



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas – IB

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia – PPG/NANO

Dissertação de Mestrado

**NANOFILMES COM ÓXIDOS DE FERRO NANOESTRUTURADOS E  
BIOPOLÍMEROS DEPOSITADOS POR AUTOMONTAGEM**

Ana Paula de Oliveira Ricaldi de Castilho

Brasília, DF

2014

ANA PAULA DE OLIVEIRA RICALDI DE CASTILHO

**NANOFILMES COM ÓXIDOS DE FERRO NANOESTRUTURADOS E  
BIOPOLÍMEROS DEPOSITADOS POR AUTOMONTAGEM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Godoy Soler.

Brasília, DF

2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

Dissertação de Mestrado

Ana Paula de Oliveira Ricaldi de Castilho

Título:

**“Nanofilmes com óxidos de ferro nanoestruturados e biopolímeros depositados por automontagem.”**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Maria Aparecida Godoy Soler Pujanian  
*Presidente / Orientador*  
*UnB / Nano*

Prof. Dra. Graziella Anselmo Junilli  
*Membro Titular Interno Vinculado ao Programa*  
*UnB / Nano*

Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno  
*Membro Titular Interno não Vinculado ao Programa*  
*UnB / IQ*

Brasília, 29 de agosto de 2014.

Ao meu querido esposo Gustavo pelo amor,  
pela paciência, pela compreensão e pelo  
incentivo durante todos esses anos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sua infinita presença em minha vida e por me conceder forças para superar todos os obstáculos.

Especialmente à Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Godoy Soler, pelos ensinamentos, pela atenção e paciência. Obrigada Maria Aparecida, pela amizade também.

Ao Professor Dr. Leonardo Giordano Paterno, pela paciência, pela amizade e pelos ensinamentos da técnica de automontagem dos filmes apresentados neste trabalho.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Graziella Anselmo Joanitti, pela realização do teste de MTT.

Ao Professor Dr. Marcelo de Assumpção Pereira da Silva pelas análises por meio de Microscopia de Força Atômica.

Ao Professor Dr. Osmino Junior do Laboratório de Toxinologia do Instituto de Biologia, por ter realizado a liofilização das amostras.

Ao Coordenador Professor Dr. Sebastião William da Silva, pelas orientações administrativas.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Camila Messias, pelo apoio nos momentos de dúvidas no laboratório.

À Camila Letti, pela amizade e companheirismo, por toda atenção, dedicação e paciência ao me introduzir nas práticas de laboratório.

Ao Luís Miguel, por tantas vezes me ajudar.

À Queila, pela amizade, pelo treinamento para utilização dos equipamentos de espectroscopia UV-Vis FT-IR e pela companhia nos almoços do RU.

Aos demais colegas que me apoiaram para a realização deste trabalho: Julhyana, Ariane, Felipe, Bernardo, Antonia, Karen, Ana Lygia, à Kelly Cristina, da secretaria do Programa de Pós-Graduação, pela sua compreensão e cordialidade no atendimento.

Ao João no apoio para realizar imagens na Microscopia Eletrônica de Varredura.

À Ingrid pelo apoio para a realização das imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Aos meus amigos Everton, Luciana e Laís que acompanham minha trajetória e me encorajaram sempre, desde o início da graduação.

Ao INCT Centro-Oeste e Norte de Nanobiotecnologia e à CAPES, por apoiar este trabalho e pelo auxílio financeiro.

À minha família, meus pais Teodorico e Francisca que sempre me apoiaram, os meus irmãos Ricardo, Luciano, Aínda Alexandra, Ana Claudia e Paulo Augusto que me incentivaram e acreditaram em mim.

Especialmente ao meu querido esposo Gustavo que tanto amo, pela paciência, compreensão e por estar sempre ao meu lado me apoiando nos momentos difíceis.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram a realizar este trabalho.

O coração do homem planeja o seu caminho, mas  
Senhor Ihe dirige os passos.

**Provérbio 16-9**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho é a fabricação de novas nanoestruturas de nanofilmes compostos por nanopartículas de óxidos de ferro e biopolímeros (quitosana ou o álcool polivinílico) por meio da técnica de automontagem camada por camada, assim como estudar o processo de adsorção das NPs de óxidos de ferro e realizar testes toxicológicos das nanoestruturas fabricadas. As NPs de óxidos de ferro (diâmetro ~ 10nm) funcionalizadas com citrato foram sintetizadas por meio da técnica de coprecipitação química em meio aquoso e dispersas para formar suspensões coloidais com pH adequado às aplicações biológicas. Os nanofilmes compostos por NPs de óxidos de ferro e polímero foram depositados em substrato de vidro óptico BK7 ou em celulose bacteriana. O monitoramento do crescimento dos nanofilmes foi realizado por meio da espectroscopia de UV-Vis, enquanto a estrutura e a morfologia foram estudadas por meio das técnicas de espectroscopia Raman, de microscopias eletrônica de transmissão, de varredura e de força atômica. Em adição, foram realizados testes toxicológicos por meio da avaliação da viabilidade celular *in vitro* em culturas de células de linhagem NIH-3T3, empregando-se o método colorimétrico do brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). Os nanofilmes formados por quitosana e nanopartículas, denotados por (QUI/CIT-MAG), depositados sobre substratos de vidro, apresentaram espessuras na faixa de 5 a 40 nm e crescimento linear, conforme se espera para amostras obtidas com a técnica de automontagem. Por outro lado, os filmes compostos por (PVA/CIT-MAG) apresentaram baixa adsorção de partículas. Os resultados obtidos pelas diversas técnicas de análise de superfície mostraram a uniformidade dos nanofilmes depositados em substratos de vidro ou celulose bacteriana. Os testes de viabilidade celular mostraram que os nanofilmes produzidos não apresentam efeitos citotóxicos, e indicaram o seu potencial para aplicações biomédicas.

**Palavras-chave:** Nanopartículas de óxidos de ferro; Magnetita; Fluido magnético; Biopolímeros; Técnica de automontagem camada por camada; Viabilidade celular; Testes toxicológicos; Nanofilmes magnéticos.

## ABSTRACT

The objective of this study is the fabrication of new nanofilms comprising iron oxide nanoparticles and biopolymers (chitosan or polyvinyl alcohol) via the layer-by-layer technique, as well as studying the process of adsorption of the iron oxide nanoparticles, and perform toxicity tests of the produced nanostructures. Citrate-coated iron oxide nanoparticles (diameter  $\sim 10$  nm) were synthesized via the chemical co-precipitation route in aqueous medium and dispersed to produce colloidal suspension for biological applications. The nanofilms composed of iron oxide nanoparticles and polymer were deposited onto optic glass BK7 as well as on bacterial cellulose substrates. The growth of the nanofilms was monitored using UV-Vis spectroscopy, while the morphology and structure was studied by Raman spectroscopy, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and atomic force microscopy. In addition, toxicity tests were performed via cell viability *in vitro* in cultures of NIH-3T3 cells using the colorimetric assay of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). The nanofilms constituted of chitosan and nanoparticles deposited on BK7, presented thickness from 5 up to 40 nm and linear growth. Otherwise, the films constituted of PVA and nanoparticles presented low nanoparticle adsorption. The analysis of the results showed nanofilms deposited on both substrates are uniform. The cell viability assay showed that the produced nanofilms don't show toxicity effects, indicating their potential for biomedical applications.

**Keywords:** Iron oxide nanoparticles. Magnetite. Magnetic fluid. Biopolymers. Layer-by-layer. Toxicity test. Magnetic nanofilms.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.1 –	(a) Ilustração de um sistema para entrega de fármacos acoplados a nanopartículas magnéticas sob ação de um campo magnético externo no local do tumor, adaptada de (PANKHURST et al., 2003). (b) Nanopartícula magnética funcionalizada acoplada a um anticorpo específico.....	2
Figura 2.1 –	Ilustração das etapas de deposição por meio da técnica de automontagem LbL e da estrutura do nanofilme obtido.....	11
Figura 2.2 –	Esquema da estrutura inter e intramolecular das ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose.....	13
Figura 2.3 –	Fórmula estrutural, onde n indica o grau de polimerização.....	14
Figura 2.4 –	Fórmula estrutural do ácido polivinílico (PVA).....	16
Figura 2.5 –	Representação da estrutura cristalina de magnetita.....	19
Figura 2.6 –	Ilustração da orientação dos momentos magnéticos nos materiais ferromagnéticos.....	21
Figura 2.7 –	Ilustração da orientação momentos magnéticos nos materiais ferrimagnéticos.....	21
Figura 2.8 –	Ilustração da curva de histerese para os materiais ferromagnéticos.....	22
Figura 3.1 –	Ilustração das técnicas utilizadas neste trabalho para caracterização do fluido magnético (FM) e dos filmes automontados.....	26
Figura 3.2 –	Mecanismos de espalhamento de um fóton.....	29

Figura 3.3 – Ilustração do processo de síntese das nanopartículas de magnetita cobertas com citrato por meio do método de coprecipitação alcalina.....	34
Figura 4.1 – Imagem MET de Micrografia da amostra de magnetita funcionalizada com citrato (a) e histograma obtido a partir da imagens MET (b).....	41
Figura 4.2 – Espectro Raman obtido para a amostra CIT-MAG na forma de pó ajustado empregando-se funções lorentzianas.....	42
Figura 4.3 – Monitoramento da deposição dos nanofilmes por meio da espectroscopia UV-Vis. Espectros de absorbância para as amostras (QUI/CIT-MAG) <sub>n</sub> , para n variando de 1 a 10 bicamadas (a). O aumento da absorbância em função do número de bicamadas é mostrado em (b). A reta foi adquirida a partir do número de bicamadas.....	44
Figura 4.4 – Espectro Raman obtido do nanofilme (QUI/CIT-MAG) <sub>10</sub> ajustado empregando-se funções lorentzianas.....	46
Figura 4.5 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para o substrato de vidro óptico BK7 (a); nanofilme (QUI/CIT-MAG) <sub>10</sub> em (b); e nanofilme (PVA/CIT-MAG) <sub>10</sub> em (c). Todas as imagens com barras de 1 μm.....	48

Figura 4.6 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de superfície e lateral em (a) e (b) respectivamente, para o substrato de celulose bacteriana; nanofilme (QUI/CIT-MAG)<sub>10</sub> de superfície e lateral em (c) e (d) a seta indica a deposição do filme na superfície, respectivamente; nanofilme (PVA/CIT-MAG)<sub>10</sub> de superfície e lateral em (e) e (f) a seta indica a deposição do filme na superfície, respectivamente. Com exceção da imagem em (b) com barra de 100 nm, as demais apresentam barras de 1µm..... 50

Figura 4.7 – Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em vidro BK7, conforme indicações..... 53

Figura 4.8 – Dados dos valores de espessura dos nanofilmes obtidos por meio das imagens de MFA, em função do número de bicamadas, para as amostras (QUI/CIT-MAG)<sub>n</sub>, com n = 1, 3, 5, 9,5 e 10 bicamadas..... 56

Figura 4.9 – Imagem de MFA em três dimensões de topografia da amostra (QUI/CIT-MAG)<sub>5</sub>..... 57

Figura 4.10 – Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em vidro BK7, conforme indicações..... 59

Figura 4.11 – Imagem de MFA em três dimensões de topografia da amostra (PVA/CIT-MAG)<sub>5</sub>..... 62

Figura 4.12 –	Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em celulose bacteriana, conforme indicações.....	64
Figura 4.13 –	Imagem de MFA em três dimensões de topografia da amostra (QUI/CIT-MAG) <sub>3C</sub> depositada em substrato de celulose bacteriana.....	66
Figura 4.14 –	Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em celulose bacteriana, conforme indicações.....	68
Figura 4.15 –	Imagem de MFA em três dimensões de topografia da amostra (PVA/CIT-MAG) <sub>3C</sub> depositada em substrato de celulose bacteriana.....	70
Figura 4.16 –	Resultados obtidos do estudo de viabilidade celular de células de fibroblasto para nanofilmes com diferentes arquiteturas e controles com tempo de exposição de 24 horas.....	73

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 3.1 – Modos vibracionais Raman obtidos de dados experimentais para a magnetita <i>bulk</i> (SHEBANOVA, 2003).....	30
Tabela 3.2 – Relação de nanofilmes com quitosana preparados para a análise de morfologia da superfície empregando-se as técnicas MEV e MFA.....	36
Tabela 3.3 – Relação de nanofilmes com PVA preparados para a análise de morfologia da superfície empregando-se as técnicas MEV e MFA.....	37
Tabela 3.4 – Relação de nanofilmes com magnetita e quitosana preparados para os testes de toxicidade.....	39
Tabela 4.1 – Relação das amostras utilizadas para o teste de toxicidade.....	73
Tabela 4.2 – Relação dos valores obtidos para a viabilidade celular por meio da análise estatística.....	74

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

2D	- Duas Dimensões
3D	- Três Dimensões
BK7	- Lâminas de Vidro Óptico
CB	- Celulose Bacteriana
cit-MAG	- Nanopartícula de Óxido de Ferro Funcionalizada com Citrato
CTRL	- Grupo Controle
DI	- Água Deionizada
D <sub>MED</sub>	- Diâmetro Médio
D <sub>MET</sub>	- Diâmetro Médio Obtido por MET
EDL	- Espalhamento de Luz Dinâmico
fcc	- Rede Cúbica Unitária de Face Centrada
FM	- Fluidos Magnético
H	- Campo Magnético Externo
HC	- Campo Coercivo
H <sub>c</sub>	- Coercividade
ION	- Nanopartícula Óxido de Ferro ( <i>Iron Oxide Nanoparticle</i> )
LbL	- Camada por Camada ( <i>Layer by Layer</i> )
M	- Magnetização do Meio
MET	- Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	- Microscopia de Força Atômica
MR	- Magnetização Remanescente
MS	- Magnetização de Saturação

- MTT - Brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
- NP - Nanopartícula
- QUI - Quitosana
- RCA - Solução de Limpeza de Vidraria (solução piranha)
- SPIO - Óxidos de Ferro Superparamagnéticos (*Superparamagnetic Iron Oxide*)
- $T_c$  - Temperatura de Curie
- UV-vis - Espectroscopia no Ultravioleta e Visível

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Motivação.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Justificativa .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Objetivos.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>8</b>
<b>2 MATERIAIS.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Método de automontagem.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Matriz polimérica.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Óxidos de Ferro.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.1 Estrutura cristalina.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2 Introdução às propriedades magnéticas dos óxidos de ferro .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.3 Superparamagnetismo .....</b>	<b>23</b>
<b>3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Técnicas de caracterização empregadas.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Procedimentos experimentais .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.1 Materiais.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2 Síntese do Fluido Magnético .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.3 Deposição dos nanofilmes por meio da técnica LbL.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Estudo da citotoxicidade dos nanofilmes fabricados.....</b>	<b>38</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Caracterização do FM empregado como fonte de NPs.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Monitoramento do crescimento dos nanofilmes.....</b>	<b>43</b>

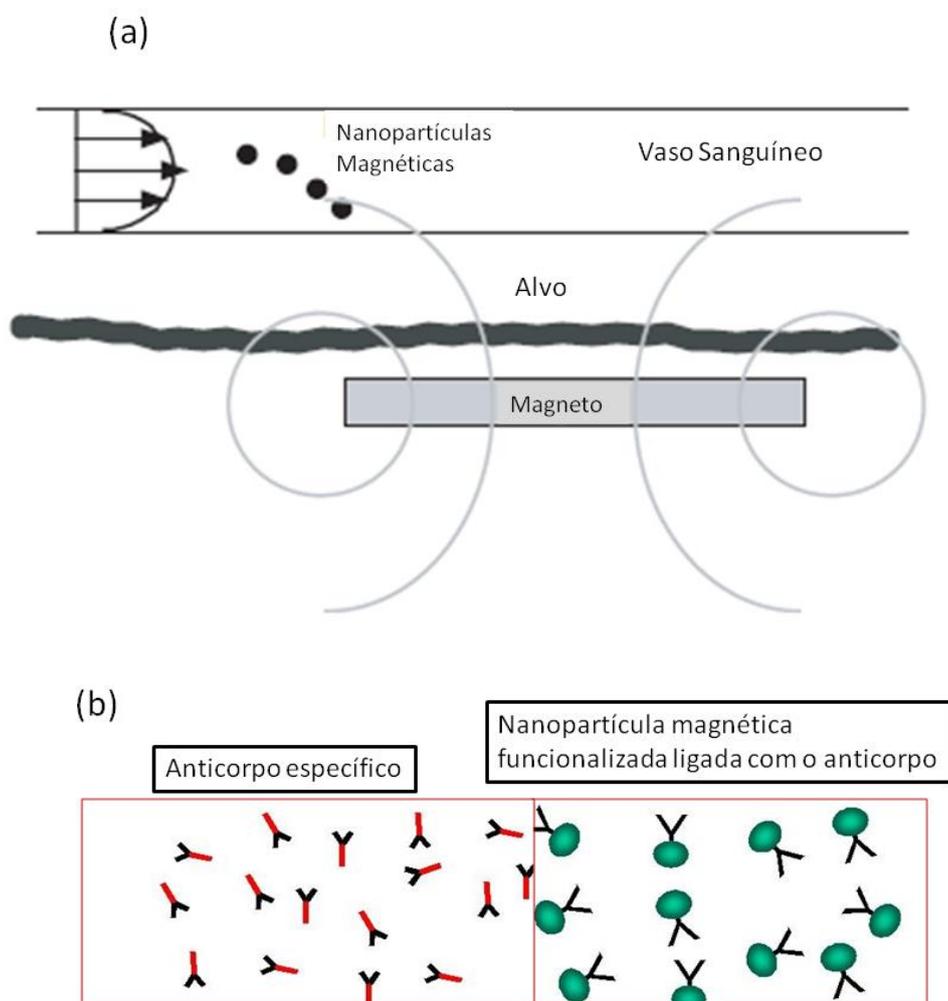
<b>4.3 Análise da morfologia da superfície dos nanofilmes por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4 Análise da morfologia da superfície dos nanofilmes por meio da técnica de Microscopia de Força Atômica .....</b>	<b>51</b>
<b>4.4.1 Imagens MFA obtidas de nanofilmes depositados em substratos de vidro BK7 .....</b>	<b>51</b>
<b>4.4.2 Imagens MFA obtidas de nanofilmes depositados em substratos de celulose bacteriana.....</b>	<b>62</b>
<b>4.5 Teste de Viabilidade Celular.....</b>	<b>70</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1 Perspectivas de trabalhos futuros .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse pelas aplicações de dispersões coloidais magnéticas formadas por óxidos de ferro nanoparticulados nas áreas de biologia e medicina tem se intensificado nas últimas décadas (YOO et al., 2011; ARANDA-SOUZA et al., 2014; ZAMORA-MORA et al., 2014). O comportamento superparamagnéticos de partículas magnéticas monodomínios é similar ao dos materiais paramagnéticos, no sentido de que perdem sua magnetização quando o campo magnético aplicado é removido, porém apresentam uma alta magnetização de saturação abaixo da temperatura de Curie (GUIMARÃES, 2009a). Adicionalmente, as nanopartículas (NPs) magnéticas podem ser funcionalizadas com moléculas propícias para interagir com, ou ligar-se a moléculas biológicas (THÜNEMANN et al., 2006; CARNEIRO et al., 2011; SOLER et al., 2011b). Além da sua alta magnetização, as nanopartículas de óxidos de ferro superparamagnéticas, (SPIO, do inglês *superparamagnetic iron oxide*), apresentam grande potencial para aplicações em biomedicina, como em diagnóstico por imagem, sendo empregadas para o aumento do contraste em imagens de ressonância magnético, e como marcador, facilitando o diagnóstico precoce de doenças neoplásicas, neurológicas e cardiovasculares. Adicionalmente também são empregadas em técnicas de terapia, que incluem plataformas para liberação de fármacos, hipertermia magnética, entre outras (GUEDES, 2005; ISLAM; JOSEPHSON, 2009; MAHMOUDI et al., 2011; SINGH; SAHOO, 2014; WANG, 2014).

As nanopartículas de óxidos de ferro adequadas para aplicações biomédicas apresentam tamanho na faixa de 5 a 20 nm, característica esta que garante interação a nível celular, alta magnetização de saturação, biocompatibilidade,

biodegradabilidade e possibilidade de serem dirigidas para um local específico do organismo (WANG, 2005; WANDEL et al., 2010). O direcionamento das nanopartículas magnéticas para um alvo específico pode ser realizado por meio da aplicação de um gradiente de campo magnético (Figura 1.1 (a)) ou por reconhecimento biológico, por exemplo, quando um anticorpo específico é ligado à superfície da nanopartícula magnética funcionalizada (Figura 1.1 (b)) e é reconhecido pelo antígeno presente no alvo.



**Figura 1.1** – (a) Ilustração de um sistema para entrega de fármacos acoplados a nanopartículas magnéticas sob ação de um campo magnético externo no local do tumor, adaptada de (PANKHURST et al., 2003). (b) Nanopartícula magnética funcionalizada acoplada a um anticorpo específico.

Fonte: Adaptado de Liquids Research Limited (2014).

Uma vez que o complexo magnético é liberado em um local específico do organismo, ele pode ser empregado para diagnóstico ou terapia. A aplicação das NPs magnéticas no transporte de fármacos leva à redução de problemas na administração sistêmica dos mesmos, tais como a biodistribuição do fármaco pelo organismo, ausência de especificidade e necessidade de altas doses que provocam diversos efeitos colaterais (BERRY et al., 2003; FARAJI; WIPF, 2009). A técnica de magnetohipertemia provoca um aumento da temperatura em uma região do corpo que esteja afetada por uma neoplasia com objetivo de causar a lise de suas células. (DURAN et al., 2006). Na magnetohipertermia o aumento de temperatura ocorre devido à presença das nanopartículas de óxidos de ferro sob ação de um campo magnético (DURAN et al., 2006), mas ainda há obstáculos a serem vencidos para sua implementação, como o controle e uniformidade da temperatura no tecido tumoral e a delimitação da área para evitar danos aos tecidos normais adjacentes (BRUSENTOV et al., 2002; SHINKAI, 2002).

A maioria das aplicações requer que as partículas sejam dispersas formando coloides, também chamados de fluidos magnéticos (FMs), ou ferrofluidos. Sob a ação de um campo magnético, o sistema age macroscopicamente como uma única fase líquida (SOLER et. al, 2011). Os fluidos magnéticos que têm sido mais utilizados se baseiam nas NPs dos óxidos de ferro magnetita ou maghemita, originando soluções coloidais estáveis e não tóxicas. A estabilidade é uma característica importante do FM. Para prevenir a aglomeração das partículas e estabilizar o coloide magnético em um dado dispersante, deve-se introduzir uma interação repulsiva adicional entre as partículas. No caso dos FMs para aplicações biomédicas, utilizam-se moléculas orgânicas que são fisio e/ou quimiosorvidas na superfície da partícula, e apresentam grupos ionizáveis que ficam em contato com o

dispersante. A estabilidade coloidal deve ser obtida em pH e salinidade fisiológicos, e, além disso, as moléculas orgânicas não devem ser tóxicas. Um aspecto interessante dos FMs é que estes podem ser empregados como fonte de partículas para fabricação de arranjos em duas ou três dimensões, como por exemplo, na preparação de filmes.

No caso dos nanofilmes ou nanocompósitos, a nanopartícula introduz uma componente magnética que pode ser explorada de diversas maneiras, desde um sítio para ancoramento de espécies de interesse, como fármacos, anticorpos, entre outros, até como um elemento de controle das propriedades da matriz (condutividade, permeabilidade, entre outros) sob efeito de um campo magnético externo (PATERNO; SOLER, 2013).

Entre as técnicas utilizadas para produzir nanoestruturas que empregam a abordagem “bottom-up”, a de automontagem camada por camada, ou LbL, (do inglês *layer-by-layer*) é muito atrativa para o controle do arranjo de nano objetos em duas (2D) ou três dimensões (3D) (DECHER, 1997; SOLER et al., 2012a). Além disso, esses arranjos de NPs apresentam propriedades coletivas que diferem significativamente daquelas observadas pelos nano objetos na forma isolada ou nos materiais correspondentes na forma *bulk*, ou seja, em dimensões macroscópicas (SOLER et al., 2012a). Para a otimização das nanoestruturas, é necessário que as NPs não estejam agregadas e apresentem baixa distribuição de tamanho, de forma que possam ser consideradas como blocos individuais (SOLER et al., 2011a).

A técnica de automontagem camada por camada, proposta por Decher G. Fuzzy tem sido empregada para depositar multicamadas de polieletrólitos com base na atração eletrostática entre os materiais depositados. Ainda, tem sido também utilizada para produção de nanocompósitos de formato esférico ou planar. No caso

dos nanocompósitos planares, obtém-se filmes ultrafinos, com controle de espessura, da morfologia e da natureza dos materiais depositados (PATERNO; SOLER, 2013). Esta técnica tem vantagens como pode ser empregada para depositar multicamadas em diferentes formas e dimensões de substratos; não necessita de infraestrutura experimental sofisticada, sendo um método de baixo custo e com grande potencial tecnológico. O solvente comumente utilizado é a água, o que o torna ainda mais atrativo para produzir arranjos com materiais biológicos (Su et al., 2009). Em adição, cargas podem ser introduzidas nas macromoléculas variando-se o pH das soluções, sem que sua atividade biológica seja prejudicada (PATERNO et al., 2001). A técnica de LbL permite realizar estudos a nível molecular sobre o mecanismo de adsorção dos componentes e da estabilidade de filmes ultrafinos. A técnica, entretanto, possui limitações em relação ao grau de organização das cadeias poliméricas ou das nanopartículas, além da obtenção de monocamadas muito espessas, limitação esta que pode ser evitada empregando-se equipamentos para deposição automática (PATERNO et al., 2001).

Os nanofilmes com componentes biológicos apresentam um enorme potencial de aplicação em biossensores e em biotecnologia. No caso dos FMs, quando utilizados como fonte de partículas para aplicações biomédicas, é necessário avaliar a toxicidade dos surfactantes, sendo que as nanopartículas devem ser dispersas em meios biológicos compatíveis, como solução aquosa com pH em torno de 7, ou soluções salinas, incluindo tampões, como o tampão fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*, em inglês). É importante ressaltar que a estabilidade do coloide final deve ser obtida em pH e salinidade fisiológicos.

Entre os polieletrólitos biocompatíveis muito utilizados, pode-se citar a quitosana, que se comporta como um polieletrólito catiônico moderadamente básico (pH = 6,3) formando sais com ácidos. Isto é uma vantagem, pois, para exibir propriedades de troca iônica, precisa ser convertida quimicamente em derivados contendo grupos químicos apropriados. A quitosana tem atraído atenção porque pode ser utilizada como uma matriz para a liberação controlada de fármacos devido à sua decomposição por enzimas e por apresentar produtos de degradação não tóxicos. Em adição, o Álcool polivinílico (PVA), que é um polímero sintético, biodegradável, não tóxico, solúvel em água, também pode ser depositado na forma de filmes (ZEPON et al., 2013).

A técnica de automontagem camada por camada tem sido utilizada com sucesso para deposição de filmes com partículas de óxidos de ferro e polieletrólitos, contemplando o estudo do processo de adsorção, propriedades magnéticas e aplicações em sensores químicos e para armazenamento de energia (PATERNO et al., 2009a; PATERNO et al., 2009b; PATERNO et al., 2010; ALCANTARA et al., 2011a; ALCANTARA et al., 2011b; SOLER et al., 2011b; ALCANTARA et al., 2013a; b; NEUMANN et al., 2013; PATERNO; SOLER, 2013).

Esta dissertação apresenta as propriedades dos materiais utilizados no capítulo 2, enquanto que as técnicas de caracterização e os procedimentos experimentais estão relatados no capítulo 3. Os resultados e as conclusões estão descritos nos capítulos 4 e 5, respectivamente.

## 1.1 Motivação

A possibilidade da fabricação de multicamadas de polieletrólitos biocompatíveis reabsorvíveis levou a várias aplicações na área biomédica. Este interesse é motivado pelas propriedades não usuais apresentadas pelos óxidos de ferro de baixa dimensionalidade, tais como o comportamento superparamagnéticos (BATLLE; LABARTA, 2002; SOLER et al., 2011a) e por não serem tóxicos para aplicações biológicas. Além disso, multicamadas que se desmontam em meio aquoso têm sido exploradas como um meio com grande potencial para transporte e liberação de fármacos. A técnica de automontagem LbL apresenta características vantajosas nesse contexto, como a obtenção de filmes com uma arquitetura de baixa dimensionalidade em substratos adequados, e a possibilidade de armazenamento no filme e posterior liberação de fármacos (SU et al., 2009).

## 1.2 Justificativa

Os materiais nanoparticulados têm sido objeto de estudo nas últimas décadas, principalmente os fluidos magnéticos que, entre outras aplicações, se mostram promissores para a preparação de nanocompósitos não tóxicos com aplicações biológicas potenciais. Por exemplo, uma estratégia para o desenvolvimento de novos nanomateriais multifuncionais pode combinar polímeros e nanopartículas magnéticas, formando nanocompósitos híbridos (SOLER et al., 2012). O polímero oferece uma matriz para a dispersão das nanopartículas, as quais podem ser empregadas como plataformas para ancoramento de moléculas biológicas, marcadores ou fármacos. Os nanocompósitos híbridos podem ainda ser

processados na forma de filmes, por meio da técnica de automontagem camada por camada, a ser empregada neste trabalho.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo geral**

Fabricação, caracterização e avaliação da toxicidade de novos nanofilmes formados por biopolímeros e nanopartículas de óxidos de ferro.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

Para alcançar o objetivo mencionado várias abordagens técnicas e científicas serão desenvolvidas, tais como:

- Síntese e caracterização das propriedades físicas de nanopartículas de óxidos de ferro funcionalizadas com citrato;
- Produção de nanofilmes formados por nanopartículas de óxidos de ferro funcionalizadas com citrato e biopolímeros, tais como quitosana e álcool polivinílico, por meio da técnica de automontagem camada por camada;
- Monitoramento da formação dos filmes;
- Caracterização estrutural e morfológica dos nanofilmes;
- Avaliação da toxicidade *in vitro* dos nanofilmes produzidos.

## 2 MATERIAIS

As multicamadas compostas por partículas magnéticas dispersas na matriz polimérica apresentam as propriedades magnéticas relativas à componente inorgânica em adição às do polímero, o qual além de servir como suporte, também pode responder a estímulos elétricos ou de variação de temperatura, entre outros. Em adição, as propriedades das multicamadas dependem também da interação entre as partículas magnéticas e dos mecanismos que ocorrem na interface partícula/polímero (SOLER et al., 2012; ALCANTARA et al., 2013a). Neste contexto, inicialmente, a técnica de automontagem será apresentada. Em seguida serão introduzidas as propriedades dos polímeros e dos óxidos de ferro nanoparticulados utilizados na preparação das multicamadas, assim como da celulose bacteriana, empregada como substrato.

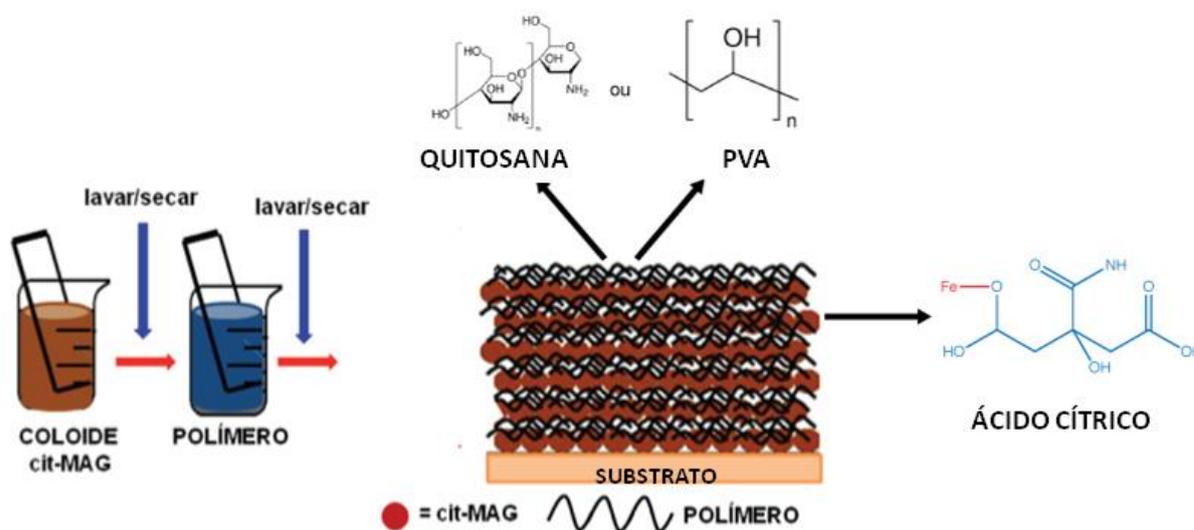
### 2.1 Método de automontagem

A técnica de automontagem camada por camada consiste na adsorção alternada de polieletrólitos e nano objetos, como nanopartículas, a partir de suas soluções ou suspensões. O método de automontagem empregado para a produção de multicamadas é de baixo custo, pode ser depositado em substratos de qualquer tipo, tamanho e formato, podendo ainda ser automatizado. Em uma primeira etapa, cada componente é obtido separadamente em suas melhores condições. Os filmes automontados por LbL podem ser obtidos por adsorção química ou física. Na adsorção química, as camadas são adsorvidas sobre o substrato por meio do estabelecimento de ligações químicas primárias, formando camadas

monomoleculares. Quando a adsorção ocorre via reação química, o material depositado deve ter afinidade pelo substrato e manter funcionalidade disponível para adsorção de uma camada subsequente, assim a continuidade da deposição depende de reações químicas, que podem diminuir devido à presença de impurezas, e por fatores de geometria molecular, como impedimentos estéricos. Tais fatores ocasionam uma constante diminuição de material adsorvido a cada camada depositada, o que resulta na interrupção do processo de fabricação do filme. Na adsorção física, os componentes são adsorvidos por meio de interações físicas, como por exemplo, por atração eletrostática. A energia envolvida nestes tipos de interações é menor do que para os casos em que ocorrem ligações químicas. Contudo, mesmo no caso de interações físicas, devido à grande quantidade de ligações que podem ser estabelecidas entre as cadeias dos polímeros e o substrato e/ou outros componentes, as camadas aderem muito e são estáveis (DURAN et al., 2006).

Neste trabalho, a produção dos nanofilmes foi realizada via interação eletrostática (ou ligação de hidrogênio) entre NPs de maghemita e polieletrólitos. Os materiais são depositados alternadamente à temperatura ambiente por meio de imersão do substrato funcionalizado na dispersão/solução correspondente, passando por um processo de lavagem e secagem (SOLER et al., 2012a; SOLER et al., 2012b). Repetindo-se os passos mencionados, obtêm-se os compósitos nanoestruturados com a espessura desejada. Neste trabalho, as nanopartículas utilizadas foram NPs magnéticas de óxidos de ferro cobertas com citrato (CIT-MAG) e os polímeros foram a quitosana ou o PVA, conforme ilustrado na Figura 2.1. A técnica de LbL permite o controle preciso da natureza das NPs, da densidade das

mesmas em cada camada, da distância NP-NP entre camadas adjacentes e da natureza e estrutura da matriz polimérica empregada.



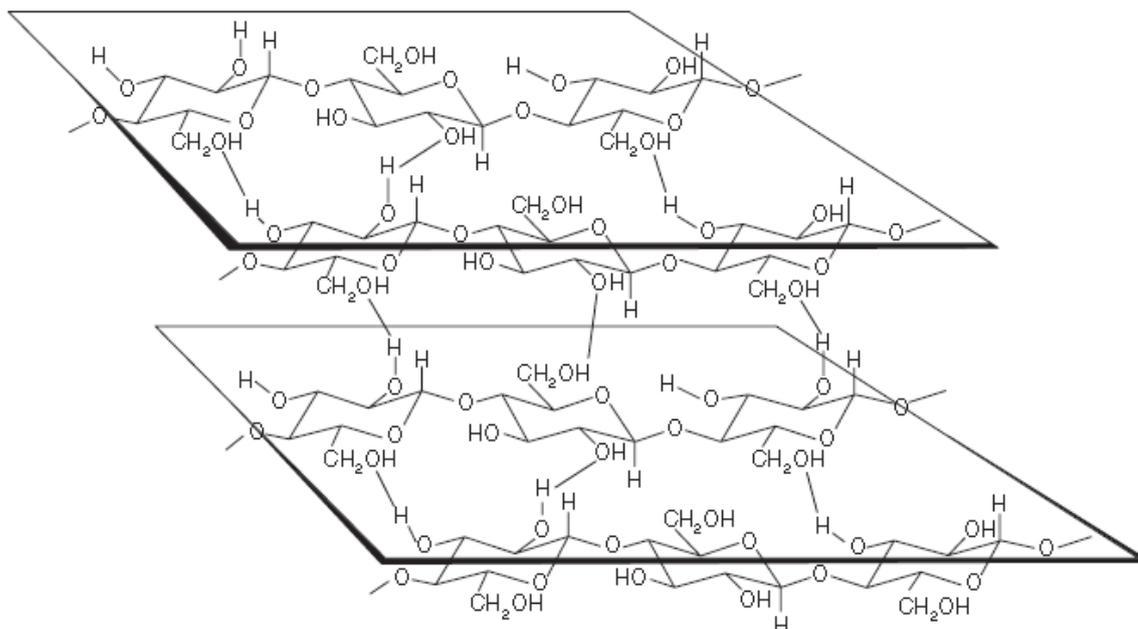
**Figura 2.1** – Ilustração das etapas de deposição por meio da técnica de automontagem LbL e da estrutura do nanofilme obtido.

Fonte: Das autoras.

Com o objetivo de obter multicamadas em substratos flexíveis, foi empregado um substrato obtido de celulose, o biopolímero mais abundante na Terra. Além das plantas, há ainda outras fontes como a animal, a bacteriana, a química e a enzimática. Dentre os gêneros de bactérias produtoras de celulose, encontram-se o *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium* e *Alcaligenes*, entretanto, a bactéria que apresenta melhor eficiência para produzir celulose, e por essa razão é a mais estudada, é a *Glucanacetobacter xylinus*, conhecida também como *Acetobacter xylinum*. Estas são as bactérias gram-negativas, estritamente aeróbicas e não fotossintéticas, capazes de converter a glicose, glicerol e outros substratos orgânicos em celulose dentro de um período de poucos dias (GANDINI. A., 2010; ROSS et al., 1991).

A biossíntese da celulose bacteriana (CB) por meio da *G. xylinus* é similar à produzida em plantas, com relação à fórmula molecular e estrutura polimérica, porém, apresenta maior cristalinidade. Comparando-se com a celulose à base de planta, a CB é quimicamente pura e livre de lignina e hemicelulose. A celulose bacteriana, com suas propriedades específicas, torna-se importante para aplicações em diversas áreas, podendo ser utilizada como componentes nutricionais (aditivo de baixo teor calórico, estabilizador, textura modificada, nata de coco), na farmacologia (curativo temporário, excipiente, cosméticos, transportadores de fármacos) e também em fábricas de papel e telecomunicação (GANDINI; BELGACEM, 2008).

A produção de celulose bacteriana por *G. xylinus* pode ser realizada em laboratório utilizando cultivos tanto em meios sólidos como líquidos (DONINI et al., 2010). As cadeias de celulose, formadas por unidades de glicose ligadas por meio de ligações 1,4-glicosídica, interagem por meio de ligações de hidrogênio, resultando em uma orientação paralela entre elas. A estrutura e a rigidez da CB dependem das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, conforme se observa na Figura 2.2.



**Figura 2.2** – Esquema da estrutura inter e intramolecular das ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose.

Fonte: Pecoraro et al. (2007).

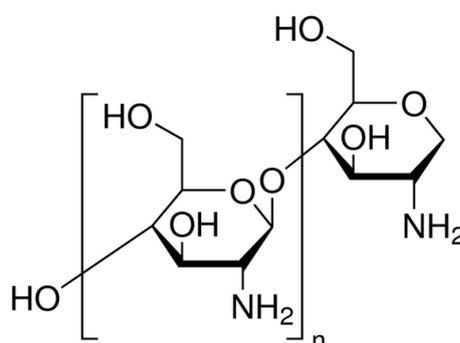
## 2.2 Matriz polimérica

Os polímeros são muito empregados, pois são relativamente baratos, fáceis de processar, podem ser naturais ou sintéticos, e são encontrados com variadas estruturas, podendo, por exemplo, ser condutores ou isolantes, responder a estímulos de variação de temperatura, entre outros. Em adição, alguns polieletrólitos podem apresentar diferentes estados de condução por meio da variação do pH da solução, como por exemplo, a polianilina. Neste capítulo, serão discutidos alguns biopolímeros, entre eles a quitosana (QUI) e o álcool polivinílico, (PVA, do inglês *polyvinyl alcohol*) que serão utilizados no trabalho.

A quitosana é obtida a partir da principal reação de derivatização da quitina, que consiste na hidrólise dos grupos acetamido, gerando os grupos amino (DELEZUK, 2013). A quitina é o componente orgânico mais abundante de muitas classes de invertebrados, como por exemplo, os moluscos. As principais fontes de

obtenção de quitina são as carapaças e os exoesqueletos de invertebrados e crustáceos, sendo obtida de resíduos da indústria pesqueira (BEZERRA et al., 2013)

A quitosana é um polímero biocompatível e tem como característica a versatilidade para modificações químicas, devido à presença de grupos amino que propiciam inúmeras modificações químicas da superfície do polímero facilitando suas várias aplicações (LAUS et al., 2006). A estrutura química da quitosana está ilustrada na Figura 2.3.



**Figura 2.3** – Fórmula estrutural, onde n indica o grau de polimerização.

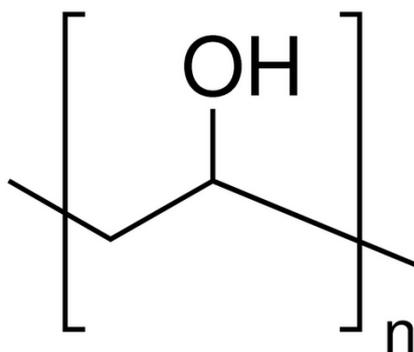
Fonte: adquirido do site Sigma Aldrich, Brasil e Adaptado.

A quitosana (QUI) comporta-se como um polieletrólito catiônico moderadamente básico (pH = 6,3) formando sais com ácidos. Ela caracteriza-se por possuir grupos amínicos livres, pela solubilidade em soluções ácidas (em pH inferior a 6,5), insolubilidade em ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), baixa solubilidade em ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), insolubilidade em solventes orgânicos e grupos amínicos protonado ( $-NH_3^+$ ), capacidade de formar soluções viscosas na forma de géis com poliânions e de se solubilizar em misturas de água e álcool. Apresenta ainda propriedades antimicrobianas e estimulantes do sistema imunológico, as quais são manifestadas na aceleração de cicatrização de feridas. Outras propriedades apresentadas pela QUI incluem a inibição de células tumorais, efeito antifúngico, atividade antiácida e antiúlcera, ação hemostática e hipocolesterolêmica (DAMIAN et

al., 2005). Devido às suas propriedades, as suas aplicações não se restringem à pesquisa básica, tendo grande importância industrial desde a fabricação de cosméticos, alimentos e embalagens, até a complexação de metais e corantes, entre outros. Em particular, as aplicações biológicas que mais se destacam são a liberação controlada de fármacos, engenharia de tecidos, agentes de redução e adsorção de gordura e colesterol, agentes bactericidas e cobertura de partículas ou micelas (PAVINATO, 2010).

Neste trabalho, a QUI foi empregada como policação para a produção dos nanofilmes, em conjunto com nanopartículas de óxidos de ferro, funcionalizadas com citrato e que possuem cargas negativas, resultando em um processo de adsorção físico, no qual as camadas são mantidas unidas devido à atração eletrostática.

O PVA é um polímero sintético, biodegradável, não tóxico, solúvel em água, não comestível, e adequado para a formação de filmes (ZEPON et al., 2013). As propriedades básicas do PVA dependem do grau de polimerização e do grau de hidrólise. O PVA tem sido utilizado como carreador de medicamentos devido às suas propriedades de degradabilidade e não toxidez. É um dos poucos polímeros semicristalinos solúveis em água com boas características interfaciais e mecânicas (ZEPON et al., 2013). Quando empregado como cobertura de NPs, previne a aglomeração das mesmas, ajudando na sua dispersão. A estrutura química do PVA está ilustrada na Figura 2.4. Nesta dissertação o PVA foi empregado para a fabricação de nanofilmes com nanopartículas de óxidos de ferro, cobertas com citrato, por meio da técnica de LbL.



**Figura 2.4** – Fórmula estrutural do ácido polivinílico (PVA).

Fonte: adquirido do site Sigma Aldrich, Brasil e Adaptado.

### 2.3 Óxidos de Ferro

Num sistema coloidal formado por nanopartículas magnéticas sob a ação de um campo magnético, o sistema, composto pelo líquido carreador e as partículas, se arrasta como um todo, sem separação de fase. Uma das propriedades mais importantes é a estabilidade do FM, e, no caso das aplicações biológicas, as nanopartículas devem ser adequadamente funcionalizadas para serem dispersas em meios biologicamente compatíveis, possuindo pH em torno de 7, tais como soluções salinas e tampões, por exemplo, o tampão fosfato salino (PBS).

Os FMs apresentam estabilidade coloidal, onde as NPs dispersas tendem a se agregar por causa do mecanismo de redução de energia livre devido à grande área superficial. Como este processo é lento, os FMs podem ter um período longo de estabilidade, mas a tendência é perdê-la. Existem dois processos de agregação das partículas nos FMs, a floculação e a coagulação. Na floculação, ocorre a formação de flocos de pouca densidade que podem ser desfeitos com a diluição ou adição de eletrólitos. Na coagulação, ocorre a formação de coágulos devido à agregação de partículas, sendo mais coeso e denso que o floco (RUSSEL et al., 1995). A estabilidade coloidal do sistema depende das características das NPs,

como o tamanho, carga superficial e cobertura, entre outras. Se as partículas não forem dispersas, pode ocorrer a separação das fases líquida e sólida do FM.

Os fatores importantes a serem levados em conta na preparação de SPIOs, são a estabilidade estrutural e a composição química do caroço magnético, bem como as propriedades físico-químicas da camada molecular adsorvida na superfície da NP. Esta última propriedade é muito importante seja na funcionalização para ligar anticorpos ou outras moléculas à NP, seja na produção de nanocompósitos. Para obter a estabilidade de um FM, é necessário levar em conta as várias forças que agem nas partículas, a interação entre as mesmas e as moléculas do dispersante. Para prevenir a aglomeração das NPs e estabilizar o coloide em um dado dispersante, deve-se introduzir uma interação repulsiva adicional entre as partículas. No caso dos fluidos magnéticos para aplicações biomédicas, utilizam-se moléculas orgânicas que são (físio) quimiosorvidas na superfície da partícula, e apresentam grupos ionizáveis que ficam em contato com o dispersante. A estabilidade coloidal deve ser obtida em pH fisiológicos e, além disso, os FMs não devem ser tóxicos. Em geral, na síntese das suspensões coloidais, utiliza-se nanopartículas magnéticas, que são funcionalizadas com moléculas específicas para determinada aplicação, as quais podem desempenhar papéis fundamentais nas propriedades desses fluidos, como: i) conferir às partículas um mecanismo para promover a estabilidade coloidal; ii) servir como agente de acoplamento para a imobilização de fármacos ou biomoléculas passíveis de reconhecimento por receptores específicos e iii) introduzir a carga superficial, e, conseqüentemente, a configuração adequada para preparar os nanofilmes por LbL.

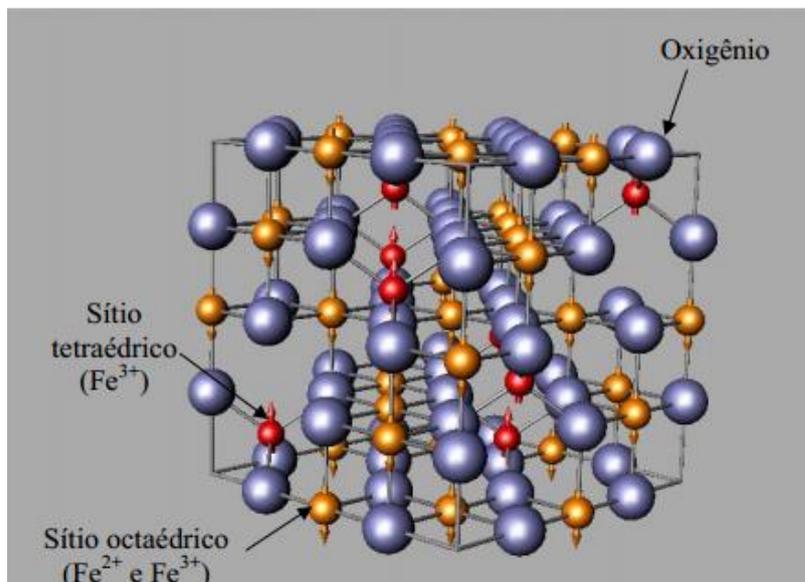
Nesta dissertação, o fluido magnético empregado como fonte de nanopartículas de óxido de ferro é composto de partículas SPIO funcionalizadas com ácido cítrico apresentando, portanto, cargas negativas.

### 2.3.1 Estrutura cristalina

Os materiais sólidos cristalinos possuem os átomos relativamente próximos com ordem espacial de longo alcance, formando um arranjo ordenado tridimensional, chamado de retículo cristalino.

Os óxidos de ferro cúbicos, também chamados de ferritas, são materiais ferrimagnéticos que exibem magnetização espontânea à temperatura ambiente. Elas apresentam os fenômenos de magnetização de saturação, de histerese e sua magnetização espontânea desaparece acima da temperatura de Curie ( $T_c$ ), tornando-se um material paramagnético (CHARAP, 1969).

As ferritas podem ser representadas pela fórmula geral  $(M^{2+})[Fe_2^{3+}]O_4^{2-}$ , originando os óxidos mistos, onde  $M^{2+}$  é um cátion divalente de um elemento metálico (Co, Ni, Mn, Cu, Zn e Cd), ou os óxidos puros, quando  $M=Fe$ , como no caso da magnetita ( $Fe_3O_4$ ) e da maghemita ( $\gamma$ - $Fe_2O_3$ ). Estes materiais apresentam estrutura do tipo espinélio, formada por uma rede cúbica unitária de face centrada (fcc) de ânions de oxigênio, com sítios preenchidos por cátions metálicos. Essa estrutura espinélio pertence ao grupo espacial  $O_h^7(Fd3m)$ .



**Figura 2.5** – Representação da estrutura cristalina de magnetita.

Fonte: Magalhães (2008).

Existem duas formas de sítios, que diferem na coordenação entre os átomos de ferro (ou outro metal) e de oxigênio: a tetraédrica e a octaédrica, conforme se observa ilustração apresentada na Figura 2.5. A estrutura espinélio é chamada de inversa quando a metade dos cátions de  $\text{Fe}^{3+}$  encontra-se nos sítios tetraédricos e o restante juntamente com os íons  $\text{M}^{2+}$  nos sítios octaédricos, enquanto que, no caso do espinélio normal, todos os íons  $\text{M}^{2+}$  se encontram nos sítios tetraédricos e todos os  $\text{Fe}^{3+}$  nos sítios octaédricos.

As propriedades magnéticas dos óxidos de ferro dependem da estrutura cristalina. No caso dos nanomateriais sintetizados por métodos químicos, a maioria apresenta distribuição de cátions imperfeita, constituindo as ferritas mistas (Co, Cu, Ni, Mn e Zn). Em consequência, as propriedades magnéticas dos óxidos de ferro nanoparticulados dependem da rota de síntese empregada.

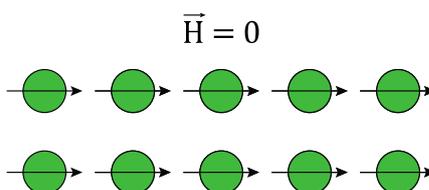
### 2.3.2 Introdução às propriedades magnéticas dos óxidos de ferro

O magnetismo é uma propriedade de origem elétrica, pois os elétrons e núcleos nos sólidos produzem campos magnéticos, uma vez que são cargas em movimento com momentos magnéticos de dipolo intrínsecos. O momento magnético dos átomos tem origem no momento angular orbital e no spin do elétron, bem como na interação entre eles (JILES, 2001).

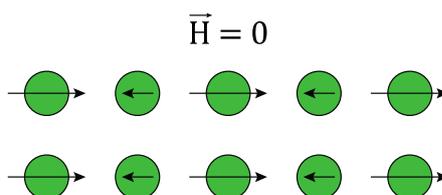
A maioria dos materiais apresenta comportamento magnético apenas quando submetidos a um campo magnético externo, é o caso dos materiais diamagnéticos e paramagnéticos. Nos materiais diamagnéticos, quando um campo magnético externo é aplicado, os momentos magnéticos formados têm direção oposta à do campo. No caso dos materiais paramagnéticos, os dipolos magnéticos estão orientados aleatoriamente, e, quando um campo magnético externo é aplicado, eles se alinham na direção do mesmo.

Na ausência de um campo magnético, os materiais ferromagnéticos podem apresentar magnetização espontânea para temperaturas abaixo da temperatura de Curie devido ao ordenamento dos seus momentos magnéticos (Figura 2.6), mas acima desta temperatura, a energia térmica alta causa desordem nos momentos magnéticos. Sob a aplicação de um campo magnético externo, os momentos magnéticos se ordenam na direção do mesmo (GUIMARÃES, 2009b). Na natureza, encontra-se um pequeno grupo de materiais ferromagnéticos, como o ferro, níquel, cobalto e as suas ligas.

Os materiais ferrimagnéticos apresentam comportamento similar ao dos ferromagnéticos, mas possuem os momentos magnéticos antiparalelos com módulos diferentes, como ilustrado na Figura 2.7, resultando em uma magnetização menor do que nos materiais ferromagnéticos. Como exemplo de materiais ferrimagnéticos, tem-se os óxidos de ferro ou ferritas, tais como a magnetita, maguemita e a ferrita de cobalto.



**Figura 2.6** – Ilustração da orientação dos momentos magnéticos nos materiais ferromagnéticos.

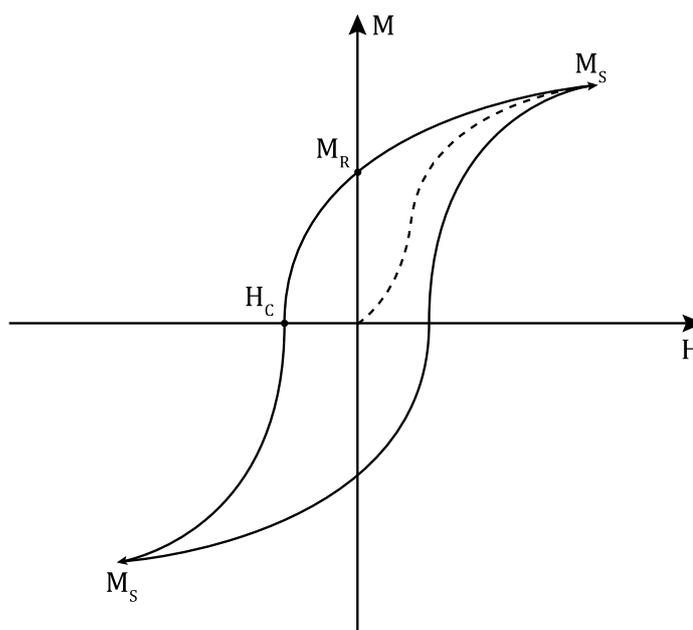


**Figura 2.7** – Ilustração da orientação momentos magnéticos nos materiais ferrimagnéticos.

A curva da variação da magnetização em função do campo magnético externo aplicado é chamada de curva de histerese, no caso de um material ferromagnético tem a forma típica ilustrada na Figura 2.8. Observa-se que, para os materiais ferromagnéticos, partindo-se de um material desmagnetizado ( $M = 0$ ), quando se aplica um campo magnético externo ( $H$ ), com o aumento do campo, a indução magnética aumenta até atingir a magnetização de saturação ( $M = M_S$ ), onde todos os momentos magnéticos estão orientados no mesmo sentido, portanto a magnetização de saturação é a magnetização máxima obtida pelo material. Quando o campo magnético é retirado ( $M=0$ ), permanece uma magnetização, chamada de remanente ( $M_R$ ). Para a magnetização tornar-se nula novamente, é necessário

aplicar-se um campo no sentido inverso, designado campo coercivo ( $H_C$ ). Caso o campo continue aumentando, no sentido inverso, o comportamento se repete até o material atingir a magnetização de saturação ( $M_S$ ).

A classificação de um material magneticamente duro ou macio depende da coercividade ( $H_C$ ), sendo que um material de alta coercividade é denominado duro, também chamados de ímãs permanentes, enquanto que os materiais de baixa coercividade são denominados de macios.



**Figura 2.8** – Ilustração da curva de histerese para os materiais ferromagnéticos.

### 2.3.3 Superparamagnetismo

O comportamento superparamagnético é característico de materiais de baixa dimensionalidade, ou seja, não se dá nos mesmos materiais em forma *bulk*, ou seja, nos materiais na forma macroscópica. No caso dos óxidos de ferro o superparamagnetismo ocorre para partículas menores do que um tamanho crítico, que, no caso dos óxidos de ferro mais comuns, é em torno de 20 nm (SOLER et al., 2011a). O termo superparamagnetismo foi atribuído devido ao fato destes sistemas apresentarem propriedades análogas às dos paramagnetos, no sentido em que perdem a magnetização quando o campo magnético externo é removido, porém os materiais superparamagnéticos apresentam um momento magnético efetivo muito maior. As nanopartículas menores do que o diâmetro crítico comportam-se como monodomínios magnéticos, as quais, quando atraídas pelo campo magnético aplicado, não se comportam como um ímã convencional, pois quando o campo é removido, sua magnetização é reduzida à zero, sem apresentar magnetização residual ou remanência. Esses materiais apresentam magnetização de saturação da ordem de  $10^2 - 10^4 \mu_B$  (Young e Freedman, 2008). A distribuição dos íons nos sítios tetraédrico e octaédrico é responsável pela magnetização e pelo comportamento magnético do material. A temperatura é um fator importante nas propriedades magnéticas dos materiais. Os materiais superparamagnéticos à temperatura ambiente não apresentam histerese, pois a flutuação dos momentos magnéticos é induzida pela energia térmica. Em geral, a função de Langvin de primeira ordem pode ser empregada para simular o comportamento de sistemas superparamagnéticos (YOUNG; FREEDMAN, 2008).

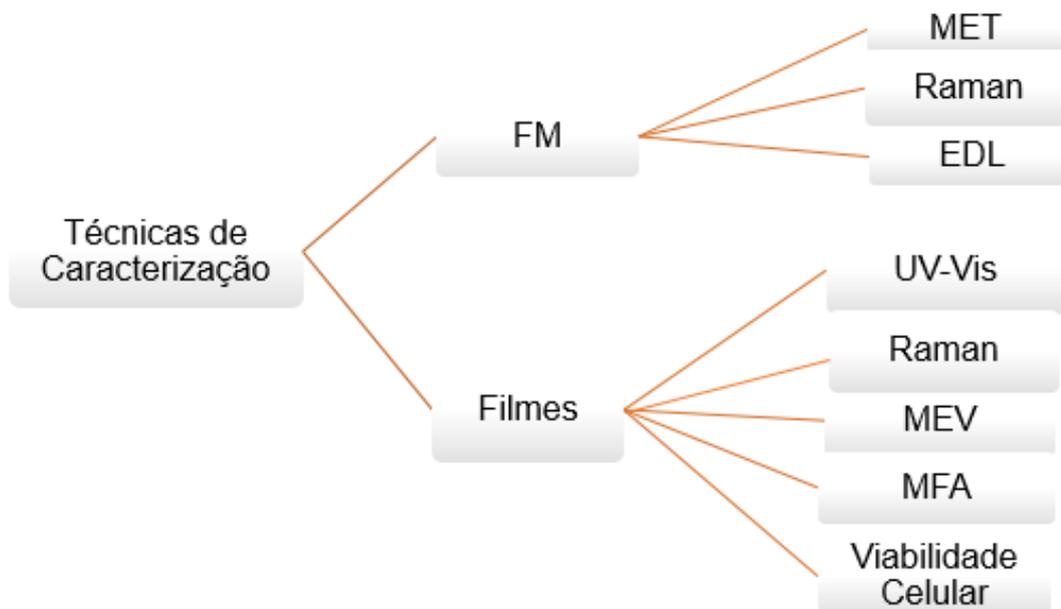
Os FMs são formados por NPs de óxidos de ferro e, quando sob a ação de um campo magnético, se arrasta como um todo. Em adição, as nanopartículas apresentam comportamento superparamagnético, de modo que respondem ao campo magnético aplicado, porém, uma vez que este é removido, não apresentam magnetização remanente, além de não serem tóxicas. Estas são as principais propriedades que as credenciam para as aplicações biomédicas.

### **3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

A utilização da técnica de automontagem para obter os nanofilmes com partículas magnéticas e polímeros requer que se inicie com os componentes preparados de forma otimizada. Portanto, é necessário conhecer as propriedades das nanopartículas de óxidos de ferro, além da própria caracterização das multicamadas depositadas. Neste capítulo, inicialmente serão introduzidas as técnicas utilizadas na caracterização do fluido magnético que será empregado como fonte de nanopartículas, bem como das multicamadas fabricadas. Em seguida, serão descritos os procedimentos experimentais realizados para a fabricação dos nanofilmes, bem como os testes de toxicidade realizados nos mesmos.

#### **3.1 Técnicas de caracterização empregadas**

A ilustração da Figura 3.1 apresenta as técnicas empregadas para caracterização do FM e dos nanofilmes preparados. A seguir serão introduzidas as técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), de Espalhamento de Luz Dinâmico (EDL), espectroscopia Raman, espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-Vis), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia de Força Atômica (MFA) e o teste de viabilidade celular, empregando-se o protocolo do brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil-tetrazólio (MTT). Os filmes produzidos foram caracterizados em cada etapa do processo de deposição.



**Figura 3.1** – Ilustração das técnicas utilizadas neste trabalho para caracterização do fluido magnético (FM) e dos filmes automontados.

Fonte: Das autoras.

O emprego da microscopia eletrônica de transmissão permite analisar a morfologia e determinar o tamanho das nanopartículas, bem como a distribuição de tamanho. Esta técnica é muito aplicada nas pesquisas de materiais, assim como no estudo do câncer e na área da virologia. Ela consiste em um feixe de elétrons que é emitido em direção à amostra ultra fina, o qual interage com a mesma enquanto a atravessa, formando uma imagem ampliada que é detectada (RUBY et al., 2003; MEI et al., 2012).

Para os FMs, as imagens de MET são obtidas a partir de amostras preparadas gotejando uma pequena quantidade em uma tela coberta por uma membrana de carbono, deixando-se secar. Uma vez introduzidas no microscópio, as imagens da amostra são gravadas, e, a partir dessas, obtém-se os diâmetros de um grande número de partículas (>200) para a construção de um histograma de distribuição de diâmetro. A partir do histograma faz-se um ajuste utilizando a

distribuição normal ou log-normal, de onde se obtém o diâmetro médio ( $D_{MET}$ ) das nanopartículas e o desvio padrão ( $\sigma$ ). Quanto menor for o valor de  $\sigma$ , menor será a polidispersão da amostra (SOLER et al., 2011a) Neste trabalho, as imagens de MET foram adquiridas no microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (JEOL, Tóquio, Japão) com filamento de tungstênio em 80 kV do Instituto de Biologia, Universidade de Brasília.

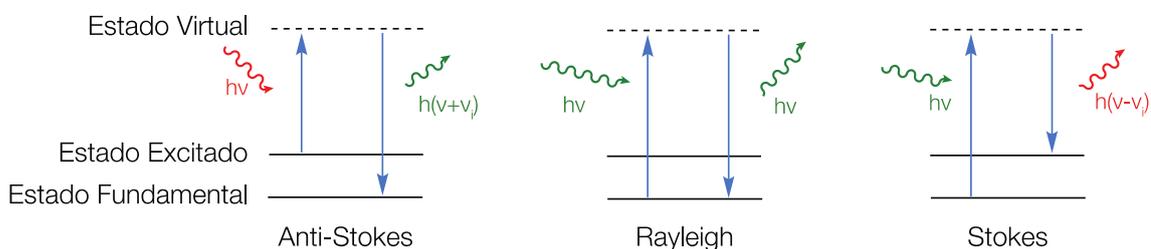
O espalhamento de luz dinâmico (DLS) consiste em uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de coloides. A técnica baseia-se no espalhamento dinâmico da luz em uma amostra em suspensão e fornece informações sobre o tamanho hidrodinâmico e sobre o índice de agregação das partículas. O raio hidrodinâmico pode ser definido como o raio efetivo, considerando-se a cobertura e interação com as moléculas do meio vizinho, em virtude da forte atração eletrostática que a carga superficial produz nas moléculas do meio aquoso. O aparelho relaciona o tamanho das partículas com a intensidade de luz espalhada, sendo possível assim determinar o diâmetro médio e a porcentagem de distribuição de tamanho. As análises por EDL foram obtidas no equipamento Zetasizer Nano Z90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido), com excitação em 632,8 nm, do Laboratório de Genética e Morfologia (Instituto de Biologia, Universidade de Brasília).

A medida da carga elétrica superficial obtida por meio do potencial  $\zeta$  é realizada no mesmo equipamento. Ele fornece informações sobre a mudança de carga superficial indicando a presença da cobertura na superfície da NP. O potencial  $\zeta$  refere-se à carga elétrica presente na superfície das nanopartículas em contato com o líquido. As cargas presentes na superfície da partícula interferem na distribuição de íons ao seu redor e aumentam a concentração de contra íons

próximos à superfície, levando à formação de uma dupla camada elétrica na interface da partícula e o meio aquoso. O potencial ( $\zeta$ ) se relaciona com a estabilidade do coloide, sendo que o seu valor absoluto deve ser maior ou igual a 30 mV para garantir a estabilidade coloidal.

A espectroscopia Raman é uma técnica de espalhamento muito importante para a caracterização de materiais, pois fornece informação sobre a composição química e estrutural de materiais inorgânicos, bem como de compostos orgânicos. No caso de nanomateriais, como os óxidos de ferro, esta técnica permite a identificação da fase do material (SOLER et al., 2007) na forma sólida, podendo ser em pó ou em filme (PATERNO et al., 2012; SOLER; FANYAO, 2012). Em adição, a técnica tem sido empregada com sucesso para obter informações sobre a cobertura das nanopartículas (MORAIS et al., 2000), bem como para o estudo da interação de fluidos magnéticos com sangue (SANTANA et al., 2005; SOLER et al., 2007a). A análise é baseada no espalhamento de uma luz monocromática com certa frequência incidente em um material, onde a maior parte da luz espalhada apresenta mesma frequência da incidente, e uma pequena porção da luz é espalhada inelasticamente devido à interação da luz com a matéria. A luz espalhada com a mesma energia do feixe incidente é chamada de espalhamento elástico e denominado espalhamento Rayleigh, enquanto que o sinal espalhado com energia diferente da incidente é chamada de espalhamento inelástico (Raman), o qual apresenta-se de duas maneiras diferentes: o espalhamento Stokes e o anti Stokes, conforme se observa na ilustração da Figura 3.2. Em 1928 esse fenômeno foi observado por Sir Chandrasekhara Venkata Raman, na Índia, e por isso foi chamado de efeito Raman (SALA, 1996; FERRARO et al., 2002).

De acordo com a teoria de grupos, os óxidos de ferro do tipo cúbico espinel, como a magnetita e maghemita, apresentam cinco modos Raman ativos, quando em temperatura ambiente, sendo 1 A<sub>1g</sub>, 1 E<sub>g</sub> e 3 T<sub>2g</sub> (WHITE; DEANGELIS, 1967). Para a análise do espectro Raman da magnetita, considera-se que somente os sítios de simetria tetraédrica contribuem para o espectro Raman (SHEBANOVA; LAZOR, 2003). Os modos vibracionais previstos para a magnetita e os modos vibracionais correspondentes, estão listados na Tabela 3.1. A identificação das bandas vibracionais obtidas nos espectros Raman desta dissertação será realizada considerando-se as referências (SHEBANOVA; LAZOR, 2003; SOLER; FANYAO, 2012). A maguemita apresenta modos vibracionais Raman mais frequentes em torno de 350, 500 e 700 cm<sup>-1</sup>, e a hematita em 229, 249, 295, 302, 414, 500 e 615 cm<sup>-1</sup> (SMITH E.; DENT. G., 2005).



**Figura 3.2** – Mecanismos de espalhamento de um fóton.

Neste trabalho, os espectros Raman foram adquiridos utilizando-se o espectrômetro triplo T64000 equipado com uma CCD, onde a excitação das amostras foi obtida com um laser de íon-argônio com comprimento de onda em 514,5 nm, e intensidade incidente sob a amostra de 0,25 mW.

**Tabela 3.1** – Modos vibracionais Raman obtidos de dados experimentais para a magnetita *bulk* (SHEBANOVA, 2003).

Modo	Origem	Posição
$A_{1g}$	Estiramento simétrico Fe-O	$\cong 668 \text{ cm}^{-1}$
$E_g$	Flexão simétrica O-Fe	$\cong 306 \text{ cm}^{-1}$
$T_{2g}^2$	Estiramento assimétrico Fe-O	$\cong 538 \text{ cm}^{-1}$
$T_{2g}^1$	Movimento translacional $\text{FeO}_4$	$\cong 193 \text{ cm}^{-1}$
$T_{2g}^3$	Flexão assimétrica O-Fe	$\cong 450 \sim 490 \text{ cm}^{-1}$

Fonte: Shebanova (2003).

A espectroscopia no ultravioleta e visível, UV-Vis, é uma técnica muito empregada no estudo de compostos orgânicos e inorgânicos, na identificação do princípio ativo de fármacos, entre outros. Em adição pode ser utilizada para monitorar o crescimento de filmes depositados em substratos de vidro óptico. A espectroscopia UV-Vis consiste na absorção (ou transmitância) de um feixe de luz, com variação da frequência ( $\nu$ ) entre a região do visível e do ultravioleta, podendo chegar até a região do infravermelho próximo. Para que ocorra a absorção de um fóton, a energia  $E$  do fóton incidente deve ser igual à diferença de energia entre dois níveis de energia de transição eletrônica. Uma vez que na região ultravioleta e visível do espectro eletromagnético os fótons promovem transições eletrônicas na matéria, a técnica permite também determinar a energia dessas transições através da frequência da radiação absorvida.

A concentração  $C$  de uma espécie absorvedora será proporcional à absorvância, cuja relação é dada lei de Lambert-Beer (STUART, 2004):

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon lc \quad (1)$$

Onde  $I_0$  é a intensidade do feixe que incide na amostra,  $I$  a distância que a luz atravessa,  $\epsilon$  é a absorvidade molar, que depende do comprimento de onda do feixe incidente e  $c$  é a concentração da substância absorvente.

A técnica de espectroscopia UV-Vis foi empregada para monitorar o crescimento dos filmes, pois os óxidos de ferro possuem bandas de absorvância características no intervalo entre 400 e 480 nm. As medidas de UV-Vis foram realizadas empregando-se o equipamento UV-2600 (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) do Núcleo de Física Aplicada da Universidade de Brasília.

A Microscopia Eletrônica de Varredura é uma técnica versátil e usada rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. A amostra a ser analisada é irradiada por um feixe de elétrons, propiciando uma grande vantagem em relação ao microscópio óptico que é a alta resolução. Basicamente o microscópio eletrônico de varredura é composto por uma coluna, unidade de varredura, câmera de amostra, sistema de detecção, sistema de visualização e armazenamento da imagem.

Caso a amostra não seja condutora, como no caso dos nanofilmes estudados neste trabalho, é preciso depositar uma cobertura ultrafina de material eletricamente condutor. Os tipos de coberturas mais utilizadas são o ouro, ouro/paládio, platina, tungstênio, grafite, cobre, entre outros. No caso dos nanofilmes produzidos, uma fina

camada de ouro foi depositado pela técnica de metalização. O equipamento empregado foi o Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL modelo JSM 7001 F, do Laboratório de Biologia Celular- CEL (Instituto de Biologia, Universidade de Brasília).

A microscopia de força atômica é muito empregada para o estudo da morfologia de superfície em filmes compostos por mono ou multicamadas, pois as imagens podem ser adquiridas em diversas condições, tais como em atmosfera natural, no vácuo ou em meio líquido, tornando-se assim um dos equipamentos mais completos para estudar materiais em micro e nano escala.

As imagens de MFA foram obtidas no modo *tapping*, que é adequado para o estudo da morfologia da superfície dos nanofilmes automontados, pois fornece também informações sobre as propriedades mecânicas da amostra estudada. Para o modo *tapping*, o cantilever, que é a ponta da agulha do MFA, se liga a um braço flexível e oscilante, onde a amplitude e ângulo de fase são obtidos. As variações do ângulo de fase resultam de diferenças na interação da ponta da agulha com a superfície da amostra que apresenta regiões macias e duras. Em consequência, pode-se obter além das características topográficas informações sobre as propriedades mecânicas da amostra (ALCANTARA et al., 2013a).

O microscópio de força atômica faz a varredura da superfície da amostra por meio de uma sonda de dimensão muito reduzida mantida a uma distância da ordem de angstroms da superfície em análise. O equipamento fornece informações com uma alta resolução espacial, lateral e vertical da amostra. A sonda é formada por um cantilever, que é uma haste flexível, em cuja parte inferior existe uma ponta piramidal de alguns micra de comprimento. Esta sonda varre a superfície da amostra por meio de um sistema de posicionamento, capaz de realizar movimentos nas três direções (x,y,z). O equipamento utilizado para as análises de MFA foi o modelo

Digital MultiMode Nanoscope IIIa, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo – *Campus* São Carlos, São Carlos, São Paulo.

### **3.2 Procedimentos experimentais**

Os procedimentos experimentais empregados para a deposição dos nanofilmes por automontagem, bem como para a preparação do fluido magnético e das soluções poliméricas serão descritos a seguir.

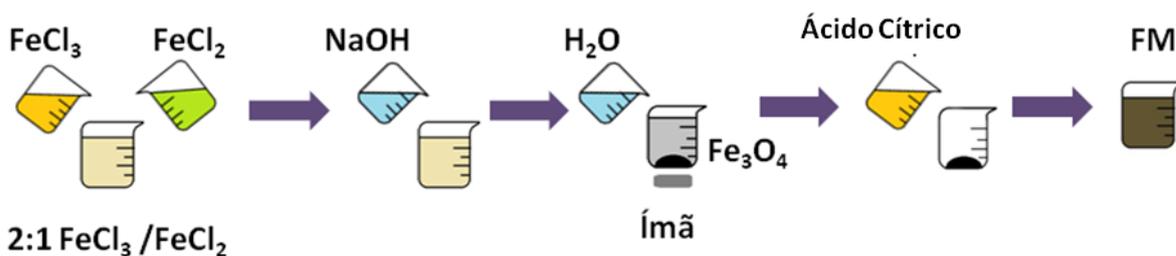
#### **3.2.1 Materiais**

Os reagentes utilizados incluem o cloreto de ferro (II) tetrahidratado (cloreto ferroso), cloreto de ferro (III) hexahidratado (cloreto férrico), hidróxido de sódio, ácido perclórico, ácido sulfúrico, peróxido de hidrogênio, hidróxido de amônio, e os polímeros quitosana e álcool polivinílico. Todos os reagentes são de grau analítico (P.A), foram adquiridos da Sigma Aldrich, Brasil, e utilizados como foram fornecidos. Em todos os experimentos foi utilizada água deionizada, provida pelo sistema Milli Q (resistividade de  $18 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$ ). As membranas de celulose, empregadas na etapa de diálise, foram adquiridas da InLab (São Paulo, Brasil). Os substratos de CB empregados foram produzidos a partir da bactéria *G. xylinus* e cedidos pelo Professor Edison Pecoraro, do Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP.

### 3.2.2 Síntese do Fluido Magnético

O FM foi obtido em três etapas: inicialmente o sólido nanoparticulado de óxido de ferro foi sintetizado por meio da técnica de coprecipitação dos íons de ferro em meio alcalino; em seguida, foi realizada a funcionalização das nanopartículas e sua suspensão em meio aquoso, formando uma dispersão coloidal estável (SOLER et al., 2007b).

A síntese das nanopartículas de óxido de ferro pode ser descrita resumidamente conforme descrito a seguir: as soluções aquosas de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (0,1mol/L) e cloreto ferroso ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (0,05mol/L) foram adicionadas à uma solução 400 mM de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) sob agitação. Em seguida, a solução foi colocada em decantação magnética, lavada e as fases separadas. A funcionalização das NPs com ácido cítrico foi obtida a partir da adição de uma solução de ácido cítrico 0,05 M (pH 5,5) à fase sólida, formada pelas partículas de óxido de ferro, e mantida sob agitação. A suspensão foi centrifugada para remoção de agregados maiores. Em seguida, a suspensão formada por nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com citrato foi submetida à diálise utilizando-se membranas de celulose (porosidade de 25 Å) por um período de 24 horas em água deionizada sob agitação.



**Figura 3.3** – Ilustração do processo de síntese das nanopartículas de magnetita cobertas com citrato por meio do método de coprecipitação alcalina.

Fonte: Adaptado de Letti C. (2013).

### 3.2.3 Deposição dos nanofilmes por meio da técnica LbL

Os filmes foram produzidos pela técnica de LbL, a qual foi descrita no Capítulo 2. As características do FM empregado como fonte de NPs de óxido de ferro serão apresentadas no próximo capítulo, enquanto a preparação das soluções poliméricas, bem como os detalhes do procedimento experimental da técnica de automontagem serão descritos a seguir.

A funcionalização dos substratos BK7, lâminas de vidro óptico, foi realizada seguindo procedimento descrito na literatura (PATERNO et al., 2009a), que pode ser descrito resumidamente como: imergir as lâminas em solução piranha ( $H_2SO_4/H_2O_2$ , 3:1 v/v), lavar com água deionizada e em seguida tratar com uma solução RCA ( $H_2O/H_2O_2$ ,  $NH_4OH$  5:1:1 v/v), solução esta usada para limpeza das lâminas. Após este procedimento, os substratos apresentam cargas negativas em sua superfície.

As NPs de magnetita funcionalizadas com citrato (CIT-MAG) apresentam cargas negativas em sua superfície, que fazem o papel de um poliânion, foram depositadas por atração eletrostática com o polímero quitosana, que possui cargas positivas (policátion). O FM CIT-MAG foi diluído em água D.I na proporção de 1:9, (1ml /9mL), enquanto a solução de quitosana com concentração de 1 mg/mL e pH 3,5 foi preparada em água D.I.

A deposição dos nanofilmes foi realizada seguindo-se as etapas:

- 1) Imersão do substrato na solução de quitosana;
- 2) Limpeza do substrato em solução aquosa;
- 3) Secagem do substrato em jato de nitrogênio;
- 4) Imersão do substrato no FM diluído;
- 5) Limpeza do substrato em solução aquosa;
- 6) Secagem do substrato em jato de nitrogênio.

Após a primeira etapa (Imersão do substrato na solução de quitosana), o substrato apresenta uma monocamada de quitosana, enquanto que, ao final do ciclo obtém-se uma bicamada de quitosana e CIT-MAG. Este ciclo de deposição é repetido quantas vezes forem necessárias, até que se obtenha o número de camadas desejável, obtendo-se uma estrutura cuja ilustração foi apresentada no Capítulo 2 (Figura 2.1). Com alternância entre as soluções aniônicas e catiônicas, se obtém um filme sólido com os componentes mantidos juntos por atração eletrostática.

Os filmes que foram depositados em lâminas de vidro óptico BK7 foram denominados de  $(\text{QUI/CIT-MAG})_n$ , onde  $n$  representa o número de bicamadas, enquanto que os depositados em substratos de celulose bacteriana foram representados por  $(\text{QUI/CIT-MAG})_{nC}$ , onde  $C$  se refere à celulose e  $n$  ao número de bicamadas. A Tabela 3.2 apresenta as amostras preparadas para as análises de microscopia de força atômica.

**Tabela 3.2** – Relação de nanofilmes com quitosana preparados para a análise de morfologia da superfície empregando-se as técnicas MEV e MFA.

Número de bicamadas	Substrato	
	BK7	CB
Monocamada	(QUI)	(QUI) <sub>c</sub>
1	$(\text{QUI/CIT-MAG})_1$	$(\text{QUI/CIT-MAG})_{1c}$
3	$(\text{QUI/CIT-MAG})_3$	$(\text{QUI/CIT-MAG})_{3c}$
5	$(\text{QUI/CIT-MAG})_5$	$(\text{QUI/CIT-MAG})_{5c}$
9,5	$(\text{QUI/CIT-MAG})_{9,5}$	$(\text{QUI/CIT-MAG})_{9,5c}$
10	$(\text{QUI/CIT-MAG})_{10}$	$(\text{QUI/CIT-MAG})_{10c}$

Fonte: Das autoras.

Uma segunda série de nanofilmes foi preparada por meio da automontagem empregando o mesmo fluido magnético, formado por NPs de magnetita funcionalizadas com citrato (CIT-MAG,) e álcool polivinílico (PVA). A solução de PVA foi preparada na concentração de 1 mg/mL em água D.I. (pH 6,2) e a dispersão coloidal foi empregada com a mesma diluição utilizada para os filmes de quitosana. Seguindo os passos de i) à vi), obteve-se uma bicamada de PVA e CIT-MAG, e, com a repetição do ciclo, obteve-se o número de camadas desejado. As amostras foram nomeadas de  $(PVA/CIT-MAG)_n$ , ou  $(PVA/CIT-MAG)_{nC}$ , onde n é o número de camadas e C representa o filme depositado em substrato de celulose. A Tabela 3.3 apresenta as amostras dos nanofilmes com PVA preparadas para as análises de microscopia de força atômica.

**Tabela 3.3** – Relação de nanofilmes com PVA preparados para a análise de morfologia da superfície empregando-se as técnicas MEV e MFA.

Número de bicamadas	Substrato	
	BK7	CB
Monocamada	(PVA)	(PVA) <sub>C</sub>
1	$(PVA/CIT-MAG)_1$	$(PVA/CIT-MAG)_{1C}$
3	$(PVA/CIT-MAG)_3$	$(PVA/CIT-MAG)_{3C}$
5	$(PVA/CIT-MAG)_5$	$(PVA/CIT-MAG)_{5C}$
9,5	$(PVA/CIT-MAG)_{9,5}$	$(PVA/CIT-MAG)_{9,5C}$
10	$(PVA/CIT-MAG)_{10}$	$(PVA/CIT-MAG)_{10C}$

Fonte: Das autoras.

### 3.3 Estudo da citotoxicidade dos nanofilmes fabricados

O estudo da citotoxicidade das multicamadas preparadas formadas por biopolímeros e óxidos de ferro foi realizado por meio do teste de viabilidade celular *in vitro* em culturas de células não-tumorais de fibroblasto normal murino da linhagem NIH-3T3. A avaliação da viabilidade celular foi realizada empregando-se o método colorimétrico do MTT, que se baseia na análise da redução do reagente MTT em formazan, por meio da ação das enzimas desidrogenais mitocondriais, que, quando presentes, tornam-se um indicativo de viabilidade celular. A redução do MTT gera a formação de cristais roxos de formazan, que são quantificados por meio da técnica de espectrofotometria (Hussain et al., 1993). A análise da viabilidade celular foi realizada empregando-se o espectrofotômetro Spectra Max M2, com comprimento de onda de 595 nm, do Laboratório de Genética e Morfologia - GEM (Instituto de Biologia, Universidade de Brasília).

Os nanofilmes fabricados utilizados no estudo de viabilidade celular estão listados na Tabela 3.4. O cultivo de células fibroblastos foi realizado inicialmente em garrafa de cultivo com o meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Life,USA) suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) (Life,USA) e antibiótico (Penicilina/Streptomicina)1% (Life,USA). O cultivo foi realizado em estufa controlada com temperatura de 37 °C em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>. As células foram posteriormente cultivadas em placas de 12 poços contendo os nanofilmes, seguindo-se os mesmos parâmetros, durante 24 horas. Após as 24 horas, resumidamente, o meio foi descartado, os poços lavados, e acrescentou-se 700 µl de MTT (0,5mg/mL) às placas que foram incubadas novamente na estufa contendo CO<sub>2</sub> como meio de

cultura pelo período de 2 horas. Depois de 2 horas a solução de MTT foi retirada das placas, e adicionou-se a todos os poços (inclusive brancos) 100µl de DMSO puro. As placas foram colocadas em agitador pelo período de 5 minutos, e mais 5 minutos foram necessários para a estabilização da cor. Para o controle e brancos, foram utilizadas amostras contendo apenas os nanofilmes ou as soluções, respectivamente, visando obter os resultados para as amostras correspondentes.

Cada amostra listada na Tabela 3.4 foi preparada em cinco replicatas, sendo três para a cultura de células e duas como controle para medida da absorbância em 595 nM (brancos). Os dados foram analisados utilizando-se o Programa Softe Max M2.

**Tabela 3.4** – Relação de nanofilmes com magnetita e quitosana preparados para os testes de toxicidade.

Número de bicamadas	Substrato	
	BK7	CB
Controle 1 (C1)	(QUI) <sub>1</sub>	-
Controle 2 (C2)	(QUI/ALG) <sub>2,5</sub>	-
3	(QUI/CIT-MAG) <sub>3</sub>	(QUI/CIT-MAG) <sub>3C</sub>
10	(QUI/CIT-MAG) <sub>10</sub>	(QUI/CIT-MAG) <sub>10C</sub>
	(PVA/CIT-MAG) <sub>10</sub>	-

Fonte: Das autoras.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

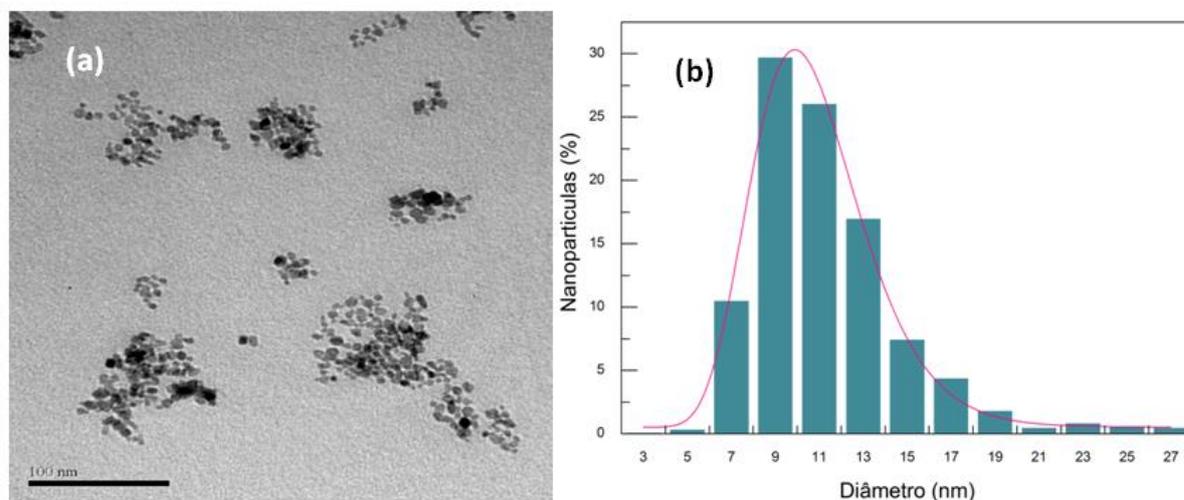
Os resultados obtidos da caracterização dos fluidos magnéticos empregados como fonte de nanopartículas para preparação dos nanofilmes, obtidos pela técnica de automontagem, tendo como componentes nanopartículas de magnetita e os biopolímeros quitosana ou PVA, são apresentados e discutidos neste capítulo. O monitoramento do crescimento dos filmes foi realizado a partir dos dados de UV-Vis, a presença do óxido de ferro e a sua fase no filme foi mostrada pelos dados da espectroscopia Raman. A morfologia da superfície dos filmes depositados em substratos de vidro óptico BK7 e na celulose bacteriana foi investigada por meio das técnicas de MEV e MFA. Em adição, os testes de toxicidade *in vitro* são apresentados.

### 4.1 Caracterização do FM empregado como fonte de NPs

A suspensão coloidal obtida foi ajustada para pH 7,2 e apresentou potencial zeta igual à  $-46,7$  mV, indicando que o FM é estável, e diâmetro hidrodinâmico ( $D_H$ ) igual à  $34,5$  nm, compatível para os FMs formados por NPs cobertas com citrato (SILVA et al., 2003; MORAIS et al., 2006). O FM estável, denominado CIT-MAG e formado por NPs de óxido de ferro cobertas com citrato e dispersas em solução aquosa com pH 7,2, foi utilizado como fonte de NPs de óxidos de ferro, com cargas superficiais negativas, sendo portanto a fonte de poliânions na deposição das multicamadas. Uma alíquota do FM foi liofilizada no equipamento Liofilizador L101 (Liobras, São Carlos, São Paulo, Brasil) do Laboratório de Toxinologia

(Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília). O sólido obtido foi utilizado para obtenção dos espectros Raman.

A Figura 4.1 (a) apresenta a imagem típica de MET, obtida para o FM preparado, onde se observa que as partículas possuem formato esférico. O histograma de distribuição de tamanho, apresentado na Figura 4.1 (b), foi obtido a partir de diversas micrografias. Após o ajuste com a função log normal, obteve-se o diâmetro médio  $D_{MET} = 10,50 \pm 0,09$  nm e dispersão de tamanho  $\sigma = 0,24 \pm 0,01$  nm. Este valor de diâmetro médio para as nanopartículas de óxidos de ferro indica que elas apresentam monodomínios e, portanto, comportamento superparamagnético e são adequadas para aplicações biológicas. É possível observar pelo valor da dispersão de tamanhos obtidos das nanopartículas que a amostra é polidispersa.

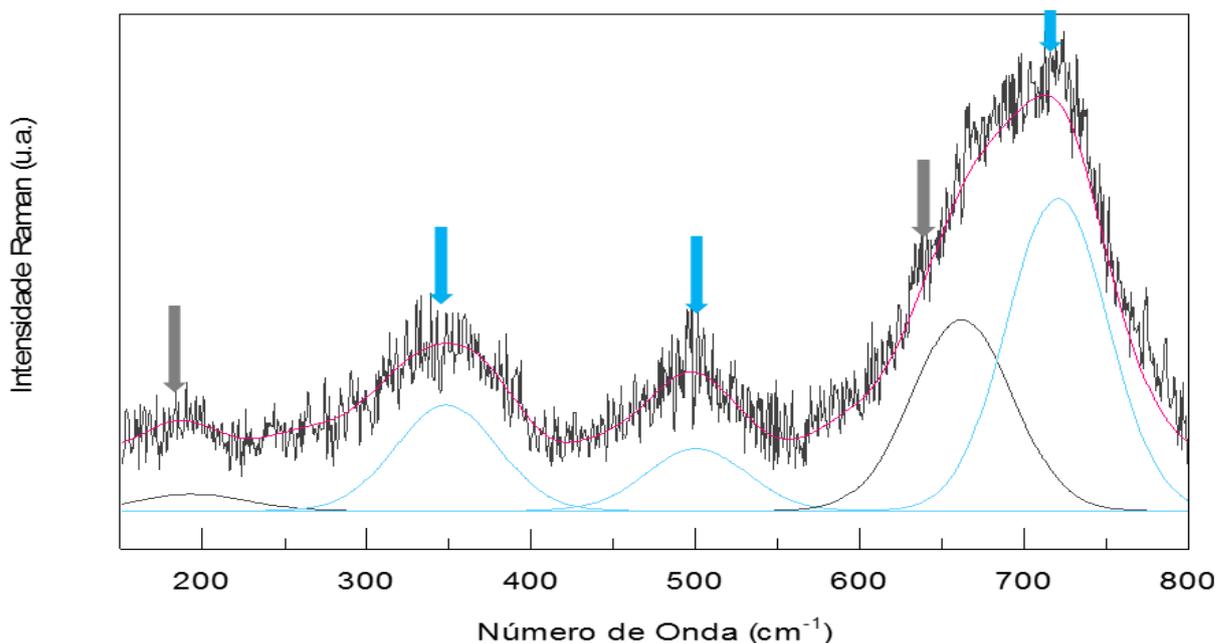


**Figura 4.1** – Imagem MET de Micrografia da amostra de magnetita funcionalizada com citrato (a) e histograma obtido a partir da imagens MET (b).

Fonte: Das autoras.

A Figura 4.2 apresenta o espectro Raman do material liofilizado. O espectro foi obtido à temperatura ambiente na região de  $150$  à  $800$   $\text{cm}^{-1}$  e ajustado empregando-se funções lorentzianas. A baixa potência do laser incidente sob a amostra,  $0,25$  mW, foi utilizada para evitar a degradação dessa (SILVA et al., 2003; SOLER et al., 2004). Observa-se que o espectro ajustado mostra as bandas (em

azul, na Figura 4.2) centrados em 344, 496 e 718  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes aos modos vibracionais Raman característicos da maguemita, enquanto a banda em torno de 650  $\text{cm}^{-1}$ , em cinza, corresponde à magnetita, e o sinal observado em 200  $\text{cm}^{-1}$  também poderia ser atribuído à magnetita é muito ruidosa. Apesar de que as NPs não sofreram processo de oxidação intencional de magnetita para maghemita, para materiais de baixa dimensionalidade, este processo pode ser induzido pela incidência do laser ou devido ao processo de secagem e ao tempo decorrido desde a preparação do fluido. O processo de oxidação natural pode ser equivalente àqueles induzidos ao oxidar a magnetita empregando borbulhamento de oxigênio (VIALI et al., 2010).

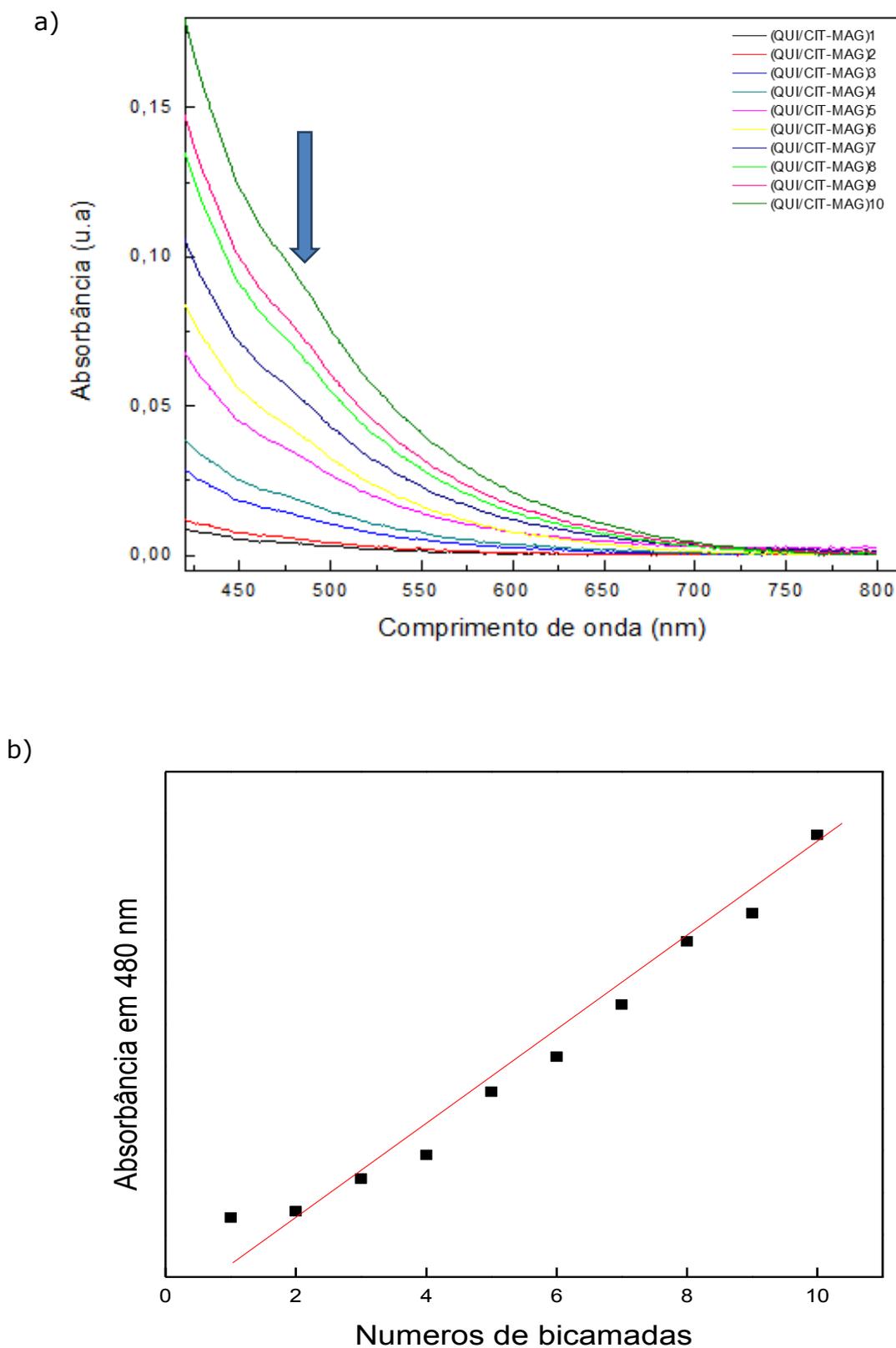


**Figura 4.2** – Espectro Raman obtido para a amostra CIT-MAG na forma de pó ajustado empregando-se funções lorentzianas.

Fonte: Das autoras.

## 4.2 Monitoramento do crescimento dos nanofimes

O monitoramento da deposição dos filmes de quitosana e NPs de óxidos de ferro foi realizado por meio da obtenção de espectros UV-Vis na faixa de comprimento de onda de 300 à 800 nm, a cada bicamada depositada. A Figura 4.3 (a) apresenta os espectros de absorbância para as amostras (QUI/CIT-MAG)<sub>n</sub>, para n variando de 1 a 10. Observa-se um leve ombro em 480 nm, que é característico das NPs de óxido de ferro (Paterno et al., 2010). Este ombro também é observado no espectro do FM usado para deposição. A Figura 4.3 (b) mostra o aumento da absorbância em função do número de bicamadas. A partir da segunda bicamada, observa-se um crescimento praticamente linear da absorbância em 480 nm, indicando que quantidades iguais de cada componente (partícula e polímero) são adsorvidas em cada bicamada. Este comportamento também foi verificado com outros tipos de NPs de óxidos de ferro automontadas com polímeros (ALCANTARA et al., 2011a; ALCANTARA et al., 2011b).

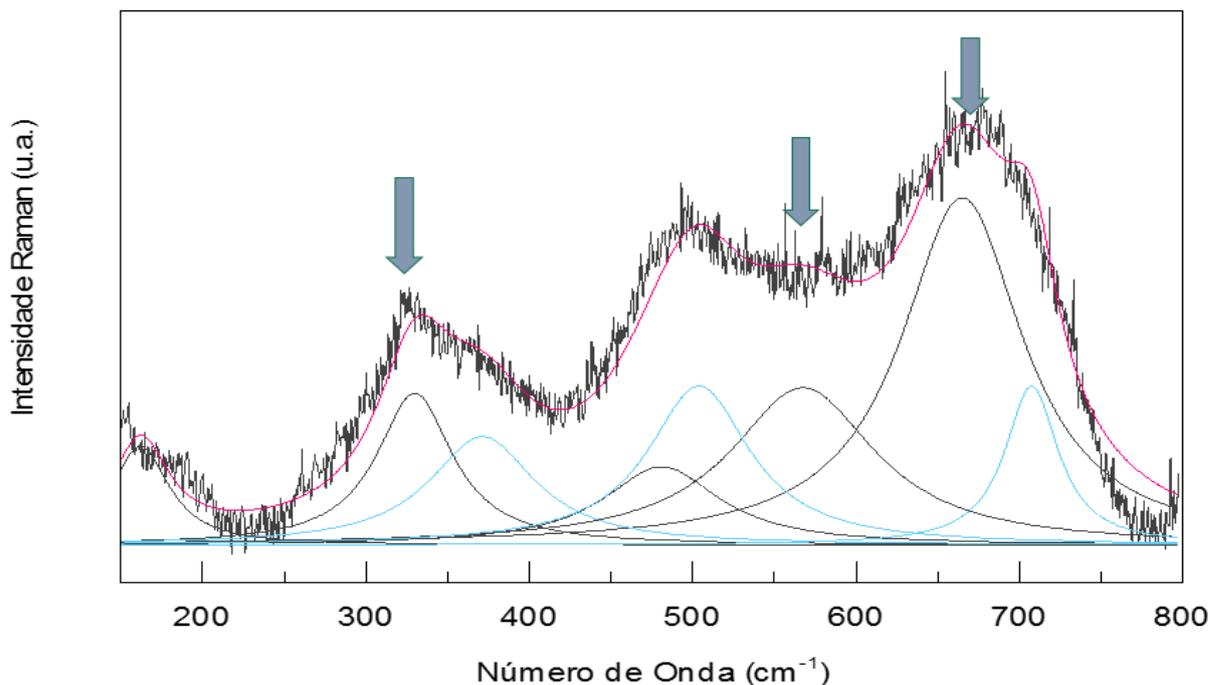


**Figura 4.3** – Monitoramento da deposição dos nanofilmes por meio da espectroscopia UV-Vis. Espectros de absorvância para as amostras (QUI/CIT-MAG)<sub>n</sub>, para n variando de 1 a 10 bicamadas (a). O aumento da absorvância em função do número de bicamadas é mostrado em (b). A reta foi adquirida a partir do número de bicamadas. Fonte: Das autoras.

No caso dos nanofilmes compostos por NPs de óxidos de ferro e PVA, uma série de amostras (PVA/CIT-MAG)<sub>n</sub>, com n variando de 1 a 15, foi confeccionada visando o monitoramento do crescimento do filme por meio de espectros de absorvância de UV-Vis. Porém, os espectros obtidos foram muito ruidosos indicando que a quantidade de material adsorvida (nanopartícula e polímero) foi muito pequena. Por outro lado, as imagens de MEV e MFA indicam a presença dos filmes na superfície dos substratos. Em adição, foi possível estimar a espessura dos nanofilmes por meio de imagens de MFA, que indicaram valores muito baixos e serão apresentados posteriormente. Assim, o mecanismo de adsorção não pode ser estudado pela técnica de UV-Vis, que não é conveniente para detectar baixas quantidades de massas depositadas. A técnica de micro balança de quartzo poderia ser empregada neste caso, pois com sua utilização é possível detectar a presença de ínfimas quantidades do material depositado e, ainda, monitorar *in vitro* o crescimento do filme conforme foi realizado por Alcantara e colaboradores (2011b).

A confirmação da presença das NPs de óxidos de ferro nos nanofilmes foi obtida por meio do espectro Raman do nanofilme. A Figura 4.2 apresenta o espectro Raman típico para a amostra (QUI/CIT-MAG)<sub>10</sub> depositada em substrato de vidro BK7 com ouro depositado na superfície (LETTI, 2013).

Observa-se que o espectro apresenta picos largos em 345, 493 e 680 cm<sup>-1</sup>, caracterizando assim a fase do óxido de ferro como magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), indicando que o fluido empregado para a preparação dos nanofilmes é composto majoritariamente por nanopartículas de magnetita. Comparando-se o espectro da Figura 4.4, obtido do nanofilme de dez bicamadas com o da Figura 4.2, obtido do pó, observa-se que a presença do polímero protege a partícula contra oxidação. Este resultado também foi observado no trabalho de Letti (2013).



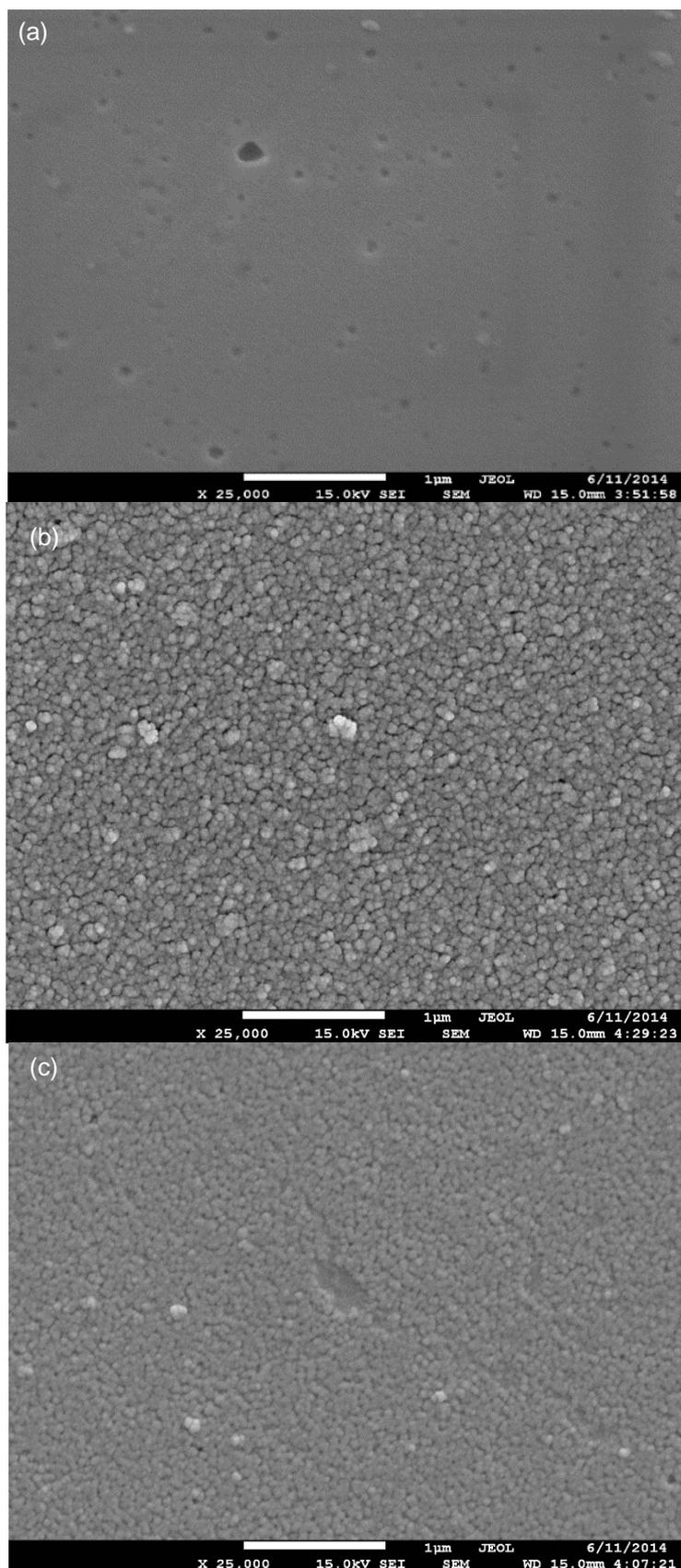
**Figura 4.4** - Espectro Raman obtido do nanofilme (QUI/CIT-MAG)<sub>10</sub> ajustado empregando-se funções lorentzianas.

Fonte: Das autoras.

### 4.3 Análise da morfologia da superfície dos nanofilmes por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi feita em nanofilmes depositados em ambos substratos de vidro BK7, lâmina de vidro óptico, e em substratos de celulose bacteriana (CB), nos quais os dois polímeros, quitosana ou PVA foram utilizados. Todas as imagens foram adquiridas com a mesma resolução. Inicialmente serão apresentadas imagens para comparação entre as superfícies dos filmes depositados com polímeros diferentes, uma vez que partículas são do mesmo tipo, sempre originadas da mesma amostra de FM. A Figura 4.5 mostra as imagens obtidas por meio da técnica de MEV dos nanofilmes depositados em substratos de vidro BK7, todas com a mesma amplificação. A imagem de MEV do controle, vidro BK7, é apresentada na Figura 4.5 (a), enquanto as imagens obtidas dos nanofilmes

(QUI/CIT-MAG)<sub>10</sub> (10 bicamadas de NPs de óxidos de ferro com quitosana) e (PVA/CIT-MAG)<sub>10</sub> (10 bicamadas de NPs de óxidos de ferro com PVA) são mostradas nas Figuras 4.5 (b) e (c), respectivamente. Por meio das imagens dos nanofilmes é possível observar que, quando comparadas ao controle, há presença do filme depositado. Ainda, é possível observar que as superfícies dos nanofilmes são bastante uniformes, mostrando uma camada densa e uniforme dos filmes depositados, com evidência de poucos aglomerados no filme (QUI/CIT-MAG) e o filme de (PVA/CIT-MAG) sem evidência de aglomerados. Também não se observa segregação dos componentes depositados. A imagem da amostra (QUI/CIT-MAG)<sub>10</sub> evidencia a presença de glóbulos maiores, fenômeno atribuído à característica da quitosana se organizar em partículas.



**Figura 4.5** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para o substrato de vidro óptico BK7 (a); nanofilme (QUI/CIT-MAG)<sub>10</sub> em (b); e nanofilme (PVA/CIT-MAG)<sub>10</sub> em (c). Todas as imagens com barras de 1 μm.

Fonte: Das autoras.

A Figura 4.6 apresenta as imagens de MEV para o controle de substrato de celulose da superfície e lateral em (a) e (b), respectivamente; enquanto as imagens de superfície e de vista lateral dos nanofilmes de quitosana (QUI/CIT-MAG)<sub>10</sub> e de PVA (PVA/CIT-MAG)<sub>10</sub>, são apresentadas nas Figuras 4.6 (c, d) e (e, f), respectivamente.

Na figura 4.6 (a) e (b), observa-se claramente as fibras de celulose, seja na vista de superfície, seja na vista lateral, que fazem parte da estrutura da celulose, conforme foi discutido no capítulo 2. A imagem do filme (QUI/CIT-MAG)<sub>10</sub> mostrada na Figura 4.6 (c) mostra que o nanofilme é uniforme cobrindo toda a superfície, e se deposita entre as fibras de celulose. Comparando-se esta imagem com a Figura 4.5 (b), aparentemente o nanofilme depositado sobre celulose apresenta superfície menos rugosa. A imagem lateral, apresentada na Figura 4.6 (d), mostra claramente o filme (QUI/CIT-MAG)<sub>10</sub> depositado (indicado pela seta) e as fibras de celulose conforme foi observado na imagem da celulose pura. A Figura 4.6 (e) mostra que o filme de (PVA/CIT-MAG)<sub>10</sub> foi depositado nas fibras de celulose seguindo a direção das mesmas. A imagem na Figura 4.6 (f) confirma a deposição do filme (PVA/CIT-MAG)<sub>10</sub>, visualizado por meio da cobertura menos densa (branca) e indicado pela seta sobre as camadas das fibras de celulose, conforme o esquema da Figura 2.2.



#### **4.4 Análise da morfologia da superfície dos nanofilmes por meio da técnica de Microscopia de Força Atômica**

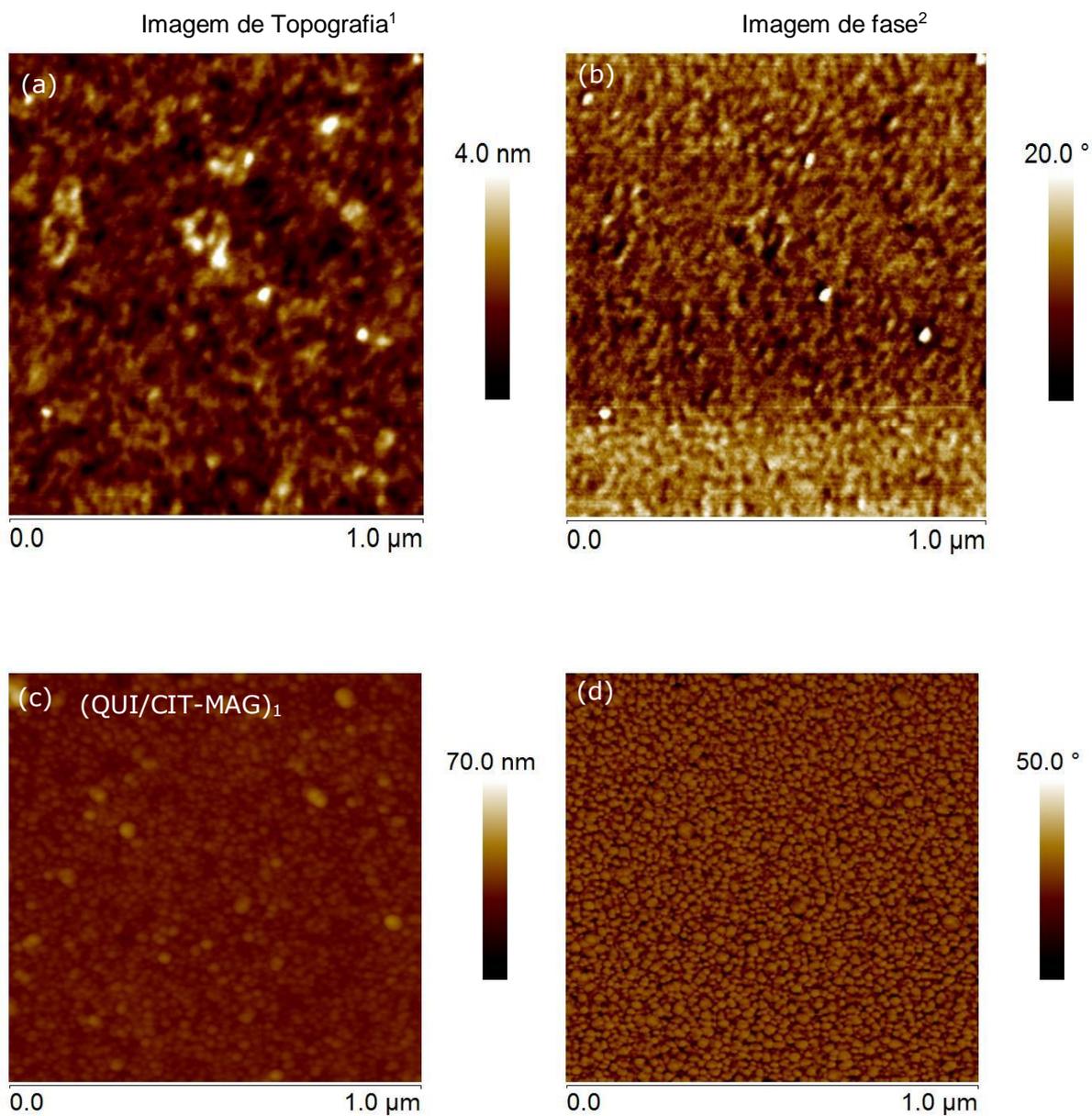
Para o estudo das propriedades morfológicas da superfície dos nanofilmes por meio da técnica de MFA, foram preparadas amostras de filmes com diferentes quantidades bicamadas, em substratos de vidro ou de celulose, visando o monitoramento da topografia dos mesmos. Foram preparadas amostras controle dos dois tipos de substratos com uma bicamada de quitosana ou de PVA para servir de comparação para as duas séries de nanofilmes depositadas com mais bicamadas. Os nanofilmes preparados estão listados nas Tabelas 3.2 e 3.3 do capítulo 3, sendo  $(\text{QUI/CIT-MAG})_n$ ,  $(\text{PVA/CIT-MAG})_n$ ,  $(\text{QUI/CIT-MAG})_{Cn}$  e  $(\text{PVA/CIT-MAG})_{Cn}$ , com  $n = 1, 3, 5, 9,5$  ou  $10$ .

##### **4.4.1 Imagens MFA obtidas de nanofilmes depositados em substratos de vidro BK7**

A Figura 4.7 mostra as imagens de topografia e de fase para o controle dos filmes de quitosana e dos filmes formados por NPs de óxidos de ferro com quitosana  $(\text{QUI/CIT-MAG})_n$  depositados em substratos BK7. As imagens (a) e (b) se referem ao substrato BK7 com uma monocamada de QUI. Observa-se na imagem topográfica da Figura 4.7 (c) o nanofilme com uma bicamada  $(\text{QUI/CIT-MAG})_1$  a presença de uma densa camada uniforme, ou seja, não se observam regiões com segregação de partícula ou de polímero. Em adição, observa-se a estrutura esférica indicando a presença das NPs de óxido de ferro. Ainda, a imagem de fase da Figura 4.7 (d) coincide com imagem topográfica e também confirma a uniformidade do filme desde

a primeira bicamada. Em adição, as imagens de fase mostram uma superfície mais densa com maior nitidez do polímero do que na imagem de topografia, evidenciando o preenchimento dos espaços entre as NPs com a cobertura do polímero. Imagens de microscopia de transmissão de alta resolução, bem como medidas elétricas em sistemas semelhantes (ALCANTARA et al., 2013a), mostraram que as partículas são envoltas pelo polímero (SOLER et al., 2012b). À medida que a espessura do filme aumenta, observa-se que começam a aparecer alguns aglomerados que se intensificam de acordo com o aumento do número de bicamadas, característica deste tipo de nanofilme.

Observa-se também que as superfícies são compostas de bicamadas entre quitosana e NPs de óxidos de ferro, onde os dois compostos formam a superfície de cada filme sem ocorrência de segregação de fase, que é característica de filmes confeccionados por LbL. Os segmentos do polieletrólito penetram em direção transversal no filme de modo que as camadas se interpenetram, fazendo com que a camada final seja composta por ambos materiais usados na deposição (LETTI, 2013).

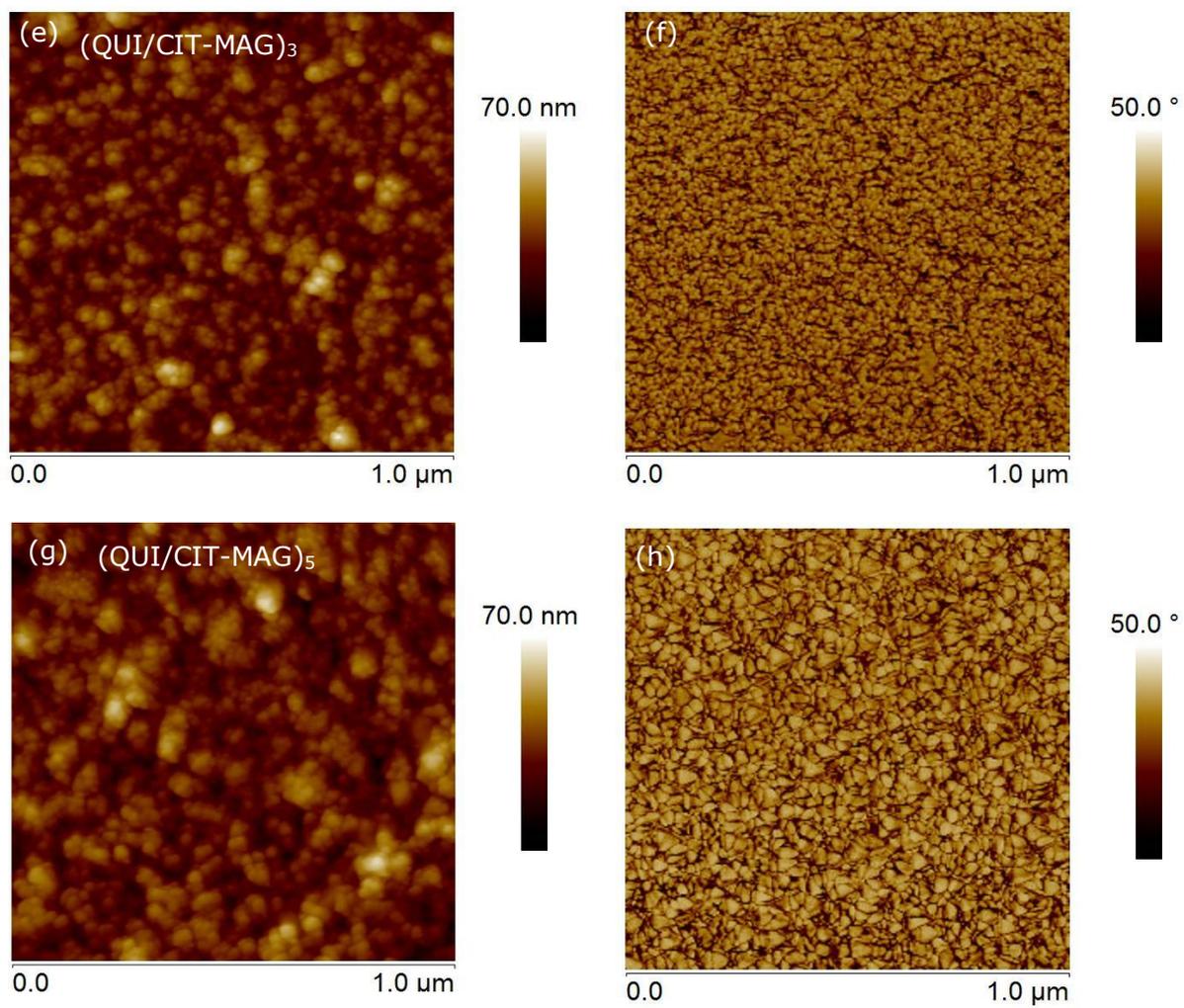


**Figura 4.7** – Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em vidro BK7, conforme indicações (continua).

Fonte: Das autoras.

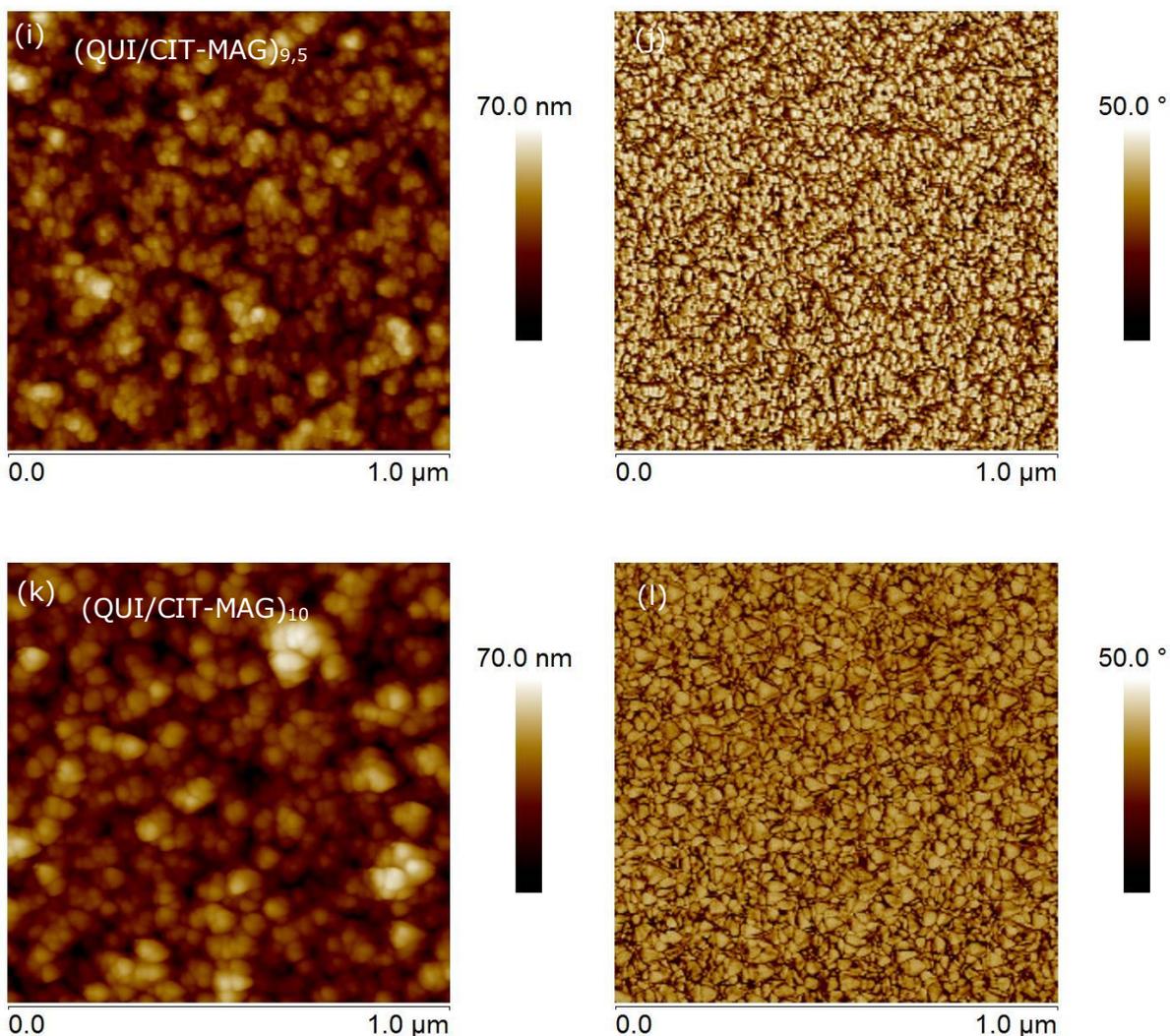
<sup>1</sup> Controle com uma monocamada de quitosana.

<sup>2</sup> Idem.



**Figura 4.7** – Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em vidro BK7, conforme indicações (continuação).

Fonte: Das autoras.

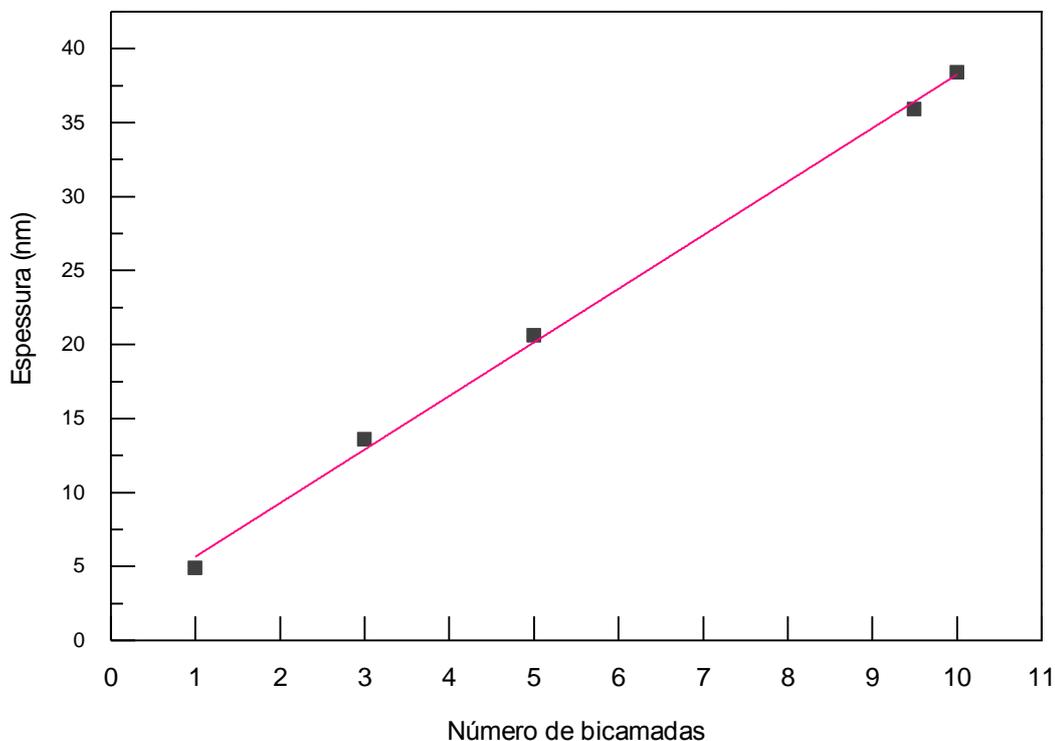


**Figura 4.7** – Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em vidro BK7, conforme indicações (conclusão).

Fonte: Das autoras.

As imagens mostradas na Figura 4.7 foram utilizadas para a obtenção da espessura dos filmes, por meio do *software* do equipamento, empregando-se a técnica desenvolvida por (LOBO et al., 1999). Os dados obtidos foram 4,9; 13,6; 20,6; 35,9 e 38,4 nm para os nanofilmes  $(\text{QUI/CIT-MAG})_n$ , com  $n = 1, 3, 5, 9,5$  e 10, respectivamente, e estão apresentados na Figura 4.8. Observa-se que o aumento da espessura apresenta uma dependência linear em função do número de bicamadas, o mesmo comportamento verificado para o monitoramento do crescimento do filme

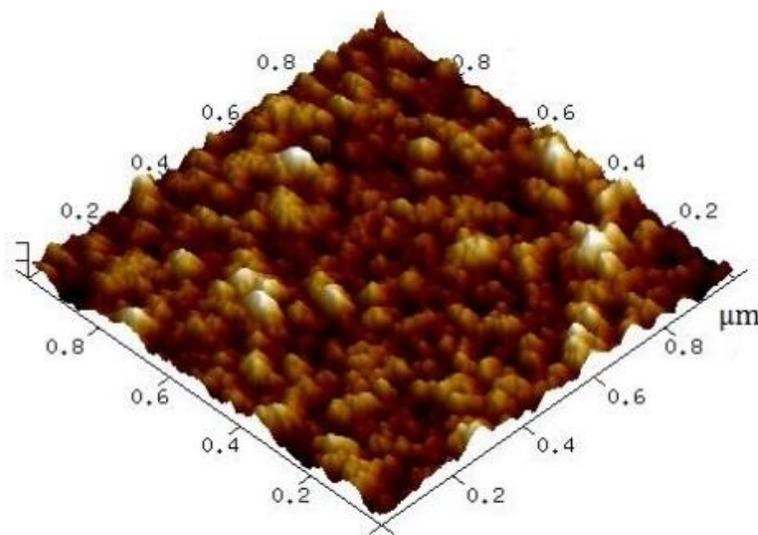
por espectroscopia UV-Vis da espessura do filme com o número de bicamadas depositadas, conforme mostrado anteriormente na Figura 4.3 (b).



**Figura 4.8** – Dados dos valores de espessura dos nanofilmes obtidos por meio das imagens de MFA, em função do número de bicamadas, para as amostras  $(\text{QUI/CIT-MAG})_n$ , com  $n = 1, 3, 5, 9,5$  e 10 bicamadas.

Fonte: Das autoras.

A Figura 4.9 apresenta a imagem de topografia em três dimensões (3D) da amostra  $(\text{QUI/CIT-MAG})_5$ , na qual observa-se as estruturas esféricas correspondentes às NPs de óxidos de ferro, em concordância com as imagens em 2D e de fase, como mostrado na Figura 4.7 (g) e (h).



**Figura 4.9** – Imagem de MFA em três dimensões de topografia da amostra (QUI/CIT-MAG)<sub>5</sub>.

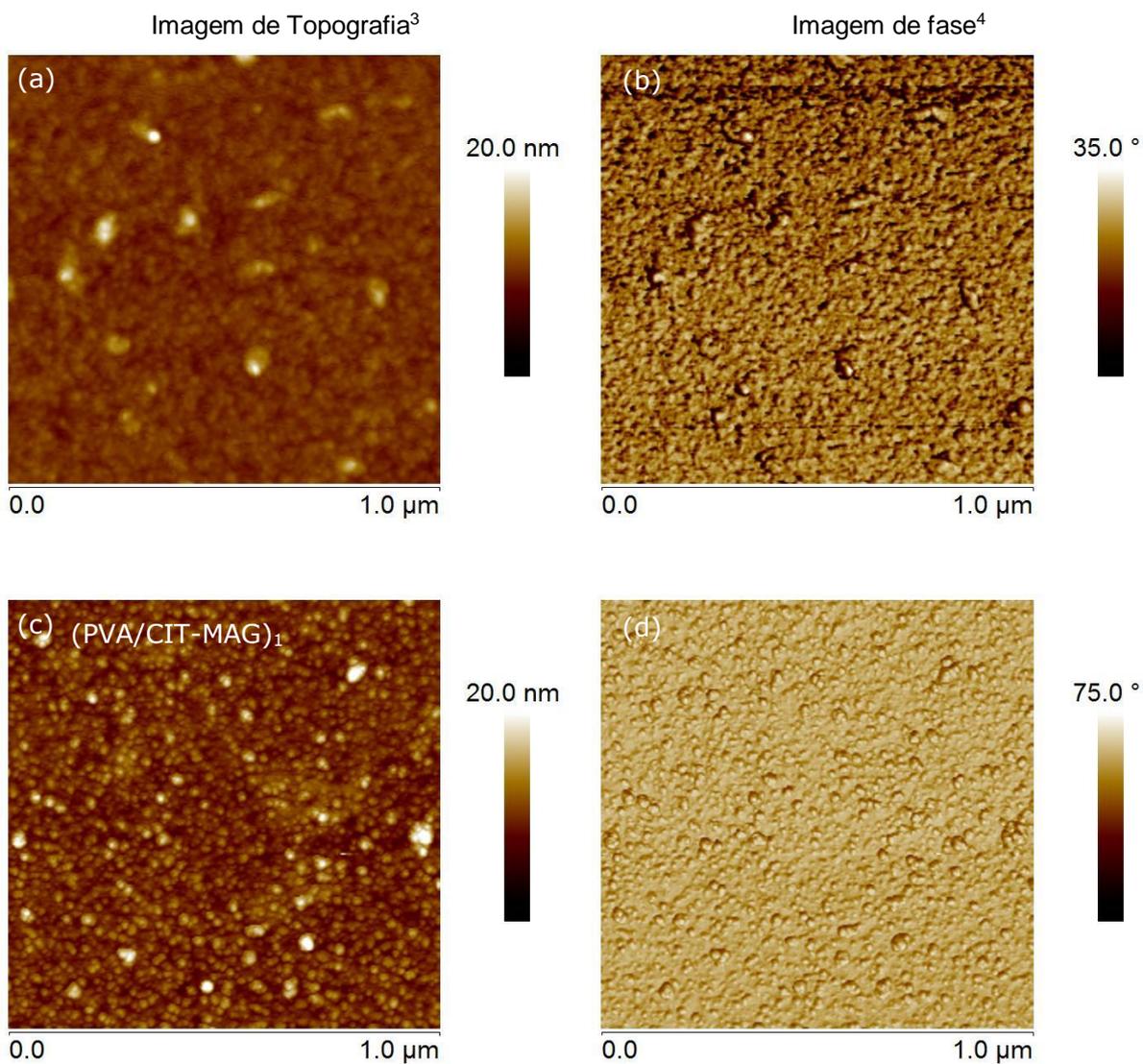
Fonte: Das autoras.

A Figura 4.10 apresenta as imagens de MFA da topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em vidro BK7: controle com uma monocamada de PVA (a, b); uma bicamada do nanofilme (PVA/CIT-MAG)<sub>1</sub> em (c, d); (PVA/CIT-MAG)<sub>3</sub> em (e, f); (PVA/CIT-MAG)<sub>5</sub> em (g,h); (PVA/CIT-MAG)<sub>9,5</sub> em (i, j) e (PVA/CIT-MAG)<sub>10</sub> em (k, l). As imagens da Figura 4.10 (c) e (d) evidenciam a presença das estruturas esféricas correspondentes às NPs de óxidos de ferro, imersas nas cadeias poliméricas, enquanto que as imagens do controle mostram a estrutura globular do polímero. Em adição, a imagem de fase na Figura 4.10 (d) corresponde à imagem topográfica na Figura 4.10 (c), mostrando que não ocorre segregação do filme.

As imagens mostradas na Figura 4.10 (e) e (f) para o nanofilme de três bicamadas evidenciam ainda mais a presença das NPs de óxidos de ferro embebidas na matriz polimérica quando comparadas com aquelas da amostra de uma bicamada. À medida que o número de bicamadas aumenta, observam-se esferas maiores, indicando que o polímero está encobrindo as NPs, de modo que a

superfície parece menos rugosa. A espessura dos nanofilmes estimadas a partir das imagens de AFM foram 2,8; 2,5; 3,0; 3,2 e 6,7 nm para os nanofilmes (PVA/CIT-MAG)<sub>n</sub>, com n = 1, 3, 5, 9,5 e 10, respectivamente, mostrando que a espessura variou pouco, à medida que o número de bicamadas aumentou, indicando que provavelmente as NPs estão sendo adsorvidas, em conformidade com a observação da morfologia da superfície. Por outro lado, o filme está, de fato, presente, conforme se observa na micrografia de MEV apresentada na Figura 4.6 (f).

Esta diferença no processo de adsorção dos componentes do nanofilme composto de PVA e nanopartículas de magnetita, quando comparado com o de quitosana, ambos depositados em substratos de vidro BK7, pode ser entendida considerando-se que o PVA não é um polieletrólito e tem facilidade para fazer ligações de hidrogênio, o que parece não ter sido eficiente para ser depositado com o FM empregado.

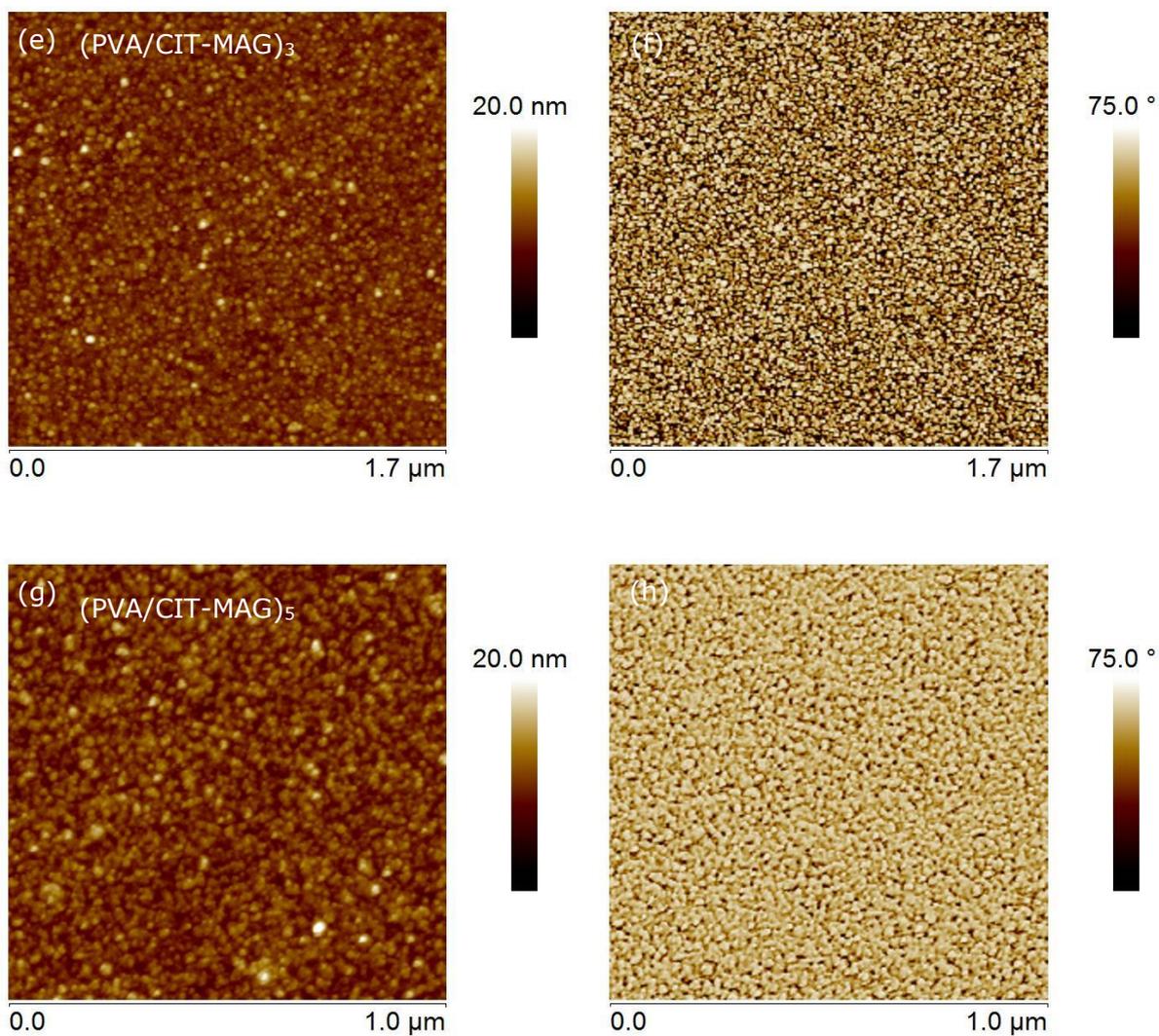


**Figura 4.10** – Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em vidro BK7, conforme indicações (continua).

Fonte: Das autoras.

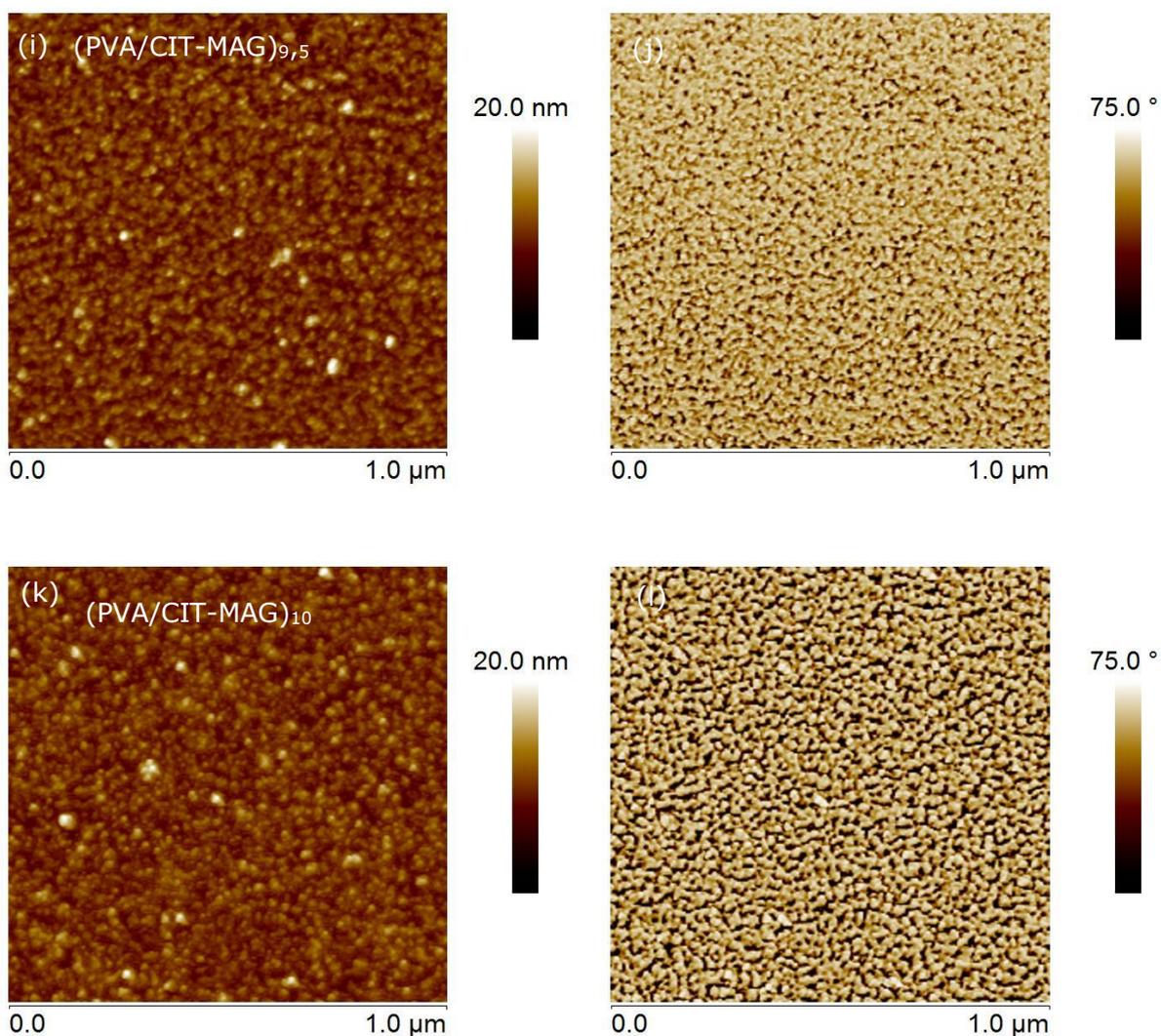
<sup>3</sup> Controle com uma monocamada de PVA.

<sup>4</sup> Idem.



**Figura 4.10** – Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em vidro BK7, conforme indicações (continuação).

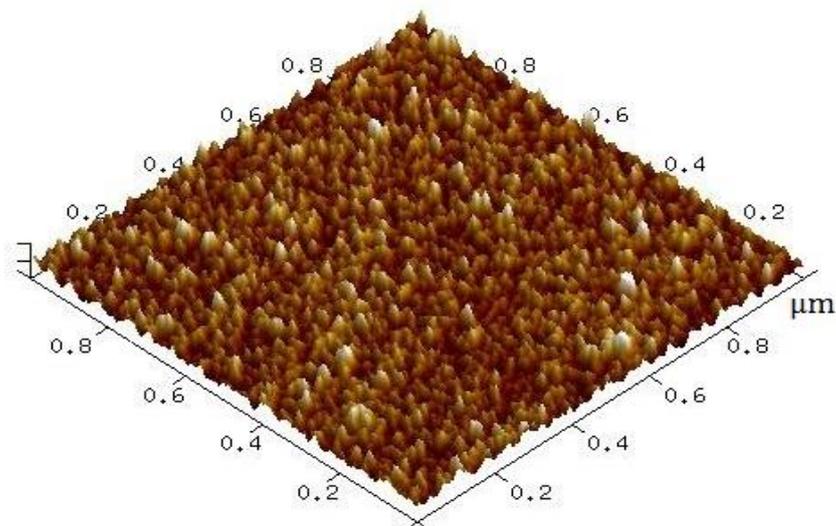
Fonte: Das autoras.



**Figura 4.10** – Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em vidro BK7, conforme indicações (conclusão).

Fonte: Das autoras.

A imagem de topografia em três dimensões (3D) da amostra (PVA/CIT-MAG)<sub>5</sub> é apresentada na Figura 4.11, onde se observa estruturas esféricas atribuídas às NPs de óxidos de ferro, em concordância com as imagens de topografia em 2D e de fase (Figura 4.10 (g) e (h)).



**Figura 4.11** – Imagem de MFA em três dimensões de topografia da amostra (PVA/CIT-MAG)<sub>5</sub>.

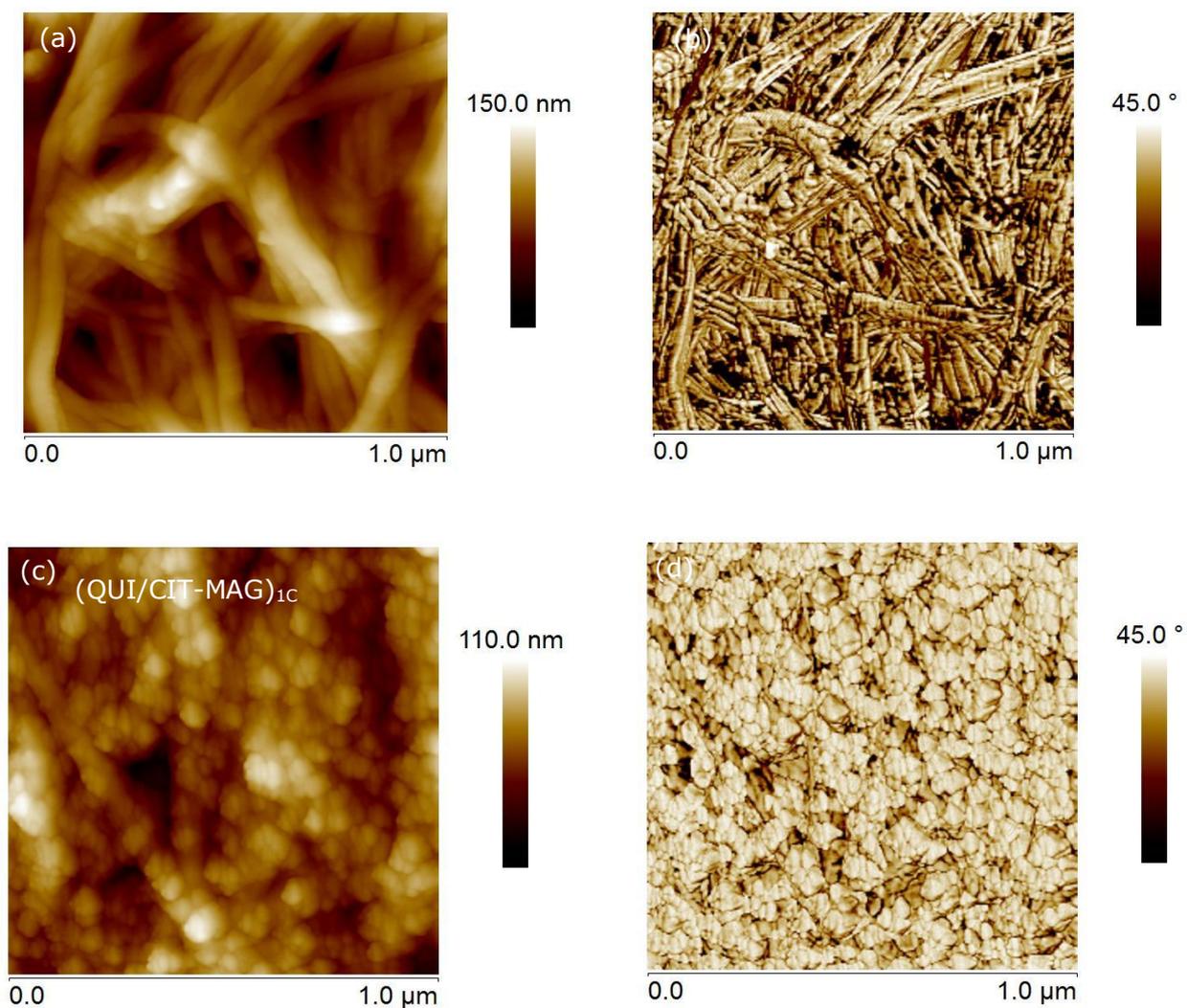
Fonte: Das autoras.

#### **4.4.2 Imagens MFA obtidas de nanofilmes depositados em substratos de celulose bacteriana**

A Figura 4.12 apresenta as imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em celulose bacteriana (CB) para o controle com uma monocamada de quitosana (a, b); uma bicamada do nanofilme (QUI/CIT-MAG)<sub>1C</sub> em (c, d); (QUI/CIT-MAG)<sub>3C</sub> em (e, f); e (QUI/CIT-MAG)<sub>10C</sub> em (g, h). As imagens mostradas na Figura 4.12 (a) mostram que o polímero foi depositado sobre as fibras de celulose, porém, a estrutura das fibras prevalece, comparando-se com a imagem da Figura 4.6 (a) de MEV do substrato de CB. Na imagem de fase, apresentada na Figura 4.12 (b), evidencia a geometria das fibras.

Quando a primeira bicamada do nanofilme (QUI/CIT-MAG)<sub>C1</sub> é depositada, é possível observar a estrutura esférica, conforme a Figura 4.12 (c), entretanto, parte dela acompanha ou encontra-se acima as fibras de CB. A imagem de fase na Figura 4.12 (d), corresponde à imagem topográfica na Figura 4.12 (c), mostrando-se mais

homogênea, quando comparada com a imagem do controle, apresentada na Figura 4.12 (b). Na imagem da amostra (QUI/CIT-MAG)<sub>C3</sub> a, presença das NPs é mais aparente, enquanto que as fibras da CB ficam menos evidentes (Figura 4.12 (d) e (e)). À medida que a espessura aumenta, aparecem alguns aglomerados na imagem topográfica, como na amostra (QUI/CIT-MAG)<sub>C10</sub>, porém, ainda se observa o resultado do crescimento sobre as fibras de CB. Por outro lado, em todas as imagens observa-se as NPs envolvidas pelas cadeias poliméricas, sem segregação dos componentes, resultando em superfícies homogêneas, conforme se observou na imagem de MEV da Figura 4.6 (c) obtida do nanofilme (QUI/CIT-MAG)<sub>C10</sub>.

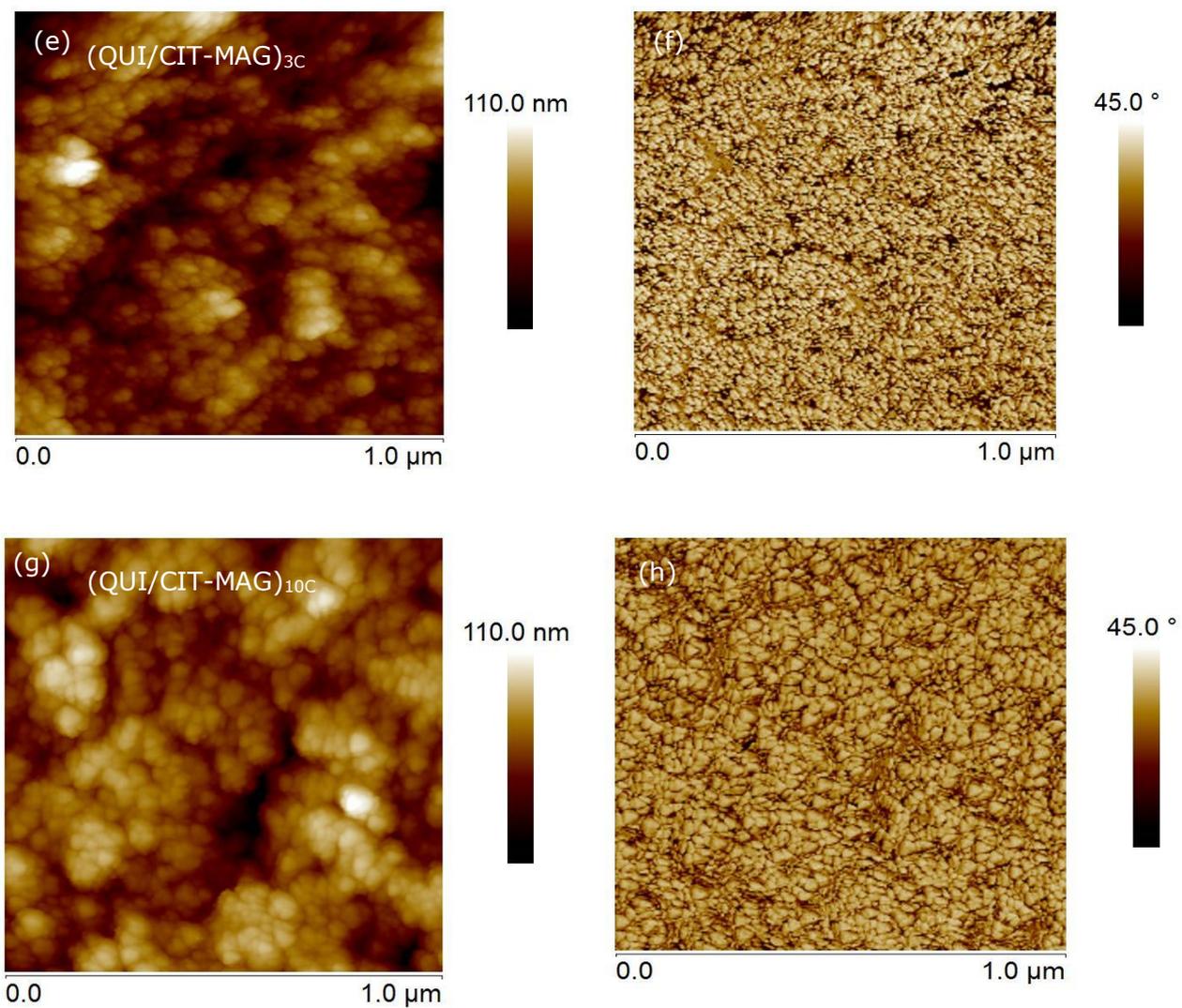
Imagem de Topografia<sup>5</sup>Imagem de fase<sup>6</sup>

**Figura 4.12** – Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em celulose bacteriana, conforme indicações (continua).

Fonte: Das autoras.

<sup>5</sup> Controle com uma monocamada de quitosana substrato celulose bacteriana.

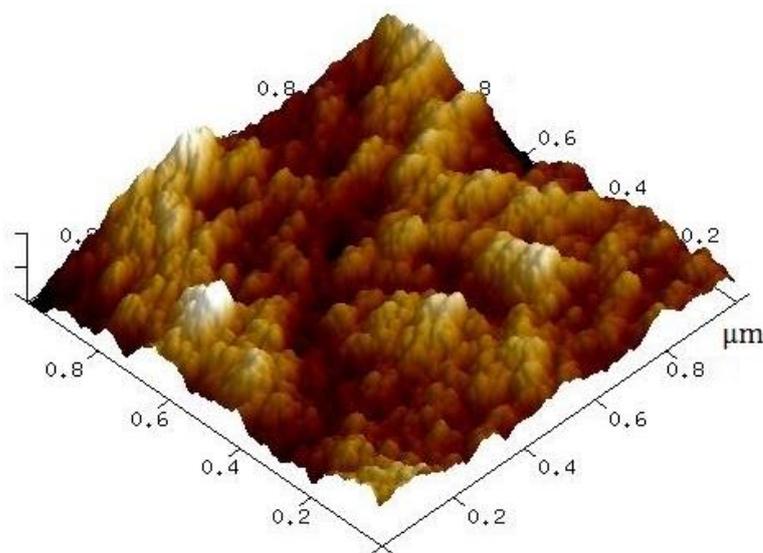
<sup>6</sup> Idem.



**Figura 4.12** – Imagens de MFM de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em celulose bacteriana, conforme indicações (conclusão).

Fonte: Das autoras.

Observa-se na imagem de topografia 3D da amostra (QUI/CIT-MAG)<sub>3C</sub>, apresentada na Figura 4.13, que as estruturas esféricas atribuídas às NPs de óxidos de ferro se depositam sobre as cadeias de CB, em concordância com as imagens de topografia em 2D e de fase, as quais foram apresentadas na Figura 4.12 (e) e (f).

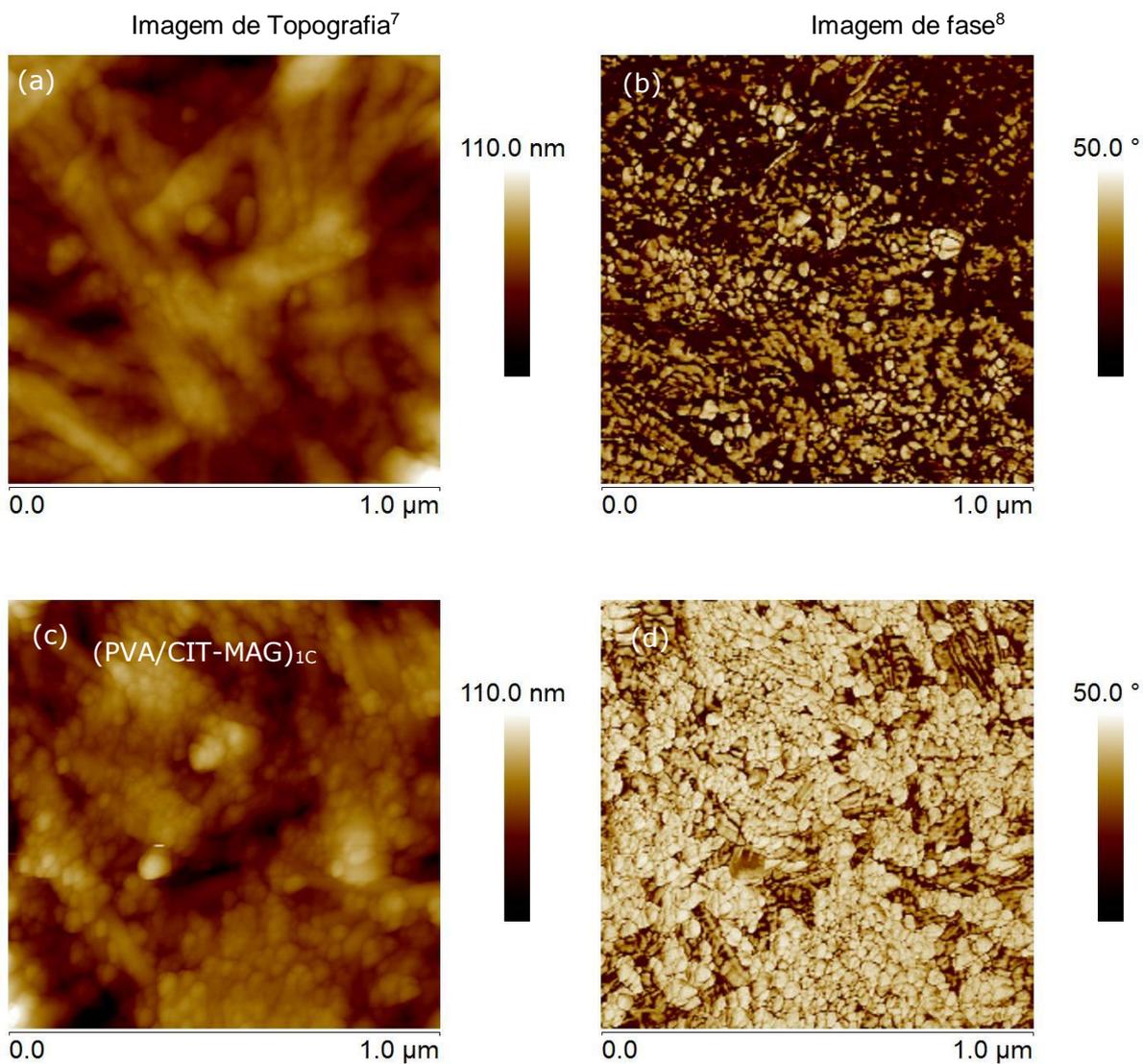


**Figura 4.13** – Imagem de MFA em três dimensões de topografia da amostra (QUI/CIT-MAG)<sub>3C</sub> depositada em substrato de celulose bacteriana.

Fonte: Das autoras.

A Figura 4.14 apresenta as imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em substratos de CB, sendo o controle com uma monocamada de PVA (a, b), e as amostras: uma bicamada do nanofilme (PVA/CIT-MAG)<sub>1C</sub> em (c, d); (PVA/CIT-MAG)<sub>3C</sub> em (e, f); e (PVA/CIT-MAG)<sub>10C</sub> em (g, h). Observa-se nas imagens da amostra controle, (a) e (b), as estruturas globulares, atribuídas ao polímero, depositadas sobre as fibras de CB. Após a primeira bicamada depositada, (PVA/CIT-MAG)<sub>1C</sub>, as estruturas esféricas são predominantes e aparentemente depositadas entorno das fibras de CB. A imagem de fase, em (d), encontra-se de acordo com a topográfica, em (c). À medida

que aumenta o número de bicamadas, para os nanofilmes (PVA/CIT-MAG)<sub>3C</sub> e (PVA/CIT-MAG)<sub>10C</sub>, observam-se as NPs envoltas pelas cadeias poliméricas depositadas sobre as fibras de CB, aparentando aglomerados. A imagem de fase na Figura 4.12 (h) indica certa desuniformidade, aparentemente devido à deposição dos componentes sobre as fibras da CB, também se observa uma diferença de superfície dos nanofilmes (PVA/CIT-MAG)<sub>3C</sub> e (PVA/CIT-MAG)<sub>10C</sub> onde mostra que o polímero é adsorvido com uniformidade, fato confirmado na imagem de MEV, Figura 4.6 (f).

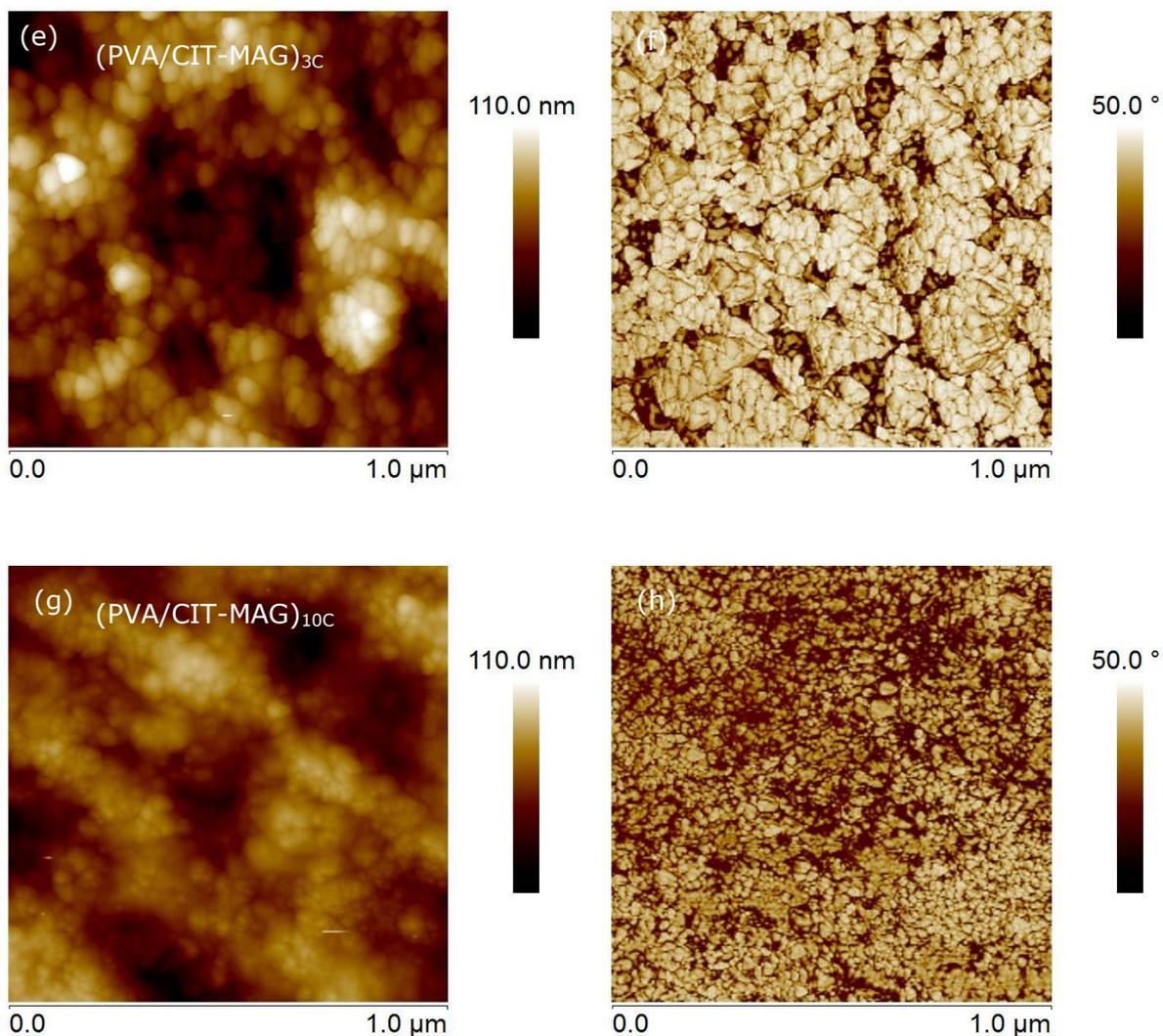


**Figura 4.14** – Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em celulose bacteriana, conforme indicações (continua).

Fonte: Das autoras.

<sup>7</sup> Controle com uma monocamada de PVA.

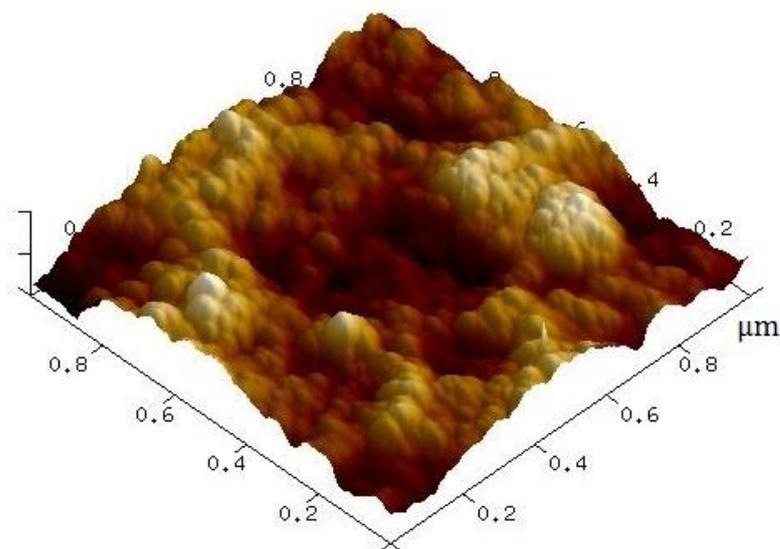
<sup>8</sup> Idem.



**Figura 4.14** – Imagens de MFA de topografia (lado esquerdo) e de fase (lado direito) para amostras depositadas em celulose bacteriana, conforme indicações (conclusão).

Fonte: Das autoras.

A Figura 4.15 mostra a imagem de topografia 3D da amostra  $(PVA/CIT-MAG)_{3C}$ , na qual é possível observar que as estruturas esféricas atribuídas às NPs de óxidos de ferro envoltas nas cadeias poliméricas se depositam sobre as fibras de CB, em concordância com as imagens de topografia em 2D e de fase (Figura 4.14 (e) e (f)).



**Figura 4.15** – Imagem de MFA em três dimensões de topografia da amostra (PVA/CIT-MAG)<sub>3C</sub> depositada em substrato de celulose bacteriana.

Fonte: Das autoras.

#### 4.5 Teste de Viabilidade Celular

Nos últimos anos a necessidade de utilizar cultura de células para estudo de biocompatibilidade de muitos materiais tem aumentado, pois os experimentos em laboratório com células possibilitam reproduzir condições e reações parecidas as ocorridas no organismo. Em adição é possível observar e quantificar alterações que as células sofrem quando em contato com um determinado fármaco ou produto e também analisar o comportamento das células individualmente diminuindo o número de variáveis. Por exemplo, os fibroblastos quando em contato com um agente agressor sofrem alteração na morfologia da membrana.

O teste de Viabilidade Celular que emprega o protocolo do MTT baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em estudo no metabolismo celular de glicídeos usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular,

é quantificada por meio da redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) ao formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) devido à atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular.

A análise de toxicidade dos nanofilmes produzidos foi realizada por meio do estudo de viabilidade celular em culturas de células não-tumorais de fibroblasto normal murino de linhagem (NIH-3T3). Foi empregando o protocolo de MTT, conforme foi detalhado no capítulo 3. A Figura 4.16 apresenta a viabilidade celular para o grupo controle (CTRL) e para os nanofilmes (QUI)<sub>0,5</sub>, (QUI/ALG)<sub>2,5</sub>, (QUI/CIT-MAG)<sub>3</sub>, (QUI/CIT-MAG)<sub>3C</sub>, (QUI/CIT-MAG)<sub>10</sub>, (QUI/CIT-MAG)<sub>10C</sub> e (PVA/CIT-MAG)<sub>10</sub>, conforme listado na Tabela 4.1.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste ANOVA one-way e two-way com nível de significância de 0,05. Os testes foram realizados com o *software* GraphPad Prism 5 (Califórnia, EUA). De forma geral, é possível observar nos dados da Figura 4.16 uma diminuição da viabilidade celular em todos os grupos de estudo, entretanto, é importante ressaltar, que ao processar os dados verifica-se que essa diminuição não possui relevância estatística. Os filmes depositados em BK7 apresentaram uma viabilidade sutilmente mais baixa que os filmes depositados em celulose bacteriana. É possível observar que, após a adição das bicamadas de quitosana com CIT-MAG amostras (QUI/CIT-MAG)<sub>3</sub> e (QUI/CIT-MAG)<sub>10</sub>, ocorre aumento da viabilidade celular em relação ao controle relativo, sendo este composto por apenas uma monocamada de quitosana amostra (QUI). Este fenômeno também se verifica nos filmes que foram depositados em celulose, conforme é possível observar nas amostras (QUI/CIT-MAG)<sub>3C</sub>, (QUI/CIT-MAG)<sub>10C</sub> e Celulose. Apesar da análise estatística indicar que estas diferenças não são relevantes, é possível

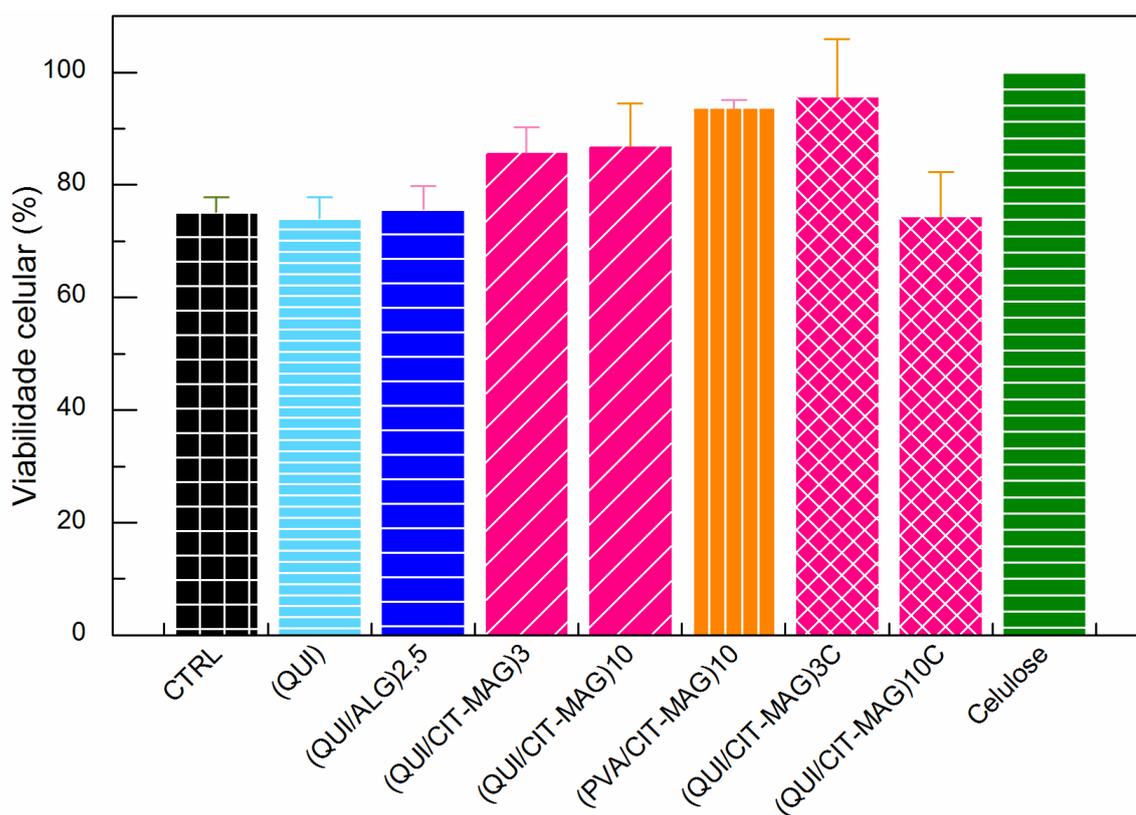
observar também que as amostras com 3 bicamadas de quitosana/CIT-MAG apresentam melhor resultado do que para 10 bicamadas depositadas, resultado este que também ocorre quando o substrato é de celulose bacteriana.

Os percentuais de viabilidade celular das amostras investigadas foram obtidos em comparação com o valor do grupo controle (CTRL - igual a 100%), obtendo-se para o grupo de células expostas aos filmes de uma monocamada de (QUI) 74%; e de polímeros (QUI/ALG)<sub>2,5</sub> 75%. Para os nanofilmes compostos com nanopartículas de magnetita obteve-se: 75 % para a amostra (PVA/CIT-MAG)<sub>10</sub> enquanto que para os de nanofilmes com QUI com 3 bicamadas obteve-se 93 e 95% quando os filmes foram depositados em BK7 e CB, respectivamente, enquanto que para os grupos de 10 bicamadas foi de 86 e 87% quando se empregou substrato BK7 e celulose, respectivamente. Esses grupos apresentaram viabilidade semelhante à viabilidade das células do grupo controle. Apenas células expostas aos filmes (QUI), (QUI/ALG)<sub>2,5</sub> e (PVA/CIT-MAG)<sub>10</sub>, apresentaram baixa viabilidade quando comparados às do grupo controle de 100%. Os grupos de filmes formados por polímeros apenas como (QUI)<sub>0,5</sub> e (QUI/ALG)<sub>2,5</sub> foram investigados para verificar se os mesmo apresentariam algum indicio de toxicidade. O substrato de CB também foi empregado como controle tendo apresentado uma viabilidade celular de 74%. Estes dados estão listados na Tabela 4.2.

**Tabela 4.1** – Relação das amostras utilizadas para o teste de toxicidade.

Número de bicamadas	Substrato	
	BK7	CB
1	(QUI) <sub>1</sub>	-
2,5	(QUI/ALG) <sub>2,5</sub>	-
3	(QUI/CIT-MAG) <sub>3</sub>	(QUI/CIT-MAG) <sub>3C</sub>
10	(QUI/CIT-MAG) <sub>10</sub>	(QUI/CIT-MAG) <sub>10C</sub>
10	(PVA/CIT-MAG) <sub>10</sub>	-

Fonte: Das autoras.

**Figura 4.16** – Resultados obtidos do estudo de viabilidade celular de células de fibroblasto para nanofilmes com diferentes arquiteturas e controles com tempo de exposição de 24 horas.

Fonte: Das autoras.

**Tabela 4.2** - Relação dos valores obtidos para a viabilidade celular por meio da análise estatística.

CTRL	100	%
(QUI)	0,74048	74
(QUI/ALG) 2,5	0,75685	75
(QUI/CIT-MAG) 3	0,93496	93
(QUI/CIT-MAG) 10	0,85739	85
(PVA/CIT-MAG) 10	0,75151	75
(QUI/CIT-MAG) 3C	0,95561	95
(QUI/CIT-MAG) 10C	0,86863	86
Celulose	0,74307	74

Fonte: Das autoras.

Os resultados mostraram variações na viabilidade celular para as diferentes amostras investigadas, incluindo-se os controles, porém a análise estatística dos resultados do teste do MTT indica que os nanofilmes produzidos não apresentam efeitos citotóxicos significativos.

## 5 CONCLUSÃO

A técnica de automontagem camada por camada foi empregada para a produção de nanofilmes compostos por nanopartículas de óxidos de ferro e polímeros, como quitosana ou álcool polivinílico. Esta técnica não requer instalações sofisticadas, sendo considerada de baixo custo e permite o controle preciso da densidade e da posição dos componentes que formam os nanofilmes.

As duas séries de nanofilmes formadas por quitosana, (QUI/CIT-MAG)<sub>n</sub> e (PVA/CIT-MAG)<sub>n</sub>, com n na faixa de 1 a 10 representa o número de bicamadas, foram depositadas em substratos de vidro óptico BK7 ou celulose, perfazendo quatro séries de amostras. O monitoramento do crescimento dos nanofilmes foi realizado por meio da técnica de espectroscopia UV-Vis, enquanto que as propriedades estruturais e a morfologia da superfície foram obtidas empregando-se as técnicas de espectroscopia Raman, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica. Em adição, foram realizados testes toxicológicos por meio do teste de viabilidade celular *in vitro* em culturas de células não-tumorais, sendo fibroblastos da linhagem (NIH-3T3). A avaliação da viabilidade celular foi realizada empregando-se o método colorimétrico do brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT).

Inicialmente foi realizada a preparação e caracterização do fluido magnético empregado como fonte de nanopartículas de magnetita na produção dos nanofilmes, obtendo-se os seguintes resultados:

- O fluido magnético apresentou potencial zeta igual a -46,7mV, indicando que o mesmo é uma dispersão coloidal altamente estável;

- O FM é composto por NPs de formato esférico com diâmetro médio de 10,50 nm e raio hidrodinâmico de 35,50 nm, compatível para os FMs formados por NPs cobertas com citrato.

Os resultados obtidos na caracterização dos nanofilmes produzidos podem ser resumidamente descritos como:

- O monitoramento do crescimento dos nanofilmes compostos por magneita e quitosana mostrou um comportamento praticamente linear em função do número de bicamadas, indicando que quantidades iguais de cada componente (partícula e polímero) são adsorvidas em cada bicamada;
- Os espectros Raman obtidos evidenciaram a presença de nanopartículas de óxidos de ferro nos nanofilmes compostas pela fase magnetita;
- As imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas dos nanofilmes, quando comparadas com as dos respectivos controles (substratos), mostraram a presença do filme depositado. Em adição, as superfícies dos nanofilmes obtidos são bastante uniformes;
- Análises detalhadas de imagens de microscopia de força atômica permitiram o estudo das propriedades de morfologia da superfície dos nanofilmes, preparados com diferentes números de bicamadas, bem como o cálculo da espessura dos mesmos;
- Ao depositar-se a primeira bicamada, observa-se a presença das estruturas esféricas que indicam a presença das nanopartículas. Os resultados mostraram que os dois compostos formam a superfície de cada filme sem haver segregação de fase;

- Os nanofilmes formados por quitosana e nanopartículas, apresentaram espessuras na faixa de 5 a 40 nm e crescimento linear em função do número de bicamadas, enquanto que os depositados com PVA apresentaram espessuras na faixa de 3 a 6 nm e apresentaram crescimento irregular;
- Os testes toxicológicos realizados por meio do teste de viabilidade celular *in vitro*, com incubação de 24 horas em nanofilmes depositados sobre substratos de vidro óptico ou celulose bacteriana, não apresentaram toxicidade significativa ao realizar a análise estatística dos resultados do teste do MTT.

Os resultados obtidos e a metodologia desenvolvida para a produção dos nanofilmes que utilizam biopolímeros abrem novas perspectivas para aplicações biomédicas das multicamadas preparadas por meio da técnica de automontagem.

### **5.1 Perspectivas de trabalhos futuros**

Finalmente, como perspectiva de trabalhos futuros, sugere-se:

- investigar a deposição de outros biopolímeros compatíveis com nanopartículas magnéticas;
- implementar o estudo da adsorção dos filmes em substratos de celulose; e
- investigar as condições para desintegração dos nanofilmes e liberação de nanopartículas em meio biológico.

## REFERÊNCIAS

ALCANTARA, G. B. Layer-by-layer assembled cobalt ferrite nanoparticles for chemical sensing. **Journal of Nanofluids**, v. 2, n. 3, p. 175-183, 2013b.

ALCANTARA, et al. Adsorption of cobalt ferrite nanoparticles within layer-by-layer films: a kinetic study carried out using quartz crystal microbalance. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 48, p. 21233-21242, dez. 2011a.

ALCANTARA. et al. Dielectric properties of cobalt ferrite nanoparticles in ultrathin nanocomposite films. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 45, p. 19853-19861, 2013a.

ALCANTARA,. et al. Morphology of cobalt ferrite nanoparticle-polyelectrolyte multilayered nanocomposites. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 323, n. 10, p. 1372-1377, maio 2011b.

ARANDA-SOUZA, M. A. et al. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. **Toxicon**, v. 82, p. 97-103, maio 2014.

BATLLE, X.; LABARTA, A. Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties. **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 35, n. 6, p. R15-R42, mar. 2002.

BERRY, C. C. et al. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v. 24, n. 25, p. 4551-4557, nov. 2003.

BEZERRA. A. M. et al. Prospecção de fonte alternativa de quitosana a partir de *Periplaneta americana*: obtenção e caracterização. **12º Congresso Brasileiro de Polímeros (12ºCBPol)**, set. 2013.

BRUSENTOV, N. A. et al. Magnetic fluid hyperthermia of the mouse experimental tumor. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, n. 1-3, p. 378-380, nov. 2002.

CARNEIRO, M. L. B. et al. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, mar. 2011.

CHARAP, S. H. Magnetic moments in solids. In: BERKOWITZ, A. E.; KNELLER, E. (Eds.). **Magnetism and Metallurgy**. V. 1. New York: Academic Press, 1969.

DAMIAN, C. et al. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, ago. 1997.

DELEZUK, J. A. M. **Produção de quitosanas com características controladas utilizando a irradiação de ultrassom de alta intensidade**. 210f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

DONINI, Í. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, p. 165-178, 2010.

DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. D.; LACAVAL, Z. G. M. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplo de aplicações**. ArtLiber, 2006.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, abr. 15 2009.

FERRARO, J.; NAKAKMOTO, K.; BROWN, C. W. **Introductory Raman spectroscopy**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2002.

GANDINI, A. Monomers, polymers and composites from renewable Resources. **École Française de Papeterie et des Industries Graphiques**, v. 35, n. 4, 2010.

GANDINI.; BELGACEM, M. N. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. El Sevier, 2008.

GUEDES, M. H. A. **Desenvolvimento de um novo sistema de magnetohipertermia para tratamento do câncer e seus efeitos em camundongos**. Tese (Doutorado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília, 2005.

GUIMARÃES, A. P. **Magnetismo e ressonância em sólidos**. São Paulo: EDUSP, 2009a.

GUIMARÃES, A. P **Principles of nanomagnetism**. New York: Springer, 2009b.

GUPTA; R. B.; KOMPELLA, U. B. **Nanoparticle technology for drug delivery**. New York: Taylor & Francis Group, 2006.

HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M. E.; OLIVER, R. T. D. A New approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, n. 1, p. 89-96, mar. 1993.

ISLAM, T.; JOSEPHSON, L. Current state and future applications of active targeting in malignancies using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Cancer Biomarkers**, v. 5, n. 2, p. 99-107, 2009.

JILES, D. **Introduction to the electronic properties of materials**. 2. ed. Reino Unido: Nelson Thornes, 2001.

LAUS, R. et al. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(III) e manganês(II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, v. 29, p. 34-39, 2006.

LETTI, C. J. **Estudo de nanocompósitos formados por partículas de óxidos de ferro e polímeros por meio da espectroscopia Raman**. Dissertação (Mestrado em Física). Instituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

LIQUIDS RESEARCH LIMITED. Disponível em: <<http://www.liquidsresearch.co.uk/>>. Acesso em: 20 fev. 2014.

LOBO, R. F. M. et al. In situ thickness measurements of ultra-thin multilayer polymer films by atomic force microscopy. **Nanotechnology**, v. 10, n. 4, p. 389-393, dez. 1999.

MAGALHÃES, F. **Síntese e caracterização de óxidos de ferro e compósitos para aplicações no tratamento redox de efluentes aquosos**. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química). Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MAHMOUDI, M. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of multiple sclerosis. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 118-140, mar. 2011.

MEI, F. et al. Particle size and magnetic properties dependence on growth temperature for rapid mixed co-precipitated magnetite nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 23, n. 14, p. 145601, 2012.

MORAIS, P. C. et al. Raman investigation of uncoated and coated magnetic fluids. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 104, n. 13, p. 2894-2896, abr. 2000.

MORAIS, P. C. MORAI, P. C. et al. Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles. **Thin Solid Films**, v. 515, n. 1, p. 266-270, set. 2006.

NEUMANN, R. F. et al. Morphology and magnetism of multifunctional nanostructured gamma-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> films: simulation and experiments. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 347, p. 26-32, dez. 2013.

PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **J. Phys. D: Appl. Phys.**, v. 36, p. R167-R181, 2003.

PATERNO, L. G. et al. Fabrication and characterization of nanostructured conducting polymer films containing magnetic nanoparticles. **Thin Solid Films**, v. 517, n. 5, p. 1753-1758, 2009a.

PATERNO, L. G. et al. Layer-by-layer assembly of bifunctional nanofilms: surface-functionalized maghemite hosted in polyaniline. **The Journal of Physical Chemistry C.**, v. 113, n. 13, p. 5087-5095, abr. 2009b.

PATERNO, L. G. et al. Magnetic nanocomposites fabricated via the layer-by-layer approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 4, p. 2679-2685, abr. 2010.

PATERNO, L. G. et al. Tuning of magnetic dipolar interactions of maghemite nanoparticles embedded in polyelectrolyte layer-by-layer films. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 8, p. 6672-6678, ago. 2012.

MATTOSO, H. L. C.; DE OLIVEIRA, O. N. Ultrathin polymer films produced by the self-assembly technique: Preparation, properties and applications. **Quimica Nova**, v. 24, n. 2, p. 228-235, mar./abr. 2001.

SOLER, M. A. G. Layer-by-layer enabled nanomaterials for chemical sensing and energy conversion. **JOM**, v. 65, n. 6, p. 709-719, jun. 2013.

PAVINATO, F. J. **Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LBL)**. 163f. Tese (Doutorado). Instituto de Física, Instituto de Química, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.

PECORARO, É. et al. Chapter 17 - Bacterial cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Eds.). **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam: Elsevier, 2007.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiol Rev**, v. 55, n. 1, p. 35-58, mar. 1991.

RUBY, C. et al. Coprecipitation of Fe(II) and Fe(III) cations in sulphated aqueous medium and formation of hydroxysulphate green rust. **Solid State Sciences**, v. 5, n. 7, p. 1055-1062, 2003.

RUSSEL, W. B.; SCHOWALTER, W. R.; SAVILLE, D. A. **Colloidal dispersions**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. Editora Unesp, 1996.

SANTANA, J. F. B. et al. Investigation of the interaction between magnetic nanoparticles surface-coated with carboxymethyldestran and blood cells using Raman spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 452-454, 2005.

SHEBANOVA, O. N.; LAZOR, P. Raman spectroscopic study of magnetite (FeFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>): a new assignment for the vibrational spectrum. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 174, n. 2, p. 424-430, 2003.

SHINKAI, M. Functional magnetic particles for medical application. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 606-613, Dec 2002.

SILVA, S. W. et al. Stability of citrate-coated magnetite and cobalt-ferrite nanoparticles under laser irradiation: A Raman spectroscopy investigation. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 39, n. 5, p. 2645-2647, set. 2003.

SINGH, A.; SAHOO, S. K. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 4, p. 474-481, abr. 2014.

SMITH, E.; DENT, G. Modern Raman spectroscopy: a practical approach **John Wiley & Sons LtdA./The Atrium**, 2005.

SOLER, M. A. G. et al. Interaction of erythrocytes with magnetic nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, p. 1069-1071, 2007a.

SOLER, M. A. G. et al. Study of molecular surface coating on the stability of maghemite nanoparticles. **Surface Science**, v. 601, n. 18, p. 3921-3925, set. 2007b.

SOLER, M. A. G. ; FANYAO, Q. Raman spectroscopy of iron oxide nanoparticles. In: KUMAR, C. S. S. R. (Ed.). **Raman spectroscopy of nanomaterials characterization**. Berlin: Springer, 2012.

SOLER, M. A. G. et al. Superparamagnetic iron oxides. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 23, p. 513-532, 2011a.

SOLER, M. A. G. et al. Spectroscopic study of maghemite nanoparticles surface-grafted with DMSA. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, n. 6, p. 1003-1008, fev. 2011b.

SOLER, M. A. G. et al. Structural stability study of cobalt ferrite-based nanoparticle using micro Raman spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272, p. 2357-2358, maio 2004.

SOLER, M. A. G. et al. Assembly of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/polyaniline nanofilms with tuned dipolar interaction. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 3, p. 1-10, set. 2012a.

SOLER, M. A. G et al. Layer-by-layer assembly of magnetic nanostructures. **J. Nanofluids**, v. 1, p. 101-119, 2012b.

STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentlas and applications**. John Wiley & Sons, 2004.

SU, X. F. et al. Layer-by-layer-assembled multilayer films for transcutaneous drug and vaccine delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 11, p. 3719-3729, nov. 2009.

THÜNEMANN, A. F. et al. Maghemite nanoparticles protectively coated with poly(ethylene imine) and poly(ethylene oxide)-block-poly(glutamic acid). **Langmuir**, v. 22, n. 5, p. 2351-2357, jan. 2006.

VIALI, W. R. et al. Investigation of the molecular surface coating on the stability of insulating magnetic oils. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 1, p. 179-188, jan. 2010.

WANDEL, S. et al. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis. **British Medical Journal**, v. 341, set. 2010.

WANG, D. L., B.; AI, H. Theranostic nanoparticles for cancer and cardiovascular applications. **Pharm Res.**, v. 31, p. 1390-1406, 2014.

WANG, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. **Analyst**, v. 130, n. 4, p. 421-426, 2005.

WHITE, W. B.; DEANGELIS, B. A. Interpretation of the vibrational spectra of spinels. **Spectrochimica Acta Part A: molecular spectroscopy**, v. 23, n. 4, p. 985-995, 1967.

YOO, D. et al. Theranostic magnetic nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 863-874, out. 2011.

YOUNG, H. D.; FREEDMAN, R. A. **Física 3 - Eletromagnetismo**. Pearson Brasil, 2008.

ZAMORA-MORA, V. et al. Magnetic core-shell chitosan nanoparticles: rheological characterization and hyperthermia application. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 691-698, fev. 2014.

ZEPON, K. M. et al. Influência do pH nas propriedades físico-químicas, térmicas e mecânicas de filmes de poli(vinil álcool)/poli(ácido acrílico)/aciclovir. **Química Nova**, v. 36, p. 215-219, 2013.