Ann. Surg.* **1957**, *146*, 596.
2. Widder, K. J.; Senyel, A. E.; Scarpelli, D. G.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1978**, *58*, 141.
3. Krishnan, K. M.; *IEEE Trans Magn.* **2010**, *46*, 2526.
4. <http://inovabrasil.blogspot.com/2010/10/cnpq-edital-para-pesquisa-em.html>, acessado em novembro de 2010.
5. Knobel, M.; Goya, G. F.; *Sci. Am. Bras.* **2004**, *58*.
6. Cornell, R. M.; Schwertmann, U.; *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*, 1st ed.; VCH Publishers, Inc.: Nova Iorque, EUA, 1996.
7. Kittel, C., *Introduction to Solid State Physics*, 8^a Ed., John Wiley & Sons, Inc.: Nova Iorque, EUA, 2005.
8. Shriver, D. F.; Atkins, P. W.; *Química Inorgânica*, 3^a ed.; Gomes, M. A. B., trad.; Bookman: Porto Alegre, 2003.
9. Teja, A. S.; Koh, P.; *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2009**, *55*, 22.
10. Figuerola, A.; Corato, R.; Manna, L.; Pellegrino, T.; *Pharmacol. Res.* **2010**, *62*, 126.
11. Knobel, M.; *Rev. Bras. Ens. Fís.* **2000**, *22*, 387.
12. Kalambur, V. S.; Han, B.; Hammer, B. E.; Shield, T. W.; Bischof, J. C.; *Nanotechnology* **2005**, *16*, 1221.
13. Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J.; *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, R167.
14. Weinberg, J. B. In *Wintrobe's Clinical Hematology* 11th Ed.; Greer, J. P.; Foerster, J.; Lukens, J. N., eds.; Lippincott Williams & Wilkins Publishers: Baltimore, 2003, ch. 13.
15. Choi, H. S.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Ipe, B. I.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V.; *Nature Biotechnol.* **2007**, *25*, 1165.
16. Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaría, J.; *Nano Today* **2007**, *2*, 22.
17. Cole, A. J.; Yang, V. C.; David, A. E.; *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 323.
18. Decuzzi, P.; Ferrari, M.; *Biomaterials* **2006**, *27*, 5307.
19. Decuzzi, P.; Ferrari, M.; *Biophys. J.* **2008**, *94*, 3790.
20. Decuzzi, P.; Pasqualini, R.; Arap, W.; Ferrari, M.; *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 235.
21. Mitragotri, S.; Lahann, J.; *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 15.
22. Decuzzi, P.; Lee, S.; Bhushan, B.; Ferrari, M.; *Ann. Biomed. Eng.* **2005**, *33*, 179.
23. Gavze, E.; Shapiro, M.; *J. Fluid Mech.* **1998**, *371*, 59.
24. Champion, J. A.; Mitragotri, S.; *PNAS* **2006**, *103*, 4930.
25. Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W.; *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662.
26. Geng, Y.; Dalhaimer, P.; Cai, S.; Tsai, R.; Tewari, M.; Minko, T.; Discher, D. E.; *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 249.
27. Cribb, J. A.; Meehan, T. D.; Shah, S. M.; Skinner, K.; Superfine, R.; *Ann. Biomed. Eng.* **2010**, *38*, 3311.
28. <http://www.iag.usp.br/~agg110/moddata//GEOMAGNETISMO/Anisotropia%20magnetic.pdf>, acessado em novembro de 2010.

-
29. Rebolledo, A. F.; Bomatí-Miguel, O.; Marco, J. F.; Tartaj, P.; *Adv. Mat.* **2008**, *20*, 1760.
 30. Sharifi, S.; Behzadi, S.; Laurent, S.; Forrest, M. L.; Stroeve, P.; Mahmoudi, M.; *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2323.
 31. Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N.; *Science* **2006**, *311*, 622.
 32. Shubayev, V. I.; Pisanic II, T. R.; Jin, S.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 467.
 33. Senyei, A.; Widder, K.; Czerlinski, G.; *J. Appl. Phys.* **1978**, *49*, 3578.
 34. Mosbach, K.; Schroder, U.; *FEBS Letters* **1979**, *102*, 112.
 35. Gupta, A. K.; Gupta, M.; *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995.
 36. Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sen, T.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 24.
 37. Parveen, S.; Misra, R.; Sahoo, S. K.; *Nanomed-Nanotechnol.* **2012**, *8*, 147.
 38. Widder, K. J.; Morris, R. M.; Poore, G. A.; Howard, D. P.; Senyei, A. E.; *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1983**, *19*, 135.
 39. Lübbe, A. S.; Bergemann, C.; Riess, H.; Schriever, F.; Reichardt, P.; Possinger, K.; Matthias, M.; Dörken, B.; Herrinann, F.; Gürtler, R.; Hohenberger, P.; Haas, N.; Sohr, R.; Sander, B.; Lemke, A.; Ohlendorf, D.; Huhnt, W.; Huhn, D.; *Cancer Res.* **1996**, *56*, 4686.
 40. Dobson J.; *Gene Ther.* **2006**, *13*, 283.
 41. Schere, F.; Anton, M.; Schillinger, U.; Henke, J.; Bergemann, C.; Krüger, A.; Gänsbacher, B.; Plank, C.; *Gene Ther.* **2002**, *9*, 102.
 42. Plank, C.; Schillinger, U.; Scherer, F.; Bergemann, C.; Rémy, J. S.; Krötz, F.; Anton, M.; Lausier, J.; Rosenecker, J.; *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 737.
 43. Ryoo, S. R.; Jang, H.; Kim, K. S.; Lee, B.; Kim, K. B.; Kim, Y. K.; Yeo, W. S.; Lee, Y.; Kim, D. E.; Min, D. H.; *Biomaterials* **2012**, *33*, 2754.
 44. Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fähling, H.; Felix, R.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *201*, 413.
 45. Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T.; *J. of Biosci. Bioeng.* **2005**, *100*, 1.
 46. Van der Zee, J.; González, D. G.; van Rhoon, G. C.; van Dijk, J. D. P.; van Putten, W. L. J.; Hart, A. A. M.; *Lancet* **2000**, *355*, 1119.
 47. Durán, N.; Mattoso, L. H. C.; Morais, P. C.; *Nanotecnologia: Introdução, Preparação e Caracterização de Nanomateriais e Exemplos de Aplicação*; Artliber Editora Ltda.: São Paulo, 2006.
 48. Habash, R. W. Y.; Bansal, R.; Krewski, D.; Alhafid, H. T.; *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *34*, 491.
 49. Stauffer, P. R.; Cetas, T. C.; Fletcher, A. M.; DeYoung, D. W.; Dewhirst, M. W.; Oleson, J. R.; Roemer, R. B.; *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **1984**, *BME-31*, 76.
 50. Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Fawling, H.; Felix, R.; *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *201*, 413.
 51. Guedes, M. H.; Sadeghiani, N.; Peixoto, D. L. G.; Coelho, J. P.; Barbosa, L. S.; Azevedo, R. B.; Kückelhaus, S.; Silva, M. F.; Moraes, P. C.; Lacava, Z. G. M.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 283.
 52. Józefczak, A.; Hornowski, T.; Skumiel, A.; Łabowski, M.; Timko, M.; Kopčanský, P.; Koneracká, M.; Szlaferek, A.; Kowalski, W.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1505.
 53. Meenach, S. A.; Hilt, J. Z.; Anderson, K. W.; *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 1039.

-
54. Johanssen, M.; Gneveckow, U.; Thiesen, B.; Taymoorian, K.; Cho, C. H.; Waldöfner, N.; Scholz, R.; Jordan, A.; Loening, S. A.; Wust, P.; *Eur. Urol.* **2007**, *52*, 1653.
55. Jordan, A.; Scholz, R.; Maier-Hauff, K.; Johanssen, M.; Wust, P.; Nadobny, J.; Schirra, H.; Schmidt, H.; Deger, S.; Loening, S.; Lanksch, W.; Feliz, R.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *225*, 118.
56. Maier-Hauff, K.; Rothe, R.; Scholz, R.; Gneveckow, U.; Wust, P.; Thiesen, B.; Feussner, A.; Deimling, A.; Waldoefner, N.; Felix, R.; Jordan, A.; *J. Neurooncol.* **2007**, *81*, 53.
57. Tiefenauer, L. X. Chapter 29: Magnetic Nanoparticles As Contrast Agents for Medical Diagnosis In *Nanotechnology in Biology and Medicine: Methods, DeVices, and Applications*; Vo-Dinh, T., Eds.; CRC Press, Taylor and Francis: Boca Raton, FL, 2007; pp 1-20.
58. <http://www.ige.unicamp.br/site/aulas/186/Espinelios.pdf>, acessado em dezembro de 2010.
59. Lee, J. D.; *Química Inorgânica Não Tão Concisa*; Toma, H. E.; Araki, K.; Rocha, R. C., trad.; Editora Edgard Blücher Ltda.: São Paulo, 2001.
60. Sugimoto, T.; Wang, Y.; *J. Coll. Int. Sci.* **1998**, *207*, 137.
61. Ozaki, M.; Kratochvil, S.; Matijević, E.; *J. Coll. Int. Sci.* **1984**, *102*, 146.
62. Sugimoto, T.; Muramatsu, A.; Sakata, K.; Shindo, D.; *J. Coll. Int. Sci.* **1993**, *158*, 420.
63. Stachen, M.; Morales, M. P.; Ocaña, M.; Serna, C. J.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 4465.
64. Shen, H. X.; Yao, J. L.; Gu, R. A.; *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **2009**, *19*, 652.
65. Serna, C. J.; Ocaña, M.; Iglesias, J. E.; *J. Phys. C: Solid State Phys.* **1987**, *20*, 473.
66. Radeva, T.; *Colloids Surf., A* **2002**, *209*, 219.
67. Ozaki, M.; Matijević, E.; *J. Coll. Int. Sci.* **1985**, *107*, 199.
68. Sugimoto, T.; Khan, M. M.; Muramatsu, A.; *Colloids Surf., A* **1993**, *70*, 167.
69. Ocaña, M.; Morales, M. P.; Serna, C. J.; *J. Coll. Int. Sci.* **1999**, *212*, 317.
70. Harris, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, 5ª ed.; Riehl, C. A. S.; Guarino, A. W. S., trad.; LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.: Rio de Janeiro, 2001.
71. Sugimoto, T.; Itoh, H.; Mochida, T.; *J. Coll. Int. Sci.* **1998**, *205*, 42.
72. Fischer, W. R.; Schwertmann, U.; *Clays Clay Miner.* **1975**, *23*, 33.
73. Hu, C.; Gao, Z.; Yang, X.; *Mater. Chem. Phys.* **2007**, *104*, 429.
74. Wang, G.; Li, W.; Jia, K.; Spliethoff, B.; Schüth, F.; Lu, A.; *Appl. Catal., A* **2009**, *364*, 42.
75. Mosmann, T.; *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.
76. Apesteguy, J. C.; Jacobo, S. E.; Schegoleva, N. N.; Kurlyandskaya, G. V.; *J. Alloys Compd.* **2010**, *495*, 509.
77. Mincheva, R.; Stoilova, O.; Penchev, H.; Ruskov, T.; Spirov, I.; Manolova, N.; Rashkov, I.; *Eur. Polym. J.* **2008**, *44*, 615.
78. Valenzuela, R.; Fuentes, M. C.; Parra, C.; Baeza, J.; Duran, N.; Sharma, S. K.; Knobel, M.; Freer, J.; *J. Alloys Compd.* **2009**, *488*, 227.
79. Jacintho, G. V. M.; Brolo, A. G.; Corio, P.; Suarez, P. A. Z.; Rubim, J. C.; *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 7684.

-
80. Schwertmann, U.; Cornell, R. M.; *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*; VCH Publishers, Inc.: Nova Iorque, EUA, 1991.
81. Lian, S.; Wang, E.; Kang, Z.; Bai, Y.; Gao, L.; Jiang, M.; Hu, C.; Xu, L.; *Solid State Commun.* **2004**, *129*, 485.
82. Skoog; D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*, 8ª ed.; Editora Thompson: São Paulo, 2006.
83. Cullity, B. D.; *Elements of X-Ray Diffraction*; Addison-Wesley Publishing Company, Inc.: Massachusetts, EUA, 1956.
84. Maity, D.; Agrawal, D. C.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *308*, 46.
85. Kandori, K.; Shigetomi, T.; Ishikawa, T.; *Colloids Surf., A* **2004**, *232*, 19.
86. Nasrazadani, S.; Raman, A.; *Corros. Sci.* **1993**, *34*, 1355.
87. Ruan, H. D.; Frost, R. L.; Klopogge, J. T.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2001**, *57*, 2575.
88. Nakamoto, K.; *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4ª ed.; John Wiley & Sons: Nova Iorque, EUA, 1986.
89. Musić, S.; Maljković, M.; Czako-Nagy, I.; *Mater. Lett.* **1997**, *31*, 43.
90. Ruan, H. D.; Frost, R. L.; Klopogge, J. T.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2001**, *57*, 2575.
91. Ruan, H. D.; Frost, R. L.; Klopogge, J. T.; Duong, L.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2002**, *58*, 967.
92. Pardoe, H.; Chua-anusorn, W.; St. Pierre, T. G.; Dobson, J.; *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *225*, 41.
93. Itoh, H; Sugimoto, T.; *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *265*, 283.
94. Morales, M. P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Montero, M. I.; Serna, C. J.; *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 3058.
95. Tartaj, P.; Morales, M. P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; González-Carreño, T.; Serna, C. J.; *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, R182.
96. Gomes, J. A.; Sousa, M. H.; Tourinho, F. A.; Aquino, R.; Silva, G. J.; Depeyrot, J.; Dubois, E.; Perzynski, R.; *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 6220;
97. Jolivet, J. P.; Tronc, E.; *J. Coll. Int. Sci.* **1988**, *125*, 688;
98. Morales, M. P.; Pecharroman, C.; Gonzalez Carreño, T.; Serna, C. J.; *J. Solid State Chem.* **1994**, *108*, 158;
99. Oliveira, F. C. C.; Effenberger, F. B.; Sousa, M. H.; Jardim, R. F.; Kiyohara, P. K.; Dupont, J.; Rubim, J. C.; Rossi, L. M.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13558;
100. Rubim, J. C.; Sousa, M. H.; Silva, J. C. O.; Tourinho, F. A.; *Braz. J. Phys.* **2011**, *31*, 402.
101. Bordelon, D. E.; Cornejo, C.; Grüttner, C.; Westphal, F.; DeWeese, T. L.; Ivkov, R.; *J. Appl. Phys.* **2011**, *109*, 124904.
102. Verde, E. L.; Landi, G. T. Carrião, M. S.; Drummond, A. L.; Gomes, J. A.; Vieira, E. D.; Sousa, M. H.; Bakuzis, A. F.; *J. Appl. Phys.*, in press.