

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Física Gleb Wataghin**

Dissertação de mestrado

**Síntese e caracterização de nanopartículas
de óxidos de ferro para aplicações biomédicas**

Tatiana Midori Martins Telles Alves

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Knobel

Co-orientadora: Dra. Daniela Zanchet

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Marcelo Knobel – DFMC/IFGW/UNICAMP

Prof. Dr. Antonio Domingues dos Santos – IF/USP

Prof. Dr. Oscar Ferreira de Lima – DFMC/IFGW/UNICAMP

Dissertação apresentada ao Instituto de Física “Gleb Wataghin” da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Física.

Campinas, Setembro de 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP**

AL87s	Alves, Tatiana Midori Martins Telles Síntese e caracterização de nanopartículas de óxidos de ferro para aplicações biomédicas / Tatiana Midori Martins Telles Alves. -- Campinas, SP : [s.n.], 2007. Orientadores: Marcelo Knobel e Daniela Zanchet. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física "Gleb Wataghin". 1. Óxidos de ferro - Aplicações biomédicas. 2. Nanopartículas – Aplicações biomédicas. 3. Nanomagnetismo. I. Knobel, Marcelo. II. Zanchet, Daniela. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin". IV. Título. (vsv/ifgw)
-------	---

- **Título em inglês:** Synthesis and characterization of iron oxides nanoparticles for biomedical applications
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
 - 1. Iron oxides – Biomedical applications
 - 2. Nanoparticles – Biomedical applications
 - 3. Nanomagnetism
- **Área de concentração:** Física da Matéria Condensada
- **Titulação:** Mestre em Física
- **Banca examinadora:**
 - Prof. Marcelo Knobel
 - Prof. Antonio Domingues dos Santos
 - Prof. Oscar Ferreira de Lima
- **Data da defesa:** 04.09.2007
- **Programa de Pós-Graduação em:** Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE MESTRADO DE **TATIANA MIDORI MARTINS TELLES ALVES – RA 049325** APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 04 / 09 / 2007.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Marcelo Knobel (Orientador da Candidata) –
DFMC/IFGW/UNICAMP

Prof. Dr. Antonio Domingues dos Santos – IF/USP

Prof. Dr. Oscar Ferreira de Lima – DFMC/IFGW/UNICAMP

Para meus pais, Ana e Ademir.

Para Ivens, meu amor.

Agradecimentos

Aos meus pais, Ana e Ademir, por tudo.

Ao meu marido, Ivens, pelo amor, apoio e paciência, sempre.

A Marcelo Knobel e Daniela Zanchet, pela orientação e confiança.

A Paula, pela parceria, amizade, apoio e inúmeras risadas.

Aos amigos do LMBT, Carlos, Elvis, Natália, Maurício, Felipe, Maia, Ana, Leandro, Cristiano, Wallace, Gerivaldo e Emílio, pelos momentos de descontração, inúmeros ensinamentos e discussões frutíferas. À Célia, Cleusa e Valter, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos do LSQ, Suzana, Cristiane, Daniela, Maura, Túlio, Edvaldo, Herbert, Andréia, Roberto, Fábio Zambello, Simone, Fábio Furlan e Guinther, pelas orientações, ajuda, apoio e muitos dados.

Aos doutores da FCM, Li Li Min, Lília de Souza Li, Konradin Metze e Randall Luis Adam, pelos dados dos testes biomédicos.

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação do IFGW, Maria Ignez, Armando e Cássia, pela ajuda com as burocracias.

Ao LNLS e LMBT, pela oportunidade e inúmeros recursos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Resumo

Neste trabalho são realizados estudos de propriedades morfológicas, estruturais e magnéticas de nanopartículas de óxidos de ferro sintetizadas por métodos químicos. Procuramos relacionar os parâmetros de síntese às características das partículas produzidas com a finalidade de melhorar sua qualidade em relação às amostras comerciais e avaliar sua aplicabilidade em biomedicina.

Foram adotados os métodos de síntese por co-precipitação de sais em solução aquosa e de decomposição térmica de dois diferentes precursores organometálicos: acetilacetato de ferro III ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) e ferro pentacarbonil ($\text{Fe}(\text{CO})_5$). Para caracterização desses sistemas, foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão convencional e de alta resolução, microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo, difração de raios-X e medidas de magnetização, além de experimentos de transfecção em células HeLa e posterior detecção por imagens de ressonância magnética.

Os estudos mostraram que as partículas sintetizadas por co-precipitação não apresentam muitas vantagens em relação às amostras comerciais, pois possuem larga distribuição de tamanhos. Através da síntese por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, partículas com distribuição mais estreita foram produzidas e resultados positivos de incorporação por células HeLa e detecção por imagens de ressonância magnética foram obtidos. Com as partículas geradas pela decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ foram realizados tratamentos térmicos em atmosfera ambiente que proporcionaram aumento do grau de cristalização, aumento do diâmetro médio e estabilização de suas propriedades magnéticas, em detrimento da perda dos contornos esféricos e aumento na dispersão de tamanhos.

De uma maneira geral, foi possível demonstrar que a decomposição térmica de compostos organometálicos em solventes orgânicos produz partículas mais homogêneas em relação às aquelas produzidas por co-precipitação e às comercialmente disponíveis, e essa qualidade apresenta um grande potencial para aplicações biomédicas mais sofisticadas.

Abstract

In this work, morphological, structural and magnetic investigations were performed in iron oxide nanoparticles synthesized by chemical methods. Our goal was to correlate the synthesis parameters to the characteristics of the produced particles to improve their quality when compared to commercial samples and to evaluate their applicability in biomedicine.

The synthetic methods were the co-precipitation of metal salts in aqueous solution and the thermal decomposition of two different organometallic precursors: iron (III) acetylacetonate ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) and iron pentacarbonyl ($\text{Fe}(\text{CO})_5$). The following techniques were used for the characterization of these systems: transmission electron microscopy, high resolution transmission electron microscopy, field emission gun scanning electron microscopy, X-ray diffraction and magnetic measurements, in addition to incorporation experiments by HeLa cells and their detection by magnetic resonance imaging.

The studies showed that nanoparticles synthesized by the co-precipitation method present no advantage over the commercial samples, once they have the same broad size distribution. Through thermal decomposition of $\text{Fe}(\text{acac})_3$, particles with narrower size distribution were produced and positive results on their incorporation by HeLa cells and magnetic resonance imaging detection were obtained. Thermal treatments under air atmosphere were performed in the particles generated by thermal decomposition of $\text{Fe}(\text{CO})_5$, giving rise to crystallization, an increase of the mean diameter and stabilization of their magnetic properties, with the disadvantages of loss of the spherical shape and increase of the size dispersion.

In summary, it was possible to demonstrate that thermal decomposition of organometallic compounds in hot organic solvents produces more homogeneous particles when compared with those produced by co-precipitation and commercially available ones, and this quality presents great potential for more sophisticated biomedical applications.

Lista de figuras

1.1: Esquema do acoplamento ferromagnético de spins no interior de uma NP e analogia com um único grande momento magnético total.	3
1.2: Esquema de um NP na ausência de campo magnético aplicado com anisotropia efetiva uniaxial K , momento magnético μ a um ângulo θ em relação ao eixo fácil e respectiva energia livre.....	4
1.3: Esquema de um sistema de NPs (a) em regime bloqueado e (b) em regime superparamagnético.....	6
1.4: Exemplos de curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado (a) para um material massivo ferromagnético ou um material granular bloqueado e (b) para um material em regime superparamagnético.....	7
1.5: Exemplos de curvas ZFC e FC de magnetização em função da temperatura para um sistema de NPs com anisotropia uniaxial, não interagentes e com distribuição de tamanhos.	11
1.6: Esquemas de NPs (a) recobertas por moléculas de ligante e (b) com moléculas biologicamente ativas para funcionalização da superfície.	13
1.7: (a) Marcação celular não-específica por internalização de NPs recobertas com ligantes catiônicos e (b) marcação celular específica de NPs funcionalizadas com anticorpos que se ligam aos receptores da célula-alvo.....	15

1.8: Ilustração de ressonância magnética para um grande conjunto de prótons com momento magnético líquido m na presença de um campo magnético externo B_0 . Em (a), o momento líquido precessiona ao redor de B_0 na frequência característica de Larmor, ω_0 . Em (b), um segundo campo externo é aplicado, perpendicular a B_0 , oscilando em ω_0 . Apesar de ser muito mais fraco que B_0 , ele tem o efeito de excitar ressonantemente o momento de precessão no plano perpendicular a B_0 . Em (c) e (d), o campo oscilante é removido no tempo zero e as amplitudes dos momentos (c) no plano e (d) longitudinal relaxam de volta a seus valores iniciais	16
1.9: Imagens de MRI ponderadas em T_2 de fígado de coelho (a) antes e (b) após a incorporação de NPs de óxidos de ferro injetadas através da circulação sanguínea	17
1.10: Esquema do procedimento de carregamento de drogas utilizando NPs magnéticas e um gradiente externo de campo magnético.	18
2.1: Arranjo experimental utilizado nas sínteses de NPs: (1) balão de reação, (2) agitador magnético, (3) rolhas para vedação, (4) seringa para adição dos reagentes, (5) termopar conectado ao controlador de temperatura, (6) manta aquecedora, (7) condensador, (8) fluxo de água para resfriar o condensador, (9) linha de vácuo/nitrogênio.....	24
3.1: (a) FEG-SEM e (b) TEM da amostra <i>Iron (III) Oxide Nanopowder</i> [®] da Aldrich.	35
3.2: (a) Medidas de magnetização ZFC/FC e (b) em função do campo magnético aplicado da amostra <i>Iron (III) Oxide Nanopowder</i> [®] da Aldrich.	36
3.3: Microscopia ótica de células HeLa coradas com Azul da Prússia após incorporação da amostra <i>Iron (III) Oxide Nanopowder</i> [®] da Aldrich. Os círculos e setas indicam células individuais coradas devido à presença de NPs em seu interior.	37
3.4: (a) Placa de cultura utilizada para os testes de detecção por MRI da amostra <i>Iron (III) Oxide Nanopowder</i> [®] da Aldrich: (b) e (c) fundo de agarose; (d) e (e) células HeLa em agarose após a incorporação das NPs.	38

4.1: Esquemas das sínteses de NPs por co-precipitação.	41
4.2: XRD das duas amostras sintetizadas pelo método da co-precipitação.	42
4.3: (a) Medidas de magnetização ZFC/FC e (b) em função do campo magnético aplicado da amostra CP1	43
5.1: Esquema da síntese de NPs pelo método de decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$	47
5.2: Esquema da troca de ligantes.	48
5.3: Teste de solubilidade (a) antes e (b) depois da troca de ligantes.	49
5.4: Imagens de TEM das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$	49
5.5: XRD das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$	50
5.6: (a) Medidas de magnetização ZFC/FC e (b) em função do campo magnético aplicado das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ antes da troca de ligantes.	51
5.7: Valores de anisotropia efetiva K e distribuição de diâmetros obtidos através das curvas ZFC/FC e sua relação com os diâmetros médios estimados por TEM para as amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ antes da troca de ligantes.	52
5.8: (a) Medidas de magnetização ZFC/FC e (b) em função do campo magnético aplicado da amostra DT1 antes e depois da troca de ligantes e após envelhecimento em atmosfera ambiente.	54
5.9: Valores de anisotropia efetiva K e distribuição de diâmetros obtidos através das curvas ZFC/FC e sua relação com o diâmetro médio de 5 nm estimado por TEM para a amostra DT1 antes e depois da troca de ligantes.	55

5.10: Imagem de TEM de célula HeLa após a incorporação das NPs da amostra DT2	56
5.11: Curvas de incorporação das amostras DT1 e DT2 por células HeLa.	57
5.12: Testes de MRI da amostra DT2 : (a) células HeLa em agarose, (b) NPs em agarose, (c) células HeLa com NPs incorporadas, (d) e (e) fundo de agarose.	58
6.1: Esquema da síntese de NPs pelo método da decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$	62
6.2: (a) Imagem de TEM e (b) difratograma da amostra original	63
6.3: Estudo do envelhecimento da amostra original quando armazenadas sob atmosfera ambiente através de medidas de magnetização em função do campo magnético aplicado.	64
6.4: XRD das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente a 100°C, 150°C e 300°C por diferentes intervalos de tempo.	65
6.5: FEG-SEM das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.	66
6.6: TEM das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.	67
6.7: Distribuições de tamanhos obtidas utilizando o programa computacional <i>GATAN</i> com base nas imagens de TEM das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.	68
6.8: HRTEM das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.	69

6.9: Medidas de magnetização ZFC/FC das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.	70
6.10: Valores de anisotropia efetiva K e distribuição de diâmetros obtidos através das curvas ZFC/FC e sua relação com a distribuição de tamanhos obtida por TEM para as amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.	72
6.11: Medidas de magnetização em função do campo magnético aplicado das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.	73
6.12: Estudo do envelhecimento das amostras quando armazenadas sob atmosfera ambiente através de medidas de magnetização em função do campo magnético aplicado para as amostras original e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.	74

Figuras de apêndices

I.1: Arranjo dos íons metálicos em sítios tetraédricos (A) e octaédricos (B) na estrutura espinélio (AB_2O_4) apresentada pela magnetita e maghemita	81
I.2: Difrátogramas padrão dos óxidos de ferro magnetita (Fe_3O_4 , JCPDS 85-1436), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, JCPDS 39-1346) e hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, JCPDS 87-1166) em estado massivo. Vemos que é difícil distinguir entre magnetita e maghemita devido a suas estruturas cristalinas similares.	82

Lista de tabelas

5.1: Valores estimados por TEM, XRD e pelos ajustes das curvas $M(H)$ para os diâmetros médios das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $Fe(acac)_3$	54
---	----

Lista de siglas

NP	Nanopartícula
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
HRTEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (do inglês <i>High Resolution Transmission Electron Microscopy</i>)
FEG-SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura com Canhão de Emissão de Campo (do inglês <i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy</i>)
XRD	Difração de Raios-X (do inglês <i>X-Ray Diffraction</i>)
SQUID	Dispositivo Supercondutor de Interferência Quântica (do inglês <i>Superconducting Quantum Interference Device</i>)
ZFC	Resfriamento a Campo Nulo (do inglês <i>Zero Field Cooling</i>)
FC	Resfriamento com Campo (do inglês <i>Field Cooling</i>)
MRI	Imagens por Ressonância Magnética (do inglês <i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
RES	Sistema Retículo-Endotelial

Índice

1. Introdução	1
1.1 Nanopartículas magnéticas	1
1.2 Propriedades magnéticas de NPs	3
1.3 Aplicações biomédicas de NPs	12
1.4 Organização da dissertação	19
Referências	20
 2. Abordagem do problema	 23
2.1 Síntese coloidal	23
2.1.1 Co-precipitação controlada	25
2.1.2 Decomposição térmica	26
2.1.3 Funções e efeitos do ligante	27
2.2 Técnicas de caracterização	28
2.2.1 Caracterização morfológica	28
2.2.2 Caracterização estrutural	29
2.2.3 Caracterização magnética	31
2.3 Testes biomédicos	31
Referências	32
 3. Amostras comerciais	 34
3.1 Caracterização	35
3.2 Discussão	38
Referências	39
 4. Co-precipitação	 40
4.1 Preparação das amostras	40
4.2 Caracterização	42
4.3 Discussão	44
Referências	44

5. Decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$	46
5.1 Preparação das amostras	46
5.2 Caracterização	49
5.3 Testes biomédicos	56
5.4 Discussão	58
Referências	59
 6. Decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$	 61
6.1 Preparação das amostras	61
6.2 Caracterização	62
6.3 Discussão	75
Referências	76
 Conclusões e perspectivas	 77
 Apêndice I	 80
Óxidos de ferro	80
Referências	82
 Apêndice II	 83
Artigos publicados ou submetidos	83

1 Introdução

Neste trabalho foram estudados sistemas de nanopartículas (NPs) magnéticas visando suas possíveis aplicações em biomedicina. Sendo assim, descreveremos brevemente neste capítulo algumas características sobre NPs, seu comportamento magnético e as principais aplicações biomédicas para as quais esses sistemas se mostram apropriados.

1.1 Nanopartículas magnéticas

NPs magnéticas são sistemas formados por grãos da ordem de nanômetros ($\sim 10^{-9}$ m) que, por encontrarem-se entre o estado molecular e o massivo, possuem propriedades físicas e químicas bastante diferentes e ajustáveis, fortemente dependentes do tamanho, morfologia e estrutura. As principais características das NPs magnéticas responsáveis por torná-las foco de tanto interesse são a formação de monodomínios magnéticos, a existência de grande área superficial em relação ao volume e a possibilidade de recobri-las com diversos tipos de ligantes específicos.

Diferentemente dos materiais massivos, que geralmente se dividem em múltiplos domínios magnéticos para diminuir a energia magnetoestática, as NPs menores que um dado tamanho crítico passam a constituir um único domínio magnético. Isso acontece porque, conforme as dimensões das partículas são reduzidas, o tamanho dos domínios também diminui, modificando a estrutura e a largura das paredes que os delimitam. Porém, abaixo de certo limite, o decréscimo na energia devido à formação de múltiplos domínios passa a ser menor do que o aumento na energia devido à formação das paredes de domínio, tornando-se portanto um processo não vantajoso do ponto de vista energético. Abaixo desse diâmetro crítico D_C , os monodomínios constituem a configuração mais favorável para as NPs [1]. Para os óxidos de ferro magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), por exemplo, monodomínios são formados em partículas de 5–20 nm de diâmetro [2].

Além disso, com a diminuição no tamanho da partícula, uma fração cada vez maior dos átomos que a compõem localiza-se em sua superfície, tornando seu papel cada vez mais relevante. Esses átomos possuem uma vizinhança bem diferente da dos átomos do interior da partícula, e assim podem afetar as propriedades físicas e magnéticas do material. Essa grande razão área superficial:volume das NPs é uma característica vantajosa para torná-las funcionais ou para sua utilização no transporte de substâncias, como veremos em outras sessões deste trabalho.

A percepção de que essas características se refletem em propriedades únicas, principalmente em relação às propriedades magnéticas, gerou motivações para investir esforços nas inúmeras aplicações possíveis [3], tanto científicas quanto tecnológicas, dentre as quais podemos citar as áreas de catálise, gravação magnética e várias aplicações biomédicas, brevemente detalhadas na seção “1.3 – Aplicações biomédicas” adiante.

O desempenho desses materiais será totalmente dependente de seus recobrimentos, suas propriedades físicas e químicas, que por sua vez são extremamente dependentes do método de síntese escolhido para sua preparação. O controle de tamanho, forma, distribuição, cristalinidade e, conseqüentemente, das propriedades magnéticas das NPs é desejável para uniformizar os parâmetros físicos envolvidos e, dentro do possível, tornar mais simples prever e modelar o comportamento desses sistemas complexos.

1.2 Propriedades magnéticas de NPs

Partículas nanométricas constituídas por um único domínio possuem um comportamento magnético especial e característico conhecido como superparamagnetismo [4]. O termo superparamagnetismo é usado para inferir uma analogia entre o comportamento do pequeno momento magnético de um único átomo paramagnético e o de um momento magnético muito maior de uma partícula nanométrica que surge do acoplamento ferromagnético de muitos spins atômicos no monodomínio, como esquematizado na Figura 1.1.

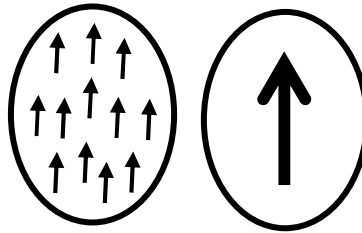


Figura 1.1: Esquema do acoplamento ferromagnético de spins no interior de uma NP e analogia com um único grande momento magnético total.

Além disso, como veremos a seguir, em dimensões tão pequenas, outra característica que se torna importante é a influência da energia de anisotropia, que é a energia que determina a direção preferencial da magnetização da NP, e pode ter origem magnetocristalina, de forma, de superfície ou de tensão mecânica.

Sendo assim, consideremos uma NP monodomínio com densidade de anisotropia efetiva uniaxial K , volume V e momento magnético $\vec{\mu}$ na ausência de campo magnético aplicado, como ilustrado na Figura 1.2.

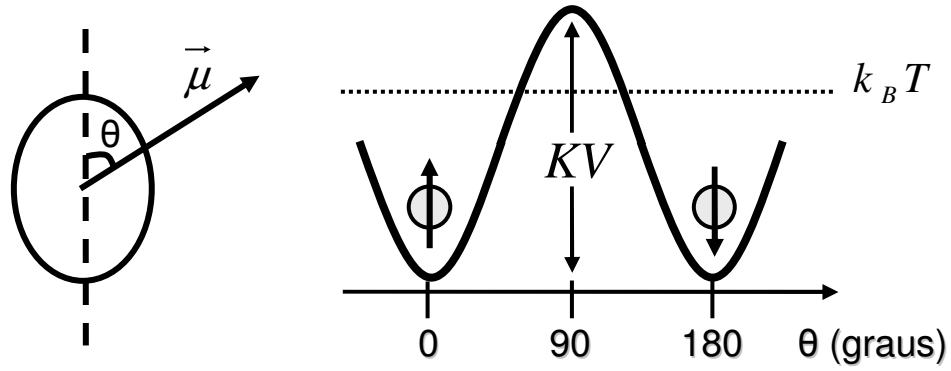


Figura 1.2: Esquema de um NP na ausência de campo magnético aplicado com anisotropia efetiva uniaxial K , momento magnético μ a um ângulo θ em relação ao eixo fácil e respectiva energia livre.

Nesse caso, a energia livre total é [5]:

$$E = KV \sin^2 \theta \quad (1.1)$$

A barreira de energia entre as direções de fácil magnetização correspondentes a $\theta = 0$ e $\theta = \pi$ é proporcional à magnitude de K e ao volume V da partícula. Portanto, espera-se que a redução nas dimensões das partículas levem a um decréscimo na energia de barreira até o ponto no qual, abaixo de um tamanho crítico, ela se torne comparável ou até mesmo menor que a energia térmica $k_B T$, sendo $k_B = 1,3806503 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ a constante de Boltzmann e T a temperatura do sistema. Sob essas condições, a barreira de energia pode ser superada e o momento magnético total da partícula fica livre para reverter entre as direções de fácil magnetização, correspondentes aos mínimos de energia. Nesse caso, não é a partícula em si que rotaciona, e sim os spins acoplados que rotacionam coerentemente dentro da partícula, como um momento magnético gigante flutuante.

O tempo de relaxação característico de salto entre os dois mínimos, é dado por [5]:

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right) \quad (1.2)$$

sendo o termo τ_0 estimado por Néel aproximadamente uma constante da ordem de 10^{-9} s para o caso de anisotropia uniaxial e $KV \gg k_B T$.

É importante ressaltar aqui que o comportamento desses sistemas depende também da escala de tempo t_m necessária para realizar a medida magnética. Para medidas magnéticas convencionais, geralmente se utiliza $t_m = 100$ s. Assim, se $\tau \gg t_m$, o momento magnético da partícula não varia com o tempo durante a medida, e diz-se que ela está em um estado ferromagnético estável, ou seja, em um regime bloqueado. Se $\tau \ll t_m$, as flutuações térmicas do momento magnético durante o tempo do experimento resultam em um momento magnético líquido nulo na ausência de campo magnético aplicado, e então se diz que a partícula está no regime superparamagnético.

Fazendo $\tau = t_m$ na equação (1.2), define-se a temperatura de bloqueio T_B que delimita esses dois regimes para um dado tamanho de partícula:

$$T_B \cong \frac{KV}{25k_B} \quad (1.3)$$

ou, para uma dada temperatura, o volume crítico V_C abaixo do qual a partícula encontra-se no regime superparamagnético:

$$V_C \cong \frac{25k_B T}{K} \quad (1.4)$$

Quanto menor a partícula, menor será a temperatura de bloqueio e, na existência de uma distribuição de tamanhos de partículas, correspondente à maioria dos casos reais, conseqüentemente haverá uma distribuição de temperaturas de bloqueio.

A Figura 1.3 resume as condições para os dois regimes.

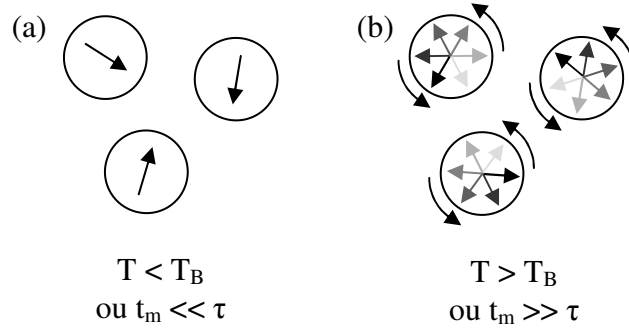


Figura 1.3: Esquema de um sistema de NPs (a) em regime bloqueado e (b) em regime superparamagnético.

Consideremos agora esse mesmo sistema na presença de um campo magnético H aplicado ao longo do eixo de fácil magnetização. A energia livre total passa a ser [5]:

$$E = KV \sin^2 \theta - \mu H \cos \theta \quad (1.5)$$

Nessas condições, os estados de mínima energia não são mais equivalentes, pois um deles será favorecido dependendo do sentido de aplicação do campo magnético, induzindo alguns dos momentos magnéticos de partículas a se reorientarem em sua direção. Assim é medida uma magnetização líquida M não nula para o sistema e o grau de reorientação aumenta com o aumento na intensidade do campo até que, quando todos os momentos magnéticos estão orientados, a magnetização de saturação M_0 é atingida.

Para um conjunto de NPs não interagentes em regime superparamagnético, ou seja, $KV \ll k_B T$ e a influência da anisotropia é irrelevante, o comportamento da amostra na presença de um campo magnético é regido pela lei de Langevin [5]:

$$\frac{M}{M_0} = \coth\left(\frac{\mu H}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{\mu H} = L\left(\frac{\mu H}{k_B T}\right) \quad (1.6)$$

Em materiais massivos ferromagnéticos, a estrutura de múltiplos domínios e as interações entre eles fazem com que, após a aplicação de um campo magnético, exista um valor não nulo para a magnetização, mesmo após a retirada do campo. Esse valor é denominado magnetização

remanente ou remanência (M_R) e, para que ela se anule, é necessário a aplicação de outro campo magnético em sentido contrário, cujo valor é denominado campo coercivo ou coercividade (H_C). Esse tipo de comportamento é o que se observa em sistemas granulares em regime bloqueado e encontra-se exemplificado na Figura 1.4 (a). Em regime superparamagnético, por outro lado, há ausência de histerese ($H_C = 0$ e $M_R = 0$), como exemplificado na Figura 1.4 (b).

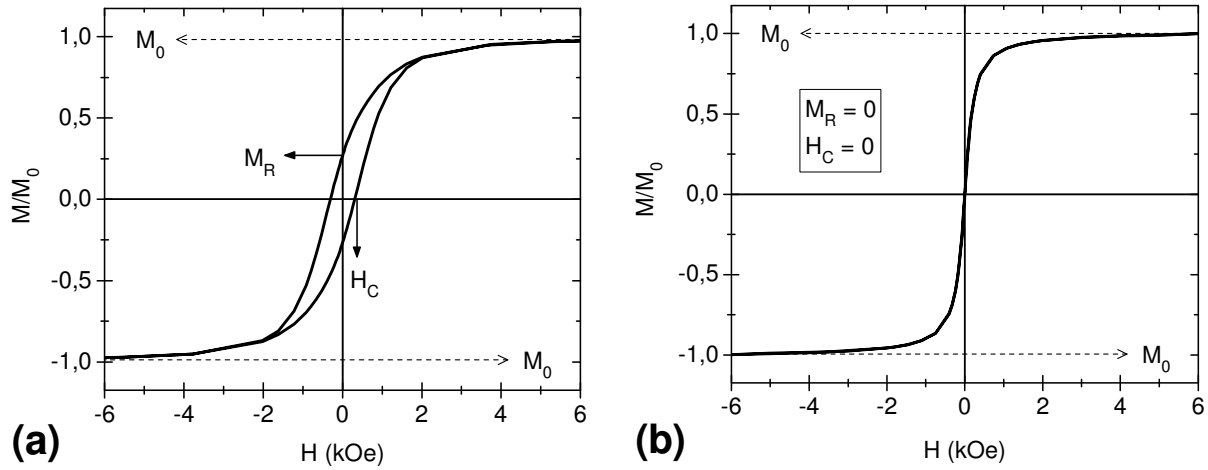


Figura 1.4: Exemplos de curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado (a) para um material massivo ferromagnético ou um material granular bloqueado e (b) para um material em regime superparamagnético.

Neste trabalho, para estimar os valores de magnetização de saturação M_0 das amostras analisadas, fazemos a extrapolação linear da abscissa em um gráfico de $M \times H^{-1}$ para $H \rightarrow \infty$.

É bom lembrar que, para uma distribuição de tamanhos de partículas, a curva de magnetização macroscópica será resultado da superposição de diferentes curvas de Langevin correspondentes aos diferentes volumes existentes na amostra analisada. Nesse caso, a magnetização será dada por:

$$M(H, T) = \int_0^\infty \mu L\left(\frac{\mu H}{k_B T}\right) f(\mu) d\mu \quad (1.7)$$

sendo $f(\mu)$ a função de distribuição de momentos magnéticos dos grãos na amostra, que, em sistemas reais, é geralmente bem representada por uma distribuição log-normal:

$$f_{\lognormal}(\mu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{1}{\sigma\mu} \exp\left(-\frac{\ln^2(\mu/\mu_0)}{2\sigma^2}\right) \quad (1.8)$$

ou gaussiana:

$$f_{gauss}(\mu) = \frac{1}{\sigma\sqrt{\pi/2}} \exp\left(-2\frac{(\mu-\mu_0)^2}{\sigma^2}\right) \quad (1.9)$$

Sabendo que [5]:

$$\mu = M_0 V \quad (1.10)$$

esta distribuição de momentos magnéticos pode ser adequadamente transformada em uma distribuição de diâmetros $f(D)$ e ser comparada àquelas fornecida por outras técnicas de caracterização, como a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), por exemplo (veja seção 2.2.1 – Caracterização morfológica).

A M_0 depende da temperatura e também das características da superfície das NPs. Em geral, devido a uma “camada morta” gerada por um ambiente assimétrico dos átomos da superfície, há um efeito de inclinação oblíqua nesses spins que aumenta com o decréscimo da temperatura e do tamanho da partícula. A curvatura da superfície das NPs é muito maior em partículas menores, o que pode gerar uma região de desorientação cristalina e defeitos na superfície e então resultar em um decréscimo significativo na M_0 [6, 7]. Conseqüentemente, valores de M_0 em materiais nanoestruturados são geralmente menores daqueles em materiais massivos, que chamaremos aqui de M_S . Para NPs de magnetita, por exemplo, é comum observar valores de $M_0 = 30\text{--}60$ emu/g [8], enquanto $M_S = 92\text{--}100$ emu/g em magnetita massiva [9].

A equação de Langevin, no caso de baixos campos magnéticos ou altas temperaturas, pode ser expandida na forma:

$$L(\alpha) = \frac{\alpha}{3} - \frac{\alpha^3}{45} + \frac{2\alpha^5}{945} - \dots \quad (1.11)$$

e, como $\alpha \rightarrow 0$, pode-se considerar apenas o primeiro termo da expansão e teremos:

$$M = \frac{M_0 \mu H}{3k_B T} \quad (1.12)$$

$$\chi_{SP} = \frac{dM}{dH} = \frac{M_0 \mu}{3k_B T} = \frac{M_0^2 V}{3k_B T} \quad (1.13)$$

sendo χ_{SP} a susceptibilidade magnética inicial do sistema, para regime superparamagnético. Esse resultado particular da lei de Langevin é a conhecida lei de Curie [5], através da qual vemos diretamente que a susceptibilidade é inversamente proporcional à temperatura, para sistemas não interagentes e baixos campos magnéticos.

Para sistemas em regime bloqueado ($T \rightarrow 0$ K), a susceptibilidade magnética inicial é dada por Wohlfarth [10]:

$$\chi_{BL} = \frac{M_0^2}{3K} \quad (1.14)$$

Em estudos com sistemas granulares, é comum medir a susceptibilidade inicial dos sistemas em função da temperatura através de uma curva de magnetização característica denominada *zero field cooling* (ZFC). Nesse procedimento, a amostra é desmagnetizada a uma temperatura bem acima da temperatura de bloqueio média $\bar{T}_B$ da amostra de modo que todos os momentos magnéticos fiquem orientados aleatoriamente. Em seguida, na ausência de campo magnético, a amostra é resfriada a uma temperatura bem abaixo da temperatura de bloqueio média e então, com a aplicação de um campo magnético de baixa intensidade, a magnetização é medida enquanto a temperatura se eleva. Conforme os momentos magnéticos aleatoriamente orientados vão sendo desbloqueados, eles se alinham ao campo e contribuem para o aumento da magnetização. A partir daí, a energia térmica é suficiente para que os momentos magnéticos entrem em regime superparamagnético e a magnetização decresce de modo inversamente proporcional à temperatura, conforme dita a lei de Curie. Um exemplo de curva ZFC encontra-se na Figura 1.5.

Nesse caso em que se considera um sistema de partículas não-interagentes e eixos de fácil magnetização orientados aleatoriamente, a susceptibilidade inicial total é dada pela soma das contribuições das partículas em regime superparamagnético e das partículas bloqueadas, ponderadas por uma função de distribuição apropriada:

$$\chi_{ZFC}(T) = \frac{M_{ZFC}}{H} = \underbrace{\left(\frac{M_0^2}{3k_B T} \right) \int_0^{V_c(T)} V^2 f(V) dV}_{\text{NPs superparamagnéticas}} + \underbrace{\left(\frac{M_0^2}{3K} \right) \int_{V_c(T)}^{\infty} V f(V) dV}_{\text{NPs bloqueadas}} \quad (1.15)$$

sendo $f(V)$ a distribuição de volumes da amostra.

A curva de magnetização *field cooling* (FC) complementa a curva ZFC. Ela é obtida de forma semelhante, mas o resfriamento da amostra é feito com campo magnético aplicado, de intensidade igual àquela utilizada para medir a ZFC, de modo que agora os momentos magnéticos das partículas são congelados parcialmente orientados ao campo. Assim, em regime superparamagnético as curvas coincidem. A diferença está no fato de que, em regime bloqueado, por estarem parcialmente alinhados, os momentos magnéticos contribuem mais e com valor de magnetização dado por $\chi_{SP}(T_B) \cdot H$:

$$\chi_{FC}(T) = \frac{M_{FC}}{H} = \underbrace{\left(\frac{M_0^2}{3k_B T} \right) \int_0^{V_c(T)} V^2 f(V) dV}_{\text{NPs superparamagnéticas}} + \underbrace{25 \left(\frac{M_0^2}{3K} \right) \int_{V_c(T)}^{\infty} V f(V) dV}_{\text{NPs bloqueadas}} \quad (1.16)$$

Note que, portanto, a contribuição das partículas bloqueadas na curva FC é 25 vezes maior do que na curva ZFC.

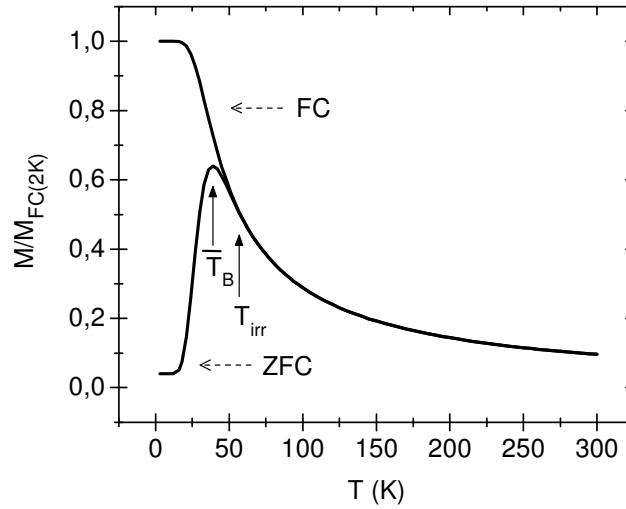


Figura 1.5: Exemplos de curvas ZFC e FC de magnetização em função da temperatura para um sistema de NPs com anisotropia uniaxial, não interagentes e com distribuição de tamanhos.

A temperatura de irreversibilidade T_{irr} , indicada no gráfico da Figura 1.5 pelo ponto de separação das curvas ZFC e FC, é a temperatura a partir da qual todas as partículas se encontram em regime superparamagnético. Quanto maior o diâmetro médio das partículas da amostra e/ou quanto mais larga sua distribuição de tamanhos, mais elevada ela será.

A partir do par de curvas ZFC e FC dados pelas equações (1.15) e (1.16) e considerando M_0 constante em relação à temperatura, é possível aplicar a seguinte relação [11]:

$$\frac{d}{dT}(M_{ZFC} - M_{FC}) \propto \frac{d}{dT} \int_{V_c(T)}^{\infty} V f(V) dV \propto T \cdot f(T_B) \quad (1.17)$$

Assim, é possível obter a função de distribuição de temperaturas de bloqueio que, no caso de NPs constituídas por monodomínios magnéticos, anisotropia uniaxial e não interagentes (condições adotadas nesse modelo de superparamagnetismo convencional), pode ser apropriadamente relacionada à distribuição de tamanhos de partículas com a ajuda de dados coletados por outras técnicas de caracterização morfológica.

Como considerações finais, devemos lembrar que muitas vezes as suposições da teoria do superparamagnetismo sobre a inexistência de interações entre as partículas e de efeitos de anisotropia não são satisfeitas. As interações de curto e longo alcance – tais como interações dipolares, de troca, de super-troca e outras – têm sido intensamente estudadas nos últimos anos,

porém ainda não há um consenso sobre seus efeitos no comportamento magnético de sistemas granulares. No caso de NPs, a maioria dos modelos de simulação e resultados experimentais indicam que as interações provocam um aumento em T_B [12], por exemplo. Portanto, é necessário ter extremo cuidado ao se determinar parâmetros morfológicos ou estruturais desses sistemas através de ajustes às curvas de magnetização, pois em geral os sistemas reais possuem um número enorme de variáveis que tornam o problema extremamente difícil de ser modelado com rigor.

1.3 Aplicações biomédicas de NPs

As características peculiares de NPs magnéticas apresentadas nas seções anteriores já demonstraram ser muito apropriadas para sua aplicação em medicina e biologia, tanto *in-vitro* quanto *in-vivo*, como bem descrito na literatura há vários anos.

Nesse aspecto, deve-se ressaltar primeiramente que NPs têm tamanhos controláveis da ordem de poucos nanômetros, o que as coloca em dimensões menores ou comparáveis às de células (10–100 μm), vírus (20–450 nm), proteínas (5–50 nm) ou genes (2 nm de largura e 10–100 nm de comprimento) e as torna adequadas às aplicações que envolvam entidades biológicas dessa ordem de grandeza. Além disso, a grande superfície relativa das NPs pode ser apropriadamente modificada para receber agentes biológicos e serem manipuladas por um gradiente de campo magnético externo para transporte e imobilização no corpo humano de modo não-invasivo.

Dentre as várias aplicações já estudadas na literatura [2, 13], podemos citar a marcação de células, vetorização de medicamentos, processos de desintoxicação, aumento do contraste em imagens por ressonância magnética (MRI), desenvolvimento de sensores bioquímicos, terapia do câncer por hipertermia e manipulação magnética de células ou moléculas biológicas em geral. Algumas dessas aplicações serão brevemente apresentadas adiante.

Com base nos diversos estudos existentes na área de síntese e aplicações biomédicas de NPs, podemos dizer que não há um consenso entre os pesquisadores em relação às características ideais que esses sistemas devem apresentar [2, 14, 15], até mesmo porque as aplicações são muito

diversificadas. De qualquer modo, descreveremos a seguir as características mais comuns encontradas em NPs na literatura.

Em relação às propriedades magnéticas, NPs com comportamento superparamagnético à temperatura ambiente apresentam melhores respostas à aplicação de campos magnéticos e, conseqüentemente, podem ser aplicadas em doses menores. Isso se traduz na formação de monodomínios, coercividade e remanência nulas e altos valores de magnetização. A não retenção de magnetização após a retirada do campo magnético aplicado é essencial para evitar a formação de aglomerados e, assim, contribuir para a estabilidade e dispersão das amostras em solução ou no corpo humano.

Para atender a essas exigências e uniformizar as propriedades físicas das partículas, morfologicamente, é desejável que elas sejam esféricas, monodispersas (com estreita distribuição de tamanhos, $\sigma < 5\%$) e de um tamanho no qual a formação de monodomínios seja garantida, dependendo do material que as compõem. Além disso, estruturalmente, é interessante que as NPs sejam cristalinas e, portanto, mais estáveis ao longo do tempo e com valores de magnetização mais elevados.

Em biomedicina, o recobrimento (ou ligante) das NPs merece especial atenção. Além de evitar a formação de aglomerados, ele é responsável por tornar as partículas solúveis em água, não-tóxicas, biocompatíveis e também possibilita a funcionalização da superfície com agentes biologicamente ativos. Esses agentes podem ser anticorpos, nucleotídeos, peptídeos, vitaminas, hormônios, antibióticos e outras moléculas que guiem as NPs a um alvo (um tipo de célula ou um órgão) bem determinado durante sua distribuição no corpo humano.

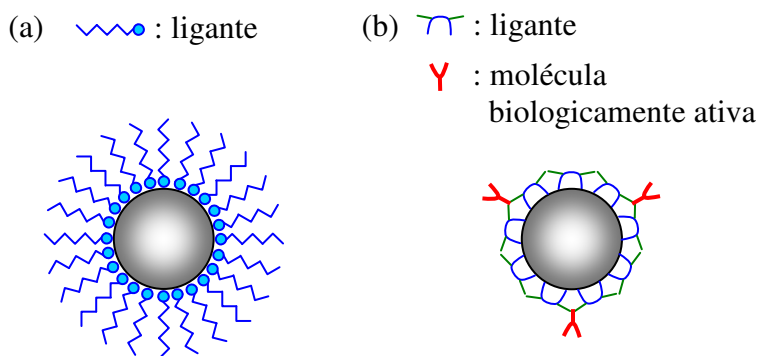


Figura 1.6: Esquemas de NPs (a) recobertas por moléculas de ligante e (b) com moléculas biologicamente ativas para funcionalização da superfície.

NPs de óxidos de ferro são conhecidas por possuírem excelentes propriedades magnéticas e serem não-tóxicas, pois podem ser quebradas e utilizadas para formar a hemoglobina sanguínea [16]. A magnetita e sua forma oxidada maghemita são as fases de óxidos de ferro mais estudadas e aplicadas em biomedicina, com valores de magnetização de saturação M_S iguais a aproximadamente 92–100 emu/g e 60–80 emu/g, respectivamente, para os materiais massivos [9]. Mais características sobre os óxidos de ferro apresentados aqui podem ser encontradas no apêndice I.

Além das propriedades magnéticas, o tamanho das NPs também influencia sua biodistribuição *in-vivo*. O sistema retículo-endotelial (RES) – formado pelas células de Kupffer no fígado, baço e linfonodos – é responsável pela fagocitose das NPs, diminuindo seu tempo de circulação no sangue. Diminuir o tamanho das partículas ajuda a driblar o RES, além de permitir sua difusão entre os espaços intercelulares dos tecidos e oferecer melhor distribuição efetiva [2, 17]. O bloqueamento de capilares só acontecerá caso as partículas possuam dimensões da ordem de 5 μm [2], limite bem acima dos sistemas nanométricos.

Sendo assim, quando apropriadamente preparadas, as NPs magnéticas apresentam muitas vantagens nas aplicações em biomedicina, como veremos nos principais casos brevemente descritos a seguir.

A marcação de células com NPs é utilizada para fazer diagnósticos ultra-sensíveis em exames por MRI ou para a manipulação de entes biológicos por separação magnética. As NPs se ligam à membrana plasmática ou são internalizadas por fagocitose, através de um receptor ou agente transfectante [18, 19]. Sabe-se que recobrimentos catiônicos facilitam a internalização das partículas, pois interagem fortemente sem especificidade com a membrana, que é aniônica [20]. Para fazer a marcação celular com especificidade, deve-se utilizar um ligante que seja facilmente reconhecido/absorvido pela célula-alvo, como os anticorpos. Nesse caso, os estudos com amostras sintetizadas apontam resultados positivos [21]. A marcação celular ideal não deve gerar efeitos colaterais, tais como afetar o metabolismo e a divisão celular ou provocar apoptose (autodestruição das células de modo programado). Esquemas de marcação celular encontram-se na Figura 1.7.

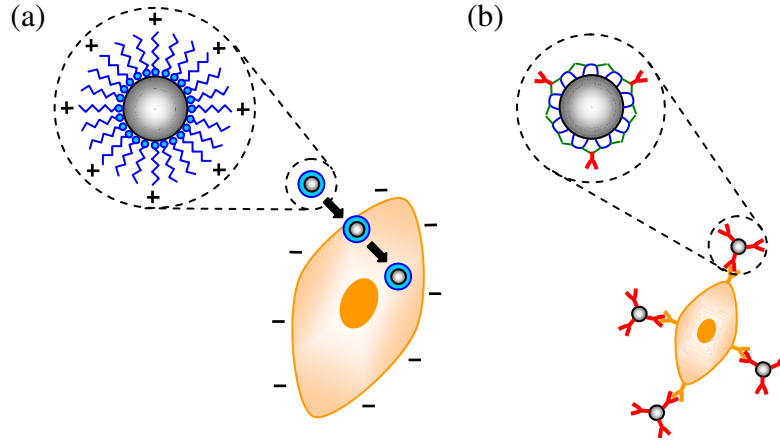


Figura 1.7: (a) Marcação celular não-específica por internalização de NPs recobertas com ligantes catiônicos e (b) marcação celular específica de NPs funcionalizadas com anticorpos que se ligam aos receptores da célula-alvo.

A MRI é uma técnica poderosa não-invasiva utilizada para diagnósticos, exames pré-cirúrgicos e monitoramento de terapias, ideal para a visualização de tecidos moles, mostra anatomia e fisiologia simultaneamente, possui capacidade tomográfica multi-dimensional e resolução de 20-25 μm , próximo ao tamanho de uma célula [22].

Essa técnica se baseia no contrabalanço entre o pequeno momento magnético em um próton e o grande número de prótons presentes nos tecidos biológicos, o que leva a um efeito mensurável de prótons alinhados na presença de altos campos magnéticos estáticos B_0 (1–2 T) [23]. Como ilustrado na Figura 1.8, esse sinal pode ser capturado usando absorção ressonante: aplicando um campo magnético variável no tempo (5–100 MHz) em uma direção perpendicular a B_0 , muda a frequência de precessão de Larmor do prótons ($\omega_0 = \gamma B_0$). Para prótons ^1H (núcleo de hidrogênio nas moléculas de água), a razão giromagnética é $\gamma = 2,67 \cdot 10^8 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$, portanto, em um campo $B_0 = 1 \text{ T}$, a frequência de precessão de Larmor corresponde ao campo de rádio-frequência $\omega_0/2\pi = 42,57 \text{ MHz}$.

Na prática, o campo transversal de rádio-frequência é aplicado em uma sequência pulsada, de duração suficiente para obter uma resposta coerente do momento magnético líquido m dos prótons no scanner de MRI. A partir do momento em que o pulso de rádio-frequência é desligado, a relaxação da resposta coerente é medida através das correntes induzidas nas bobinas *pick-up* do scanner. Como mostrado na Figura 1.8, para B_0 paralelo ao eixo z , os sinais de relaxação são da forma [23]:

$$m_z = m(1 - e^{-t/T_1}) \quad (1.18)$$

$$m_{x,y} = m \sin(\omega_0 t + \phi) e^{-t/T_2} \quad (1.19)$$

onde T_1 e T_2 são os tempos de relaxação longitudinal (spin-rede) e transversal (spin-spin), respectivamente, e ϕ é a constante de fase. A relaxação longitudinal reflete a perda de energia na forma de calor do sistema para sua “rede” vizinha, e é a medida do acoplamento dipolar dos momentos dos prótons a suas vizinhanças. A relaxação no plano xy é relativamente rápida, e é conduzida pela perda de coerência de fase nos prótons precessantes devido às interações magnéticas entre eles e com outros momentos flutuantes no tecido.

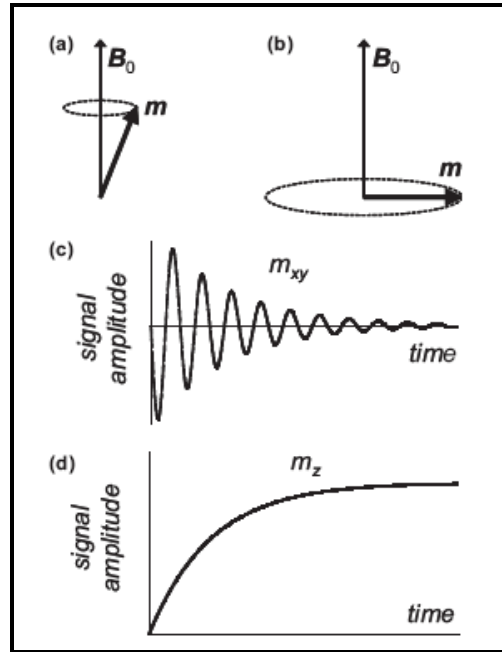


Figura 1.8: Ilustração de ressonância magnética para um grande conjunto de prótons com momento magnético líquido m na presença de um campo magnético externo B_0 . Em (a), o momento líquido precessiona ao redor de B_0 na frequência característica de Larmor, ω_0 . Em (b), um segundo campo externo é aplicado, perpendicular a B_0 , oscilando em ω_0 . Apesar de ser muito mais fraco que B_0 , ele tem o efeito de excitar ressonantemente o momento de precessão no plano perpendicular a B_0 . Em (c) e (d), o campo oscilante é removido no tempo zero e as amplitudes dos momentos (c) no plano e (d) longitudinal relaxam de volta a seus valores iniciais [23].

A defasagem também pode ser afetada por inhomogeneidades no campo longitudinal aplicado, levando à substituição de T_2 na equação (1.19) pelo tempo de relaxação mais curto, T_2^* [24]:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \frac{\Delta B_0}{2} \quad (1.20)$$

onde ΔB_0 é a variação no campo devido às distorções na homogeneidade do campo aplicado em si ou por variações locais na susceptibilidade magnética do sistema.

As NPs, quando utilizadas como agentes de contraste magnético, estabelecem um campo dipolar perturbador substancial localizado que leva, de acordo com a equação (1.20), a uma notável redução em T_2^* , juntamente com uma menos notável redução em T_1 , gerando um contraste negativo que aumenta os detalhes e contornos da imagem, como exemplificado na Figura 1.9. Ainda que diversas teorias sobre o processo de relaxação na presença de partículas de óxidos de ferro tenham sido propostas, seu modo exato de atuação ainda não foi esclarecido [25, 26].

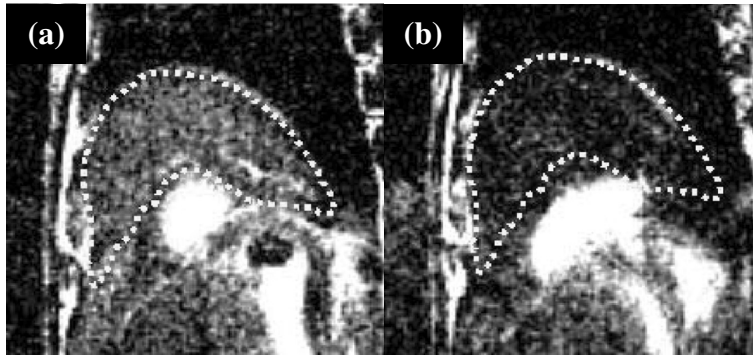


Figura 1.9: Imagens de MRI ponderadas em T_2 de fígado de coelho (a) antes e (b) após a incorporação de NPs de óxidos de ferro injetadas através da circulação sanguínea [27].

Existem diferentes configurações para a seqüência pulsada de campos de rádio-freqüência em termos de tempo, ordem, polaridade e freqüência de repetição. As seqüências mais aplicadas são *Spin-Echo* e *Gradient Recall-Echo* [28, 29], sendo que as imagens obtidas com seqüências do tipo *Gradient Recall-Echo* possuem uma sensibilidade significativamente maior a uniformidades

no campo magnético e a agentes de contraste em relação às imagens obtidas com seqüências *Spin-Echo* [28, 29].

A grande área superficial relativa das NPs e sua manipulação através de um campo magnético externo são características que permitem o uso desses sistemas também para a otimização do carregamento de drogas. As drogas ou fármacos são conectados à superfície das NPs, que são conduzidas e retidas com um imã ou outra fonte de gradiente de campo magnético na região ou órgão de interesse, liberando a dose correta sem sobrecarregar o organismo com doses massivas e diminuindo os efeitos colaterais. Esse procedimento seria extremamente apropriado para a administração de substâncias quimioterápicas no tratamento do câncer, por exemplo, onde os efeitos colaterais são severos (veja esquema da Figura 1.10). O carregamento de drogas por NPs pode ser ainda mais eficiente quando associado à marcação de células através de ligantes que possuam células-alvo bem específicas, como os anticorpos já citados anteriormente.

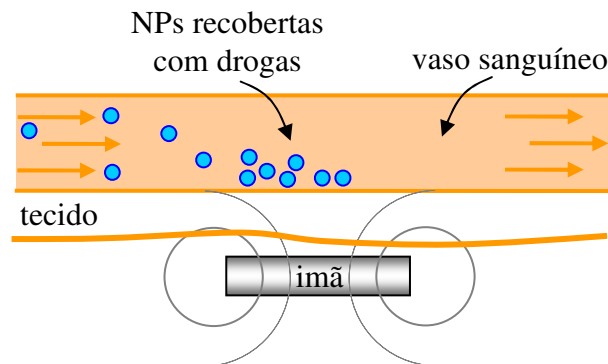


Figura 1.10: Esquema do procedimento de carregamento de drogas utilizando NPs magnéticas e um gradiente externo de campo magnético.

A hipertermia é o tratamento médico baseado na destruição de tecidos através do aquecimento a temperaturas acima de 42°C , aplicado principalmente em tumores. A aplicação de NPs em tratamentos desse tipo é possível porque, sob um campo magnético alternado de alta frequência, os momentos magnéticos tentam se reorientar acompanhando o campo e a energia representada por essa perda de fase é dissipada para o meio na forma de calor. A reorientação das NPs na direção do campo ocorre através da relaxação de Néel (rotação do momento dentro da partícula) e da relaxação de Brown (rotação da partícula em si) e produz mais calor por unidade de massa do que partículas maiores [30], compostas por muitos domínios magnéticos e cuja

produção de calor é representada pela área dentro da histerese. A magnetohipertermia com NPs é eficiente no tratamento do câncer porque as células cancerosas são mais sensíveis a altas temperaturas em relação às células saudáveis [31]. Além disso, o calor gerado pelas partículas é extremamente localizado e sua superfície pode ser conjugada com agentes que visem células-alvo, como os anticorpos monoclonais específicos para um dado tipo de câncer, otimizando assim o tratamento com o menor prejuízo possível aos tecidos sadios adjacentes. Em geral, se utiliza um campo magnético alternado com frequência entre 0,05 e 1,2 MHz e intensidades menores que 188 Oe, aquecendo a região a temperaturas entre 42°C e 47°C por cerca de 30 min [3].

Enfim, para essas e inúmeras outras aplicações nas áreas de medicina em biologia, as características e comportamentos peculiares das NPs magnéticas têm muitas vantagens a oferecer. Cabe à comunidade científica aprimorar cada vez mais os métodos de sínteses desses materiais a fim de obter as melhores amostras com as melhores respostas magnéticas possíveis, pois assim se pode diminuir a quantidade de material utilizado e, conseqüentemente, os possíveis efeitos deletérios que qualquer material estranho ao corpo humano pode produzir.

1.4 Organização da dissertação

Os avanços no uso de partículas magnéticas em aplicações biomédicas dependem do aperfeiçoamento dos métodos de síntese para produção de amostras específicas com características apropriadas. Sendo assim, os principais objetivos deste trabalho foram explorar o efeito de parâmetros como tamanho, forma, distribuição, cristalinidade e recobrimento nas propriedades magnéticas de NPs sintetizadas de óxidos de ferro, além de comparar e relacionar essas características aos métodos de síntese utilizados e realizar testes preliminares de aplicações biomédicas.

No capítulo 2 são apresentados detalhes dos dois métodos de síntese de NPs por métodos químicos adotados neste trabalho – co-precipitação de sais em solução aquosa e decomposição térmica de precursores organometálicos –, assim como a importância dos ligantes nesses processos. Esse capítulo também contém breves descrições sobre as técnicas utilizadas nas caracterizações morfológica, estrutural e magnética das partículas e sobre os testes biomédicos realizados.

No capítulo 3 encontram-se os estudos sobre NPs disponíveis comercialmente, incluindo a caracterização da amostra *Iron (III) Oxide Nanopowder*[®] da Aldrich. Procuramos estabelecer fatores a serem aprimorados nas sínteses desse trabalho.

No capítulo 4 descrevemos a rotina sintética adotada para a produção de NPs por co-precipitação variando a temperatura de síntese e os resultados da caracterização dessas amostras.

A síntese de NPs pelo método da decomposição térmica de acetilacetonato de ferro III ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) é mostrada no capítulo 5. Foram produzidas 3 amostras diferentes com as quais foram realizadas troca de ligantes hidrofóbicos por hidrofílicos e realizados alguns testes de transfecção em células HeLa e detecção por MRI.

O capítulo 6 apresenta o estudo da síntese de NPs pelo método da decomposição térmica de ferro pentacarbonil ($\text{Fe}(\text{CO})_5$) e posteriores tratamentos térmicos da amostra original a diferentes temperaturas por diferentes tempos. Procuramos analisar a influência das diferentes condições dos aquecimentos nas propriedades morfológicas, estruturais e magnéticas das partículas, incluindo sua estabilidade em atmosfera ambiente e possibilidade de aplicação em biomedicina.

Finalmente, apresentamos as principais conclusões e perspectivas para a continuação deste trabalho.

-
- [1] *Nanoscale Materials in Chemistry*, K. J. Klabunde, John Wiley & Sons Inc. (2001).
 - [2] A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials* **26**, 3995 (2005).
 - [3] D. L. Huber, *Small* **1**, 482 (2005).
 - [4] C. P. Bean, J. D. Livingston, *J. Appl. Phys.* **30**, 120S (1959).
 - [5] *Introduction to Magnetic Materials*, B. D. Cullity, Addison-Wesley Publishing Company Inc. (1972).
 - [6] M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, M. I. Montero, C. J. Serna, A. Roig, L. Casas, B. Martinez, F. Sandiumenge, *Chem. Mater.* **11**, 3058 (1999).
 - [7] X. Batlle, A. Labarta, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **35**, R15 (2002).
 - [8] G. F. Goya, T. S. Berquó, F. C. Fonseca, M. P. Morales, *J. Appl. Phys.* **94**, 3520 (2003).
 - [9] *The Iron Oxides*, R. M. Cornell, U. Schwertmann, VCH Publishers (1996).
 - [10] E. P. Wohlfarth, *Phys. Lett. A* **70**, 489 (1979).

-
- [11] J. M. Vargas, J. Gómez, R. D. Zysler, A. Butera, *Nanotechnology* **18**, 115714 (2007).
- [12] D. Kechrakos, K. N. Trohidou, *Phys. Rev. B* **58**, 12169 (1998).
- [13] P. Gould, *Materials Today* **February**, 36 (2004).
- [14] P. Guardia, B. Batlle-Brugal, A. G. Roca, O. Iglesias, M. P. Morales, C. J. Serna, A. Labarta, X. Batlle, *J. Magn. Magn. Mater.* **316**, e756 (2007).
- [15] P. Tartaj, M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. González-Carreño, C. J. Serna, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, R182 (2003).
- [16] R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs, J. Lewis, *Am. J. Roentgenol.* **152**, 167 (1989).
- [17] C. C. Berry, A. S. G. Curtis, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, R198 (2003).
- [18] T. Pellegrino, S. Kudera, T. Liedl, A. M. Javier, L. Manna, W. J. Parak, *Small* **1**, 48 (2005).
- [19] R. Weissleder, H. Cheng, A. Bogdanova, A. Bogdanov Jr., *J. Magn. Reson. Imag.* **7**, 258 (2005).
- [20] H. Song, J. Choi, Y. Huh, S. Kim, Y. Jun, J. Suh, J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9992 (2005).
- [21] Y. Jun, Y. Huh, J. Choi, J. Lee, H. Song, S. Kim, S. Yoon, K. Kim, J. Shin, J. Suh, J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5732 (2005).
- [22] J. W. M. Bulte, I. D. Duncan, J. A. Frank, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22**, 899 (2002).
- [23] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, R167 (2003).
- [24] *Magnetic Resonance Imaging: Physical Principles and Sequence Design*, E. M. Haacke, R. W. Brown, M. R. Thompson, R. Venkatesan, John Wiley & Sons Inc. (1999).
- [25] A. Roch, R. N. Muller, P. Gillis, *J. Chem. Phys.* **110**, 5403 (1999).
- [26] J. W. M. Bulte, R. A. Brooks, B. M. Moskowitz, L. H. Bryant Jr., J. A. Frank, *Magn. Res. Med.* **42**, 379 (1999).
- [27] H. Lee, H. Shao, Y. Huang, B. Kwak, *IEEE Trans. Magn.* **41**, 4102 (2005).
- [28] *The Essential Physics of Medical Imaging*, J. T. Bushberg, J. A. Seibert, E. M. Leidholdt Jr., J. M. Boone, Lippincott Williams & Wilkins (2002).
- [29] J. A. Frank, B. R. Miller, A. S. Arbab, H. A. Zywicke, E. K. Jordan, B. K. Lewis, L. H. Bryant, J. W. M. Bulte, *Radiology* **228**, 480 (2003).

[30] M. Mitsumori, M. Hiraoka, T. Shibata, Y. Okuno, Y. Nagata, Y. Nishimura, M. Abe, M. Hasegawa, H. Nagae, Y. Ebisawa, *Hepato-Gastroenterology* **43**, 1431 (1996).

[31] K. Overgaard, J. Overgaard, *Eur. J. Cancer* **8**, 65 (1972).

2 Abordagem do problema

Antes de apresentar os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, cabe aqui uma introdução sobre os métodos de síntese química adotados na produção das NPs, assim como breves descrições sobre os métodos de caracterização e experimentos biomédicos realizados.

2.1 Síntese coloidal

O método de obtenção de NPs sempre desperta grande interesse e, para quase todas as aplicações, representa o mais importante dos desafios, pois ele determina as características morfológicas, estruturais, estequiométricas e, conseqüentemente, magnéticas desses materiais. Várias rotinas sintéticas foram desenvolvidas para controlar a qualidade das amostras [1, 2] e, dentre elas, as sínteses químicas para produção de NPs coloidais têm recebido destaque. Sínteses químicas em solução são mais simples, manejáveis e eficientes, com apreciável controle de tamanhos, composição e até mesmo forma das NPs. No caso de óxidos de ferro para aplicações biomédicas, os métodos mais importantes e mais bem estabelecidos na literatura são a co-

precipitação de sais em solução aquosa e a decomposição térmica de precursores organometálicos. Neste trabalho essas duas metodologias foram adotadas e estão descritas nas seções 2.1.1 e 2.1.2. Participei diretamente de todas as sínteses químicas descritas neste trabalho, com acompanhamento dos pós-doutorandos Dr. Herbert Winnischofer ou Dra. Paula Silvia Haddad Ferreira no Laboratório de Síntese Química (LSQ) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

O arranjo experimental utilizado nas sínteses é relativamente simples, conforme esquematizado na Figura 2.1.

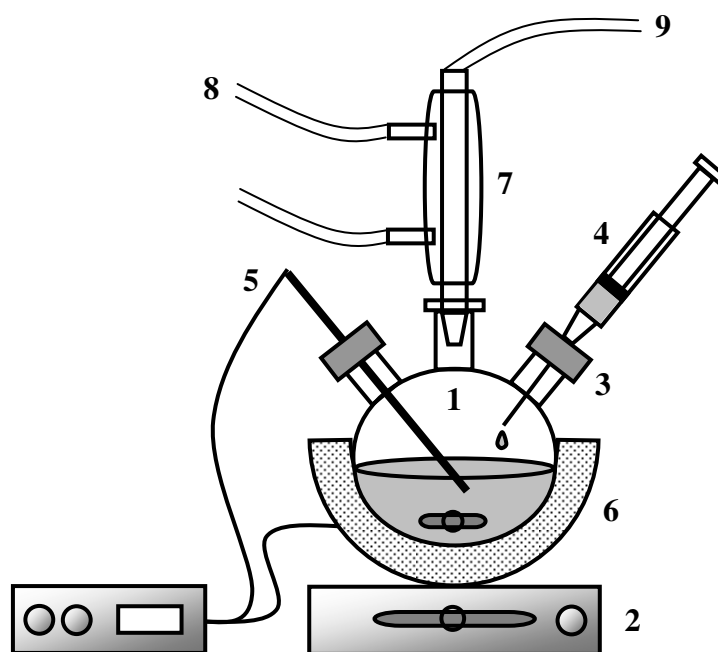


Figura 2.1: Arranjo experimental utilizado nas sínteses de NPs: (1) balão de reação, (2) agitador magnético, (3) rolhas para vedação, (4) seringa para adição dos reagentes, (5) termopar conectado ao controlador de temperatura, (6) manta aquecedora, (7) condensador, (8) fluxo de água para resfriar o condensador, (9) linha de vácuo/nitrogênio.

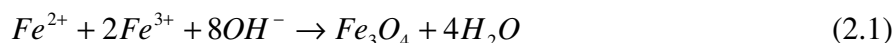
Geralmente, as sínteses são realizadas sob atmosfera inerte (nitrogênio ou argônio) e na presença de moléculas de recobrimento (ligante). Para obter uma estreita distribuição de tamanhos, é importante que a agitação do sistema se mantenha vigorosa, evitando assim gradientes de temperatura ou concentração na solução.

Existem vários mecanismos de formação de NPs bem descritos na literatura que podem estar presentes nas sínteses químicas. Na maioria dos casos, acredita-se que as partículas inicialmente se formem através de um processo de nucleação – induzido pela saturação de monômeros na solução – e posterior crescimento. Esse mecanismo foi proposto por LaMer e Dinegar [3], e indica que a separação dessas duas etapas é o segredo para a obtenção de amostras monodispersas (desvio padrão menor que 5%). Porém, subseqüentemente ou paralelamente ao mecanismo de LaMer, podem ocorrer outros processos como a maturação de Ostwald (crescimento das partículas maiores às custas da dissolução das partículas menores) [4] ou a coalescência (agregação das partículas) [5].

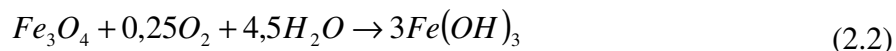
2.1.1 Co-precipitação controlada

Óxidos de ferro podem ser sintetizados através da co-precipitação de soluções aquosas de sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} com a adição de uma base. O controle de tamanho, forma e composição das NPs depende do tipo de sal utilizado (cloretos, sulfatos, nitratos, percloratos, etc...), razão ($Fe^{2+}:Fe^{3+}$), pH e força iônica do meio [6, 7].

Convencionalmente, magnetita é preparada adicionando-se uma base (NaOH ou NH_4OH) a uma mistura aquosa de cloretos de Fe^{2+} e Fe^{3+} a uma razão molar de (1:2). A reação química é dada pela equação (2.1) [7]:



É importante que a reação se realize sob atmosfera inerte, livre de oxigênio. Caso contrário, ocorre também a reação de oxidação de Fe_3O_4 :



a solução passaria de preta a amarela, isso afetaria a pureza do produto final e as propriedades físicas e químicas das NPs.

Nas sínteses por co-precipitação, a morfologia das partículas depende da natureza da base utilizada e da temperatura da reação, sendo que partículas maiores são obtidas a temperaturas mais altas [8].

Esse método é simples, reproduzível, apropriado para produções em massa e possui a vantagem de, por ser realizado em solução aquosa, fornecer amostras diretamente hidrofílicas e biocompatíveis, uma vez que se use o ligante apropriado. Porém, devido ao baixo limite de temperatura na qual essa síntese pode ser realizada (máximo de 100°C, temperatura de ebulição da água), geralmente há pouco controle de tamanho, distribuição, forma e cristalinidade.

2.1.2 Decomposição térmica

Dentre os métodos de sínteses de NPs descritos na literatura, a síntese coloidal não-aquosa (orgânica) provou ser uma rota conveniente, simples e reproduzível para a fabricação de partículas com excelente cristalinidade, controle de tamanhos e formas [9, 10].

Nesse método, precursores organometálicos, que geralmente contém elementos-chave para o material nanocristalino desejado, são injetados em um solvente orgânico aquecido (~ 100°C–350°C) juntamente com o ligante escolhido. Assim é induzido um aumento rápido na concentração de monômeros através da decomposição térmica do precursor, o crescimento dos nanocristais pela agregação de monômeros à superfície dos núcleos e o posterior recobrimento da superfície do nanocristal com as moléculas do ligante.

Essas sínteses orgânicas geralmente fornecem amostras com baixa polidispersão porque a nucleação a altas temperaturas ocorre quase instantaneamente, e, assim, o estágio de crescimento das partículas é bem separado do evento inicial de nucleação. Além disso, a alta temperatura da reação facilita a remoção de defeitos cristalinos e resulta em partículas magnéticas de alta qualidade.

Esse método possui vários aspectos sintéticos controláveis, tais como a escolha do precursor molecular, tipos de ligantes, temperatura da reação e tempo de crescimento. Porém, por ser realizado com solventes orgânicos, geralmente apolares, uma posterior troca de ligantes das NPs é necessária a fim de torná-las hidrofílicas e passíveis de serem aplicadas em testes biomédicos.

2.1.3 Funções e efeitos do ligante

Partículas em escala nanométrica, devido à suas grandes áreas superficiais, tendem a se aglomerar para diminuir a energia de superfície do sistema. Sendo assim, uma das maneiras de prevenir a aglomeração e também limitar a oxidação da superfície de NPs metálicas é recobri-las por moléculas de cadeias longas orgânicas de um surfactante ou polímero. O ligante é adicionado durante ou ao final da síntese, e é a repulsão entre as moléculas desse ligante que previne a aglomeração [11].

Uma vez que são responsáveis pela estabilização das NPs em solução, os ligantes determinam sua solubilidade em meio aquoso ou orgânico e, assim, sua escolha é fundamental quando os objetivos são aplicações biomédicas. Como já explicado anteriormente, em sínteses orgânicas, as amostras são inicialmente recobertas por ligantes hidrofóbicos e necessitam de posterior troca por ligantes hidrofílicos. É possível substituir o ligante expondo a solução de NPs a um novo ligante em grande excesso [12].

O recobrimento das NPs determina seu arranjo bidimensional, seu tamanho hidrodinâmico quando em solução, a biocinética e biodistribuição no corpo humano. O recobrimento deve ser escolhido de acordo com a aplicação final da NP.

A modificação da superfície por moléculas biocompatíveis possui diferentes tarefas a cumprir [13]:

- estabilizar as NPs em suspensão biológica com pH por volta de 7,4 e alta concentração de sais;
- prover grupos funcionais na superfície para posterior funcionalização através da ligação de moléculas bioativas tais como drogas, proteínas, anticorpos, nucleotídeos, enzimas e, assim, serem retidas em um determinado órgão, tecido ou tumor;
- evitar acúmulo imediato no sistema retículo-endotelial, pois partículas com superfícies hidrofóbicas são rapidamente recobertas com elementos do plasma sanguíneo e retiradas da circulação, impedidas de atingir seus objetivos.

O ligante, além de compor uma barreira contra a aglomeração, possui participação ativa durante a reação, influenciando o tamanho final das partículas [14]. Quanto maior a razão molar (ligante:metal), mais o equilíbrio estará voltado para a espécie ligada, impedindo o crescimento e, como resultado, partículas menores serão obtidas ao se utilizar altas concentrações de ligantes.

Do mesmo modo, quanto mais extenso e mais volumoso o ligante, mais difícil será o acesso de monômeros para promover o crescimento.

2.2 Técnicas de caracterização

Para avaliar a qualidade das amostras, relacioná-las aos diferentes métodos de síntese adotados e analisar as possibilidades de aplicações em biomedicina, uma caracterização detalhada e completa se faz necessária. Sendo assim, técnicas complementares foram utilizadas para investigar a morfologia, estrutura, composição estequiométrica e comportamento magnético desses sistemas.

2.2.1 Caracterização morfológica

A fim de determinar a forma, diâmetro médio e grau de polidispersão das amostras sintetizadas, foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (FEG-SEM, do inglês *Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy*) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês *Transmission Electron Microscopy*).

Para obtenção das imagens de FEG-SEM, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura de alta resolução JSM 6330F do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do LNLS, operado com voltagem de aceleração de 30 kV. O porta-amostras que permite a obtenção de imagens no modo de transmissão foi desenvolvido pelo aluno de mestrado Maurren Joel Lagos Paredes, do LNLS. Desse modo, o feixe de elétrons atravessa a amostra sendo varrido ponto a ponto como no modo de varredura. Os elétrons espalhados a altos ângulos na direção do feixe incidem em uma superfície metálica, que por sua vez cria elétrons secundários de baixa energia detectados para a formação da imagem [15]. Os elétrons do feixe espalhados a baixos ângulos são absorvidos por uma cavidade e não colaboram para a composição da imagem. As imagens de FEG-SEM apresentadas neste trabalho foram coletadas pelos pós-doutorandos do LNLS Dra. Paula Silvia Haddad Ferreira e Dr. Edvaldo Alves de Souza Júnior.

Complementarmente, também foram obtidas imagens de TEM no microscópio JEM 3010 URP (LME – LNLS), operado com voltagem de aceleração de 300 kV e 0,17 nm de resolução pontual. O canhão desse microscópio gera um feixe de elétrons de alta energia que, guiado por um conjunto de lentes magnéticas, incide sobre a amostra. Assim, os feixes transmitido e difratado são recombinados na construção da imagem, que é projetada na tela do microscópio e capturada por uma câmera digital CCD (do inglês, *Charge-Coupled Device*) [16]. É importante ressaltar que esse microscópio fornece imagens que são projeções bidimensionais das amostras e esse fato deve ser considerado nas análises futuras. As imagens de TEM apresentadas neste trabalho foram coletadas por membros do LSQ (LNLS) e pelo Dr. Leandro Martín Socolovsky do Laboratório de Materiais e Baixas Temperaturas (LMBT) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

As amostras para ambas as técnicas de microscopia são preparadas de acordo com os seguintes passos: dissolução das NPs em água ou solvente orgânico, deposição de uma gota em um filme de carbono amorfo sustentado por uma grade de cobre e total evaporação do solvente.

Observando várias imagens de uma mesma amostra e utilizando o programa computacional de análise de imagens *Gatan Digital Micrograph*, foi possível obter histogramas de distribuições de tamanhos de partícula, sempre considerando 300 partículas ou mais por amostra. Porém, ainda que sejam observadas várias regiões distintas do porta-amostras, devemos lembrar que a estatística dessa técnica fica limitada a uma população de algumas centenas de partículas.

2.2.2 Caracterização estrutural

A fim de determinar o grau de cristalinidade e a fase dos óxidos de ferro que compõem as amostras sintetizadas, foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM, do inglês *High Resolution Transmission Electron Microscopy*) e difração de raios-X (XRD, do inglês *X-Ray Diffraction*).

O microscópio JEM 3010 tem resolução pontual de 0,17 nm, o que permite a visualização de famílias de planos dos óxidos de ferro. Através das projeções obtidas por HRTEM, foi possível determinar o arranjo atômico das NPs orientadas em relação ao feixe de elétrons, a forma e o grau da cristalinidade. Para complementar a estatística limitada dessa técnica, foram realizados também estudos de XRD.

Quando raios-X interagem com um material cristalino, obtém-se um padrão de difração característico. A estrutura molecular e atômica determina a intensidade e a posição dos máximos dos difratogramas, possibilitando assim a identificação de compostos desconhecidos, sua estrutura e fase cristalina.

A amplitude do feixe difratado terá um máximo quando a diferença de caminho Δl entre raios refletidos por planos sucessivos do material for igual a um múltiplo inteiro do comprimento de onda, ou seja, quando houver interferência construtiva entre eles. Essa é a chamada lei de Bragg [17], dada por:

$$\Delta l = 2d \sin \theta = n\lambda \quad (2.3)$$

sendo d a distância entre os planos cristalinos, θ o ângulo de espalhamento, n um número natural e λ o comprimento de onda incidente.

Participei diretamente dos experimentos de XRD desse trabalho, com acompanhamento da Dra. Paula Silvia Haddad Ferreira e do Dr. Fábio Furlan Ferreira, com as amostras em pó na linha de luz de difração de raios-X em amostras em pó (XPD, do inglês *X-Ray Powder Diffraction*) do LNLS. Utilizamos $\lambda = 1,74619 \text{ \AA}$, configuração θ - 2θ e monocromador de Si (111). Os dados foram coletados em 2θ de 15° a 80° com passos de $0,05^\circ$.

Para identificar a fase cristalina dos óxidos de ferro, utilizamos a base de dados JCPDS. Mas é importante ressaltar aqui que magnetita e maghemita, principais fases encontradas neste trabalho, possuem o mesmo tipo de estrutura cristalina cúbica espinélio inversa com parâmetros de rede muito similares e, assim, a técnica de XRD isoladamente em geral não é suficiente para distingui-las em NPs. Mais características sobre os óxidos de ferro apresentados aqui podem ser encontradas no apêndice I.

Complementarmente, uma estimativa do tamanho do domínio cristalino também pode ser feita a partir dos picos dos difratogramas. O ângulo de espalhamento θ do pico de difração e sua respectiva largura a meia altura β podem ser usadas para calcular o tamanho médio dos grãos D através da equação de Scherrer [17]:

$$D = \frac{0.89\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (2.4)$$

Neste trabalho, a estimativa do tamanho médio das partículas foi feita considerando apenas o pico de maior intensidade e mais bem definido obtido nos difratogramas, que no caso da estrutura cúbica espinélio inversa dos óxidos de ferro magnetita e maghemita, é o pico de reflexão correspondente à família de planos {311}.

Ressaltamos que o alargamento instrumental b deve ser desconvoluído de β . Supondo uma superposição de gaussianas, a largura a meia altura do pico de difração experimental B é:

$$B^2 = \beta^2 + b^2 \quad (2.5)$$

Para determinar o alargamento instrumental, utilizamos uma amostra padrão de alumina e obtivemos $b = 0,088$.

2.2.3 Caracterização magnética

A fim de estudar o comportamento magnético das amostras, foram realizadas medidas isotérmicas de magnetização em função do campo magnético aplicado ($M \times H$) a 300 K (regime superparamagnético) até $H = 6,0$ T e também as varreduras térmicas da magnetização ZFC e FC, com $H = 20$ Oe.

Particpei diretamente das medidas magnéticas apresentadas neste trabalho, realizadas com as amostras em pó em um magnetômetro do tipo dispositivo supercondutor de interferência quântica (SQUID, do inglês *Superconducting Quantum Interference Device*) MPMS XL7 da Quantum Design (LMBT – UNICAMP).

2.3 Testes biomédicos

A avaliação da viabilidade de aplicação dos sistemas sintetizados foi feita através de alguns testes biomédicos.

Os testes de transfecção (incorporação das NPs por células) foram realizados pela Dra. Lília de Souza Li, do Laboratório de Endocrinologia Pediátrica da Faculdade de Ciências Médicas

(FCM) da UNICAMP. Foram utilizadas células HeLa, uma linhagem de células de câncer de colo de útero muito utilizadas em pesquisas médicas [18]. Elas foram incubadas em meio de cultura juntamente com as NPs em forma de ferroflúido (solução aquosa de 50 µg/ml). Para verificar a eficácia da transfecção, após a incubação as células foram coradas com Azul da Prússia (ou de Perls) e observadas sob microscópio ótico. A reação de coloração se processa na interação de íons ferrocianeto com íons férricos no interior da célula, resultando em um produto de cor azul-esverdeado chamado ferrocianeto férrico [19].

Imagens de TEM e análise quantitativa da eficiência da transfecção foram realizados pelo Dr. Konradin Metze e pelo Dr. Randall Luis Adam, do grupo interdisciplinar “Patologia Analítica Celular”, Departamento de Anatomia Patológica (FCM – UNICAMP). Após um tratamento adequado e específico das células marcadas e coradas [20], foram feitas imagens de TEM de seções ultrafinas e a estimativa da quantidade do ferro incorporado em função do tempo de incubação através de programas computacionais, considerando um mínimo de 100 células para cada amostra [21].

Imagens de MRI foram feitas pelo Dr. Li Li Min, do Laboratório de Neuroimagem do Departamento de Neurologia (FCM – UNICAMP) em um MRI Scanner 2T (Elscent Prestige, Haifa, Israel) utilizando as seqüências de pulso *Fast Spin-Echo* e *Gradient Recall-Echo* [22]. As fatias de imagem têm 3 mm de espessura e as NPs estavam dispersas em agarose em placas de acrílico, bem como células antes e depois da incorporação.

[1] D. L. Huber, *Small* **1**, 482 (2005).

[2] P. Tartaj, M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. González-Carreño, C. J. Serna, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**, R182 (2003).

[3] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4847 (1950).

[4] A. D. Brailsford, P. Wynblatt, *Acta Metallurgica* **27**, 489 (1979).

[5] M. Ocaña, R. Rodriguez-Clemente, C. J. Serna, *Advanced Materials* **7**, 212 (1995).

[6] A. Bee, R. Massart, S. Neveu, *J. Magn. Magn. Mater.* **149**, 6 (1995).

[7] D. K. Kim, Y. Zhang, W. Voit, K. V. Rao, M. Muhammed, *J. Magn. Magn. Mater.* **225**, 30 (2001).

-
- [8] Z. L. Liu, Y. J. Liu, K. L. Yao, Z. H. Ding, J. Tão, X. Wang, *J. Mater. Synth. Process.* **10**, 83 (2002).
 - [9] S. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, G. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 273 (2004).
 - [10] J. Park, E. Lee, N. Hwang, M. Kang, S. C. Kim, Y. Hwang, J. Park, H. Noh, J. Kim, J. Park, T. Hyeon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 2872 (2005).
 - [11] *Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*, A. S. Edelstein, R. C. Cammarata, Taylor & Francis Group (1996).
 - [12] C. B. Murray, C. R. Kagan, M. G. Bawendi, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **30**, 545 (2000).
 - [13] T. Neuberger, B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann, B. Rechenberg, *J. Magn. Magn. Mater.* **293**, 483 (2005).
 - [14] *Nanostructures and Nanomaterials – Synthesis, Properties and Applications*, G. Cao, Imperial College Press (2004).
 - [15] *SEM: A Users's Manual for Materials Science*, B. L. Gabriel, American Society for Metals (1985).
 - [16] *Transmission Electron Microscopy: A Text Book for Material Science*, D. B. Williams, C. B. Carter, Plenum Press (1994).
 - [17] *X-Ray Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials*, H. P. Klug, L. E. Alexander, John Wiley & Sons Inc. (1974).
 - [18] J. R. Masters, *Nature Reviews Cancer* **2**, 315 (2002).
 - [19] *General Chemistry*, L. Pauling, Dover Publications Inc. (1970).
 - [20] K. Metze, L. A. Andrade, *Pathol. Res. Pract.* **187**, 1031 (1991).
 - [21] M. R. Alborghetti, M. E. Correa, R. L. Adam, K. Metze, F. L. Coracin, C. A. Souza, M. L. Cintra, *J. Oral Pathol. Med.* **34**, 486 (2005).
 - [22] *The Essential Physics of Medical Imaging*, J. T. Bushberg, J. A. Seibert, E. M. Leidholdt Jr., J. M. Boone, Lippincott Williams & Wilkins (2002).

3 Amostras comerciais

Existem vários agentes de contraste para MRI compostos por NPs de óxidos de ferro disponíveis comercialmente, dentre os quais podemos citar Endorem[®] (Gerbet, França), Resovist[®] (Schering, Alemanha), Feridex[®] (Berlex, USA), entre outros [1, 2, 3, 4, 5]. Esses produtos são apresentados na forma de soluções coloidais aquosas de partículas recobertas por dextran ou outros tipos de polímeros, próprios para injeção intravenosa.

Porém, as aplicações clínicas destes agentes de contraste na maioria dos casos se limitam apenas à obtenção de imagens do sistema retículo-endotelial, pois como já citado anteriormente, após injeção intravenosa, as NPs de óxidos de ferro se acumulam nas células de Kupffer do fígado, baço e linfonodos. Uma vez que tumores hepáticos não possuem células do sistema retículo-endotelial ou sua atividade é reduzida, por exemplo, eles não incorporam o agente de contraste e permanecem inalterados na imagem, enquanto o contraste negativo aparece nos tecidos saudáveis vizinhos, permitindo assim a identificação de lesões [6].

A fim de analisar a qualidade dessas amostras disponíveis comercialmente, foi feita a caracterização da amostra *Iron (III) Oxide Nanopowder*[®] da Aldrich, apresentada a seguir.

3.1 Caracterização

A amostra *Iron (III) Oxide Nanopowder*[®] nos foi cedida pela Dra. Lília de Souza Li do Laboratório de Endocrinologia Pediátrica (FCM – UNICAMP), obtida da Aldrich (registro nº 544884) na forma de pó cristalino marrom avermelhado de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sem recobrimento, com diâmetros variando na faixa de 5–25 nm, de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante.

Apesar da ausência de recobrimento, essa amostra se dispersa bem em água, e assim foi possível depositar as partículas nas grades de cobre com carbono amorfo para obtenção de imagens de microscopia. Essas imagens se encontram na Figura 3.1.

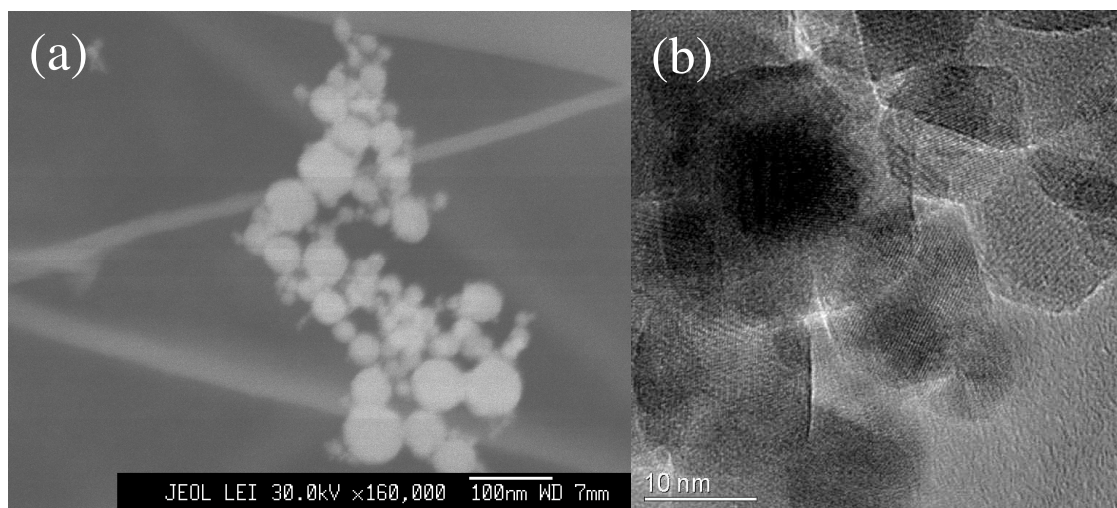


Figura 3.1: (a) FEG-SEM e (b) TEM da amostra *Iron (III) Oxide Nanopowder*[®] da Aldrich.

Através da imagem de FEG-SEM da Figura 3.1 (a), observamos uma larga distribuição de tamanhos, com a existência de partículas de até 70 nm, indicando que a amostra possui uma dispersão de diâmetros muito maior do que a informada pelo fabricante. Vemos também que as partículas se dispõem ligeiramente aglomeradas, provavelmente devido à ausência de recobrimento. Na imagem de TEM da Figura 3.1 (b) notamos a presença de planos cristalinos nas partículas e também alguns contornos facetados.

A fim de analisar o comportamento magnético dessa amostra, foram realizadas medidas de magnetização em função da temperatura (curvas ZFC e FC) e em função do campo magnético aplicado à temperatura ambiente (300 K). Os resultados obtidos são mostrados na Figura 3.2.

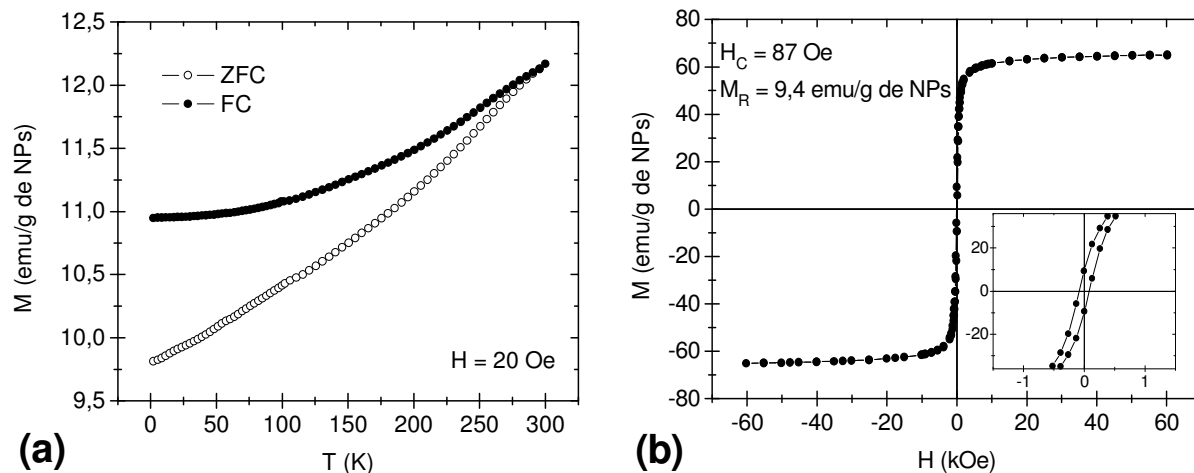


Figura 3.2: (a) Medidas de magnetização ZFC/FC e (b) em função do campo magnético aplicado da amostra *Iron (III) Oxide Nanopowder*[®] da Aldrich.

A curva ZFC do gráfico da Figura 3.2 (a) apresenta alto valor de T_{irr} , próxima da temperatura ambiente, o que indica a larga distribuição de temperaturas de bloqueio dessa amostra, reflexo da larga distribuição de tamanhos de partículas, já identificada pelas microscopias, ou da existência de grandes aglomerados interagentes. A curva FC mostra um comportamento ascendente da magnetização com o aumento da temperatura, muito diferente do comportamento esperado para NPs magnéticas monodomínio com anisotropia uniaxial, suposições adotadas no modelo superparamagnético apresentado anteriormente. Esse comportamento é um forte indício de que algumas partículas presentes nessa amostra são grandes o suficiente para não mais constituírem monodomínios.

Como as curvas se unem apenas em temperaturas próximas a 300 K, podemos dizer que nessa temperatura coexistem partículas em regimes superparamagnético e bloqueado, além de partículas grandes constituídas por múltiplos domínios com comportamento ferromagnético. Isso se reflete na coercividade significativa (~ 87 Oe) observada na isoterma de magnetização em função do campo magnético aplicado da Figura 3.2 (b) (veja a ampliação do gráfico na região de baixos campos magnéticos). Apesar disso a susceptibilidade inicial dessa curva é alta, indicando a possível existência de cadeias de partículas interagentes que aumentam o campo magnético

local. A magnetização de saturação dessa amostra é $M_0 \approx 66$ emu/g de NPs, correspondente ao valor da maghemita massiva ($M_S = 60\text{--}80$ emu/g).

Com a dispersão em água dessa amostra, foi realizado um teste de incorporação em células HeLa. Uma imagem de microscopia ótica após 6 horas de incubação e coloração com Azul da Prússia está na Figura 3.3.

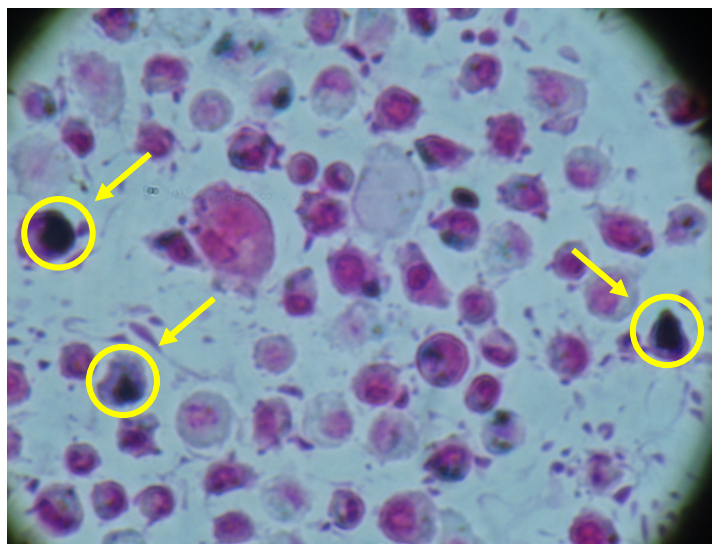


Figura 3.3: Microscopia ótica de células HeLa coradas com Azul da Prússia após incorporação da amostra *Iron (III) Oxide Nanopowder*® da Aldrich. Os círculos e setas indicam células individuais coradas devido à presença de NPs em seu interior.

Através dessa microscopia ótica, é possível identificar corados em azul-escuro aglomerados de NPs incorporadas no interior de algumas células, o que comprova, em princípio, a eficácia do produto comercial na marcação dessa linhagem celular.

A seguir, essas células marcadas foram colocadas em uma placa de cultura de 6 poços (3,45 cm de diâmetro cada poço) e testes de MRI foram feitos. Uma das imagens obtidas utilizando a sequência de pulso *Gradient Recall-Echo* encontra-se na Figura 3.4.

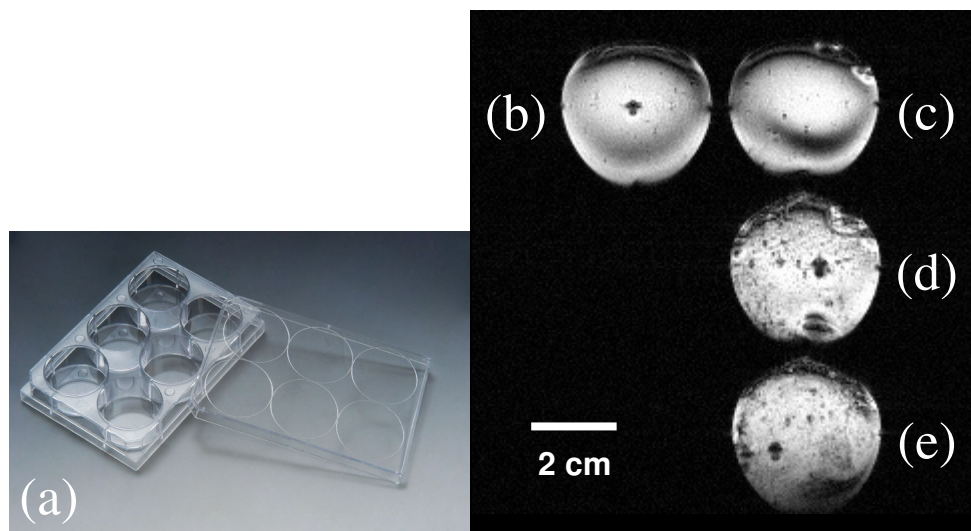


Figura 3.4: (a) Placa de cultura utilizada para os testes de detecção por MRI da amostra *Iron (III) Oxide Nanopowder*[®] da Aldrich; (b) e (c) fundo de agarose; (d) e (e) células HeLa em agarose após a incorporação das NPs.

Através da imagem de ressonância magnética podemos notar o contraste negativo provocado pela presença das NPs no interior das células, apesar da agarose utilizada para sua dispersão. Assim, podemos dizer que essa amostra comercial é eficiente na marcação de células HeLa e detecção por aparelhos de MRI clínicos.

3.2 Discussão

A amostra comercial *Iron (III) Oxide Nanopowder*[®] da Aldrich analisada neste trabalho mostrou ser composta por uma larga distribuição de tamanhos de partículas ligeiramente facetadas, aglomeradas e possivelmente cristalinas. A caracterização magnética indica comportamento ferromagnético, provavelmente devido à existência de partículas relativamente grandes (maiores que 50 nm) constituída por múltiplos domínios magnéticos. Apesar dessas características aparentemente desvantajosas, a amostra da Aldrich se mostrou eficiente na marcação de células da linhagem HeLa e sua detecção através de MRI.

Podemos relacionar essa amostra com as demais citadas anteriormente (Endorem[®], Feridex[®] e Resovist[®]). Uma vez que grande parte das amostras comerciais foi desenvolvida restringindo suas aplicações ao aumento no contraste em exames do sistema retículo-endotelial,

não há grandes preocupações com o controle de tamanhos, formas ou cristalinidade, pois tais fatores não afetariam o objetivo final do produto, que é certamente acumulado nos órgãos-alvo. O contraste não-específico e passivo desses materiais não exige amostras de alta qualidade.

Porém, a eficácia e desenvolvimento de aplicações mais sofisticadas de NPs magnéticas em biomedicina depende da produção de sistemas mais finos, com alto controle morfológico, funcionalizações de superfície, estrutura e, conseqüentemente, propriedades magnéticas aprimoradas e ajustáveis.

Sendo assim, para atender as demandas de aplicações mais avançadas, o estudo amplo das rotinas sintéticas e propriedades gerais das amostras produzidas se faz necessário. Neste trabalho foram adotados três diferentes tipos de síntese química a fim de obter amostras de qualidade superior àquelas apresentadas pelas amostras disponíveis comercialmente, descritas nas sessões seguintes.

-
- [1] M. P. Morales, O. Bomati-Miguel, R. P. Alejo, J. Ruiz-Cabello, S. Veintemillas-Verdaguer, K. O'Grady, *J. Magn. Magn. Mater.* **266**, 102 (2003).
 - [2] O. Bomati-Miguel, M. P. Morales, P. Tartaj, J. Ruiz-Cabello, P. Bonville, M. Santos, X. Zhao, S. Veintemillas-Verdaguer, *Biomaterials* **26**, 5695 (2005).
 - [3] M. Laniado, A. Chachuat, *Der Radiologe* **35**, S266 (1995).
 - [4] O. Clement, N. Siauve, C. A. Cuenod, G. Frija, *Top. Magn. Res. Imag.* **9**, 167 (1998).
 - [5] P. Reimer, E. J. Rummeny, H. E. Daldrup, T. Balzer, B. Tombach, T. Berns, P. E. Peters, *Radiology* **195**, 489 (1995).
 - [6] J. W. M. Bulte, *J. Magn. Magn. Mater.* **289**, 423 (2005).

4 Co-precipitação

A primeira síntese adotada neste trabalho foi a síntese por co-precipitação controlada de sais em solução aquosa. Essa rotina é freqüentemente citada e relacionada a aplicações biomédicas na literatura, pois produz amostras diretamente hidrofílicas e biocompatíveis, quando utilizado o recobrimento adequado. Como já dito anteriormente, alguns estudos mostram que é possível variar a morfologia das amostras através da temperatura da reação, e foi esse o princípio testado nesta parte do trabalho.

4.1 Preparação das amostras

Foram sintetizadas duas amostras por co-precipitação, seguindo uma rotina baseada no trabalho de Kim *et al.* [1].

Na primeira síntese, foram adicionados 3,00 g (18,5 mmol) de FeCl_3 e 1,84 g (9,25 mmol) de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em um frasco contendo 20 ml de água Milli-Q desaerada, sob atmosfera de N_2 e constante agitação magnética. Em seguida, foram gotejados 50 ml de solução 25% de NH_4OH , também desaerada e aquecida a 80°C . Mantiveram-se a atmosfera inerte, a agitação magnética e

todo o sistema a 80°C por 2 horas. A seguir, foram adicionados 40 ml de solução 20% de hidróxido de tetraetilamônio (50 mmol), para recobrir as partículas formadas. Após o resfriamento, as partículas foram decantadas magneticamente e a solução sobrenadante descartada. Repetindo esse processo, as partículas foram lavadas diversas vezes com água Milli-Q desaerada, secas sob vácuo e armazenadas sob N₂ em geladeira. Essa amostra foi denominada **CP1**.

A segunda síntese foi realizada como a primeira, mas o sistema foi mantido à temperatura ambiente durante a co-precipitação e as partículas foram secas sem recobrimento. O recobrimento foi feito redispersando as NPs em 15 ml de solução 25% de NH₄OH com 6,5 ml (20,41 mmol) de ácido oléico e agitando magneticamente sob N₂ por 1 hora. As lavagens seguintes foram feitas com etanol desaerado. Essa amostra foi denominada **CP2**. Os esquemas dessas sínteses encontram-se na Figura 4.1.

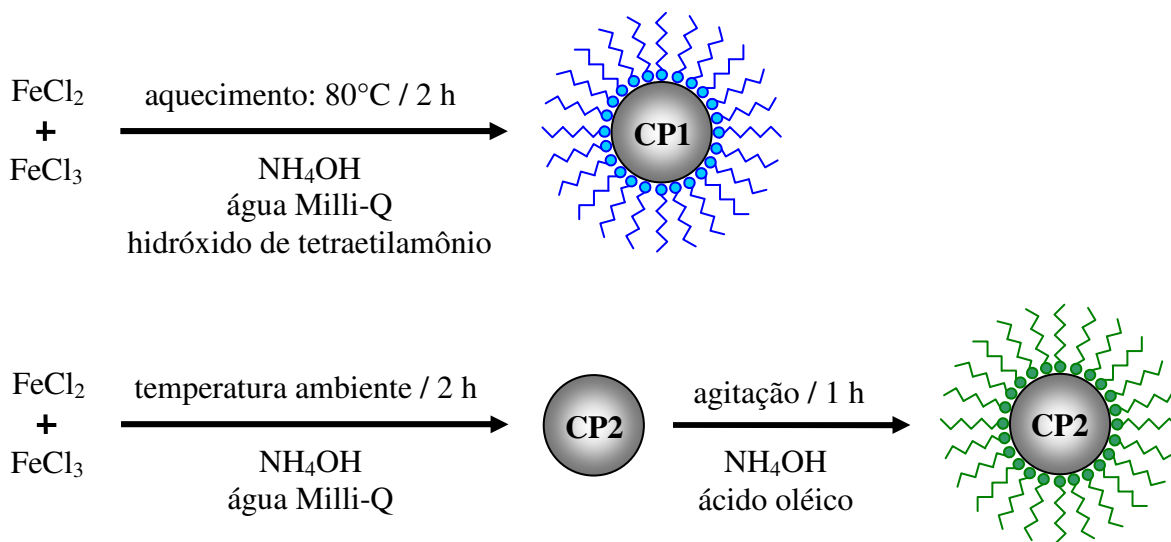


Figura 4.1: Esquemas das sínteses de NPs por co-precipitação.

Ambas as amostras foram secas sob vácuo para obtenção do pó de partículas para realização das caracterizações e armazenadas sob atmosfera inerte em geladeira sempre que possível.

4.2 Caracterização

Os difratogramas das duas amostras sintetizadas encontram-se na Figura 4.2.

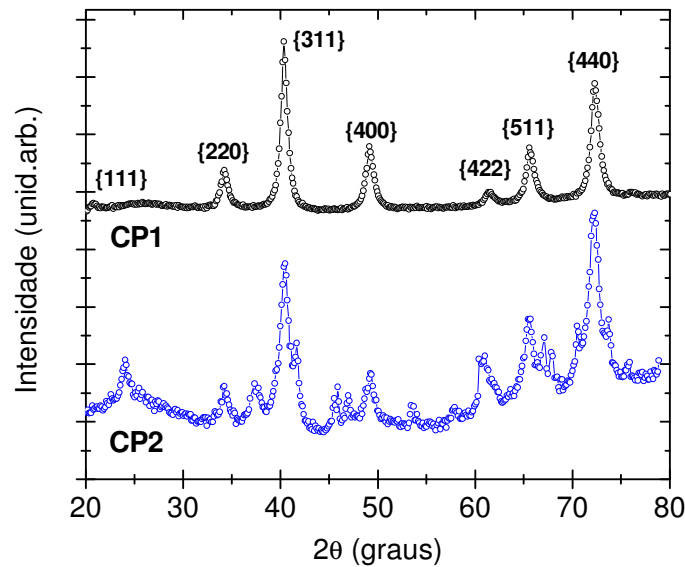


Figura 4.2: XRD das duas amostras sintetizadas pelo método da co-precipitação.

Através das medidas de XRD, vemos que a amostra **CP1** possui picos correspondentes à estrutura cúbica espinélio inversa da magnetita/maghemita (JCPDS 85-1436 e JCPDS 39-1346, respectivamente) [2, 3].

A amostra **CP2**, por sua vez, apresenta claramente uma fase adicional de hematita (α -Fe₂O₃) (JCPDS 87-1166) [4], que é a fase mais estável dos óxidos de ferro (mais características sobre os óxidos de ferro apresentados aqui podem ser encontradas no apêndice I).

Os tamanhos médios dos domínios cristalinos dessas amostras foram estimados através da fórmula de Scherrer, sendo que, nesse caso, consideramos os picos de reflexão {220} e {400} para a amostra **CP2**, já que o pico {311} da estrutura magnetita/maghemita encontra-se sobreposto ao pico {110} da hematita. Obtivemos os valores de $12,1 \pm 0,3$ nm para a amostra **CP1** e $9,9 \pm 0,6$ nm para a amostra **CP2**. Podemos confirmar, com base nessas estimativas, que a temperatura da reação de co-precipitação influencia o tamanho final das partículas, sendo que partículas ligeiramente maiores são geradas a temperaturas mais altas.

Uma vez que a amostra **CP2** mostrou ser parcialmente composta por hematita, uma fase de óxido de ferro com acoplamento antiferromagnético [5], optamos por estudar o comportamento magnético da amostra **CP1**, apresentado na Figura 4.3 a seguir.

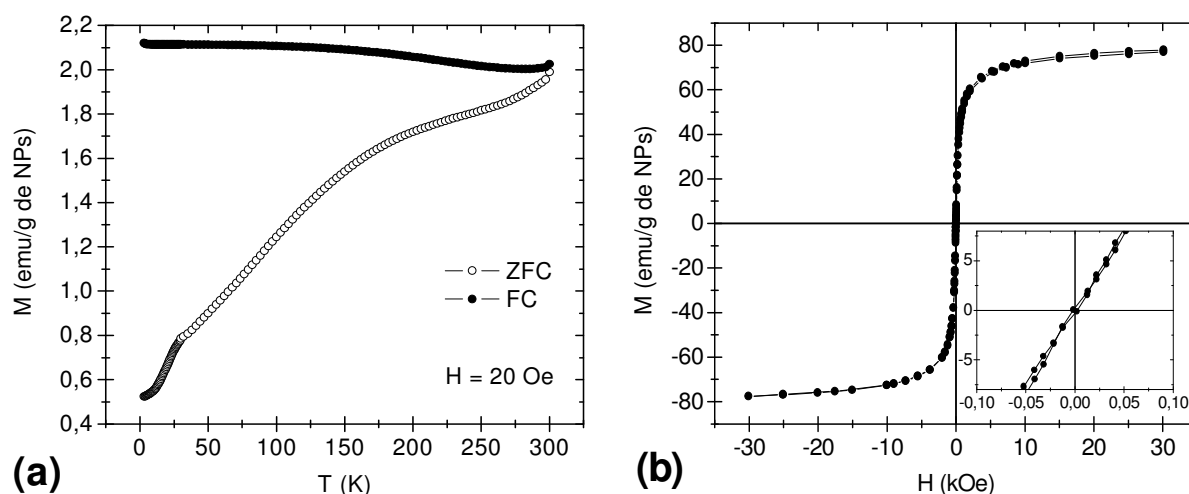


Figura 4.3: (a) Medidas de magnetização ZFC/FC e (b) em função do campo magnético aplicado da amostra **CP1**.

À primeira vista, percebemos que o comportamento magnético dessa amostra assemelha-se ao das NPs comerciais *Iron (III) Oxide Nanopowder*[®] da Aldrich analisadas no capítulo anterior.

O comportamento da curva ZFC e o alto valor de T_{irr} (~ 300 K) ilustram o vasto conjunto de temperaturas de bloqueio, o que indica uma larga distribuição de tamanhos, já esperada para amostras sintetizadas por co-precipitação.

No gráfico da magnetização em função do campo magnético aplicado, apresentamos os valores de magnetização em unidades de emu/g de NPs. Para isso, subtraímos da quantidade total de amostra a contribuição em massa do ligante hidróxido de tetraetilamônio que recobre as partículas, assumindo que ele compõe uma camada de aproximadamente 1 nm de espessura com densidade constante ao redor de partículas esféricas de diâmetro igual a 12,1 nm (valor estimado pela fórmula de Scherrer). Nesse caso, sabendo que a densidade do hidróxido de tetraetilamônio é igual a $1,041 \text{ g/cm}^3$, calculamos que o recobrimento corresponda a 36,8% do volume total e 10,48% da massa total das partículas. Vale lembrar que esses valores são uma estimativa, já que não obtivemos experimentalmente o número de moléculas que recobre as NPs.

Neste estudo a amostra **CP1**, diferentemente da amostra comercial, não mostra sinais de histerese, apresentando comportamento superparamagnético e alta magnetização de saturação ($M_0 \approx 80$ emu/g de NPs) em relação ao valor da magnetita ($M_S = 92\text{--}100$ emu/g) ou maghemita ($M_S = 60\text{--}80$ emu/g) massivas [5]. A alta magnetização de saturação para essa amostra já era esperada devido ao diâmetro médio grande – estimado pela fórmula de Scherrer – e à provável presença de partículas ainda maiores da larga distribuição de tamanhos. Apesar disso, essa amostra mantém o regime superparamagnético à temperatura ambiente.

4.3 Discussão

A síntese de NPs pelo método da co-precipitação, ainda que simples e compatível com futuras aplicações biomédicas, não se mostrou ideal para a obtenção de amostras de boa qualidade. Apesar dos altos valores de magnetização apresentados pela amostra **CP1**, a caracterização realizada nas amostras sintetizadas também indica que há pouco controle da fase formada ou uniformidade de diâmetros das partículas.

Essa rotina sintética poderia ser mais profundamente estudada, com adoção de outros métodos de caracterização para estudo da morfologia das partículas, aprimoramento da reação à temperatura ambiente a fim de evitar a mistura de fases cristalinas, testes com outros tipos de bases e outras temperaturas de síntese, mas como essas partículas não apresentaram vantagens significativas em relação às amostras comercialmente disponíveis, optou-se por não investir mais esforços na caracterização dessas amostras ou na produção de outras mais por esse método.

Uma vez que, comparativamente, a amostra de melhor qualidade foi aquela sintetizada a temperatura mais alta, neste ponto, a síntese por decomposição térmica de precursores orgânicos, realizadas a temperaturas de até 300°C, mostrou ser uma boa opção para a continuação desse trabalho, como descrito no capítulo seguinte.

[1] D. K. Kim, M. Mikhaylova, Y. Zhang, M. Muhammed, *Chem. Mater.* **15**, 1617 (2003).

[2] M. E. Fleet, *Acta Crystallogr.* **38**, 1718 (1982).

[3] D. Schulz, G. McCarthy, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA, ICDD Grant-in-Aid, (1987).

[4] H. Sawasa, *Mater. Res. Bull.* **31**, 141 (1996).

[5] *The Iron Oxides*, R. M. Cornell, U. Schwertmann, VCH Publishers (1996).

5 Decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$

Com a finalidade de melhorar a qualidade das amostras sintetizadas em relação às amostras comercialmente disponíveis e também em relação àquelas produzidas pelo método da co-precipitação (descritas no capítulo anterior), adotamos o método químico de síntese de NPs através da decomposição térmica de precursores orgânicos. Como descrito anteriormente, essa rotina sintética é conhecida na literatura pela produção de amostras com estreita distribuição de tamanhos.

5.1 Preparação das amostras

Para estabelecer as rotinas sintéticas a serem seguidas nesta seção, nos baseamos em experimentos relatados na literatura e principalmente no trabalho de Sun *et al.* [1], onde os autores afirmam que o ponto principal para se obter partículas monodispersas através do método da decomposição térmica está em tentar separar os processos de nucleação e de crescimento fracionando o aquecimento da solução de reagentes em duas diferentes temperaturas, como descrito a seguir.

Com a intenção de variar o diâmetro médio das NPs, foram adotados 3 procedimentos experimentais diferentes utilizando como precursor o composto organometálico $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2)_3$ (acetilacetionato de ferro III), também conhecido como $\text{Fe}(\text{acac})_3$, sendo $\text{acac} = \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$.

Na primeira síntese, 0,706 g (2 mmol) de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, 2,58 g (10 mmol) de 1,2-hexadecanodiol (agente redutor), 1,90 ml (6 mmol) de ácido oléico e 1,97 ml (6 mmol) de oleilamina (ácidos graxos responsáveis pelo recobrimento das partículas) foram adicionados em um frasco contendo 20 ml de benziléter (solvente orgânico). Sob atmosfera de N_2 e constante agitação magnética, a mistura foi aquecida a 200°C por 30 min e depois a 300°C por mais 30 min em regime de refluxo. Após o resfriamento, adicionou-se etanol desaerado para precipitação das partículas (~ 40 ml), que foram posteriormente isoladas por centrifugação (3000 rpm, 20 min) e descarte da solução sobrenadante. Repetindo esse processo, as partículas foram lavadas diversas vezes com etanol desaerado, secas sob vácuo e armazenadas sob N_2 em geladeira. Essa amostra foi denominada **DT1**. O esquema geral dessa síntese está na Figura 5.1.

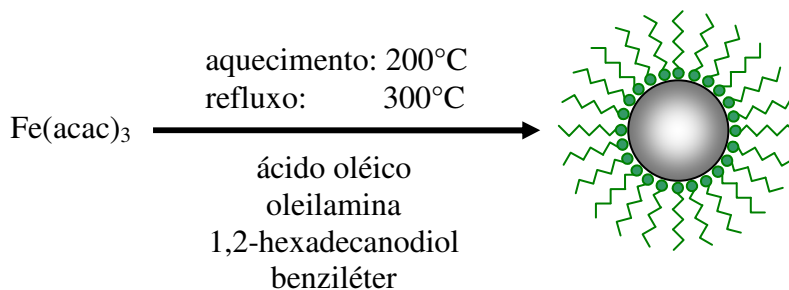


Figura 5.1: Esquema da síntese de NPs pelo método de decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$.

A segunda síntese foi realizada utilizando-se as mesmas quantidades dos mesmos reagentes da primeira síntese, porém a mistura foi aquecida a 200°C por 2 horas e depois mantida sob refluxo a 300°C por mais 1 hora. Essa amostra foi denominada **DT2**.

A terceira síntese foi feita utilizando as NPs da amostra **DT2** como sementes. Antes de iniciar o aquecimento da mistura de reagentes, foram adicionados também 84 mg do pó seco de NPs da amostra **DT2** dispersos em 4 ml de hexano. Mantendo o sistema fechado sob pressão reduzida, elevou-se então a temperatura a 100°C por 30 min para retirada do hexano. A seguir, sob atmosfera de N_2 , a mistura foi aquecida a 200°C por 1 hora e depois mantida sob refluxo a 300°C por mais 30 min. Essa amostra foi denominada **DT3**.

Como as partículas produzidas são inicialmente recobertas por ligantes hidrofóbicos (ácido oléico e oleilamina), adotamos para a troca de ligantes o procedimento desenvolvido por Jun *et al.* [2], descrito com sucesso em seu trabalho.

O ligante hidrofílico escolhido para a troca de ligantes desses sistemas foi o ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), uma molécula que se liga facilmente a metais, utilizado como agente quelante nos processos de desintoxicação por metais pesados [3]. O DMSA forma uma camada estável de recobrimento através da ligação do grupo carboxílico (-COOH) às partículas e através da ligação intermolecular de pontes dissulfeto – ligação covalente entre grupos tiol (-SH). Além disso, ele é apropriado para aplicações biomédicas, pois possui um grupo tiol livre para possível ligação de moléculas bioativas.

Para realizar a troca de ligantes das amostras sintetizadas, aproximadamente 10 mg do pó seco de partículas dispersas em 1 ml de tolueno e 10 mg de DMSA dissolvidos em 1 ml de DMSO (dimetilsulfóxido) foram misturados e mantidos sob agitação magnética por 14 horas. Em seguida, as partículas foram novamente isoladas por centrifugação e secas sob vácuo. Todo esse procedimento também foi realizado sob atmosfera inerte e o esquema correspondente encontra-se na Figura 5.2.

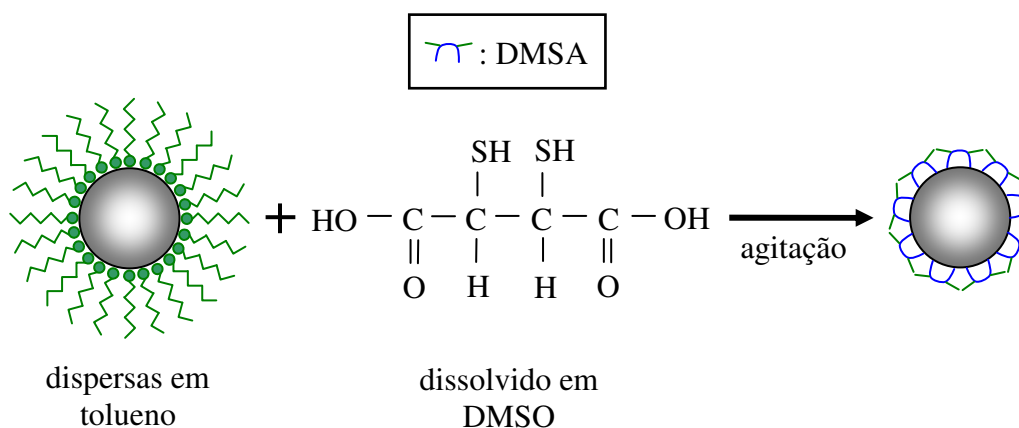


Figura 5.2: Esquema da troca de ligantes.

Um teste simples de solubilidade foi feito para verificar o sucesso da troca de ligantes, mostrado na Figura 5.3.

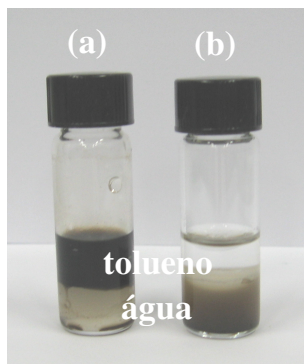


Figura 5.3: Teste de solubilidade (a) antes e (b) depois da troca de ligantes.

Pequenas quantidades das amostras antes e depois da troca de ligantes foram dispersas com ultra-som separadamente em frascos contendo água e tolueno. Vemos então que a amostra recoberta com ácido oléico (antes da troca de ligantes) se dispersa bem em tolueno, enquanto a amostra recoberta com DMSA (depois da troca de ligantes) se dispersa em água, comprovando o sucesso do procedimento. Em água, as NPs se mostraram estáveis em solução por um período de aproximadamente 5 dias. Mesmo após a aglomeração e precipitação, elas podem ser facilmente redispersas com ultra-som.

5.2 Caracterização

As imagens de TEM das 3 amostras sintetizadas encontram-se na Figura 5.4.

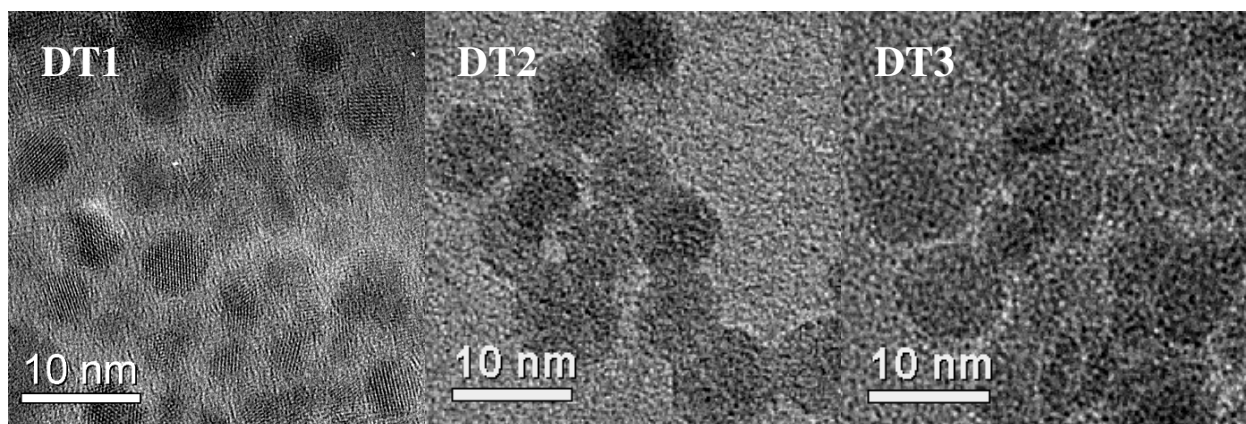


Figura 5.4: Imagens de TEM das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$.

Devemos ressaltar que as condições experimentais de obtenção das imagens de **DT2** e **DT3** não permitiram uma resolução tão boa quanto a da imagem de **DT1**, de modo que a não visualização de planos cristalinos nessas imagens não deve ser interpretada como característica amorfa desses materiais.

Vemos que as partículas sintetizadas possuem contornos esféricos bem-definidos e, aparentemente, baixa polidispersão quando comparadas às partículas comerciais analisadas anteriormente (veja capítulo “3 – Amostras comerciais”). A caracterização realizada não foi suficiente para obter uma distribuição de tamanhos estatisticamente confiável; entretanto, a partir das microscopias, podemos estimar os diâmetros médios de 5 nm, 8 nm e 10 nm para as amostras **DT1**, **DT2** e **DT3**, respectivamente.

Sendo assim, foi possível ajustar o tamanho médio das partículas sintetizadas variando o tempo de reação, e quanto maior o tempo, maiores foram as partículas. Além disso, comprovamos que o uso de uma amostra como semente permitiu obter uma nova amostra com maior tamanho médio.

Para complementar a estatística limitada fornecida pelas microscopias e também determinar a estrutura cristalina das amostras, foram realizados experimentos de XRD, cujos resultados são apresentados na Figura 5.5:

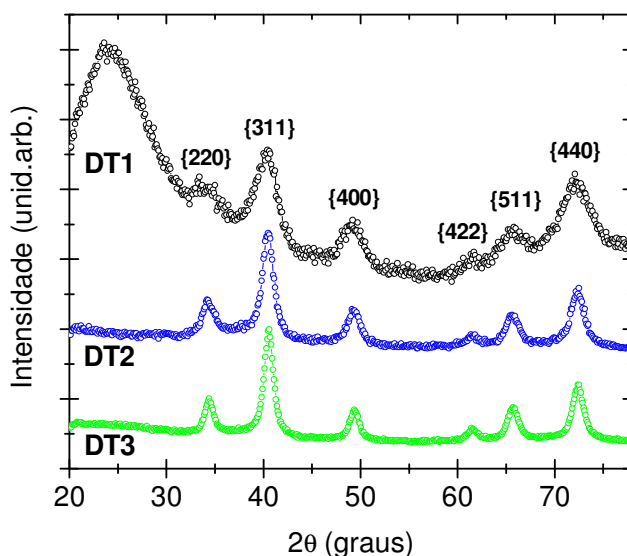


Figura 5.5: XRD das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$.

Os difratogramas indicam que todas as amostras possuem picos de reflexão correspondentes à estrutura da magnetita/maghemita (JCPDS 85-1436 / JCPDS 39-1346) [4, 5] e, utilizando a fórmula de Scherrer, estimamos os tamanhos médios de cristalito de $3,0 \pm 0,3$ nm, $7,8 \pm 0,2$ nm e $9,1 \pm 0,2$ nm para as amostras **DT1**, **DT2** e **DT3**, respectivamente. Pode-se dizer que esses valores estão de acordo com aqueles estimados pelas microscopias.

As medidas de magnetização realizadas com as amostras antes da troca de ligantes (recobertas com ácido oléico) são apresentadas na Figura 5.6.

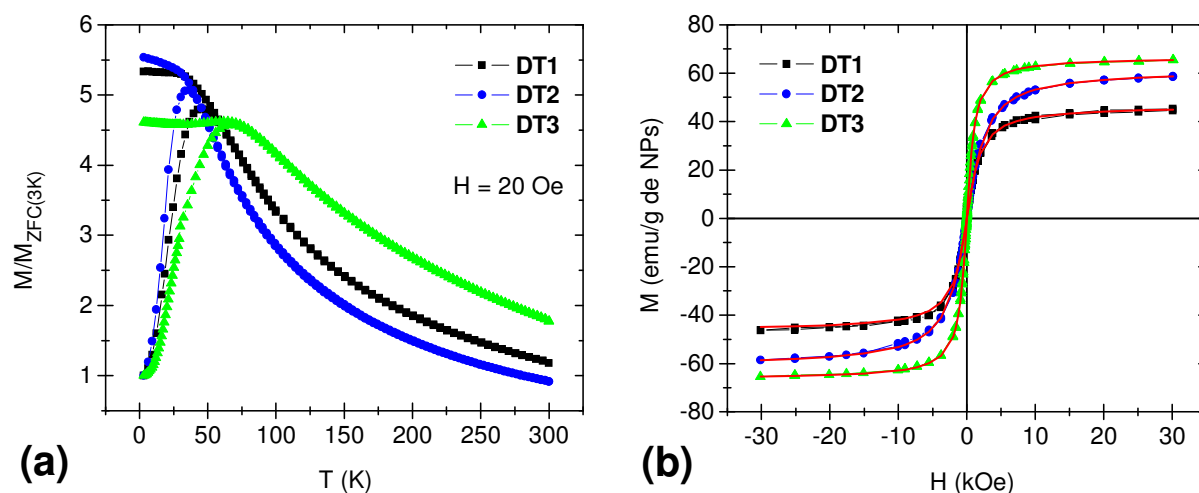


Figura 5.6: (a) Medidas de magnetização ZFC/FC e (b) em função do campo magnético aplicado das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ antes da troca de ligantes.

Quando comparamos as curvas ZFC das amostras **DT2** e **DT3**, sabendo que as NPs da primeira foram utilizadas como sementes para a síntese da segunda, vemos pela distribuição de temperaturas de bloqueio o reflexo do ligeiro aumento no tamanho das partículas e também um alargamento na distribuição, indicado também pelo aumento na T_{irr} . O comportamento da curva FC a temperaturas abaixo de T_{irr} para a amostra **DT3**, com um mínimo local por volta de 30 K, pode ser um indício da existência de interações entre as partículas maiores a baixas temperaturas [6], assim como o comportamento não compatível com a Lei de Curie para temperaturas mais altas (queda da magnetização com T^{-1} na região de regime superparamagnético).

A curva ZFC da amostra **DT1** apresenta temperaturas de bloqueio maiores em relação à amostra **DT2**, ou seja, as barreiras de anisotropia são um pouco maiores. Como as barreiras de anisotropia são dadas pelo produto KV e sabemos que a amostra **DT1** possui volume menor que a

amostra **DT2**, concluímos que a amostra **DT1** possui uma densidade de anisotropia efetiva maior em relação à amostra **DT2**. Especulamos que esse aumento se deve principalmente à influência da anisotropia de superfície, uma vez que seu tamanho é muito reduzido em relação às outras amostras.

Como primeira aproximação, para extrair das curvas ZFC e FC mais informações a respeito dessas amostras, assumiremos aqui que as NPs são constituídas por monodomínios magnéticos, ausência de interações, anisotropia uniaxial em regime bloqueado e ausência de efeitos de anisotropia em regime superparamagnético. Sendo assim, a partir do par de curvas ZFC e FC, como descrito na seção “1.2 – Propriedades magnéticas de NPs”, é possível obter a distribuição de temperaturas de bloqueio através da equação (1.17) e relacioná-la a uma distribuição de tamanhos de partículas utilizando a equação (1.3) e os valores médios estimados por TEM, assim determinando também um valor para a anisotropia efetiva K do sistema. Os resultados dessas análises encontram-se na Figura 5.7.

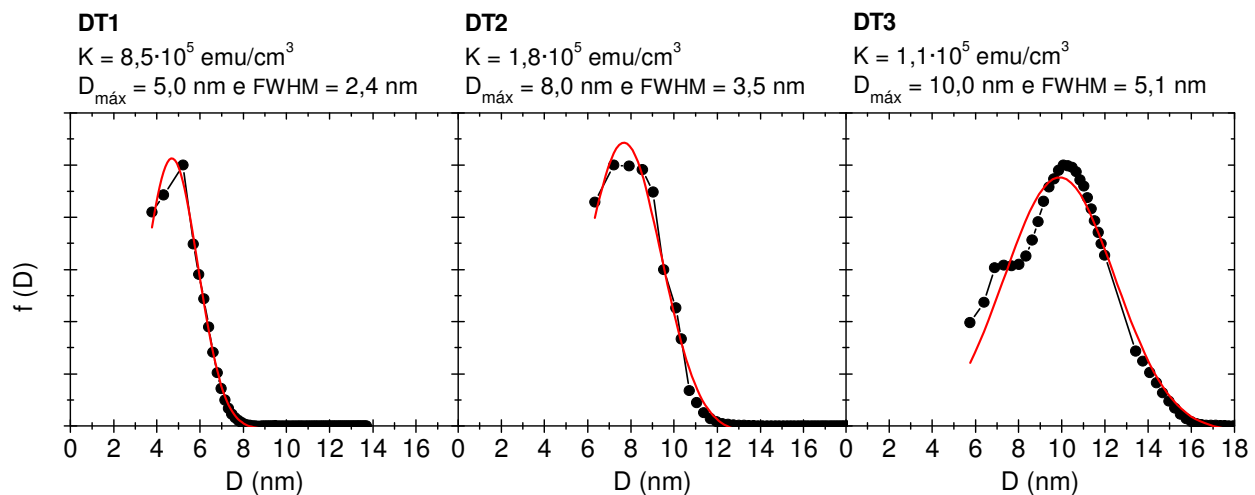


Figura 5.7: Valores de anisotropia efetiva K e distribuição de diâmetros obtidos através das curvas ZFC/FC e sua relação com os diâmetros médios estimados por TEM para as amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ antes da troca de ligantes.

As varreduras térmicas de magnetização indicam, como mostram os gráficos da Figura 5.7, que a anisotropia efetiva das partículas diminui com o aumento no diâmetro médio. Além disso, notamos o alargamento da distribuição de tamanhos, principalmente da amostra **DT2** para a amostra **DT3**, talvez devido ao processo de crescimento através de sementes.

Nas curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado da Figura 5.6 (b) apresentamos os valores de magnetização em unidades de emu/g de NPs para assim permitir uma comparação justa dos sinais magnéticos de amostras de tamanhos diferentes, uma vez que quanto menor a partícula, maior será sua porcentagem em volume e em massa devido ao recobrimento. Para isso, subtraímos da quantidade total de amostra a contribuição em massa do ligante ácido oléico que recobre as partículas, assumindo que ele compõe uma camada de aproximadamente 1 nm de espessura com densidade constante ao redor de partículas esféricas de diâmetros iguais àqueles estimados pelas microscopias. Nesse caso, sabendo que a densidade do ácido oléico é igual a $0,887 \text{ g/cm}^3$, calculamos que o recobrimento corresponda a 63,6% do volume e 22,9% da massa para a amostra **DT1**, 48,8% do volume e 14,0% da massa para a amostra **DT2** e 42,1% do volume e 11,09% da massa para a amostra **DT3**.

Nessas curvas, todas as amostras apresentam comportamento superparamagnético à temperatura ambiente e há um aumento considerável no momento magnético efetivo das amostras **DT1** a **DT3**, em concordância com o aumento no tamanho médio já identificado pelas caracterizações anteriores. Os valores para a magnetização de saturação obtidos por extrapolação são $M_{01} = 46 \text{ emu/g de NPs}$, $M_{02} = 61 \text{ emu/g de NPs}$ e $M_{03} = 67 \text{ emu/g de NPs}$ para as amostras **DT1**, **DT2** e **DT3**, respectivamente.

Para aplicar aqui o modelo do superparamagnetismo convencional, consideraremos como primeira aproximação NPs constituídas por monodomínios magnéticos, ausência de interações e de efeitos de anisotropia. Desse modo, de acordo com a equação (1.7), a curva de magnetização macroscópica pode ser modelada como o resultado da superposição de diferentes curvas de Langevin correspondentes aos diferentes volumes existentes na amostra analisada.

Utilizamos então um programa computacional desenvolvido pelo pós-doutorando Dr. Wallace de Castro Nunes (LMBT – UNICAMP) que realiza essas simulações, representadas pelas linhas em vermelho sobrepondo os dados experimentais no gráfico da Figura 5.6 (b). Vemos que os ajustes são bastante adequados e, através da equação (1.10) e o valor do momento magnético médio fornecido pelo programa, estimamos os diâmetros médios de 6,8 nm, 5,6 nm e 7,3 nm para as amostras **DT1**, **DT2** e **DT3**, respectivamente. Para esses ajustes, a dispersão da distribuição de momentos magnéticos não influencia significativamente a forma da curva [7], de modo que desconsideramos tal informação.

A Tabela 5.1 a seguir resume toda a caracterização morfológica realizada com essas amostras.

	D (nm)		
	TEM	XRD	Ajuste $M(H)$
DT1	5	$3,0 \pm 0,3$	6,8
DT2	8	$7,8 \pm 0,2$	5,6
DT3	10	$9,1 \pm 0,2$	7,3

Tabela 5.1: Valores estimados por TEM, XRD e pelos ajustes das curvas $M(H)$ para os diâmetros médios das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$.

Os valores de diâmetros médios estimados pelos ajustes das curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado apresentam desvios significativos em relação àqueles estimados pelas demais técnicas de caracterização. Especulamos que efeitos do alto valor de anisotropia efetiva da amostra **DT1** e a presença de interações de ordem dipolar nas demais amostras possam ter prejudicado a adaptação desses casos reais às suposições do modelo do superparamagnetismo convencional adotado.

A fim de analisar o impacto da troca de ligantes sobre as propriedades magnéticas desses sistemas, os gráficos da Figura 5.8 apresentam a comparação do comportamento magnético da amostra **DT1** antes (partículas recobertas por ácido oléico) e depois (partículas recobertas por DMSA) deste procedimento.

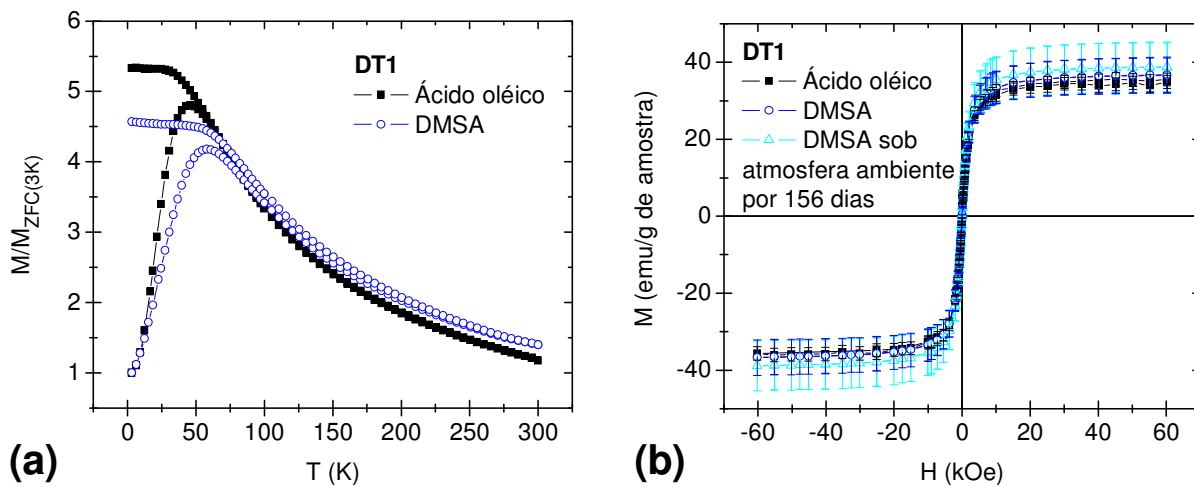


Figura 5.8: (a) Medidas de magnetização ZFC/FC e (b) em função do campo magnético aplicado da amostra **DT1** antes e depois da troca de ligantes e após envelhecimento em atmosfera ambiente.

Os resultados mostram que há um aumento no máximo da curva ZFC e na T_{irr} (~ 300 K) após a troca de ligantes. As suposições levantadas para esse caso incluem um ligeiro aumento no diâmetro médio das partículas da amostra após a troca de ligantes devido às etapas adicionais de centrifugação e lavagem envolvidas no processo que possam eventualmente ter dissolvido e descartado as partículas menores e também a formação de aglomerados com interações de ordem dipolar.

Na Figura 5.9 a seguir comparamos os valores de anisotropia efetiva K e as distribuição de tamanhos de partícula obtidas através do tratamento dessas curvas ZFC e FC, como já explicado anteriormente.

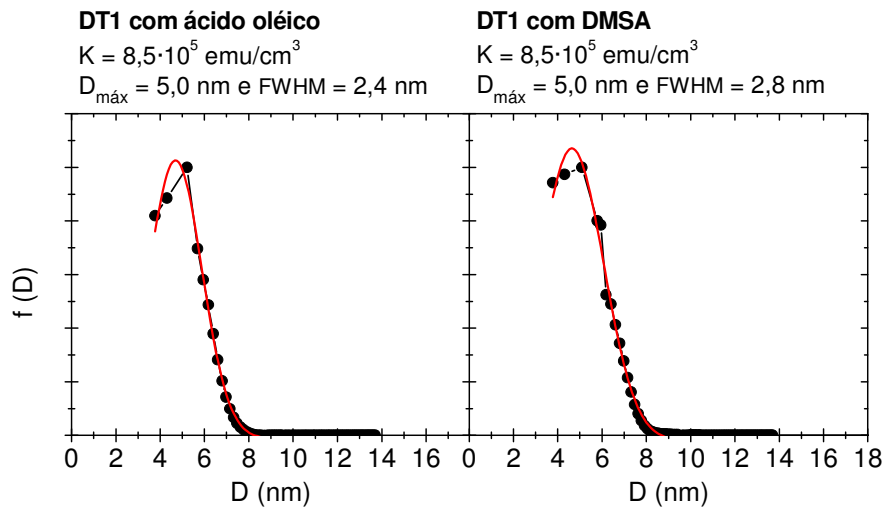


Figura 5.9: Valores de anisotropia efetiva K e distribuição de diâmetros obtidos através das curvas ZFC/FC e sua relação com o diâmetro médio de 5 nm estimado por TEM para a amostra **DT1** antes e depois da troca de ligantes.

Essa análise reforça a idéia de que não foram significativas as mudanças nos comportamentos magnéticos em função da temperatura, já que se mantiveram os valores de anisotropia efetiva e as distribuições de diâmetros antes e depois da troca de ligantes.

Nos gráficos de magnetização em função do campo magnético aplicado da Figura 5.8 (b), optamos por apresentar os valores de magnetização em unidades de emu/g de amostra, pois nesse caso em que comparamos diferentes ligantes, a suposição de que ambos os recobrimentos formariam camadas de 1 nm de espessura com densidade uniforme poderia embutir graves erros na apresentação dos dados e levar a conclusões precipitadas. Além disso, incluímos as barras de

erro associados aos valores de magnetização devido às pequenas quantidades de amostra analisadas (da ordem de alguns poucos miligramas em massa de pó de partículas).

Assim, observamos que, em princípio, a troca de ligantes não afeta consideravelmente o comportamento magnético da amostra à temperatura ambiente e ela se mantém estável ao longo do tempo, mesmo quando exposta à atmosfera ambiente. No entanto, é importante ressaltar que o estudo realizado aqui foi pontual e dados adicionais são desejáveis.

5.3 Testes biomédicos

Com a finalidade de avaliar a possível aplicação desses sistemas em biomedicina, selecionamos as amostras **DT1** e **DT2** para a realização de testes de transfecção em células HeLa e posterior detecção das células marcadas em aparelhos de MRI clínico.

Células HeLa em meio de cultura foram incubadas juntamente com a solução aquosa dessas amostras na forma de ferrofluido pelos intervalos de tempo de 1, 3, 6 e 20 horas, respectivamente. A imagem de TEM da Figura 5.10 mostra uma dessas células após incubação com partículas da amostra **DT2**.

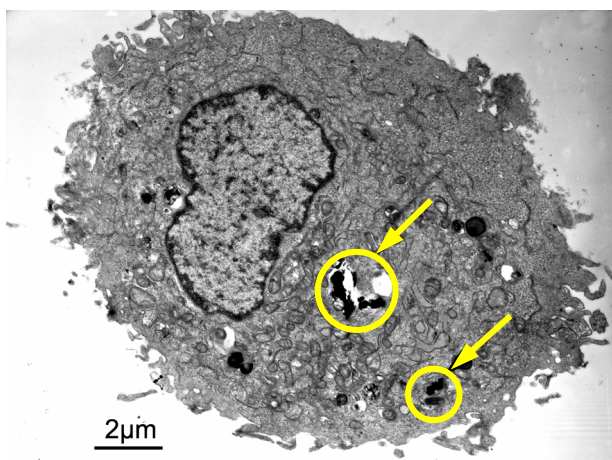


Figura 5.10: Imagem de TEM de célula HeLa após a incorporação das NPs da amostra **DT2**.

As setas indicam regiões de aglomerados de NPs incorporadas pela célula, o que indica o sucesso da fagocitose sem o uso adicional de agentes de transfecção, como já descrito na literatura [8].

A análise quantitativa da incorporação das NPs pelas células em função do tempo de incubação, de acordo com o procedimento descrito previamente na seção “2.3 – Testes biomédicos”, encontra-se no gráfico da Figura 5.11.

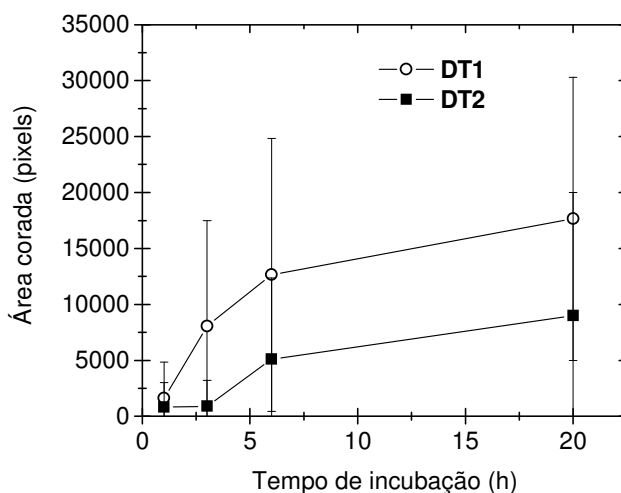


Figura 5.11: Curvas de incorporação das amostras **DT1** e **DT2** por células HeLa.

Os dados sugerem que partículas menores são mais facilmente fagocitadas pelas células HeLa e a maior taxa de incorporação ocorre nas primeiras 6 horas de incubação. Porém, deve-se considerar que as amostras estudadas apresentam apenas uma pequena diferença entre os diâmetros médios (cerca de 3 nm), os erros associados aos valores de área corada de NPs são grandes e os resultados devem ser tomados com ressalva.

Testes de detecção por MRI das células marcadas com a amostra **DT2** também foram realizados e as imagens se encontram na Figura 5.12.

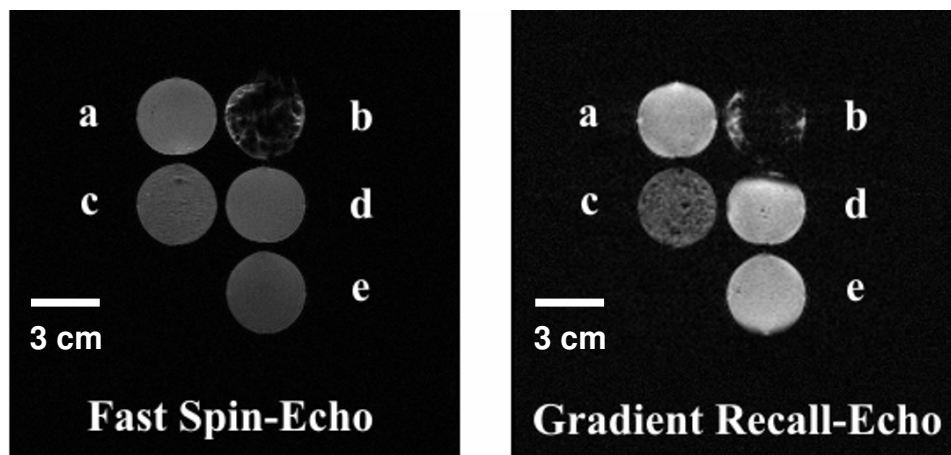


Figura 5.12: Testes de MRI da amostra **DT2**: (a) células HeLa em agarose, (b) NPs em agarose, (c) células HeLa com NPs incorporadas, (d) e (e) fundo de agarose.

Essas imagens comprovam que, além do fundo de agarose e de células HeLa não marcadas, é possível distinguir o contraste negativo gerado pelas células marcadas com as NPs da amostra **DT2**. Podemos então dizer que esses sistemas, quando recobertos por DMSA, assim como a amostra comercial *Iron (III) Oxide Nanopowder*[®] da Aldrich analisada anteriormente, é eficiente na marcação de células HeLa e detecção por aparelhos de MRI clínicos.

Em relação às imagens obtidas, vemos que a sequência de pulsos *Gradient Recall-Echo* apresenta melhor sinal em relação à sequência *Fast Spin-Echo*.

5.4 Discussão

A síntese de NPs magnéticas através da decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ mostrou ser um procedimento adequado para a produção de sistemas com futuras possibilidades de aplicações biomédicas. Essa metodologia apresentou bom controle de tamanhos de partícula com estreitas distribuições, contornos esféricos bem definidos e alta cristalinidade nas fases de óxido de ferro de interesse. Além disso, verificamos que é possível ajustar as características morfológicas das NPs através de variações nos parâmetros da reação; nesse caso, aumentando o tempo de aquecimento e utilizando sementes pré-sintetizadas foi possível aumentar o diâmetro médio das partículas.

Neste trabalho, vimos que será necessário dispensar mais atenção no planejamento de experimentos futuros mais sistemáticos e abrangentes antes de chegarmos a resultados conclusivos tanto em relação à preservação das propriedades magnéticas das NPs após a troca de ligantes e após envelhecimento em atmosfera ambiente quanto em relação às taxas de incorporação por células HeLa em função do tamanho médio das partículas e do tempo de incubação.

As características das camadas de recobrimento de ácido oléico e de DMSA poderão ser melhor analisadas através de medidas de espectroscopia de absorção na região do infra-vermelho para verificação da adsorção das moléculas de ligantes nas NPs e também por medidas de termogravimetria para avaliar a porcentagem referente aos ligantes na massa total de amostra. Uma análise morfológica após a troca de ligantes também se faz necessária a fim de verificar a possível formação de aglomerados.

Os testes biomédicos de incorporação de NPs por células HeLa necessitam de estatísticas mais confiáveis em suas análises quantitativas e também poderiam ser feitas variando-se o tamanho das NPs em uma escala maior ou utilizando outros recobrimentos biocompatíveis.

De qualquer modo, verificamos que, assim como as partículas comerciais analisadas, esses sistemas são facilmente incorporados por células HeLa e posteriormente é possível detectar essas células marcadas em aparelhos de MRI clínico.

Concluimos que a síntese em solventes orgânicos a altas temperaturas apresenta muitas vantagens em relação à síntese por co-precipitação de sais em soluções aquosas, e que a qualidade das partículas geradas pode ser aproveitada para futuras aplicações na área da medicina através de um simples procedimento de troca de ligantes.

A descrição desses resultados e informações adicionais podem ser encontradas no artigo “*Structural and morphological investigation of magnetic nanoparticles based on iron oxides for biomedical applications*”; Paula S. Haddad, Tatiana M. Martins, Lília D’Souza-Li, Li M. Li, Konradin Metze, Randall L. Adam, Marcelo Knobel, Daniela Zanchet, aceito para publicação na revista *Materials Science & Engineering C* (doi:10.1016/j.msec.2007.04.014).

[1] S. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, G. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 273 (2004).

-
- [2] Y. Jun, Y. Huh, J. Choi, J. Lee, H. Song, S. Kim, S. Yoon, K. Kim, J. Shin, J. Suh, J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5732 (2005).
- [3] D. A. Cory-Slechta, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **246**, 84 (1988).
- [4] M. E. Fleet, *Acta Crystallogr.* **38**, 1718 (1982).
- [5] D. Schulz, G. McCarthy, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA, ICDD Grant-in-Aid, (1987).
- [6] *Advances in Chemical Physics (Vol. 98)*, I. Prigogine, S. A. Rice, John Wiley & Sons Inc. (1997). Capítulo: *Magnetic Relaxation in Fine-Particle Systems*, J. L. Dormann, D. Fiorani, E. Tronc, pág. 283.
- [7] F. Luis, J. M. Torres, L. M. García, J. Bartolomé, J. Stankiewicz, F. Petroff, F. Fettar, J. L. Maurice, A. Vaurès, *Phys. Rev. B* **65**, 094409 (2002).
- [8] T. Pellegrino, S. Kudera, T. Liedl, A. M. Javier, L. Manna, W. J. Parak, *Small* **1**, 48 (2005).

6 Decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$

Frente aos resultados positivos obtidos nas sínteses por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ descritos no capítulo anterior, optamos por dar continuidade nos estudos de sínteses orgânicas a altas temperaturas, adotando agora um novo precursor organometálico.

A síntese de NPs magnéticas a partir da decomposição térmica do ferro pentacarbonil ($\text{Fe}(\text{CO})_5$) já vinha sendo estudada no grupo LSQ (LNLS) pelo aluno de mestrado José Marcelo Vargas. Os experimentos previamente realizados mostraram que essa rotina gera partículas com alto controle de tamanhos e formas e também há um maior rendimento em massa, que facilita a manipulação e caracterização desses sistemas.

6.1 Preparação das amostras

A decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ é frequentemente utilizada para a formação de NPs, pois as moléculas do precursor se decompõem com facilidade e a síntese em si é muito simples. São necessários apenas o precursor $\text{Fe}(\text{CO})_5$, energia na forma de calor, solvente orgânico,

surfactante para o recobrimento das partículas e um sistema apropriado para a remoção do monóxido de carbono (CO), único subproduto da reação.

A síntese química adotada nessa seção foi desenvolvida por Wonterghem *et al.* [1]. Foram adicionados 0,62 g (1,75 mmol) de oleilsarcosina (ácido graxo responsável pelo recobrimento das partículas) em um frasco contendo 7 ml de decahidronaftaleno (solvente orgânico, também conhecido como decalin) sob atmosfera de N_2 e constante agitação magnética. Após 45 minutos de purga, injetou-se 2,8 ml (21,7 mmol) de $\text{Fe}(\text{CO})_5$, a mistura foi aquecida a 120°C por 2 horas e, após uma mudança no ponto de ebulição da solução, a 180°C por mais 3 horas. Nessa fase, a cor da solução passou de laranja a preto e há liberação do gás CO. Após o resfriamento, adicionou-se etanol desaerado para precipitação das partículas (~ 40 ml), que foram posteriormente isoladas por centrifugação (3000 rpm, 20 min) e descarte da solução sobrenadante. Repetindo esse processo, as partículas foram lavadas diversas vezes com etanol desaerado, secas sob vácuo e armazenadas sob N_2 em geladeira. Essa amostra foi denominada **original** e o esquema dessa síntese encontra-se na Figura 6.1.

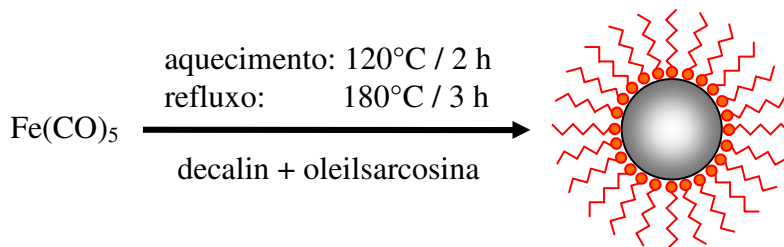


Figura 6.1: Esquema da síntese de NPs pelo método da decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$.

Nessa síntese, quanto maior a razão molar (Fe:oleilsarcosina), maior o tamanho inicial da partícula. Escolhemos a razão molar (Fe:oleilsarcosina) = (10:1) para a obtenção de NPs de aproximadamente 7 nm [2].

6.2 Caracterização

A amostra **original** foi caracterizada morfologicamente por TEM e estruturalmente por medidas de XRD, e os resultados são mostrados na Figura 6.2.

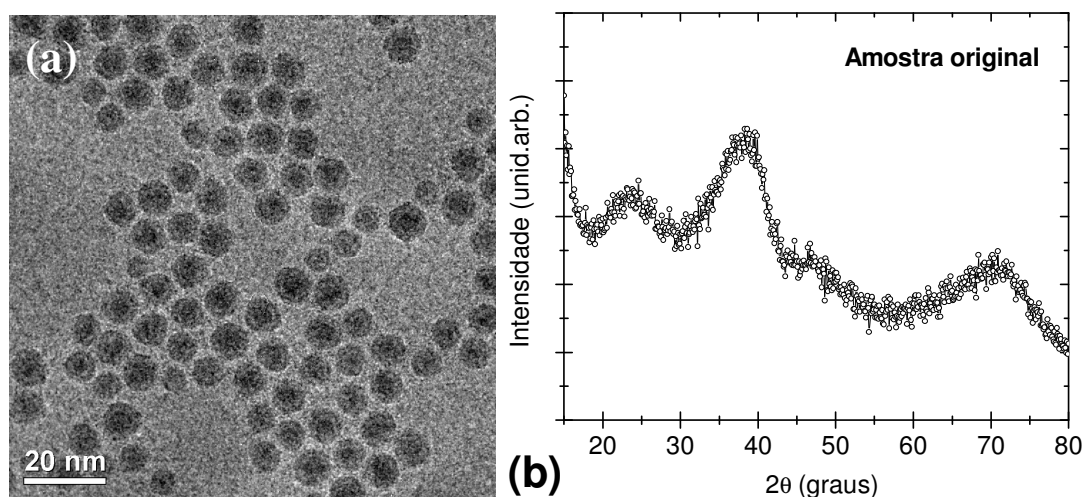


Figura 6.2: (a) Imagem de TEM e (b) difratograma da amostra **original**.

A microscopia da Figura 6.2 (a) mostra que as partículas possuem contornos esféricos bem definidos, estreita distribuição de tamanhos e diâmetro médio em torno de 6,5 nm. A separação regular entre as partículas indica que há um recobrimento efetivo por oleilsarcosina que impede a formação de aglomerados.

As medidas de XRD, por sua vez, indicam que as NPs possuem um baixo grau de cristalinidade, uma vez que observamos um fundo amorfo e alguns picos largos que podem corresponder a reflexões das fases magnetita/maghemita ou hematita, sem uma fase característica. Experimentos prévios já realizados no grupo LSQ mostraram que essas partículas de Fe se oxidam rapidamente quando exposta à atmosfera ambiente, formando um óxido amorfo, como mostrado por XRD. Essa estrutura amorfa parcialmente oxidada pode estar relacionada com o contraste tipo casca-carço visualizado na imagem de TEM [3].

Sendo assim, a fim de analisar a estabilidade dessa amostra e a influência dessa oxidação, estudamos seu comportamento magnético ao longo do tempo sob atmosfera ambiente. Os gráficos de magnetização encontram-se na Figura 6.3. Neste capítulo, seguindo o procedimento adotado nos capítulos anteriores a fim de apresentar os valores de magnetização em unidades de emu/g de NPs, subtraímos da massa total de amostra a contribuição do ligante oleilsarcosina, supondo que este compõe uma camada de aproximadamente 1 nm de espessura com densidade constante ao redor das partículas e considerando os diâmetros médios estimados por TEM.

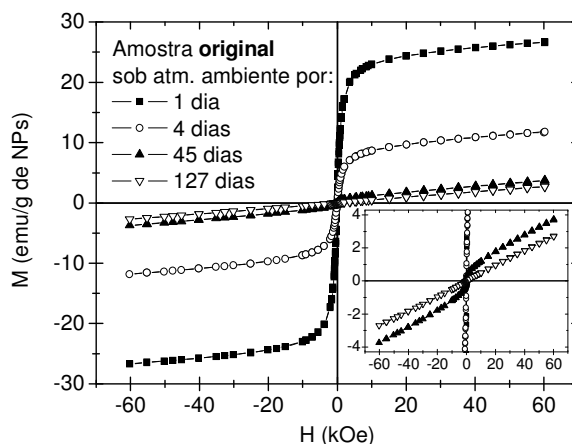


Figura 6.3: Estudo do envelhecimento da amostra **original** quando armazenadas sob atmosfera ambiente através de medidas de magnetização em função do campo magnético aplicado.

Notamos inicialmente que, após 1 dia de exposição ao ar, a amostra **original** apresenta comportamento superparamagnético com $M_0 = 28$ emu/g de NPs. Mas, apesar do recobrimento efetivo por oleilsarcosina, as partículas sofrem perdas significativas do sinal magnético ao longo do tempo quando expostas ao ar, principalmente nos primeiros dias, tornando-se praticamente paramagnéticas em cerca de 127 dias.

Desse modo, visando promover uma maior estabilidade às partículas originais, assim como analisar a evolução da distribuição de tamanhos, da morfologia e da cristalinidade, foram realizados tratamentos térmicos em atmosfera ambiente e com excesso de oleilsarcosina na razão em massa (NPs:oleilsarcosina) = (4:1), para garantir o recobrimento e solubilidade das partículas, quaisquer que fossem as mudanças ocorridas durante os tratamentos. Os parâmetros variados foram a temperatura (de 100°C a 300°C, temperatura limite de degradação da oleilsarcosina) e o tempo de tratamento (de 30 minutos a 24 horas). Esses estudos foram realizados em parceria com a Dra. Paula Silvia Haddad Ferreira (LSQ – LNLS), que em seu trabalho de pós-doutorado procura propor um mecanismo de cristalização para esses sistemas sob tratamento térmico.

Os difratogramas das amostras geradas pelos tratamentos térmicos são apresentados na Figura 6.4 a seguir.

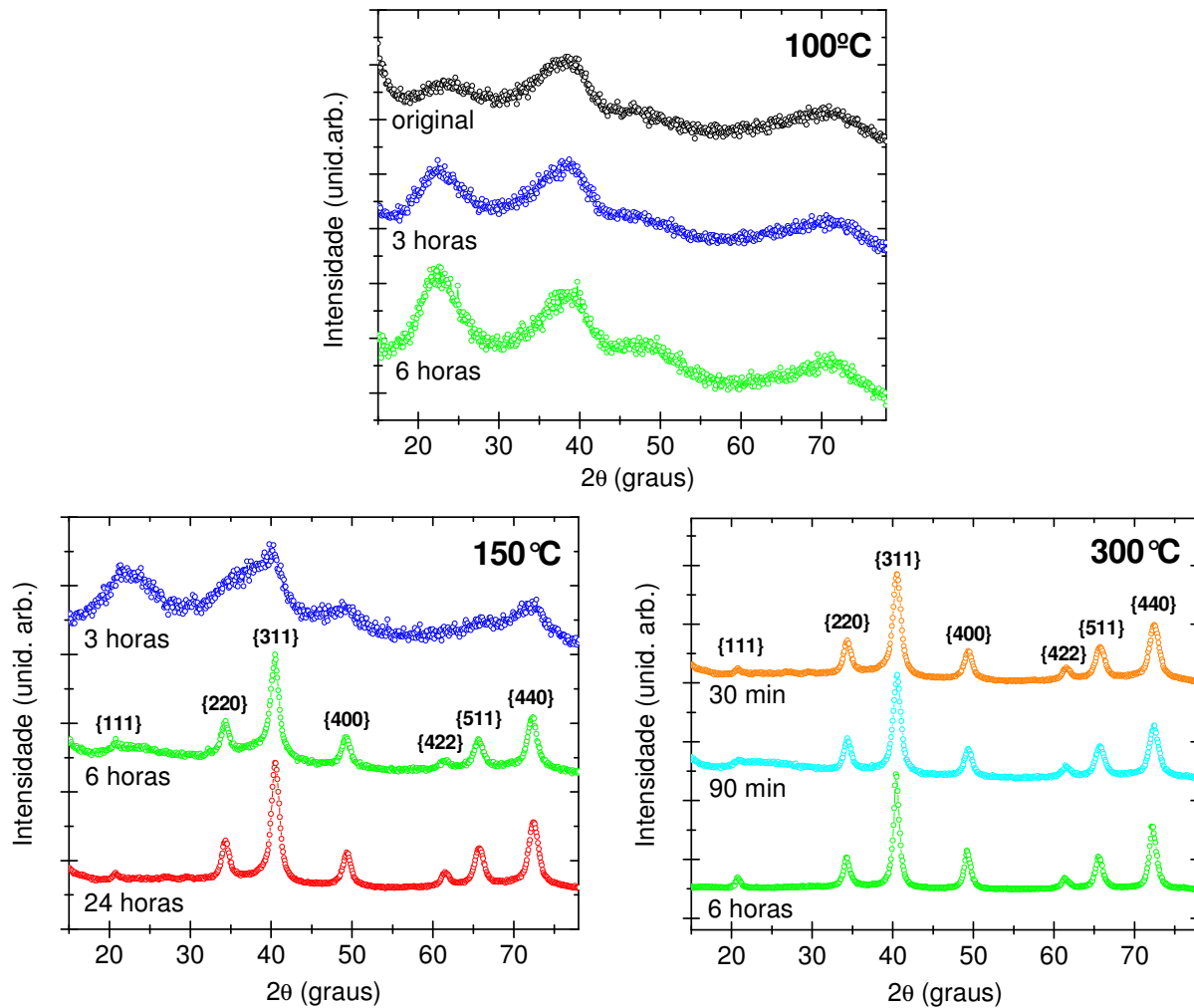


Figura 6.4: XRD das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente a 100°C, 150°C e 300°C por diferentes intervalos de tempo.

Observamos que os difratogramas das amostras aquecidas a 100°C por um intervalo de tempo de até 6 horas não apresentam mudanças significativas em relação à amostra **original**, indicando que essa temperatura não fornece energia térmica suficiente para modificar o ordenamento atômico das partículas.

As NPs tratadas a 150°C por 3 horas também apresentam somente o fundo amorfo com picos alargados de um óxido de baixa cristalinidade sem fase definida. Mas, a partir de 6 horas de tratamento térmico nessa mesma temperatura, podemos identificar um processo de cristalização do sistema, pois os difratogramas passam a apresentar vários picos de reflexão bem definidos correspondentes à estrutura da magnetita/maghemita (JCPDS 85-1436 / JCPDS 39-1346) [4, 5].

Através da fórmula de Scherrer, estimamos os diâmetros médios de $7,3 \pm 0,3$ nm e $8,0 \pm 0,2$ nm para as amostras tratadas durante 6 e 24 horas, respectivamente.

Para a temperatura de 300°C , observamos cristalização já em 30 minutos de tratamento térmico. Pela fórmula de Scherrer, estimamos os diâmetros médios de $7,9 \pm 0,3$ nm, $8,1 \pm 0,3$ nm e $11,6 \pm 0,3$ nm para as amostras tratadas durante 30 minutos, 90 minutos e 6 horas, respectivamente.

A morfologia das partículas foi investigada através de FEG-SEM e TEM. Para facilitar a comparação, analisamos apenas as microscopias das amostras aquecidas durante 6 horas a diferentes temperaturas. As imagens de FEG-SEM estão na Figura 6.5.

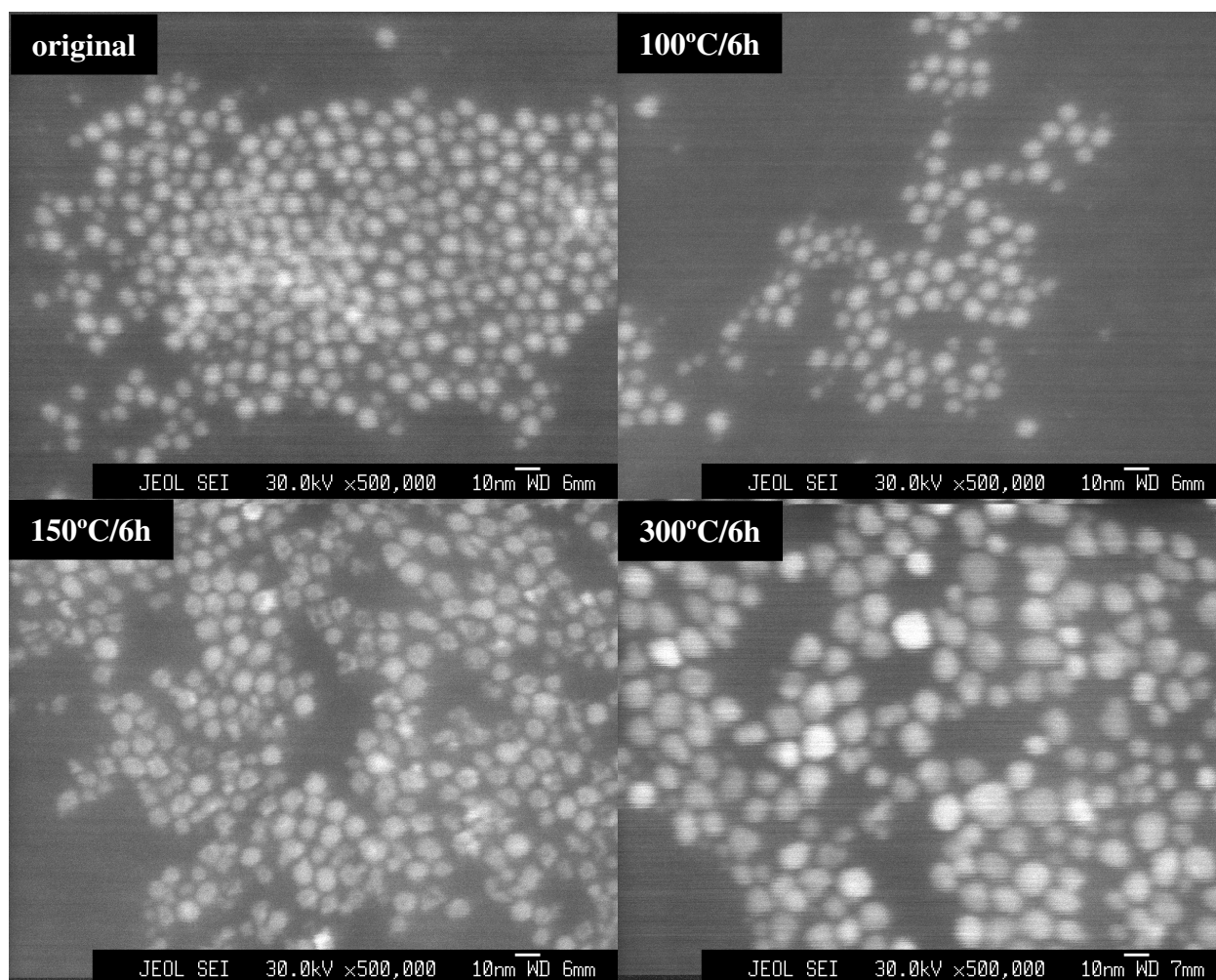


Figura 6.5: FEG-SEM das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.

Como visto anteriormente, as partículas originais são esféricas e apresentam estreita distribuição de tamanhos, enquanto a amostra aquecida a 100°C parece indicar uma distribuição bimodal. As NPs da amostra tratada a 150°C , por sua vez, se mostram ligeiramente maiores e facetadas, com uma maior dispersão de diâmetros. Quando tratadas a 300°C , notamos um aumento efetivo no diâmetro médio das partículas, porém a distribuição se torna muito mais larga e há perda dos contornos esféricos.

Com a melhor resolução das imagens de TEM foi possível investigar mais a fundo a morfologia das amostras e também obter, utilizando o programa computacional *GATAN*, as distribuições de tamanhos, sempre considerando 300 partículas ou mais. As imagens de TEM e suas respectivas distribuições de tamanhos encontram-se na Figura 6.6 e Figura 6.7.

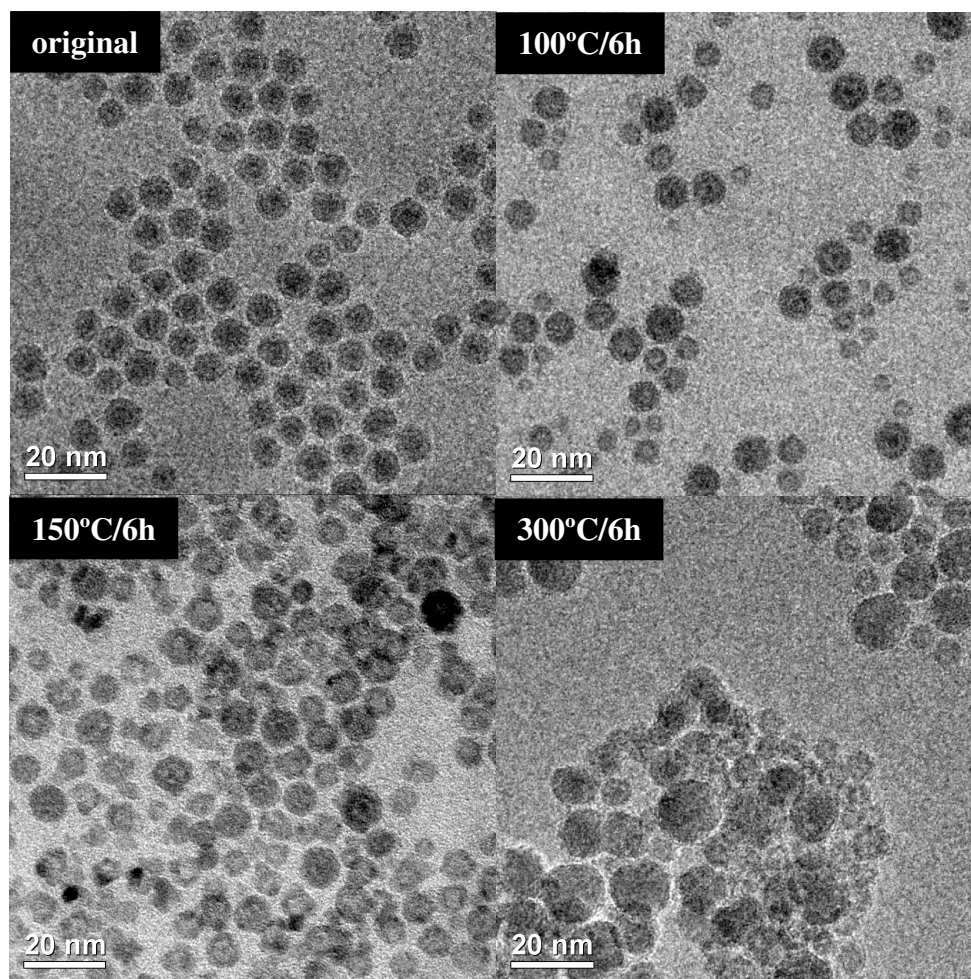


Figura 6.6: TEM das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.

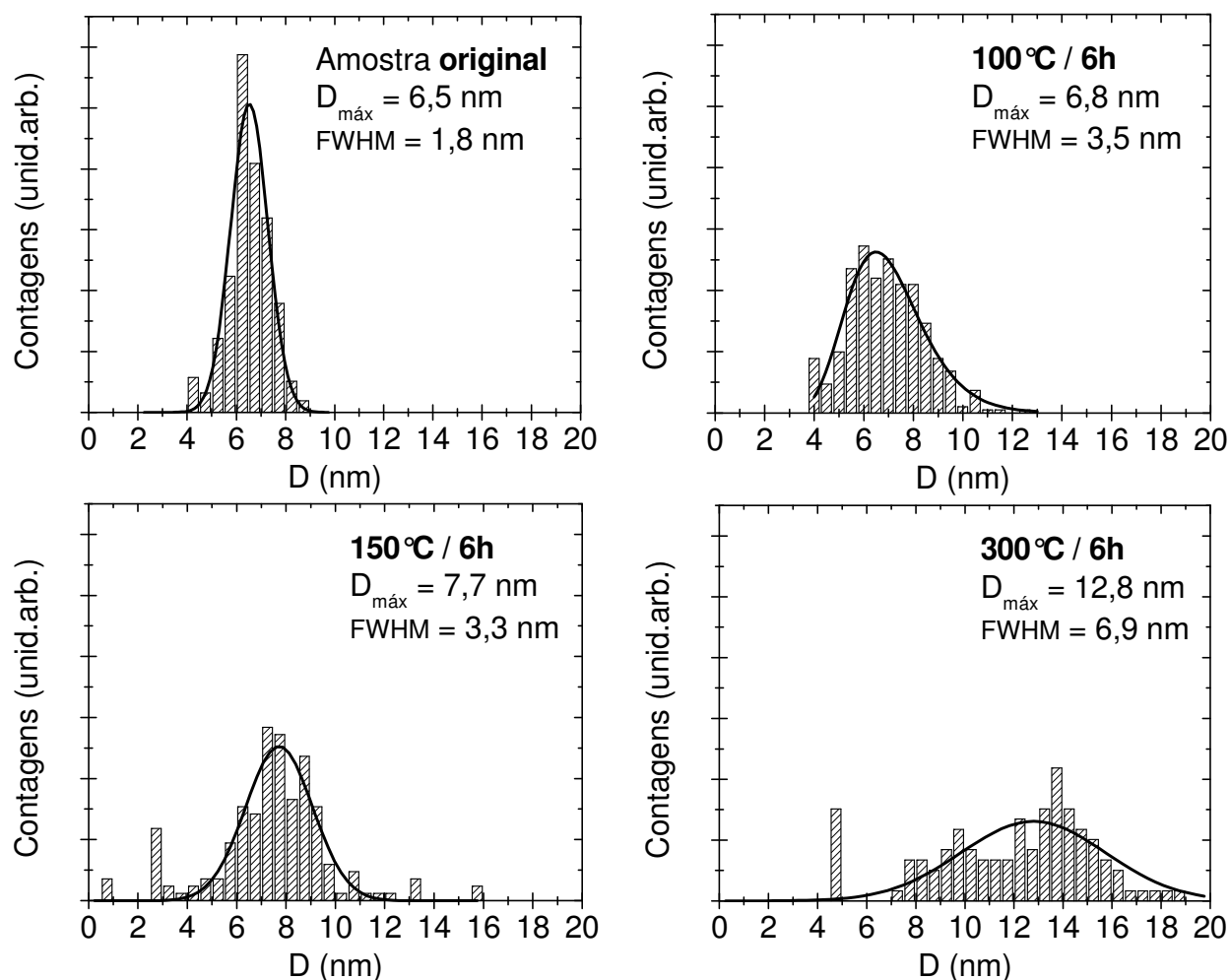


Figura 6.7: Distribuições de tamanhos obtidas utilizando o programa computacional *GATAN* com base nas imagens de TEM das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.

As microscopias da Figura 6.6 mostram que, assim como a amostra original, as partículas tratadas a 100°C ainda mantêm os contornos esféricos, os espaçamentos regulares entre si devido ao recobrimento com oleilsarcosina e também parecem indicar uma estrutura do tipo casca-carço. Podemos dizer que, conforme aumenta a temperatura do tratamento térmico, menor se torna o carço em relação à casca, o que pode ser um indício de um processo de oxidação de fora para dentro em virtude dos aquecimentos. Entretanto, é importante lembrar que o contraste das imagens de TEM é afetado por vários parâmetros como espessura da amostra e foco e tal afirmação necessita de estudos complementares para se tornar conclusiva.

Na amostra aquecida a 150°C , as partículas já não estão mais bem espaçadas como na amostra **original** e, para as partículas aquecidas a 300°C , foi observada a formação de alguns aglomerados.

A análise morfológica estatística realizada a partir das imagens de TEM, mostradas na Figura 6.7, estão de acordo com as informações fornecidas anteriormente pelas imagens de FEG-SEM. As distribuições de tamanho obtidas mostram claramente que há um aumento efetivo no diâmetro médio das partículas com o aumento da temperatura de tratamento térmico, em detrimento de uma maior dispersão de tamanhos.

As imagens de HRTEM na Figura 6.8 corroboram as medidas de XRD e confirmam a baixa cristalinidade das partículas originais, assim como das tratadas a 100°C , uma vez que só foi possível identificar pequenos domínios cristalinos em cada NP. Nas amostras aquecidas a 150°C e 300°C , por sua vez, foi observada a total cristalização das partículas.

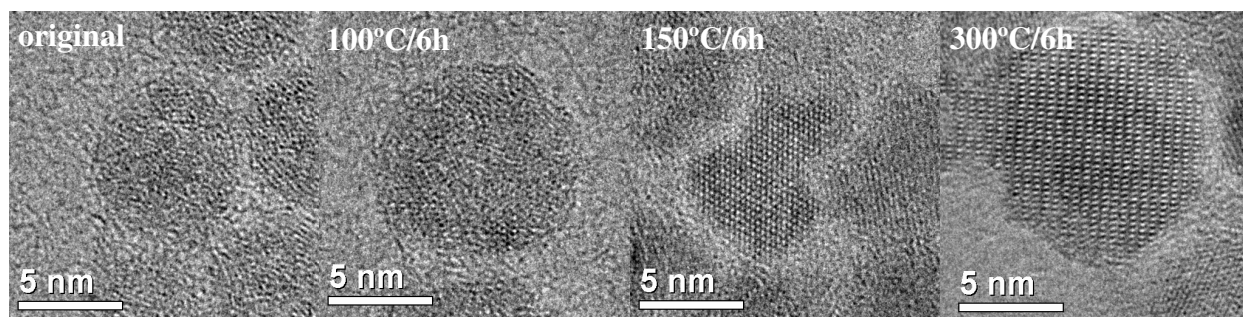


Figura 6.8: HRTEM das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.

Medidas de magnetização em função da temperatura foram realizadas na amostra **original** e nas amostras aquecidas. As curvas ZFC e FC das partículas tratadas termicamente pelo período de 6 horas encontram-se na Figura 6.9.

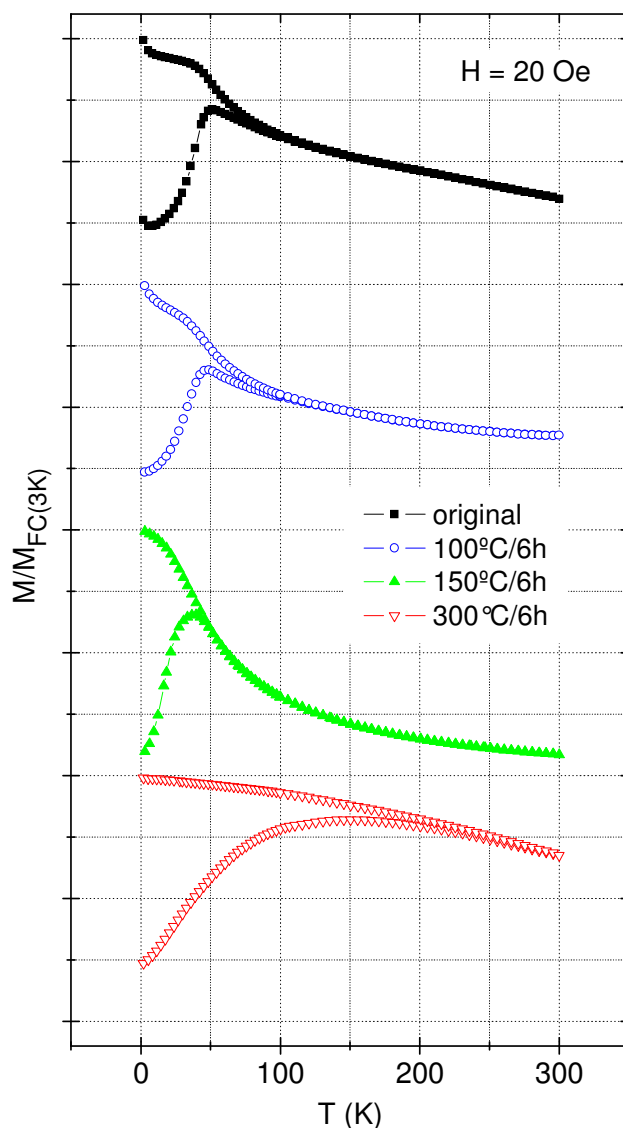


Figura 6.9: Medidas de magnetização ZFC/FC das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.

Em concordância com a caracterização morfológica e estrutural desses sistemas, as curvas ZFC e FC mostram que não há diferenças substanciais entre a amostra **original** e a aquecida a 100°C. Ambas apresentam um comportamento complexo com o desvio em relação ao esperado pela Lei de Curie para temperaturas mais altas (queda da magnetização com T^{-1} na região de regime superparamagnético).

Na amostra **original**, nota-se um ligeiro aumento nos valores de magnetização a temperaturas próximas de 2 K, tanto na curva ZFC quanto na curva FC, o que provavelmente se deve a efeitos de desordem na superfície das partículas com estrutura casca-carão. Como os

momentos magnéticos da superfície estão desordenados, eles são os últimos a serem bloqueados pela queda na energia térmica do sistema e assim contribuírem para o aumento no valor total da magnetização. Na amostra aquecida a 100°C esse fenômeno não é tão aparente, mas a existência de 2 regiões com diferentes inclinações na curva FC a temperaturas abaixo da temperatura de irreversibilidade pode ser um indício da distribuição bimodal já detectada por caracterizações anteriores.

Quando o aquecimento ocorre a 150°C, esses efeitos desaparecem e, a 300°C, observa-se claramente um aumento efetivo no tamanho e na largura da distribuição de tamanhos através da distribuição de temperaturas de bloqueio e da alta T_{irr} .

Assim como feito no capítulo anterior, foram calculadas as distribuições de temperaturas de bloqueio a partir do par de curvas ZFC e FC e, sobrepondo-as às distribuições de tamanhos obtidas por TEM, obtivemos uma nova distribuição de tamanhos e um valor para a anisotropia efetiva K . Os resultados encontram-se Figura 6.10.

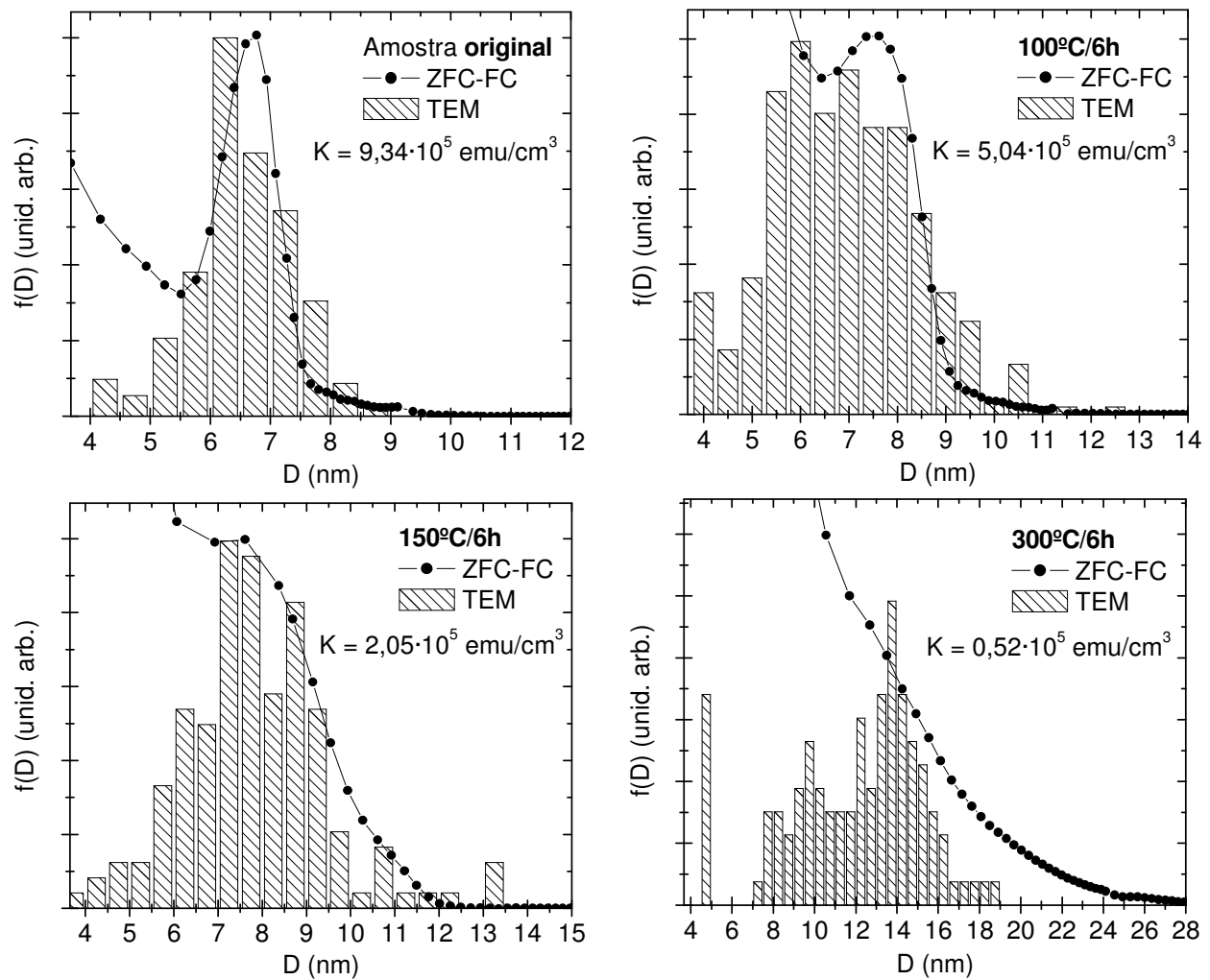


Figura 6.10: Valores de anisotropia efetiva K e distribuição de diâmetros obtidos através das curvas ZFC/FC e sua relação com a distribuição de tamanhos obtida por TEM para as amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.

No caso da amostra **original**, a análise é válida e vemos que a distribuição de tamanhos gerada pelas curvas ZFC e FC está em concordância com aquela obtida por TEM, levando a um alto valor de anisotropia efetiva. Para as demais amostras, na medida em que o comportamento magnético real das partículas se desvia das suposições adotadas no modelo (NPs constituídas por monodomínios magnéticos, ausência de interações, anisotropia uniaxial em regime bloqueado e ausência de efeitos de anisotropia em regime superparamagnético), a distribuição de temperaturas de bloqueio não mais poderá ser relacionada a uma distribuição de tamanhos e os resultados não

são confiáveis. Nos casos apresentados, esse desvio pode ocorrer devido à presença de interações ou devido à cristalização das partículas em estrutura cúbica, cuja anisotropia não é uniaxial.

Na Figura 6.11 estão as curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado para esse mesmo grupo de amostras.

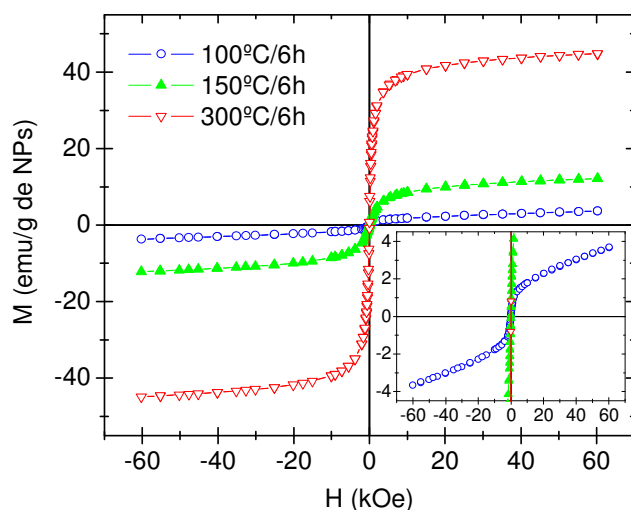


Figura 6.11: Medidas de magnetização em função do campo magnético aplicado das amostras sintetizadas por decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.

Observamos que o comportamento da amostra tratada termicamente a 100°C é bastante similar ao da amostra original após a oxidação sob atmosfera ambiente por alguns dias, mostrado anteriormente (Figura 6.3). A baixa susceptibilidade magnética dessa amostra pode ser reflexo do seu estado amorfo, e tal característica se torna menos notável com o aumento na temperatura do tratamento térmico, pois o grau de cristalização se torna maior. Assim como visto nas curvas ZFC e FC, o aumento no tamanho das partículas é notável através do aumento no momento magnético efetivo em função da temperatura do tratamento térmico.

A fim de avaliar a estabilidade das propriedades magnéticas das partículas após os tratamentos térmicos, novas medidas de magnetização em função do campo magnético aplicado foram realizadas após a exposição das amostras à atmosfera ambiente por alguns dias. Os resultados estão na Figura 6.12.

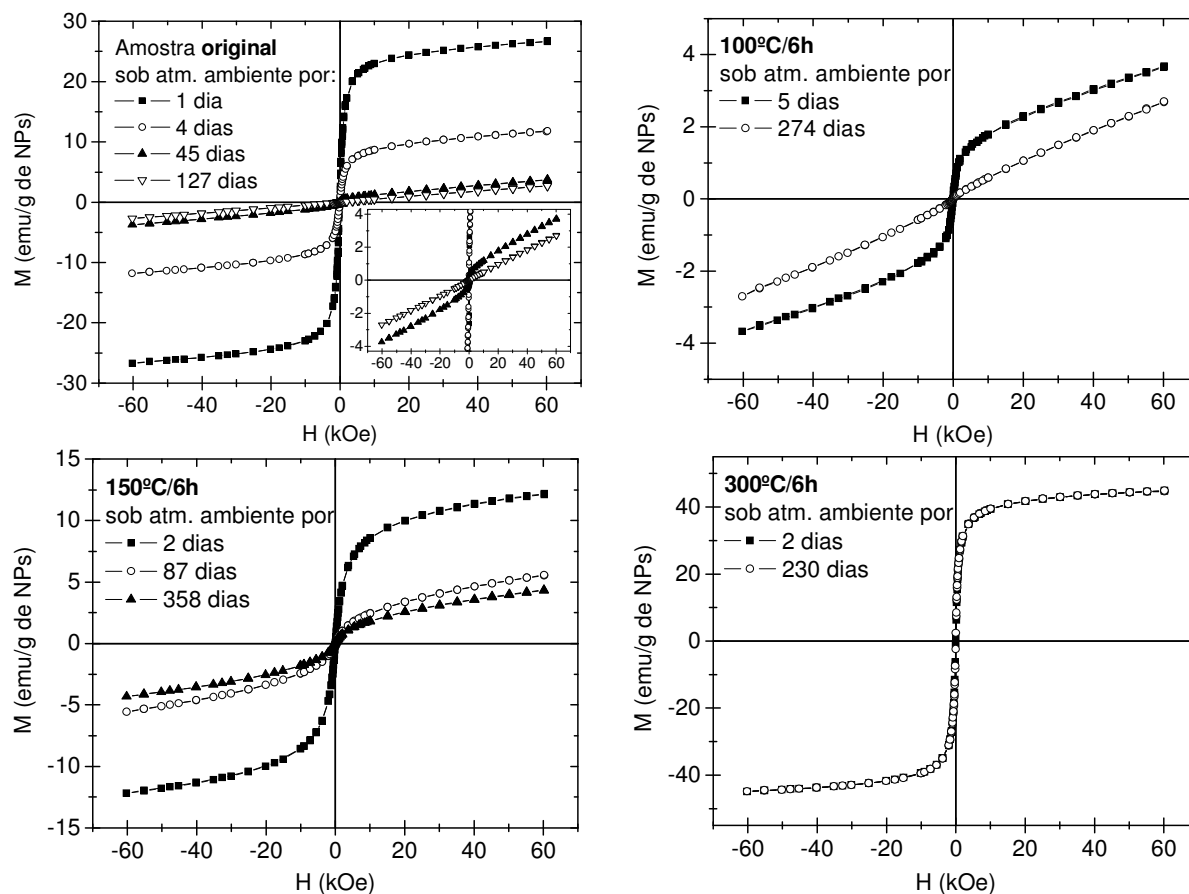


Figura 6.12: Estudo do envelhecimento das amostras quando armazenadas sob atmosfera ambiente através de medidas de magnetização em função do campo magnético aplicado para as amostras **original** e tratadas termicamente por 6 horas a diferentes temperaturas.

Após os tratamentos térmicos, apesar do excesso de oleilsarcosina na proporção (NPs:oleilsarcosina) = (4:1), as amostras ainda apresentam perda de sinal magnético para as temperaturas de tratamento iguais a 100°C e 150°C, enquanto a amostra aquecida a 300°C, por sua vez, se mostra bastante estável ao longo do tempo, provavelmente devido ao seu estado completamente cristalino. Esse estudo comprova a instabilidade dessas amostras quando em estado total ou parcialmente amorfo, explicita a importância do armazenamento sob atmosfera inerte em geladeira e a realização dos experimentos logo após sua exposição ao ar.

Por fim, adotamos o mesmo procedimento descrito com sucesso no capítulo anterior para a troca de ligantes. Todas as amostras (original e tratadas termicamente) mostraram ser facilmente dispersas em solventes orgânicos e não se dispersam em água. A troca de ligantes foi realizada misturando-se aproximadamente 10 mg do pó seco de partículas dispersas em 1 ml de tolueno e 10 mg de DMSA dissolvidos em 1 ml de DMSO e mantendo-os sob agitação magnética por 24

horas. Em seguida, as partículas foram novamente isoladas por centrifugação, secas sob vácuo e um teste simples mostrou que elas passam a ser dispersas em água. Todo esse procedimento também foi realizado sob atmosfera inerte.

6.3 Discussão

As NPs originais sintetizadas pelo método da decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ mostraram boa homogeneidade de tamanhos, com contornos esféricos e bem recobertas pela oleilsarcosina, um ligante que posteriormente pode ser trocado pelo DMSA para torná-las hidrofílicas e passíveis de serem aplicadas em biomedicina.

Em linhas gerais, podemos dizer que os tratamentos térmicos realizados em atmosfera ambiente com excesso de oleilsarcosina modificam as características estruturais e morfológicas desses sistemas de modo que:

- baixas temperaturas e tempos curtos de tratamento não modificam as NPs consideravelmente;
- há um aumento considerável no tamanho médio e na largura da distribuição de tamanhos das NPs com o aumento da temperatura do tratamento térmico;
- para altas temperaturas, observamos mais claramente um aumento no tamanho médio das NPs com o tempo de tratamento, a cristalização das NPs ocorre mais rapidamente e os contornos esféricos tornam-se mal definidos.

Além disso, as curvas de magnetização mostram que, quanto maior a temperatura do tratamento térmico, maior a susceptibilidade inicial, maior a magnetização de saturação e a anisotropia, mais larga é a distribuição de temperaturas de bloqueio e mais estáveis ao longo do tempo elas se tornam. Esses resultados estão de acordo com o aumento no tamanho e grau de cristalização das NPs com a temperatura do tratamento térmico, observadas nas caracterizações estruturais e morfológicas.

Todos esses resultados comprovam que a decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ também pode gerar partículas de alta qualidade com potencial de aplicação biomédica após tratamento térmico sob atmosfera ambiente e troca de ligantes. A amostra aquecida a 300°C , por exemplo, possui altos valores de magnetização (ainda maiores daqueles apresentados pela amostra **original**), é

altamente cristalina e estável, mas mostrou maior dispersão de tamanhos e indícios de formação de aglomerados.

Sendo assim, concluímos que uma investigação ainda mais ampla se faz necessária a fim de compreender o mecanismo exato de crescimento dessas partículas sob tratamento térmico, pois desse modo será possível estabelecer condições ótimas que proporcionem amostras estáveis ainda mais uniformes e com propriedades magnéticas adequadas.

-
- [1] J. V. Wonterghem, S. Mørup, S. W. Charles, S. Wells, *J. Colloid Interface Sci.* **121**, 558 (1988).
 - [2] J. M. Vargas, L. M. Socolovsky, M. Knobel, D. Zanchet, *Nanotechnology* **16**, S285 (2005).
 - [3] J. M. Vargas, L. M. Socolovsky, G. F. Goya, M. Knobel, D. Zanchet, *IEEE Trans. Magn.* **39**, 2681 (2003).
 - [4] M. E. Fleet, *Acta Crystallogr.* **38**, 1718 (1982).
 - [5] D. Schulz, G. McCarthy, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA, ICDD Grant-in-Aid, (1987).

Conclusões e perspectivas

Este trabalho teve como principal foco a produção de NPs magnéticas de óxidos de ferro por diferentes métodos químicos e o estudo de suas características morfológicas, estruturais e magnéticas em função da rotina sintética adotada. Procuramos obter partículas de melhor qualidade em relação às amostras comercialmente disponíveis e avaliar a aplicabilidade desses sistemas em biomedicina.

Foram feitas sínteses de NPs por co-precipitação de sais em solução aquosa e por decomposição térmica de compostos organometálicos. Várias técnicas foram utilizadas na caracterização desses sistemas (TEM, HRTEM, FEG-SEM, XRD e medidas de magnetização), além de testes de incorporação por células HeLa e detecção por MRI.

Verificamos que, por serem realizadas a temperaturas mais elevadas, as sínteses orgânicas proporcionam melhor controle de tamanhos. Foi observado também que a mudança do precursor organometálico nas sínteses por decomposição térmica implica na geração de sistemas muito distintos. Enquanto o uso de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ produz partículas bem cristalinas na estrutura magnetita/maghemita, o uso de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ produz partículas amorfas parcialmente oxidadas. Essas partículas, por sua vez, após tratamento térmico em atmosfera ambiente, podem sofrer aumento no diâmetro médio, completa cristalização e estabilização de suas propriedades magnéticas ao longo do tempo, porém às custas de um alargamento na distribuição de tamanhos e perda dos contornos esféricos. Concluimos que à medida que for compreendido o mecanismo sob o qual

ocorre o crescimento e cristalização dessas partículas sob tratamento térmico, teremos ferramentas para melhorar ainda mais a qualidade das amostras. Novas medidas como espectroscopia de absorção na região infra-vermelho, termogravimetria e espalhamento de raios-X a baixos ângulos já estão em andamento e em análise no trabalho de pós-doutorado da Dra. Paula Silvia Haddad Ferreira (LSQ – LNLS).

Em relação às sínteses realizadas pela decomposição térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, corroboramos que a alta qualidade das NPs provenientes de reações orgânicas pode ser aproveitada para aplicações em biomedicina através de um procedimento simples – porém fundamental – de troca de ligantes hidrofóbicos por ligantes hidrofílicos. No entanto, ainda que a análise realizada aqui não aponte mudanças significativas nas propriedades magnéticas das partículas após a troca de ligantes, tal procedimento demanda experimentos adicionais mais amplamente sistematizados a fim de obter resultados conclusivos em relação ao seu impacto sobre as características iniciais das NPs, estabilidade e sucesso do novo recobrimento.

Os testes de incorporação de NPs por células HeLa forneceram resultados positivos, mas também poderão ser ampliados e sistematizados em função das diversas características variáveis de NPs a fim de determinar as características ideais, como tamanho e recobrimento.

Os estudos de magnetização realizados em todos os sistemas sintetizados podem se tornar ainda mais precisos se pudermos facilitar a adaptação do comportamento real ao modelo teórico, por exemplo, dispersando as partículas em polímeros, aumentando assim as distâncias entre elas e reduzindo interações de troca e de ordem dipolar. Além disso, caracterizações adicionais em relação às camadas de recobrimento poderiam permitir uma quantificação mais exata da massa efetiva de partículas. Desse modo poderíamos obter ainda mais informações a partir das medidas de magnetização e relacioná-las melhor às outras técnicas de caracterização.

Com a realização de experimentos adicionais, como espectroscopia Mössbauer e absorção de raios-X por exemplo, a questão da natureza do óxido de ferro formado nessas sínteses (magnetita ou maghemita), ainda em aberto, também poderá ser melhor investigada.

Apesar das dificuldades enfrentadas, podemos dizer que foi possível analisar as vantagens de cada tipo de síntese e obter partículas finas com potencialidade para aplicações biomédicas, indo desde as etapas de fabricação de amostras, passando por ampla caracterização e finalizando com a interpretação dos resultados obtidos para esses sistemas. Devido ao grande interesse da

comunidade científica nessa área, NPs magnéticas de óxidos de ferro são alvo de amplas pesquisas e ainda permanecem inúmeras opções e questões a serem investigadas.

Apêndice I – Óxidos de ferro

Ao todo, existem 16 diferentes fases de óxidos de ferro já identificadas [1]. Através de processos de oxidação ou tratamentos térmicos, é possível passar de uma fase a outra, sendo a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a mais estável.

A hematita possui uma estrutura cristalina hexagonal romboédrica (hcp) e, abaixo da temperatura de transição de Morin a 260 K, constitui um material com acoplamento antiferromagnético.

As fases de óxidos de ferro mais apropriadas e estudadas para aplicações biomédicas são a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Ambas apresentam uma estrutura do tipo cúbica espinélio inversa (ccp), esquematizada na Figura I.1.

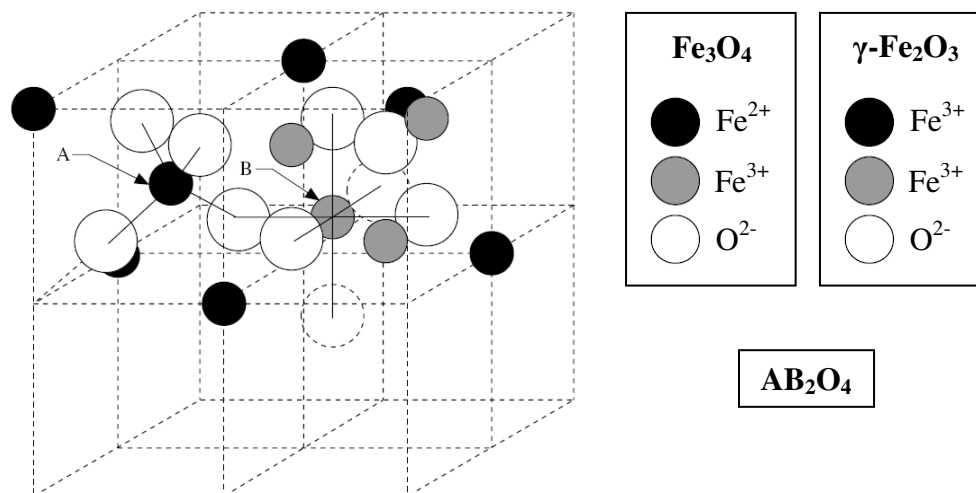


Figura I.1: Arranjo dos íons metálicos em sítios tetraédricos (A) e octaédricos (B) na estrutura espinélio (AB_2O_4) apresentada pela magnetita e maghemita [2].

A magnetita tem estrutura cúbica espinel inversa com oxigênios formando uma rede ccp, cátions de Fe^{2+} os ocupando sítios tetraédricos (A) e cátions Fe^{3+} ocupando os sítios octaédricos (B). A maghemita se diferencia apenas por possuir todos ou a maioria dos íons metálicos no estado trivalente (Fe^{3+}), sendo que vacâncias catiônicas compensam a oxidação dos cátions Fe^{2+} . Ambos os materiais apresentam acoplamento ferrimagnético e magnetizações de saturação de $M_S = 92\text{--}100$ emu/g para a magnetita e $M_S = 60\text{--}80$ emu/g para a maghemita [1].

É importante destacar que, devido a tamanha semelhança na estrutura desses dois óxidos de ferro, é difícil distinguir entre uma fase e outra apenas utilizando a técnica de XRD, principalmente em sistemas nanométricos (veja Figura I.2).

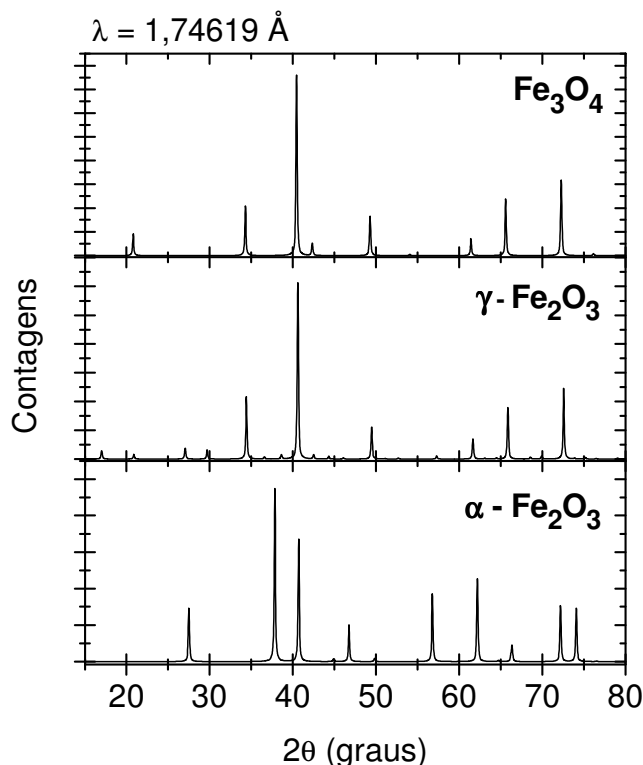


Figura I.2: Difratogramas padrão dos óxidos de ferro magnetita (Fe_3O_4 , JCPDS 85-1436) [3], maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, JCPDS 39-1346) [4] e hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, JCPDS 87-1166) [5] em estado massivo. Vemos que é difícil distinguir entre magnetita e maghemita devido a suas estruturas cristalinas similares.

Nesse caso, são necessários experimentos complementares de absorção de raios-X ou espectroscopia Mössbauer, por exemplo, para auxiliar na determinação de cada um desses óxidos.

[1] *The Iron Oxides*, R. M. Cornell, U. Schwertmann, VCH Publishers (1996).

[2] *Ferromagnetic Materials*, R. A. McCurrie, Academic Press (1994).

[3] M. E. Fleet, *Acta Crystallogr.* **38**, 1718 (1982).

[4] D. Schulz, G. McCarthy, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA, ICDD Grant-in-Aid, (1987).

[5] H. Sawasa, *Mater. Res. Bull.* **31**, 141 (1996).

Apêndice II – Artigos publicados ou submetidos

- *Structural and morphological investigation of magnetic nanoparticles based on iron oxides for biomedical applications*

Paula S. Haddad, Tatiana M. Martins, Lília D'Souza-Li, Li M. Li, Konradin Metze, Randall L. Adam, Marcelo Knobel, Daniela Zanchet

Aceito para publicação na *Materials Science & Engineering C*.

- *Evolution of colloidal iron oxides nanoparticles under thermal treatment*

Paula S. Haddad, Tatiana M. Martins, Marcelo Knobel e Daniela Zanchet,

A ser submetido à *The Journal of Colloid and Interface Science*.