

Aplicação de Nanopartículas Magnéticas em Hipertermia

**Stefan dos Santos Cunha**

Relatório Final de Projeto apresentado na

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**

**Instituto Politécnico de Bragança**

Para obtenção do grau de Mestre em

**Tecnologia Biomédica**

Novembro 2014





## Aplicação de Nanopartículas Magnéticas em Hipertermia

Relatório Final de Projeto apresentado na

**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**

**Instituto Politécnico de Bragança**

Para obtenção do grau de Mestre em

**Tecnologia Biomédica**

Orientadores: Helder Gomes, Pedro João Rodrigues, Rui Lima

“Este Trabalho de Projeto não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri”

Novembro 2014



# Agradecimentos

---

No momento em que dou por completa esta tese de mestrado, gostaria de expor a minha gratidão pela compreensão e apoio àqueles que, com o decurso do tempo, enriqueceram a minha investigação científica.

Queria agradecer em especial:

- Ao Professor Doutor Helder Gomes, pelos conhecimentos transmitidos que se tornaram cruciais para o desenvolvimento da tese, assim como a dedicação e o incentivo que tornaram a realização do trabalho mais cativante;
- Ao Professor Doutor Rui Lima pela orientação e ensinamentos concedidos ao longo do desenvolvimento desta tese, mas também pela dedicação e paciência na elaboração de todo o relatório;
- Ao Professor Doutor Pedro João pelo empenho prestado ao longo do projeto, assim como a disponibilidade em criar as condições necessária para a realização da tese;
- À Doutora Helena Gonçalves, um agradecimento especial, não só pela ajuda, pelos conhecimentos e companhia, mas também pelo tempo e dedicação mostrada ao longo desta fase;
- À Diana Pinho, pela ajuda no trabalho, pela orientação e pelo estímulo dado ao longo destes últimos meses;
- Ao Rui Ribeiro, pela colaboração e ajuda, bem como todas as pessoas dos laboratórios que frequentei na ESTiG para a realização deste trabalho;
- Ao Doutor Adrián Silva, do Laboratório de Catálise e Materiais da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, pela disponibilidade mostrada para a realização da caracterização dos materiais produzidos por SEM e XPS;
- Aos meus pais e família, pelo incentivo, dedicação, paciência e, sobretudo, pela forma como me educaram ao longo de todos estes anos. E à minha namorada Andreia Flores, sobretudo pela muita paciência demonstrada, pela força e pela muita ajuda transmitida para desenvolver e finalizar esta etapa.



# Resumo

---

Desde a sua descoberta, as nanopartículas (NP) têm sido aplicadas nas mais diversas áreas da ciência. De facto, atualmente, é comum observar o uso de nanopartículas em áreas como a eletrónica, ótica e ambiente. À medida que o número de aplicações foi crescendo, tornou-se necessário avaliar a possível citotoxicidade das nanopartículas, sendo este um parâmetro particularmente importante em hipertermia magnética. De acordo com alguns dos estudos publicados, a toxicidade das nanopartículas está associada a diversos fatores, como por exemplo os grupos de superfície, o estado de oxidação dos elementos na superfície, a natureza dos materiais que as constituem, a reatividade com as membranas celulares e o tamanho, entre outros.

No sentido de tentar explorar a relação entre o tamanho, os grupos de superfície, o material de partida e a sua toxicidade, produziram-se óxidos de ferro a partir de nitrato de ferro (III), cloreto de ferro (III) e hexacianoferrato de potássio (II), em que as nanopartículas resultantes eram magnéticas e outras não. De forma a avaliar a toxicidade das nanopartículas produzidas na membrana celular, escolheu-se como modelo a hemoglobina de diferentes espécies, nomeadamente, humano, bovino, ovino e caprino. Adicionalmente efetuou-se um ensaio para verificar se as nanopartículas produzidas tinham um efeito mensurável na inibição do crescimento da bactéria *Escherichia coli*.

A realização de escoamentos sanguíneos em capilares de vidro com e sem campo magnético permitiu verificar a influência das nanopartículas na camada de plasma em diferentes caudais bem como a área de aglomeração destas quando é aplicado um campo magnético.

**Palavras-chave:** Nanopartículas magnéticas, Toxicidade, Camada de plasma



# Abstract

---

Since its discovery, nanoparticles (NP) have been applied in several areas of science. In fact, currently it is common to observe the use of nanoparticles in areas such as electronics, optics and environment. As the number of applications has grown, particularly in the environmental and biomedical technology area, it became necessary to evaluate the possible cytotoxicity of nanoparticles in blood flow. According to some studies published in the subject, the toxicity of nanoparticles is associated with several factors, such as, the surface groups, the oxidation state of the elements on the surface, the nature of the material used, reactivity with membranes cellular and size, among others.

In order to attempt to exploit the relationship between sizes, surface groups, starting materials and its toxicity, the nanoparticles were produced from: iron nitrate (III), iron chloride (III) and potassium hexacyanoferrate potassium (II), resulting in magnetic and none magnetic nanoparticles. In order to evaluate the toxicity of the produced nanoparticles in the cell membrane, the hemoglobin model of different species was chosen, including human, bovine, sheep and goats. Additionally, we performed a trial which aimed to verify whether the produced nanoparticles had a measurable effect in inhibiting the growth of the bacterium *Escherichia coli*.

The performance of blood flow (glass capillaries) with and without magnetic field could note the influence of nanoparticles on the plasma layer in different flow area and agglomeration of these when applied in a field.

**Key-words:** Magnetic nanoparticles, Toxicity, Cell-free layer



# Índice Geral

---

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
Índice Geral .....	xi
Lista de Acrónimos .....	xv
Índice de Tabelas .....	xvii
Índice de Figuras.....	xix
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo e Enquadramento .....	3
1.2 Estrutura da Tese.....	4
<b>CAPÍTULO 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Nanopartículas .....	7
2.1.1 Nanotecnologia .....	7
2.1.2 Características e Aplicações dos Nanomateriais Magnéticos.....	10
2.1.2.1 Mecanismos de Libertação Controlada .....	12
2.1.2.2 Imagem por Ressonância Magnética.....	12
2.1.2.3 NP's Magnéticas em Hipertermia .....	13
2.1.3 Métodos de Síntese de Nanopartículas Magnéticas .....	14
2.1.3.1 Precipitação Química .....	14
2.1.3.2 Microemulsão .....	15
2.1.3.3 Decomposição Térmica .....	16
2.1.3.4 Síntese Hidrotérmica .....	17
2.1.4 Propriedades Magnéticas dos Materiais .....	19

2.1.5	Magnetismo nos Materiais.....	20
2.1.5.1	Ferromagnetismo .....	20
2.1.5.2	Diamagnetismo .....	21
2.1.5.3	Paramagnetismo .....	22
2.1.5.4	Antiferromagnetismo.....	23
2.1.5.5	Ferrimagnetismo .....	24
2.1.5.6	Histerese .....	25
2.1.6	Técnicas de Caracterização das Nanopartículas .....	28
2.1.6.1	Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	28
2.1.6.2	Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM).....	30
2.1.6.3	Espectroscopia Fotoeletrónica de Raios-X (XPS).....	30
2.1.7	Toxicidade das Nanopartículas .....	31
2.2	Biomicrofluidica .....	33
2.2.1	O Sangue.....	34
2.2.2	Constituição do Sangue .....	35
2.2.2.1	Hemácias .....	35
2.2.2.2	Glóbulos Brancos .....	36
2.2.2.3	Plaquetas Sanguíneas .....	37
2.2.2.4	Plasma Sanguíneo .....	37
2.2.3	Microcanais e fluidos fisiológicos .....	38
2.2.3.1	Capilares de Vidro Borosilicato.....	38
2.2.3.2	Dextran 40 .....	38
2.2.3.3	Soro Fisiológico .....	39
2.2.4	Comportamento reológico em microcanais .....	39
<b>CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>		<b>43</b>
3.1	Preparação das Nanopartículas .....	45

3.2	Caracterização das Nanopartículas.....	46
3.3	Avaliação da Citotoxicidade sobre Hemácias .....	47
3.4	Avaliação da Citotoxicidade sobre E.coli.....	48
3.5	Escoamento Sanguíneo em Microcanais .....	48
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>		<b>53</b>
4.1	Síntese de Nanopartículas.....	55
4.2	Magnetismo das Nanopartículas .....	57
4.3	Caracterização das Nanopartículas.....	58
4.3.1	SEM e DLS.....	58
4.3.2	EDS .....	66
4.3.3	XPS.....	69
4.4	Citotoxicidade das NP's .....	74
4.4.1	Citotoxicidade sobre Hemácias.....	75
4.4.2	Citotoxicidade sobre <i>Escherichia coli</i> .....	80
4.5	Escoamento Sanguíneo com Nanopartículas .....	82
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES.....</b>		<b>89</b>
Conclusões.....		91
<b>CAPÍTULO 6. REFERÊNCIAS .....</b>		<b>95</b>
Referências .....		97



# Lista de Acrónimos

---

CLC – Camada Livre de Células  
CP – Camada de Plasma  
DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
EDS – Espectroscopia Dispersiva de Raios-X  
Gd-DTPA – Ácido gadoxético  
GV – Glóbulos Vermelhos  
HC – Campo Coercivo  
Hct – Hematócrito  
IRM – Imagiologia de Ressonância Magnética  
Mr – Magnetização Remanescente  
NP – Nanopartículas  
PEG – Polietilenoglicol  
PVA – Álcool Polivinílico  
RM – Ressonância Magnética  
RNA – Ácido Ribonucleico  
SEM – Microscopia Eletrônica de Varrimento  
SPIONs – Nanopartículas de Óxido de Ferro Supermagnéticas  
Tc – Temperatura de Curie  
XPS – Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X



# Índice de Tabelas

---

<b>Tabela 1:</b>	Exemplos de aplicações de nanomateriais nas diversas indústrias, adaptado de [8]. .....	9
<b>Tabela 2:</b>	Condições de preparação das nanopartículas. ....	46
<b>Tabela 3:</b>	Concentração de precursor, pH da solução de precursor e da solução final, e rendimento de síntese das nanopartículas.....	55
<b>Tabela 4:</b>	Resumo das percentagens atômicas e energias de ligação (BE) para os elementos químicos C, Fe, N, Na e O, das nanopartículas NP1, NP1CN e NP4.....	70



# Índice de Figuras

---

<b>Figura 1:</b>	Representação esquemática da escala nanométrica [5].....	8
<b>Figura 2:</b>	Os diferentes tipos de comportamento magnético [56]. .....	20
<b>Figura 3:</b>	Comportamento de um material ferromagnético na ausência de um campo [58].....	21
<b>Figura 4:</b>	Comportamento magnético de um material diamagnético, a) ausência de um campo magnético externo ( $H=0$ ), e b) na presença de um campo magnético ( $H\neq 0$ ) [58].....	22
<b>Figura 5:</b>	Comportamento de um material paramagnético, a) ausência de um campo magnético externo ( $H=0$ ), e b) na presença de um campo magnético ( $H\neq 0$ ) [58].....	23
<b>Figura 6:</b>	Ordenamento dos momentos de dipolo magnéticos num antiferromagneto [58].....	23
<b>Figura 7:</b>	Diagrama esquemático mostrando a configuração de momentos magnéticos na ferrite [58].....	25
<b>Figura 8:</b>	Variação da magnetização com a temperatura [53].....	26
<b>Figura 9:</b>	(a) Curva de magnetização predominantemente reversível, (b) Curva de magnetização onde há processos irreversíveis caracterizando a formação de uma histerese [54].....	27
<b>Figura 10:</b>	a) Curva de histerese, magnetização em função de $H$ ; b) magnetização inicial [58]. .....	28
<b>Figura 11:</b>	Esquema que ilustra espalhamento de luz por partículas pequenas e grandes em função do tempo [60].....	29
<b>Figura 12:</b>	Hemácias visualizadas em microscópio de varrimento [82]. .....	35
<b>Figura 13:</b>	Representação dos tipos de leucócitos [84].....	36
<b>Figura 14:</b>	Efeito de Fahraeus em capilares de vidro. Distribuição do Hct no microcanal [86].....	40
<b>Figura 15:</b>	Efeito de Fahraeus-Lindqvist. Variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal, adaptada de [86]. .....	41

<b>Figura 16:</b>	Representação esquemática da migração axial das Hemácias, adaptada de [97].	42
<b>Figura 17:</b>	Dispositivo constituído com um capilar de vidro utilizado para efetuar as visualizações do escoamento.	49
<b>Figura 18:</b>	Sistema para a visualização do escoamento no microscópio.	51
<b>Figura 19:</b>	Mecanismo de formação de $Fe_3O_4$ , adaptada de [99].	56
<b>Figura 20:</b>	Aspecto e comportamento magnético das NP's sintetizadas	57
<b>Figura 21:</b>	Imagens de Microscopia Eletrónica de Varrimento obtidas usando o modo de eletrões secundários (SE) das nanopartículas purificadas NP1 para a ampliação a) 20 000 vezes e b) 200 000 vezes.	59
<b>Figura 22:</b>	Dispersão de tamanhos das nanopartículas NP1 obtidas por DLS em três ensaios consecutivos.	59
<b>Figura 23:</b>	Imagens de Microscopia Eletrónica de Varrimento obtidas usando o modo de eletrões secundários (SE) das nanopartículas purificadas NP4 para a ampliação a) 2 000 vezes e b) 20 000 vezes.	60
<b>Figura 24:</b>	Dispersão de tamanhos das nanopartículas NP4 obtidas por DLS em três ensaios consecutivos.	61
<b>Figura 25:</b>	Imagens de Microscopia Eletrónica de Varrimento obtidas usando o modo de eletrões secundários (SE) das nanopartículas purificadas NP1N para a ampliação 20 000 vezes em duas áreas distintas da grelha de SEM.	62
<b>Figura 26:</b>	Dispersão de tamanhos das nanopartículas NP1N obtidas por DLS em três ensaios consecutivos.	62
<b>Figura 27:</b>	Imagens de Microscopia Eletrónica de Varrimento obtidas usando o modo de eletrões secundários (SE) das nanopartículas purificadas NP1CN para a ampliação a) 2 500 vezes e b) 100 000 vezes.	63
<b>Figura 28:</b>	Dispersão de tamanhos das nanopartículas NP1CN obtidas por DLS em três ensaios consecutivos.	64
<b>Figura 29:</b>	Dispersão de tamanhos das nanopartículas NP1CN com tempo de reação de 24 h obtidas por DLS em três ensaios consecutivos.	64
<b>Figura 30:</b>	Espectro de EDS das nanopartículas NP1.	66
<b>Figura 31:</b>	Espectro de EDS das nanopartículas NP4.	67
<b>Figura 32:</b>	Espectro de EDS das nanopartículas NP1N.	68

<b>Figura 33:</b>	Espectro de EDS das nanopartículas NP1CN. ....	69
<b>Figura 34:</b>	Espectro de XPS para o pico C <sub>1s</sub> das nanopartículas NP1, NP1CN e NP4. .....	71
<b>Figura 35:</b>	Espectro de XPS para o pico O <sub>1s</sub> das nanopartículas NP1, NP1CN e NP4. .....	73
<b>Figura 36:</b>	Espectro de XPS para o pico Fe <sub>2p</sub> das nanopartículas NP1, NP1CN e NP4. .....	74
<b>Figura 37:</b>	Representação gráfica do valor médio da absorvância da solução sobrenadante das NP's incubadas com hemácias de bovino com hematócrito de 5%, para três ensaios independentes. ....	76
<b>Figura 38:</b>	Representação gráfica do valor médio da absorvância da solução sobrenadante das NP's incubadas com hemácias de caprino com hematócrito de 5%, para três ensaios independentes. ....	77
<b>Figura 39:</b>	Representação gráfica do valor médio da absorvância da solução sobrenadante das NP's incubadas com hemácias de ovino com hematócrito de 5%, para três ensaios independentes. ....	78
<b>Figura 40:</b>	Representação gráfica do valor médio da absorvância da solução sobrenadante das NP's incubadas com hemácias de humano com hematócrito de 5%, para três ensaios independentes. ....	79
<b>Figura 41:</b>	Avaliação da citotoxicidade sobre <i>Escherichia coli</i> em a) para 0,25 g/L e em b) para 2 g/L (NP4). ....	81
<b>Figura 42:</b>	Representação microscópica: a) limite da zona de ação das NP's; b) zona sem ação das NP's (NP4). ....	81
<b>Figura 43:</b>	Avaliação da toxicidade em <i>Escherichia coli</i> com uma concentração de a) 0 g/L e b) 2 g/L, para três ensaios independentes. ....	82
<b>Figura 44:</b>	Zona de camada de plasma obtida através do <i>Image J</i> , sangue com 5% Hct. .....	83
<b>Figura 45:</b>	Camada de plasma para o fluido 5% Hct, com intervalo de confiança a 95 %. .....	83
<b>Figura 46:</b>	Escoamento de um fluido com 5% Hct e 1% de nanopartículas em suspensão na zona da agulha com campo magnético. ....	84

<b>Figura 47:</b> Espessura da camada de plasma para um caudal de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ , 5 % Hct, com intervalo de confiança a 95 % .....	85
<b>Figura 48:</b> Espessura da camada de plasma para um caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ , hematócrito de 5 % e 1% de nanopartículas. Intervalo de confiança a 95 % .....	86
<b>Figura 49:</b> Espessura da camada de plasma para um caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ , hematócrito de 5% e 1% de nanopartículas. Intervalo de confiança a 95 % .....	86
<b>Figura 50:</b> Contorno da aglomeração das nanopartículas realizado pelo <i>software Image J</i> .....	87
<b>Figura 51:</b> Área de aglomeração de nanopartículas NP200 para diferentes caudais ..	87

# **Capítulo 1. INTRODUÇÃO**



## 1.1 Objetivo e Enquadramento

---

As nanopartículas magnéticas são usadas em aplicações biomédicas como hipertermia magnética, libertação controlada de fármacos, bioseparações e agentes de contraste em imagiologia de ressonância magnética. De modo a prolongar o tempo de circulação na corrente sanguínea, as nanopartículas são normalmente revestidas por um polímero biocompatível. Quando o tamanho das nanopartículas é inferior a 50 nm, devido a fenómenos de relaxação térmica, tornam-se supermagnéticas. Esta característica é particularmente importante para utilização das NP's em hipertermia magnética, um dos métodos de tratamento de tecidos cancerígenos.

Esta tese teve como objetivo preparar nanopartículas magnéticas de óxido de ferro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ou  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) por processos hidrotérmicos variando o precursor metálico utilizado (Cloreto de Ferro (III) hexahidratado, Nitrato de Ferro (III) nonahidratado ou Hexacianoferrato de Potássio (II) trihidratado) e a sua concentração. As nanopartículas produzidas foram de seguida caracterizadas recorrendo a várias técnicas como Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e Espectroscopia Fotoeletrónica de Raios-X (XPS). Após a caracterização das NP's, procedeu-se à avaliação da citotoxicidade das mesmas em diferentes géneros de hemácias e depois em cultura de *Escherichia coli*. Estes ensaios de citotoxicidade visam avaliação da sua viabilidade para aplicação em hipertermia magnética.

Numa fase final do trabalho estudou-se o escoamento das NP's em microcanais que simulam microvasos sanguíneos, mais concretamente o escoamento de uma suspensão de células sanguíneas em Dextran 40 contendo nanopartículas magnéticas.

## 1.2 Estrutura da Tese

---

O presente trabalho está dividido em quatro capítulos.

No primeiro capítulo é apresentado o objetivo e enquadramento do trabalho realizado, e a estrutura da tese redigida.

No segundo capítulo é realizada uma revisão teórica sobre os principais temas abordados, nomeadamente sobre a síntese, caracterização e toxicidade das nanopartículas, bem como sobre todo o processo reológico.

No capítulo 3 é descrita a parte experimental, desde a preparação das nanopartículas até à realização dos escoamentos do sangue.

Em seguida, no capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos, bem como a discussão dos mesmos.

No capítulo 5 serão apresentadas as conclusões do trabalho realizado.

## **Capítulo 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**



## 2.1 Nanopartículas

---

### 2.1.1 Nanotecnologia

A Nanotecnologia é encarada como um dos progressos mais cativantes nas tradicionais áreas do conhecimento. Como tal, tem vindo a ser um dos fundamentais focos de atividades de investigação, crescimento e inovação em vários países [1].

Nano (do grego “anão”) é um prefixo usado na ciência para denominar um bilionésimo de metro ( $10^{-9}$  m = 1 nm). Como referências comparativas pode-se apresentar o diâmetro médio de um átomo, 0,2 nm [2] e também, por exemplo, um vírus que tem um tamanho variável de 10 a 100 nm (Figura 1).

A palestra pronunciada por Richard Feynman, Prémio Nobel da Física em 1959, onde numerosos autores consideraram como ponto inaugural da Nanotecnologia, na qual sugeriu que um dia seria realizável manipular átomos individualmente, um pensamento revolucionário na época. Como explicação, Feynman estimulou a comunidade científica a reduzir 25 mil vezes a página de um livro. Isto tornaria possível condensar, na cabeça de um alfinete, todas as páginas dos 24 volumes da Enciclopédia Britânica. Deste modo abriu a oportunidade para as inúmeras descobertas que haveriam de ser feitas através do fabrico de materiais na escala nanométrica [3].

Apenas nos anos 80 a ideia de Feynman se concretizou como algo real, com o desenvolvimento dos microscópios de varrimento por sonda. Em geral estes microscópios mapeiam objetos de dimensões nanométricas recorrendo a uma agulha muito fina. Dessa forma, em escala atómica e com elevada resolução é possível construir uma imagem. Este equipamento tornou possível manipular individualmente átomos, a menor unidade possível de um elemento químico [3].

Desde então, o domínio científico e tecnológico da escala nanométrica tem crescido devido ao progresso de novas ferramentas de pesquisa e aos progressos experimentais e teóricos. Este rápido desenvolvimento está na fonte de novos produtos e processos industriais que aumentam a um ritmo extremamente rápido. De facto, têm surgido

categorias inteiramente novas de mecanismos e sistemas micro e nanofabricados. Esta nova situação parece indicar um novo salto da civilização tecnológica porque oferece oportunidades científicas e industriais que eram inconcebíveis até então [4].

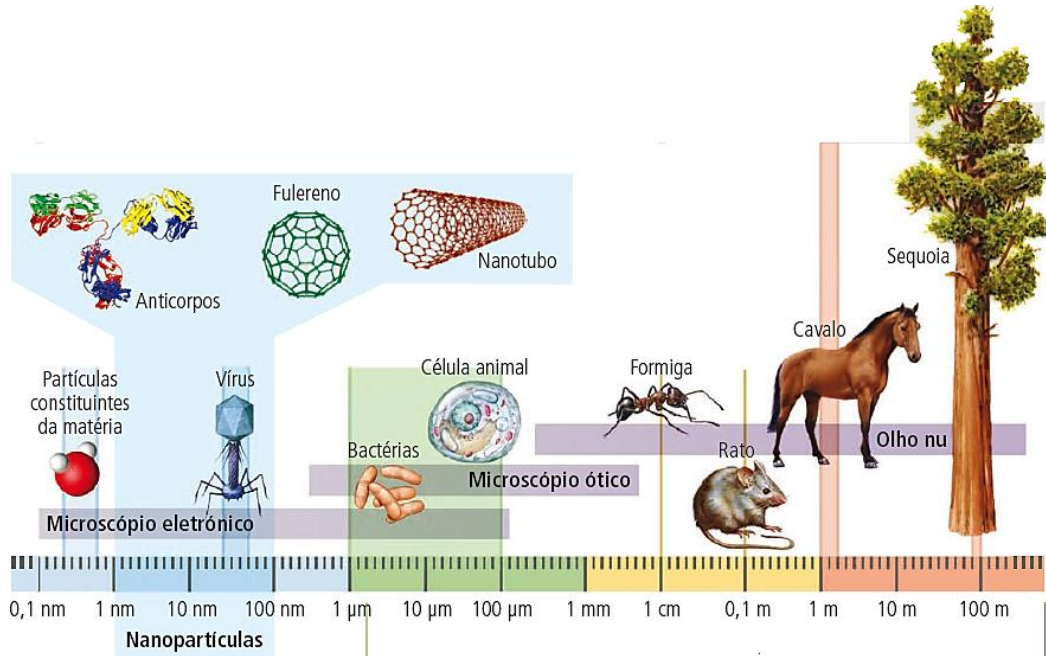


Figura 1: Representação esquemática da escala nanométrica [5].

Se podem encontrar aplicações da nanotecnologia em praticamente todos os setores industriais e serviços. Estas podem ser numa escala grandiosa, como os nanocompósitos poliméricos produzidos a partir de *commodities*, como os termoplásticos e as argilas, ou, em pequena escala, mas com valor associado elevado, os elementos criados para as tecnologias de informação e de telecomunicações.

De acordo com avaliações recentes, durante o período de 2010 à 2015, prevê-se que o mercado mundial para materiais, produtos e processos industriais baseados em nanotecnologia represente cerca de um trilião de dólares [6].

Os comportamentos na nanoescala não são necessariamente previstos a partir daqueles observados em escala macroscópica. De facto, as variedades mais importantes são causadas não pela ordem de grandeza da redução no tamanho, mas pelos novos fenómenos observados, que são intrínsecos ou se tornam influentes na nanoescala. Estes fenómenos incluem confinamento no tamanho, predominância de fenómenos de

interface (em nanoescala, a relação superfície/volume é particularmente dominante) e fenómenos quânticos [7].

Efetivamente, desde que seja possível controlar as características de tamanho, será também possível delimitar o controlo das propriedades de um material e de funções de dispositivos muito além do conhecimento atual ou mesmo de aspetos considerados não factíveis. A capacidade de criar estruturas de dimensões em nanoescala conduz a materiais com propriedades únicas, como os nanotubos de carbono, as nanofibras e pontos quânticos (*Quantum Dots*), filmes finos, sistemas baseados em DNA, nanodispositivos para libertação controlada de fármacos, materiais magnéticos com propriedades de superparamagnetismo, entre outros, cujas aplicações assumem uma tendência exponencial, tal como se observar na Tabela 1 [8].

**Tabela 1:** Exemplos de aplicações de nanomateriais nas diversas indústrias, adaptado de [8].

<b>Indústria</b>	<b>Exemplos de Aplicação de Nanomateriais</b>
Automobilística e Aeronáutica	Formação de materiais mais leves, pneus mais resistentes, plásticos não inflamáveis e económicos
Eletrónica e Comunicações	Armazenamento de dados, aumento na velocidade de processamento
Química e Materiais	Catalisadores mais eficientes, ferramentas de corte mais duras, fluídos magnéticos inteligentes
Farmacêutica, Biotecnologia e Biomédica	Novos fármacos baseados em nanoestruturas, conjunto para autodiagnóstico, materiais para regeneração de ossos e tecidos
Sector de Fabricação	Novos microscópios e instrumentos de medida, ferramentas para manipular a matéria a nível atómico, bioestruturas
Sector Energético	Novos tipos de bateria, fotossíntese artificial, economia de energia ao utilizar materiais mais leves e circuitos menores
Meio Ambiente	Membranas seletivas para remover contaminantes ou sal da água, novas possibilidades de reciclagem, desenvolvimento de materiais para bioremediação criando os chamados “ <i>Lab-on-a-Chip</i> ” para deteção e quantificação de poluentes
Defesa	Detetores de agentes químicos e orgânicos, circuitos eletrónicos mais eficientes, sistemas miniaturizados de observação, tecidos mais leves

## 2.1.2 Características e Aplicações dos Nanomateriais Magnéticos

A diminuição tridimensional dos materiais gera as nanopartículas. Atualmente existem diversas nanopartículas provenientes de diferentes materiais. Uma das classes que têm vindo a adquirir um grande interesse por parte da comunidade científica são os pontos quânticos (*Quantum Dots*). De facto, estas nanopartículas semicondutoras têm vindo a encontrar aplicabilidade em áreas tão diversas como a medicina e a eletrónica. Outra classe de nanomateriais com alto interesse tecnológico são as nanopartículas magnéticas, das quais fazem parte as ferrites, que exibem comportamento superparamagnético e que formam fluidos magnéticos nos quais as partículas e a fase líquida se movimentam como uma única fase.

O superparamagnetismo é uma característica exclusiva da escala nanométrica. As nanopartículas com estas características apresentam magnetização apenas na presença de um campo magnético sem contudo permanecerem magnéticas aquando da remoção do mesmo. As nanopartículas magnéticas têm ligado inúmeras aplicações nas áreas da biomedicina [9, 10], diagnóstico [11], biologia molecular [12, 13], bioquímica [14, 15], catálise [16, 17], biossensores [18], entre outras.

Como vantagem complementar, as nanopartículas apresentam a possibilidade de modificação dos grupos funcionais da sua superfície, de forma a atribuir-lhes outras características apetecíveis [19]. Detetar diferentes espécies (quando utilizadas como sensores), o confinamento por meio de campos, a intensificação de imagem em tomografia, o transporte de fármacos e aplicações em hipertermia magnética são exemplos que as alterações químicas na superfície das nanopartículas magnéticas permitem. As nanopartículas magnéticas funcionalizadas ou quimicamente modificadas são criadas basicamente por um núcleo magnético, envolvido por uma camada polimérica, com ou sem centros ativos, e que podem ancorar metais ou compostos orgânicos seletivos [20]. Estas nanopartículas em particular podem ser consideradas como materiais híbridos orgânico/inorgânicos de grande interesse em aplicações comerciais devido ao pormenor das propriedades obtidas que não são observadas nos materiais convencionais [21]. Os materiais híbridos orgânicos/inorgânicos visam ser

uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais específicos com uma ampla gama de aplicações.

O óxido de ferro, e em especial a magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), é um material que tem vindo a ser amplamente usado em áreas relacionadas com a farmacologia e a medicina. De facto, estes nanomateriais podem ser aplicados como veículos de transporte de fármacos, genes e radionuclídeos, como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética (ferrofluídos) e em tecnologias baseadas na separação magnética de DNA/RNA, proteínas, bactérias, vírus e outras biomoléculas.

Uma das áreas de alto interesse por parte da sociedade científica é o desenvolvimento de novas metodologias de síntese e de métodos de análise destas nanopartículas, associadas a métodos otimizados de recobrimento das mesmas. As NP's de óxido de ferro com características superparamagnéticas têm-se revelado altamente atrativas para aplicações biomédicas em diagnóstico e terapia [22].

A maior parte dos estudos tem sido afetado em nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas em laboratório. No entanto, recentemente, um nanomaterial magnético biológico descoberto em bactérias e conhecido como magnetossoma têm sido muito estudado [22]. Os magnetossomas são organelos especializados que surgem no citoplasma destas bactérias, contendo no seu interior os cristais de magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). O padrão de cristal produzido por estes organismos tem a vantagem de possuir uma estreita distribuição de tamanhos, o que leva a um elevado controlo de produção. Esta característica é especialmente atraente quando se tem em mente o facto de que as nanopartículas produzidas quimicamente raramente terem uma disposição de tamanhos tão confinados, levando à necessidade de métodos de purificação. Estes microrganismos, conhecidos hoje como organismos magnetotáticos, têm vindo a obter um elevado interesse devido à síntese dos cristais magnéticos. Estes cristais possuem uma baixa citotoxicidade, fornecendo presumivelmente uma boa biocompatibilidade *in vivo* [22].

Os nanomateriais magnéticos apresentam diversos tipos de aplicações nomeadamente mecanismos de libertação controlada, imagem por ressonância magnética e hipertermia.

### 2.1.2.1 Mecanismos de Libertação Controlada

Os métodos que se assemelham aos processos biológicos nos quais a quantidade de fármaco libertada é função das necessidades fisiológicas, são conhecidos como sistemas “open loop”, em contraste aos “closed loop” [23]. Os mecanismos externos de ação estimulante à libertação do núcleo das cápsulas nos sistemas “open loop” são fundamentados nas suas propriedades magnéticas, elétricas e térmicas, bem como na ação do ultrassom e da radiação quando aplicados às nanocápsulas [24]. Devido ao gradiente de concentração, quando nanopartículas (NP's) estão uniformemente dispersas numa matriz polimérica e esta entra em contato com o sistema biológico, ocorre a difusão normal do fármaco. Contudo, se aplicarmos um campo magnético externo oscilante, poderá ser libertada mais rapidamente uma maior quantidade de fármaco [25]. Os parâmetros considerados críticos para a regulação da libertação incluem a posição, orientação e força magnética das partículas embutidas no polímero e ainda a amplitude e frequência do campo magnético aplicado. Além dos parâmetros ligados às partículas magnéticas e ao campo magnético, a natureza do polímero também deve ser levada em consideração. A matriz polimérica terá que ser removida caso não seja biodegradável no corpo humano através de uma cirurgia, o que origina um alto custo e risco para o paciente [24]. Daí a necessidade do uso de polímeros biodegradáveis, que se dividem em pedaços menores, não tóxicos e que possam ser excretados facilmente pelo corpo.

### 2.1.2.2 Imagem por Ressonância Magnética

A imagem por ressonância magnética (IRM) é uma técnica de imagem médica, talvez a mais utilizada em radiologia, para visualizar a estrutura detalhada e função limitada do corpo. A IRM proporciona um maior contraste entre diferentes tecidos moles do corpo do que a tomografia computadorizada, tornando-se especialmente útil nas imagens neurológicas e dos músculos.

Os prótons de diferentes tecidos retornam ao seu estado de equilíbrio a taxas diferentes e com isso pode-se detetar tecidos doentes, como tumores. Ao alterar-se os parâmetros do *scanner*, esse efeito é usado para criar um contraste entre diferentes tipos de tecido do corpo.

Para aperfeiçoar esse contraste, podem-se utilizar agentes de contraste que melhoram a aparência dos vasos sanguíneos, tumores ou inflamações. Estes agentes podem ser injetados via intravenosa ou, no caso de imagem das articulações, podem ser injetados direto na articulação. O contraste mais utilizado é o Gd-DTPA (ácido gadoxético). Estes agentes são considerados paramagnéticos e atuam diminuindo o tempo de relaxamento dos prótons da água, ou seja, eles aumentam a velocidade com que os prótons da água se alinham ao campo magnético principal. Isso resulta num maior sinal de RM e maior contraste.

As NP's superparamagnéticas de óxido de ferro podem também aumentar a capacidade de contraste em exames de IRM, devidas às suas propriedades magnéticas.

As grandes vantagens na utilização dessas nanopartículas são as modificações químicas que podem ser feitas para torná-las não-tóxicas, injetáveis, biocompatíveis, capazes de se concentrar num alto nível no tecido ou órgão de destino e também a natureza fortemente magnética dessas nanopartículas, tornando-as excelentes agentes de contraste [26].

### 2.1.2.3 NP's Magnéticas em Hipertermia

A hipertermia é uma terapia promissora para o tratamento do cancro [27]. Os elementos usados nesta terapêutica são materiais magnéticos como óxidos de ferro, recorrendo a técnicas como aplicação de campo magnético alternado. A aplicação deste campo em fluidos magnéticos é capaz de originar calor pela transformação de energia magnética em térmica, elevando a temperatura local a uma faixa de 41 a 46°C, na qual se mata a célula tumoral sem matar a célula normal [28]. Segundo Zhao *et al.*, as partículas modificam a energia do campo magnético alternado em calor por mecanismos físicos (agitação das nanopartículas magnéticas devido à presença do campo magnético oscilante) e a eficácia dessa transformação depende fortemente da frequência do campo externo e da essência das partículas. Esse aquecimento varia em função do tamanho e da microestrutura das partículas [29]. As células tumorais são sensíveis a mudanças de temperatura, assim na presença de ferrofluidos e com a aplicação de um campo magnético alternado, pode-se suprimir células tumorais *in vivo* e *in vitro* por hipertermia [30].

Os fluidos magnéticos são colóides de partículas magnéticas constituídos de magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), dióxido de crómio ( $\text{CrO}_2$ ) e outros, que são facilmente sintetizados em escala laboratorial. Segundo D.H. Kim *et al*, esta aplicação de hipertermia obriga a que as nanopartículas magnéticas tenham altos valores de magnetização de forma a obter elevados valores de energia térmica. Adicionalmente é fundamental que o seu tamanho seja menor que 50 nm e apresente uma estreita distribuição de tamanho de partículas [31]. Além disso, para aplicação em hipertermia, estas NP's magnéticas precisam de um revestimento superficial especial, que deve ser, não só não-tóxico como biocompatível para permitir classificar as partículas numa área específica. Por causa de suas superfícies hidrofóbicas e a grande área superficial em relação ao volume, na utilização *in vivo* de NP's magnéticas, estas tendem a aglomerarem-se e a serem libertadas rapidamente pela circulação. Evitar essas dificuldades é possível se a superfície das nanopartículas for modificada por um polímero biocompatível. No presente trabalho procurou-se sintetizar NP's magnéticas de óxidos de ferro, biocompatíveis e não-tóxicas.

### 2.1.3 Métodos de Síntese de Nanopartículas Magnéticas

Existem diversos métodos de síntese de nanopartículas magnéticas. Os métodos mais usados são a precipitação química, a microemulsão, a síntese hidrotérmica e a decomposição térmica. A magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e a magmite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) os principais óxidos de ferro que compõem a categoria das SPIONs (Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas [32]).

#### 2.1.3.1 Precipitação Química

O processo da precipitação química é o ensaio químico mais simples, rápido e barato para a obtenção de NP's. A coprecipitação dos sais de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  com uma solução alcalina é a mais usual, devido à baixa temperatura de reação necessária e às propriedades hidrofílicas da superfície das partículas resultantes [33]. O controlo do tamanho, forma e constituição das NP's depende do tipo de sais usados (cloretos, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), da razão entre  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , do pH, da força iónica do

meio [34], do tipo de agente precipitante [35] e da força da base usada [36]. O controlo destes parâmetros possibilita a formação de nanopartículas com uma distribuição de tamanho grande (maior que 30% do tamanho médio de partícula) e aproximadamente esféricas. A concentração dos sais de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  presentes na mistura inicial da reação tem o maior efeito sobre o tamanho global das NP's. O crescimento limitado das partículas, embora as partículas provenientes sejam, geralmente, mais uniformes em tamanho resultam de baixas concentrações. Quando a concentração dos sais é ampliada, existe um acréscimo das partículas, com uma subsequente perda de uniformidade de tamanho [35].

Os iões podem ser oxidados antes da precipitação, afetando as propriedades físicas e químicas das NP's [36]. A reação deve, portanto, ser efetuada sob um ambiente anaeróbio, por forma a eliminar o oxigénio. Borbulhar a solução com um gás inerte permite não só proteger a oxidação crítica da magnetite, mas também reduz o tamanho da partícula, quando comparado com os métodos que não removem o oxigénio [34].

A principal vantagem das reações de precipitação química é que permitem a síntese de imensas quantidades de nanopartículas [35]. No entanto, apesar do método da coprecipitação ser o mais simples e a via química mais eficiente para obter NP's magnéticas, também apresenta desvantagens, como por exemplo, a baixa cristalinidade, a agregação e também a distribuição de partículas[36].

### 2.1.3.2 Microemulsão

O nome de emulsão é aplicado a uma fusão de pelo menos três componentes: uma fase de óleo, uma fase aquosa e uma superfície de espécies ativas, designadas surfactantes. Por vezes, está presente também um quarto componente, designado co-surfactante [37]. As diferenças entre microemulsões e emulsões são mais do que simples semântica, apesar de ultimamente utilizarem-se estes termos alternadamente. Para a formação de uma microemulsão, é essencial que ocorra a união de dois líquidos imiscíveis. Inicialmente, quando estes dois líquidos são agitados mecanicamente, um deles é disperso no interior do outro. Se um surfactante for acrescentado ao processo, o mesmo tende a firmar-se, formando um sistema homogéneo com a constituição de uma fase

interna, dispersa ou descontínua. Sem a acumulação do surfactante, o sistema tende a separar as fases e é fácil visualizar novamente os dois líquidos separados [38].

O método da microemulsão pode ser dividido em duas classes baseado no uso de uma fase contínua orgânica ou aquosa. No método de fase contínua orgânica, as moléculas hidrossolúveis estão situadas no interior de pequenas gotículas esféricas de água e cercadas por moléculas de surfactante num meio contínuo de óleo. A fase aquosa é a interna, dispersa ou intermitente, ao passo que o óleo compõe a fase externa, dispersante ou contínua. Nesses casos, o sistema é conhecido como A/O [38]. Apesar de este método ter sido um dos primeiros a ser utilizado para a produção de NP's, tem tido pouca importância, pois requer a utilização de solventes orgânicos tóxicos e surfactantes, os quais são subsequentemente eliminados das NP's [39-41]. Inversamente, quando moléculas lipossolúveis estão localizadas no interior de pequenas gotículas esféricas de óleo e envolvidas por moléculas de surfactante num meio contínuo de água, esse sistema é conhecido como O/A [38]. Este tipo de mistura é especialmente proveitoso para a administração de fármacos lipossolúveis (por exemplo, vitaminas, hormonas, entre outros) por via intravenosa.

### 2.1.3.3 Decomposição Térmica

O método da decomposição térmica é um método bastante promissor para sintetizar NP's monodispersas de alta qualidade [42], o que é muitíssimo desejável para o controlo das propriedades físico-químicas das nanopartículas [33]. Este método usa vários tipos de precursores, como  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  (acetilacetato de ferro III),  $\text{Fe}(\text{Co})_5$  (pentacarbonilo de ferro) e complexos de  $\text{Fe}(\text{oleato})_3$ , sob elevadas temperaturas [33]. Para obter um controlo exigente do tamanho das NP's de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  formadas é necessário utilizar grandes quantias de precursores tóxicos e de surfactantes no solvente orgânico, pelo que, previamente à sua utilização em aplicações biomédicas, as NP's necessitam de um tratamento de purificação [43].

Mais propriamente, o método da decomposição térmica envolve-se numa dissolução de  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  num solvente ponto de ebulição elevado, na presença de surfactantes como ácido oleico e oleilamina [42]. É necessário que a superfície das NP's seja funcional, para facilitar a conjugação com o fármaco e encapsulá-lo com o polímero, de modo a

formar um sistema de transporte do fármaco com a circulação, no sistema fisiológico. A união da oleilamina à superfície, que é acrescentada durante a síntese química das NP's, torna-as hidrofóbicas [44]. Contudo, a área hidrofóbica das partículas obtidas limita as aplicações biomédicas, onde é necessária dispersão em água e biocompatibilidade. A modificação da superfície de tais partículas hidrofóbicas continua um desafio.

#### 2.1.3.4 Síntese Hidrotérmica

O apelido hidrotérmico é exclusivamente de origem geológica e usualmente refere-se a qualquer reação heterogénea na presença de solventes aquosos, sob alta pressão e sob circunstâncias de temperatura que dissolvem e recristalizam materiais que, em condições vulgares, são relativamente insolúveis. O geólogo britânico Roderick Murchison (1792-1871) usou este termo para descrever a ação da água a elevada temperatura e pressão que fez alterações na crosta terrestre e conduziu à formação de vários minerais. A versatilidade do procedimento hidrotérmico, devido sobretudo ao papel da mineralização da água, é bastante visível na forma como origina diversos minerais com diversidade estrutural considerável [45].

Nos derradeiros anos, o método hidrotérmico tem sido desenvolvido para sintetizar NP's por se tratar de um método básico de fabricar nanocristais a partir de soluções aquosas a elevadas temperaturas [46] (mais de 100 °C) [47] e elevadas pressões [46, 47].

Estudos prévios ditam que, a temperaturas superiores a 160 °C, é possível obter partículas com um tamanho maior. Com temperaturas inferiores, como 80 °C ou 120 °C, há tendência a obter partículas com um tamanho menor [47]. Além disso, a durabilidade do processo de aquecimento também desempenha um papel importante na produção de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, atuando ao nível da cristalinidade das nanopartículas. Um dos parâmetros mais importantes na síntese hidrotérmica é a razão molar entre os sais de ferro. Mizutani *et al*, provaram que, ampliando o período de aquecimento, a cristalinidade das nanopartículas, bem como o seu tamanho, aumentam também [48]. Mao *et al*, em 2006, sintetizaram NP's de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a 180°C durante 24h e os seus resultados apontam que as nanopartículas produzidas apresentavam uma forma de cristal, bem definida, e eram maiores, devido à recristalização[49]. Por outro lado, Haw

*et al.*, 2010, sintetizaram NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a  $200^\circ\text{C}$  durante 1h e os seus resultados indicam a aquisição de NP's de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  esféricas e com um diâmetro médio de 17,22 nm [47]. A duração do processo de aquecimento atua também ao nível da cristalinidade das nanopartículas.

Outro aspeto valorizado é a aquisição dos reagentes que, de outro modo, são difíceis de dissolver numa solução sob ação de solventes ou mineralizantes. Isto é semelhante às reações químicas de transporte, o que levou à explicação de reações hidrotérmicas como um caso particular das reações químicas de transporte [45].

A síntese hidrotérmica envolve a água, que atua como um catalisador e, casualmente, como um componente de fases sólidas na síntese [46]. Muitas das propriedades físicas da água, tais como fugacidade, constante dielétrica, densidade, sofrem alterações consideráveis ao longo do processo hidrotérmico devido às elevadas temperaturas [45].

Este processo utiliza autoclaves ou reatores de alta pressão, onde a pressão pode ser mais de 2000 Pa e a temperatura superior a  $200^\circ\text{C}$  [35]. Uma autoclave é um cilindro de aço de paredes espessas selado hermeticamente com o intuito de resistir a elevadas temperaturas e pressões, por períodos prolongados de tempo. Polietilenoglicol (PEG) é um polímero extensivamente utilizado para a síntese de NP's. Wang *et al.* sintetizaram NP's de ferrite de níquel com tamanho controlado através de um método solvotérmico simples utilizando etilenoglicol como solvente [50].

O método hidrotérmico possui como vantagem, quando comparado aos restantes, é a sua capacidade para criar fases cristalinas que não são estáveis no ponto de fusão e criar materiais que têm uma alta pressão de vapor perto dos seus pontos de fusão. Além disso, com esta técnica consegue-se controlar o tamanho, a forma, a composição química e a estequiometria das partículas [46]. O controlo do tamanho e da morfologia das partículas, neste método, deve-se a um domínio do tempo e da temperatura de síntese [35]. Outras regalias passam pelo facto de, com este método, é desprezável o uso de reagentes orgânico, obter-se produtos com um alto rendimento e baixo custo-benefício, bem como promover a obtenção de partículas com excelente cristalinidade, tamanho controlável e boa morfologia. Além disso, não precisa de nenhum tratamento pós-aquecimento [47].

Após sintetizar as NP's é preciso ter em atenção as propriedades magnéticas dos materiais.

## 2.1.4 Propriedades Magnéticas dos Materiais

O magnetismo é conhecido pelo homem há milhares de anos, mas a análise dos seus princípios e mecanismos é relativamente recente. O inicial contato do homem com o magnetismo seguramente envolveu a magnetite, que é um dos materiais que ocorre naturalmente no estado magnético. Mais tarde, com a diminuição de minérios de ferro e a aquisição de ferro metálico, pode-se verificar que a magnetite pode atrair e repelir o ferro [51].

O magnetismo é um fenómeno pelo qual os materiais exercem forças de atração e repulsão uns sobre os outros. Esta descrição, embora útil e prática, apresenta algumas restrições. O estado magnético de um material não é estável e pode ser modificado de diversas maneiras. Além disso, o fato de materiais se afastarem ou atraírem não indica que eles sejam magnéticos. Entre eles, por exemplo, pode existir uma força de carácter electrostático [51].

Num campo magnético, o comportamento dos materiais magnéticos externos é decidido pela origem dos seus dipolos magnéticos e pela natureza da interação entre eles. O momento angular orbital e o spin dos electrões nos iões ou átomos que formam a matéria, é onde têm origem os dipolos magnéticos, que depende da distribuição electrónica dos átomos e moléculas [52, 53].

Os fenómenos magnéticos podem ser manifestados por duas grandezas: o vetor indução magnética  $B$  e o vetor intensidade de campo magnético  $H$ . Enquanto  $H$ , é relacionado com a corrente que cria o campo (corrente de condução),  $B$  depende tanto da corrente de condução, quanto da magnetização do meio, ou seja, da corrente de Ampère. Assim,  $B$  é a solução a um campo externo ( $H$ ) num material magnético.  $B$  e  $H$  relacionam-se pela equação 1, onde  $\mu$  é a permeabilidade magnética [52, 53].

$$B = \mu \cdot H \quad (1)$$

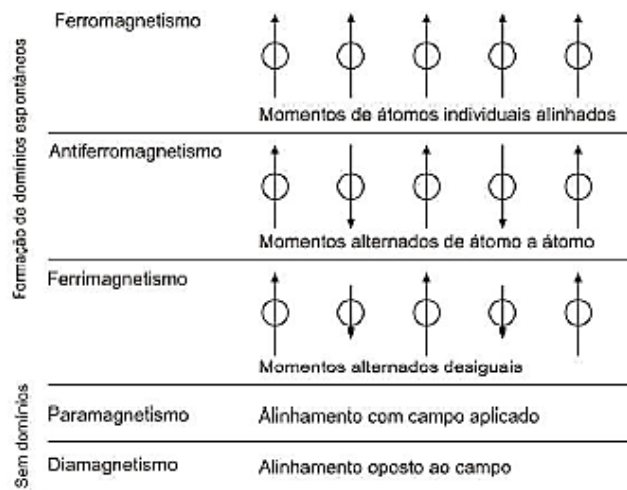
A importância do magnetismo não está somente limitada à pesquisa básica. Os materiais magnéticos executam um importante papel na tecnologia actual, pois encontram um

grande número de aplicações em produtos e processos industriais dos mais variados setores [53].

## 2.1.5 Magnetismo nos Materiais

Os materiais podem ser organizados em diferentes tipos, como ferromagnético, diamagnético, paramagnético, ferrimagnético, antiferromagnético, entre outras, dependendo da sua resposta a um campo magnético externo aplicado [34, 54]. A Figura 2 apresenta os distintos tipos de comportamento magnético.

Cada tipo de átomo possui características magnéticas divergentes, logo, o somatório dos momentos magnéticos de cada átomo ordenará o comportamento magnético de cada material [55].



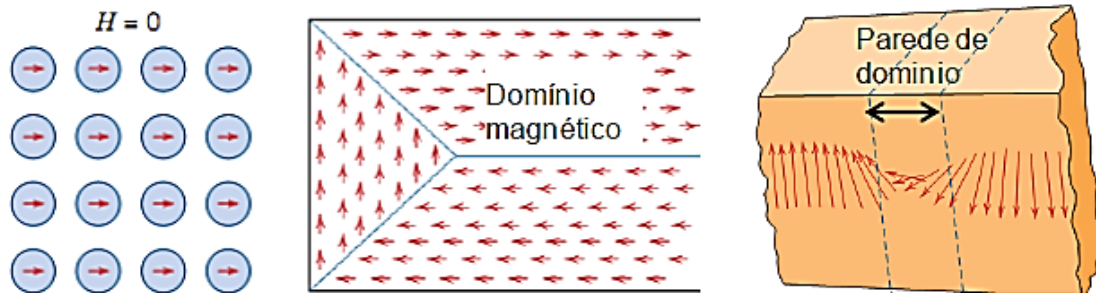
**Figura 2:** Os diferentes tipos de comportamento magnético [56].

### 2.1.5.1 Ferromagnetismo

Os materiais ferromagnéticos possuem uma característica importante que é conhecida como magnetização espontânea, ou seja, eles apresentam uma magnetização não nula, mesmo na ausência de aplicação de um campo externo aplicado [34, 54, 56].

Nos materiais ferromagnéticos os spins estão todos ordenados numa dada direção, mesmo na inexistência de um campo externo. Os spins dos vários domínios, no estado

desmagnetizado, estão dirigidos aleatoriamente e o campo macroscópico líquido é zero, como apresentado na Figura 3 [55, 57].



**Figura 3:** Comportamento de um material ferromagnético na ausência de um campo [58].

Os fundamentais exemplos de materiais ferromagnéticos são: ferro, cobalto, níquel e gadolínio. Algumas ligas e compostos de manganês, como MnBi e  $\text{Cu}_2\text{MnAl}$ , também expõem ferromagnetismo [51, 54]. Os materiais ferromagnéticos podem apresentar valores de suscetibilidade magnética tão altos como  $10^6 \chi_m$ . A suscetibilidade magnética dos materiais ferromagnéticos abranda com o incremento da temperatura [51].

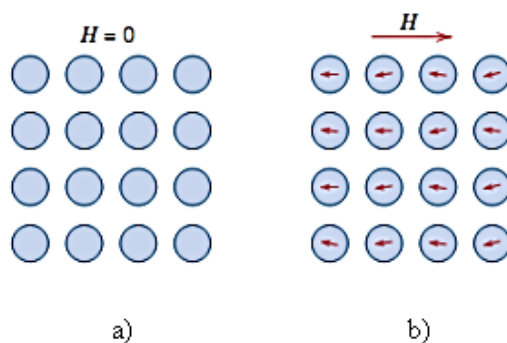
### 2.1.5.2 Diamagnetismo

Diamagnetismo é uma configuração muito fraca de magnetismo, que só perdura enquanto um campo magnético externo estiver a ser aplicado. Na ausência de um campo externo, os átomos de um material diamagnético têm momento nulo, como se apresenta na Figura 4a. A grandeza do momento magnético induzido pelo campo externo é excessivamente pequena e a sua direção é oposta à direção do campo aplicado, Figura 4b [51-53, 59]. Materiais diamagnéticos são aqueles que não têm dipolos magnéticos permanentes, ou seja, cujos átomos têm camadas eletrônicas completas [55].

Todos os materiais têm diamagnetismo, mas é tão fraco que só pode ser observado em materiais que não mostram outro tipo de magnetismo. Esta forma de magnetismo não tem interesse prático. Os materiais diamagnéticos apresentam suscetibilidade magnética na faixa de  $-10^{-6}$  a  $-10^{-5} \chi_m$ , a qual não varia com a temperatura [51-53]. O fato deste valor ser negativo é evidenciado pela Lei de Lenz. Esta é uma lei que diz que um

circuito submetido a um campo magnético externo oscilante, cria um campo contrário contrariando a variação deste campo externo [52, 53].

O diamagnetismo pode ser presenciado em numerosos materiais tais como gases inertes, metais, elementos não metálicos (B, Si, P e S), iões, moléculas diatômicas ( $H_2$  e  $N_2$ ), compostos orgânicos e água [51, 57].

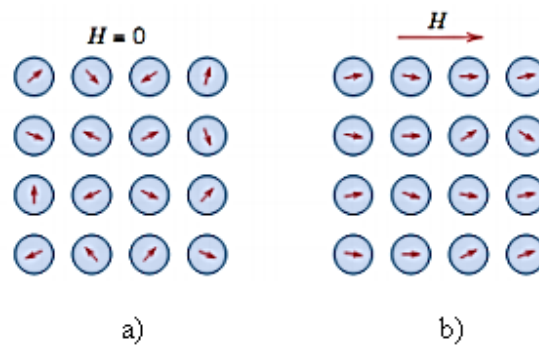


**Figura 4:** Comportamento magnético de um material diamagnético, a) ausência de um campo magnético externo ( $H=0$ ), e b) na presença de um campo magnético ( $H\neq 0$ ) [58].

### 2.1.5.3 Paramagnetismo

Nos materiais paramagnéticos, os átomos individuais contêm momentos magnéticos, mas com direções incertas que originam numa magnetização nula para um grupo de átomos. Os dipolos podem ser ordenados na direção do campo aplicado, como apresentado na Figura 5 [51, 56].

A aplicação de um campo externo  $H$  tenderá a alinhar os dipolos na direção do campo magnético, pois esta forma é energeticamente favorecida (o mínimo de energia obtém-se quando  $M$  e  $H$  estão alinhados).

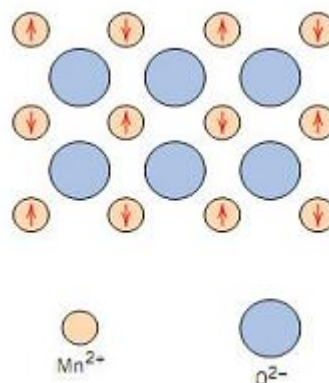


**Figura 5:** Comportamento de um material paramagnético, a) ausência de um campo magnético externo ( $H=0$ ), e b) na presença de um campo magnético ( $H\neq 0$ ) [58].

#### 2.1.5.4 Antiferromagnetismo

O antiferromagnetismo, como o ferromagnetismo, é originado pela interação entre os spins, mas esta tende a alinhar os momentos magnéticos (spin) em direções opostas, de modo que os momentos vizinhos se cancelam mutuamente [52, 55].

O procedimento da magnetização em função do campo é semelhante à de um paramagneto, mas as origens deste comportamento para um antiferromagneto são inteiramente diferentes, pois este é um estado metódico de longo alcance, enquanto o paramagnetismo é um estado desordenado. Os momentos magnéticos são alinhados numa configuração alternada, como mostra a Figura 6.



**Figura 6:** Ordenamento dos momentos de dipolo magnéticos num antiferromagneto [58].

Diversos compostos de metais de transição expõem comportamentos antiferromagnéticos, como  $MnO$ ,  $CoO$ ,  $NiO$ ,  $Cr_2O_3$ ,  $MnS$ ,  $MnSe$  e  $CuCl_2$  [51].

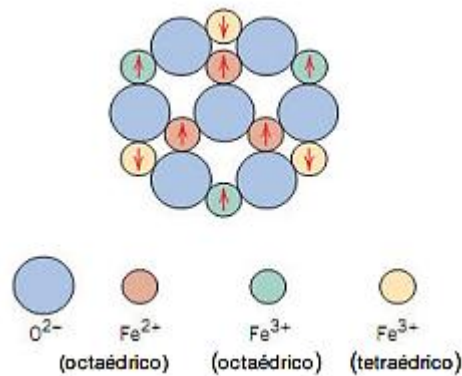
Os materiais antiferromagnéticos ostentam temperatura crítica, intitulada temperatura de Néel. Acima da temperatura de Néel, o material exhibe o comportamento paramagnético. A susceptibilidade dos materiais antiferromagnéticos é de igual ordem de grandeza dos materiais paramagnéticos e diminui com o aumento de temperatura [51, 56].

### 2.1.5.5 Ferrimagnetismo

Os materiais ferrimagnéticos, assim como os materiais antiferromagnéticos igualmente exibem forças entre os átomos adjacentes que arrastam os momentos atômicos a alinharem-se de modo antiparalelo, contudo, neste tipo de comportamento magnético, os momentos não são iguais. Estes materiais apresentam uma forte réplica a campos magnéticos externos, como é o caso da magnetite e do óxido de ferro [55, 56]. Alguns materiais cerâmicos igualmente apresentam forte ferrimagnetismo. Estes materiais são denominados ferrites. As ferrites podem ser representadas pela fórmula geral  $MFe_2O_4$ , onde M é um elemento metálico. O protótipo das ferrites é a magnetite,  $Fe_3O_4$ , que pode ser reescrita como  $Fe^{+2} 2(Fe^{+3})2(O^{-2})^3$ . Na organização cúbica da magnetite, o cátion  $Fe^{2+}$  ocupa interstícios octaédricos e o cátion  $Fe^{3+}$  ocupa os interstícios tetraédricos e octaédricos. O ânion  $O^{2-}$  é magneticamente neutro. Por outro lado, os momentos magnéticos dos dois tipos de íons de ferro não se anulam totalmente e o material mostra magnetismo permanente. A Figura 7 ilustra os momentos magnéticos da magnetite.

O íon  $M^{2+}$  pode ser,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ . Alguns exemplos de ferrites mais comuns são  $NiFe_2O_4$  e  $(Mn, Mg)Fe_2O_4$  [51].

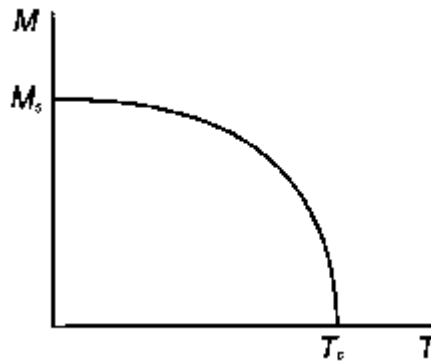
Os materiais ferrimagnéticos também apresentam temperatura crítica, denominada temperatura de Curie ( $T_c$ ). A susceptibilidade dos materiais ferrimagnéticos é de igual ordem de grandeza da dos materiais ferromagnéticos e atenua com o aumento de temperatura [51]. As características macroscópicas do ferromagnetismo e ferrimagnetismo são análogas.



**Figura 7:** Diagrama esquemático mostrando a configuração de momentos magnéticos na ferrite [58].

### 2.1.5.6 Histerese

As tenções da estrutura eletrónica constituem também a estrutura da interação entre os momentos magnéticos. Quando a interação é bastante forte para se sobrepôr à agitação térmica, os momentos magnéticos visam ficar alinhados coletivamente resultando numa magnetização. É esta magnetização que decide a resposta macroscópica do material quando está submetido a campos externos. Por outro lado, se a temperatura é aumentada, a desordem térmica aumenta e a magnetização diminui, tendendo bruscamente para zero numa temperatura de transição  $T_c$ . A Figura 8 apresenta o comportamento característico da magnetização  $M$  em função da temperatura  $T$  de um material magnético. Quando a temperatura ultrapassa o valor de  $T_c$ , o sistema passa da fase ordenada (momentos magnéticos alinhados) para a fase paramagnética, sofrendo assim uma transição de fase [53, 56].

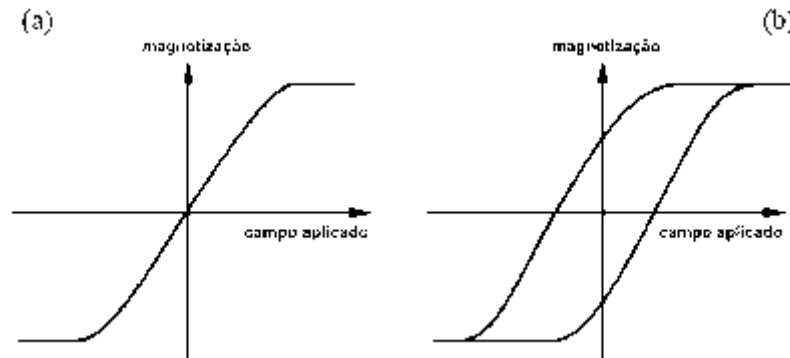


**Figura 8:** Variação da magnetização com a temperatura [53].

A elevada magnetização nos materiais ferromagnéticos está relacionada com o caso destes possuírem momentos de dipolo magnético intrínsecos que se alinham paralelamente entre si [52].

O módulo da magnetização em materiais ferromagnéticos é várias ordens de grandeza maior do que em materiais paramagnéticos e diamagnéticos, e a sua ligação com o campo  $H$  é não linear [52].

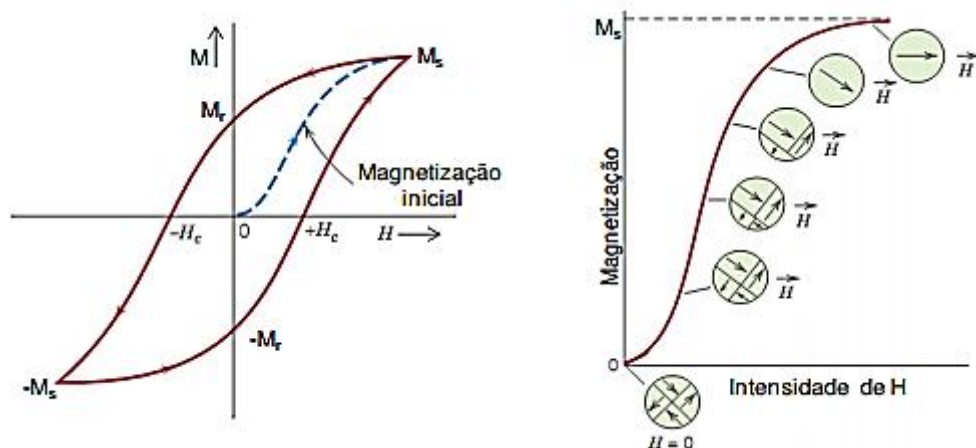
Uma forma de estudar os processos de magnetização num material ferromagnético é submetê-lo a um campo externo oscilante, e seguir o comportamento da magnetização total do material à medida que o campo aplicado se altera. Podemos então esboçar uma curva de magnetização em função do campo. Esta curva será um somatório de todos os processos reversíveis e irreversíveis de magnetização que vão acontecendo à medida que o campo varia. Na Figura 9a temos um exemplo de como seria uma curva onde dominam processos reversíveis. Na Figura 9b temos um exemplo do que acontece quando há processos irreversíveis [54].



**Figura 9:** (a) Curva de magnetização predominantemente reversível, (b) Curva de magnetização onde há processos irreversíveis caracterizando a formação de uma histerese [54].

Aplicando-se um campo magnético no material inicialmente desmagnetizado, Figura 9, este seguirá a curva até atingir um patamar estável chamado de magnetização de saturação ( $M_s$ ). Através da redução do campo magnético a partir deste valor,  $M$  decresce mais lentamente seguindo o sentido dado pela seta até um valor residual da magnetização para um campo nulo chamado de magnetização remanescente ( $M_r$ ), onde o material fica magnetizado sem aplicação de campo. Trocando o sentido do campo a magnetização segue no mesmo sentido da curva para valores de  $M$  menores que  $M_r$  até que a magnetização se anule para um determinado valor de campo chamado de campo coercivo ( $H_C$ ). Com o prosseguimento da variação do módulo do campo magnético, adquire-se novamente uma região de saturação e repetindo o ciclo no sentido inverso ocorre uma curva fechada que é o chamado ciclo de histerese [52, 56].

A Figura 10 apresenta uma curva de histerese. A histerese decorre de perdas energéticas durante o processo de magnetização e a área da histerese está relacionada com essas perdas. Materiais com “pouca histerese” (com pouca área de histerese) exibem poucas perdas durante o processo de magnetização [54].



**Figura 10:** a) Curva de histerese, magnetização em função de H; b) magnetização inicial [58].

## 2.1.6 Técnicas de Caracterização das Nanopartículas

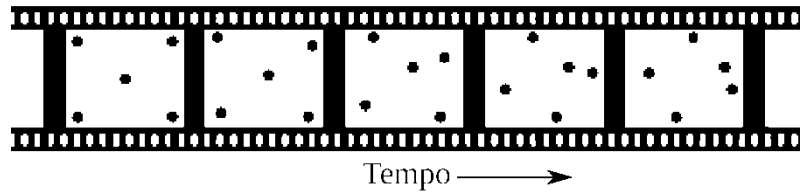
Para a caracterização de NP's recorre-se a várias técnicas tais como o espalhamento de luz dinâmico, Microscopia eletrônica de varrimento e Espectroscopia fotoelétrica de raio-X.

### 2.1.6.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

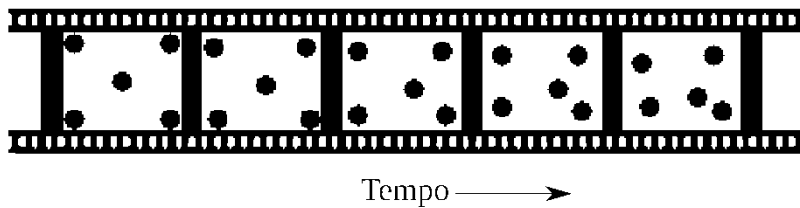
Espalhamento de luz dinâmico é uma técnica utilizada para a determinação da dimensão de partículas em soluções coloidais. Nesta prática a amostra é iluminada por um laser e a intensidade da luz espalhada resultante é dependente do tamanho da partícula.

As partículas suspensas em líquido agitam-se constantemente devido ao movimento Browniano e devido a colisões aleatórias com as moléculas do líquido que aglomeram a partícula. Ao comparar as intensidades de luz espalhada nos tempos  $t$  e  $t+dt$ , onde  $dt$  é uma quantidade de tempo muito pequena, percebe-se que as intensidades são muito análogas, ou seja, estão fortemente correlacionadas. A intensidade no tempo  $t+2dt$  também será fortemente correlacionada com a intensidade no tempo  $t$ , mas menos do que a do tempo  $t+dt$ . Portanto, a correlação entre as intensidades de luz espalhada diminui com o passar do tempo devido ao movimento das partículas. Como pode ser visto na Figura 11, a velocidade com que esta correlação abranda depende do tamanho das partículas, pois partículas menores movem-se mais rapidamente que as partículas maiores.

Partículas pequenas e rápidas



Partículas grandes e lentas



**Figura 11:** Esquema que ilustra espalhamento de luz por partículas pequenas e grandes em função do tempo [60].

A curva da correlação em função do tempo  $G$  pode ser ajustada por uma exponencial:

$$G(dt)=[I(t) \cdot I(t+dt)]=A(1+Bexp(-2 \Gamma dt)) \quad (2)$$

Onde  $I(t)$  é a intensidade de luz espalhada no tempo  $t$ ,  $A$  é a amplitude de  $G$ ,  $B$  é a linha de base de  $G$  e  $\Gamma$  é a taxa de decaimento de  $G$ . O valor de  $\Gamma$  é proporcional ao fator de difusão das partículas no meio  $D$ . A constante de proporcionalidade é igual ao quadrado do módulo do vetor de espalhamento do meio e é independente do tamanho das partículas. Pela da equação de Stokes-Einstein pode-se adquirir o valor de  $D$ :

$$D=\frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (3)$$

Onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta do meio,  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $R_H$  é o raio do espaço ocupado pela partícula no meio (raio hidrodinâmico). O valor de  $R_H$  obtido é maior ou igual ao raio real da partícula devido à presença de surfactantes e/ou outros materiais na superfície da partícula.

Uma dificuldade inerente a técnica é a formação de aglomerados de nanopartículas, já que o valor médio de  $R_H$  depende fortemente da intensidade de luz espalhada pelas partículas.

### 2.1.6.2 Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)

A análise SEM é uma das técnicas mais versáteis atualmente para estudar a morfologia de nanopartículas. O microscópio utiliza um feixe de elétrons focado mas, em vez de passar através da amostra, circunda toda a superfície sob a qual se encontra a amostra em estudo. Essa ação gera uma série de sinais que são posteriormente convertidos em imagens, para uma mais fácil interpretação de dados.

A criação da imagem de uma análise SEM depende da recepção dos sinais resultante da interação entre o feixe de elétrons e a espécie em estudo. Dessa interação obtém-se diversos sinais, de entre os quais se podem destacar os *elétrões retrodifundidos* e os *elétrões secundários* (SE), em que os primeiros são responsáveis pela informação acerca da forma, composição do material em análise e pela atribuição de contraste à imagem e os segundos pela visualização da textura e rugosidade na análise SEM [60].

A preparação de amostras para um estudo deste tipo exige um serviço mínimo e a aquisição de resultados é normalmente rápida. As principais condições deste tipo de análise implicam que a amostra seja sólida e que caiba na câmara do microscópio.

Esta técnica está usualmente ligada à técnica de espectroscopia dispersiva de Raios-X (EDS), que permite uma análise semi-quantitativa dos elementos químicos na superfície dos materiais.

### 2.1.6.3 Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios-X (XPS)

A Espectroscopia Fotoeletrônica de Raios-X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS), igualmente designada por Espectroscopia Eletrônica para Análise Química (*Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*, ESCA), possibilita o reconhecimento dos elementos presentes nas primeiras camadas atômicas de uma dada amostra, a sua quantidade e a determinação do seu estado de oxidação.

A técnica baseia-se, como se mencionou, no efeito fotoelétrico e consiste na emissão de elétrons (ou fotoelétrons) por uma amostra quando sobre ela se faz incidir radiação X com energia igual ou superior à necessária para ionizar as camadas mais internas de um átomo.

Quando os raios-X tocam a amostra, um elétron de um dado átomo pode absorver a energia. Se a energia dos fótons incidentes,  $h\nu$ , for igual à energia de ligação  $E_1$  do elétron no átomo este será ejetado sem energia cinética; se  $h\nu$  for superior a  $E_1$  o elétron é ejetado da superfície com uma determinada energia cinética,  $E_c$ .

O espectrómetro de XPS mede a  $E_c$  dos fotoelétrons emitidos. Esta é função da energia dos raios-X,  $h\nu$ , da energia do nível atômico de onde os elétrons resultam, ou seja, da energia de ligação,  $E_1$ , e da função trabalho do espectrómetro,  $\phi$ , que é possível conhecer, como explicitado na equação 4.

$$E_c = h\nu - E_1 - \phi \quad (4)$$

onde  $h$  representa a constante de Planck ( $6,62 \times 10^{-34}$  J s) e  $\nu$  a frequência da radiação (Hz). Se o elétron ejetado provier de uma camada interna, a sua energia de ligação é praticamente igual à que tem no átomo isolado (ao contrário do que acontece com os elétrons de valência) e constitui, por isso, uma impressão digital do elemento de que provém.

Os espectros de XPS consistem numa representação gráfica do número de elétrons detetados por intervalo de energia em função da sua energia de ligação. Cada elemento químico possui uma energia de ligação característica associada a cada orbital atômica interna tendo, por isso, cada elemento um espectro único. Deste modo, a técnica permite a identificação qualitativa de quase todos os elementos da Tabela Periódica (com exceção do H e do He que só possuem elétrons de valência) e a determinação do estado de oxidação e, portanto, do ambiente químico em que se encontram os seus átomos. A análise das intensidades dos picos e das respetivas áreas permite ainda obter informação quantitativa sobre a composição da superfície, uma vez que o número de elétrons emitidos está diretamente relacionado com a concentração de cada elemento na amostra. A profundidade de penetração dos raios-X não ultrapassa os 10 nm, sendo realizável, nalguns casos, caracterizar as 10-20 primeiras camadas atômica de uma amostra. O XPS é por isso uma técnica específica da superfície [61].

### 2.1.7 Toxicidade das Nanopartículas

As investigações iniciais sobre a toxicidade de nanomateriais foram efetuadas na última década do século XX, pesquisando-se materiais que em escala micrométrica não

expunham toxicidade, e que em escala nanométrica, exibiam algum efeito tóxico. Um dos primeiros trabalhos sobre esta tema foi realizado por Seaton *et al.*, que, num ensaio *in vivo* com ratos presenciaram a inflamação de tecidos intersticiais somente dos indivíduos que foram expostos a partículas nanométricas de 20 nm, enquanto que os demais, expostos a partículas de 250 nm, mantiveram-se saudáveis [62].

Donaldson *et al.*, observou em 1996, experimentaram a atividade de TiO<sub>2</sub> (25 e 500 nm de diâmetro) e averiguaram que a atividade biológica das nanopartículas de 25 nm era muito superior à das partículas de 500 nm [63].

Com o aumento da necessidade do conhecimento dos potenciais riscos dos compostos nanoestruturados diretamente relacionados com a saúde humana, surgiu o termo nanotoxicologia, que tem como fim estudar e avaliar a toxicidade de nanomateriais e nanodispositivos que contactam diretamente com o Homem. De forma análoga, o termo nanoecotoxicologia é utilizado para estudos direcionados à avaliação dos danos de nanomateriais ao ambiente [64], esclarecendo os caminhos de transferência do agente tóxico, bem como a sua interação com o mesmo [65]. A nanoecotoxicologia como a nanotoxicologia, abrangem a caracterização adequada dos compostos pesquisados e dos mecanismos de toxicidade dos próprios, para que os seus potenciais riscos sejam estimados de forma segura [66].

A diminuição no tamanho das NP's aperfeiçoa a sua biodisponibilidade, mas também aumenta a reatividade das partículas, o que representa um potencial perigo para a saúde. Entender as propriedades das NP's e os seus efeitos é elementar antes de qualquer uso clínico, o que pede esforços multidisciplinares para o desenvolvimento adequado de metodologias de análise, através da implementação de instrumentos complementares para caracterização físico-química relevantes das NP's e avaliação dos processos bioquímicos que ocorrem nas células [67].

Para que NP's de óxido de ferro superparamagnéticas possam ser usadas em aplicações *in vivo* é fundamental entender o limite de segurança, sendo essenciais estudos mais elaborados para avaliar os efeitos dependentes da concentração de NP's sobre a função celular e sua toxicidade [68].

Para apreciação toxicológica devem ser considerados diferentes parâmetros, como tamanho das partículas, forma, superfície, estrutura química, entre outros. Requer uma abordagem interdisciplinar, compreendendo aspetos que vão desde a física, química,

biologia até à medicina, e considerando mobilidade no corpo, via de penetração, tamanho, área superficial, reatividade e estrutura química das NP's [69-71].

Para estimação do risco no uso de NP's, como dose, local de ação e via de administração, são imprescindíveis estudos farmacocinéticos. Quanto menor a partícula, maior a competência de resposta inflamatória e a formação de espécies reativas de oxigénio a nível pulmonar. Sendo assim, é essencial o desenvolvimento de moldes de toxicidade e de rastreio *in vivo* e *in vitro* para um progresso seguro da nanotecnologia [71].

## 2.2 Biomicrofluidica

---

Na microcirculação, a conduta do escoamento dos Glóbulos Vermelhos (GVs) tem um papel essencial em muitos fenómenos fisiológicos e patológicos. O comportamento reológico dos GVs que escoam em microcanais e microvasos dependem de vários efeitos, como hematócrito (Hct) [72, 73], geometria do microvaso [74] e temperatura [75]. Em estudos *in vitro* anteriores foi também calculado o efeito de diversos elementos sobre a dispersão radial (Dyy) em suspensões diluídas [76] e concentradas [72, 73] de GVs. A maioria destas investigações utilizaram o *software Image J* apelando a vários *plugins* para a realização da análise de imagem e correspondente determinação de vários parâmetros hemodinâmicos. Utilizando esse *software*, é realizável efetuar o acompanhamento dos GVs no microcanal e adquirir a sua posição em função do tempo. O escoamento de cada GV escolhido manualmente, é calculado automaticamente em imagens sucessivas.

No estudo [73], realizado por Lima e seu grupo de investigação, com os novos avanços em informática, microscopia e processamento de imagem digital, foi possível combinar um método de seguimento de GVs com um sistema de microscopia confocal. Neste trabalho é fundamentado o desenvolvimento do sistema “confocal micro-PTV” para capturar o escoamento dos GVs corados em suspensões concentradas. As medidas foram realizadas em diversas profundidades e com capilares de vidro de 100  $\mu\text{m}$ . O sistema “confocal micro-PTV” foi capaz de detetar circulação de translação e rotação dos GVs, individualmente, que escoam em suspensões concentradas. Os resultados

proporcionam evidência de que os GVs em suspensões diluídas (3% de Hct) apontam a seguir trajetórias lineares, enquanto GVs em suspensões concentradas (20% de Hct) apresentam deslocamentos transversais de cerca de 2% do caminho original.

Em relação à “camada do plasma” concluíram que aparenta ampliar as oscilações nas trajetórias dos GVs devido ao impedimento, diminuindo os movimentos transversais procriados por outros GVs [73].

Pelos mesmos autores foi efetuado um estudo semelhante, em capilares de vidro no entanto não só com 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro mas igualmente com 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro [72] onde concluíram que as flutuações dos GVs (coeficiente de dispersão,  $D_{yy}$ ) visam a engrandecer com o aumento do Hct e a reduzir com a diminuição do diâmetro.

Por Meireles *et al*, em 2011, foram estabelecidas várias trajetórias dos GVs a escoarem na área de limite da “camada de plasma” em que os resultados apontam para que as trajetórias seguem um comportamento polinomial [77].

### 2.2.1 O Sangue

O sangue tem como principal função o transporte de oxigênio, nutrientes, produtos residuais e calor para todo o corpo. O sangue oxigenado sai do coração com uma alta velocidade e pressão, pela aorta e encaminha-se continuamente para outras artérias de grande porte, arteríolas e por último para os capilares. No regresso, este move-se para as vénulas, veias e finalmente volta para o coração e o processo é repetido [78].

Num adulto saudável com cerca de 70 kg de peso, o volume de sangue corresponde a aproximadamente 7% do peso do corpo, a que correspondem cerca de 5 litros, dos quais quase 60% é plasma.

Considerando a importância que o sangue tem para a sobrevivência do ser vivo, tem-se averiguado um aumento significativo de estudos nas mais distintas áreas. Estudos relacionados com a sua composição, as patologias associadas, assim como o seu comportamento ao longo do escoamento nos mais diferentes canais de transporte que o ser vivo possui, são objeto de reflexão e de estudo na atualidade.

## 2.2.2 Constituição do Sangue

O sangue é um fluído opaco, com viscosidade superior à da água, heterogéneo e constituído por um líquido claro, o plasma, e uma série de elementos celulares. O sangue está contido num compartimento fechado, o aparelho circulatório, que o mantém em movimento segundo um fluxo unidirecional [79]. O sangue, devido à sua complexidade e ao facto de ser constituído por células que executam funções específicas, pode ser denominado de tecido, considerando o ponto de vista funcional. O sangue não é um líquido, ele encontra-se num estado fisiológico normal, perto da composição líquida (gel diluído) [80, 81].

### 2.2.2.1 Hemácias

As hemácias, eritrócitos ou glóbulos vermelhos (Figura 12), são elementos celulares anucleados, com forma de disco bicôncavo, com cerca de 7,5 micrómetros de diâmetro, cerca de 2,6 micrómetros de espessura no contorno e unicamente 0,8 micrómetros de espessura no centro. A forma bicôncava garante uma grande superfície, o que auxilia as trocas gasosas da responsabilidade dos eritrócitos. Além disso, as hemácias são muito maleáveis, o que lhes possibilita adaptar-se à forma dos capilares de menor diâmetro. A concentração habitual no sangue varia entre 3,9 e 5,5 milhões/mm<sup>3</sup> de sangue na mulher e entre 4,1 e 6,0 milhões/mm<sup>3</sup> de sangue no homem [79].

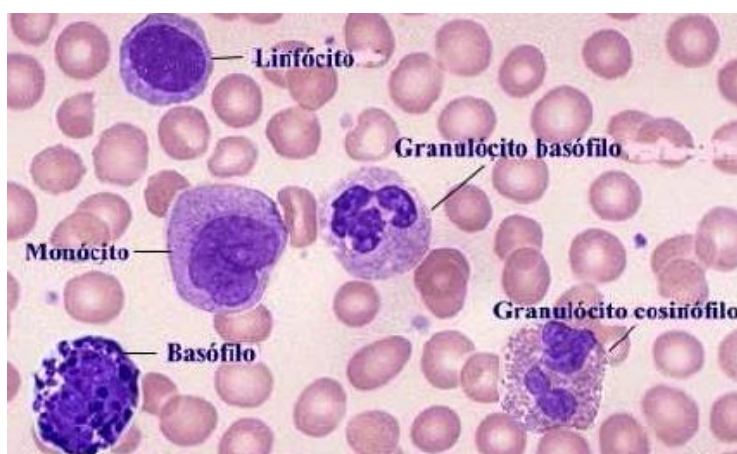


**Figura 12:** Hemácias visualizadas em microscópio de varrimento [82].

A vida de um glóbulo vermelho é cerca de 125 dias, ou seja, 0,8% das hemácias são destruídas diariamente, por conseguinte é produzida na medula óssea a mesma quantidade de glóbulos vermelhos. As hemácias são as principais responsáveis pelo transporte de oxigênio dos pulmões para todos os tecidos do corpo humano [83].

### 2.2.2.2 Glóbulos Brancos

Os glóbulos brancos, ou leucócitos, são células originadas na medula óssea, que estão presentes no sangue, linfa, órgãos linfóides e diversos tecidos conjuntivos. Têm a função de combater os microrganismos que motivam doenças fazendo a sua captura ou utilizando anticorpos. Existem três tipos de leucócitos: os granulados (50 a 60%), os agranulados ou linfáticos (30 a 40%) e os monócitos (até 7%) (Figura 13).



**Figura 13:** Representação dos tipos de leucócitos [84].

Os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) têm um núcleo irregular segmentado, contêm grânulos no seu interior, delineados por uma membrana. Os agranulócitos (monócitos e linfócitos) têm um núcleo que tem uma forma regular, ou seja, não mostram granações no seu citoplasma. O número de leucócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue no adulto normal alterna entre 6.000 a 10.000, sendo 60 a 70% de neutrófilos, 2 a 4% de eosinófilos, 0 a 1% de basófilos, 20 a 30% de linfócitos e 3 a 8% de monócitos [79, 85]. O diâmetro dos leucócitos poderá alterar entre os 7 e os 22  $\mu\text{m}$  de acordo com o seu tipo [86].

### 2.2.2.3 Plaquetas Sanguíneas

A plaqueta sanguínea, ou trombócito, é um fragmento de célula presente no sangue que é formado na medula óssea. A sua essencial função é a criação de coágulos, tendo um papel muito importante na coagulação sanguínea. As plaquetas estão em circulação no sangue durante cerca de 5 dias sendo depois destruídas no baço.

Um indivíduo normal tem entre 150.000 e 400.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> de sangue. A sua diminuição (trombocitopenia) ou disfunção pode levar a sangramentos e o seu aumento (trombocitose) eleva o risco de trombose.

### 2.2.2.4 Plasma Sanguíneo

Todos os fluidos fora do compartimento celular constituem o fluido extracelular, do qual  $\frac{1}{4}$ , ou cerca de 3 litros (considerando um adulto com cerca de 70 kg), está no interior de vasos sanguíneos constituindo o plasma, a porção líquida ou não celular do sangue.

O plasma é um líquido (92% água) amarelado e no qual as células sanguíneas estão suspensas; é o maior componente do sangue, correspondendo a 55% do volume total do sangue. Contém inumeráveis substâncias em solução ou suspensão, substâncias de pequeno e elevado peso molecular, correspondendo a 10% do volume de plasma. Destas substâncias, as proteínas plasmáticas equivalem a 7%, os sais inorgânicos são cerca de 0,9% e o resto são compostos orgânicos diversos, como aminoácidos, glicose, vitaminas, mediadores químicos, entre outros.

A fundamental função do plasma é carregar as proteínas e as substâncias dissolvidas, como nutrientes, medicamentos, produtos tóxicos (por exemplo o dióxido de carbono que as células eliminam) e também transportar para todo o corpo os medicamentos ingeridos.

O plasma possibilita uma troca livre dos seus componentes com o líquido intersticial, através dos poros existentes na membrana capilar. As proteínas plasmáticas em condições normais, não perfuram a membrana devido às suas grandes dimensões, ficando assim no plasma. O mesmo não acontece com a água e outras substâncias dissolvidas, que atravessam facilmente a membrana.

Um processo simples de separar as células do sangue do plasma é através de centrifugação, que afasta o plasma das hemácias.

Se ao plasma sanguíneo forem isolados os fatores de coagulação (como a fibrina), este fica com o nome de soro sanguíneo. Este soro é obtido através da coagulação do sangue total pois os fatores de coagulação foram gastos pela coagulação das hemácias.

## **2.2.3 Microcanais e fluidos fisiológicos**

### **2.2.3.1 Capilares de Vidro Borosilicato**

O vidro borosilicato é um tipo de vidro resistente ao calor e aos produtos químicos, sendo construído pela adição de boro aos componentes tradicionais do vidro. O seu baixo coeficiente de dilatação possibilita que instrumentos de vidro possam conservar a precisão das suas medidas mesmo quando sujeito ao calor. Este tipo de vidro é resistente ao calor, o que o torna útil em material de laboratório que tenha que suportar temperaturas elevadas.

Além de laboratórios, é igualmente utilizado em indústrias químicas, iluminação, telescópios, equipamento de cozinha e armazenamento de resíduos nucleares. Os capilares de vidro borosilicato usados neste projeto têm 100  $\mu\text{m}$ . Estes capilares foram fabricados pela Vitrocom (Mountain Lakes, NJ, EUA) e foram colocados sobre uma lâmina de vidro imersa em glicerina que tem o mesmo índice de refração [87].

O fluxo laminar através de tais microcanais gera um fluxo meramente axial, que é semelhante ao comportamento do fluxo através dos capilares [88].

### **2.2.3.2 Dextran 40**

O Dextran 40 é um polissacarídeo alterado, solúvel em água, composto por resíduos de D-glucose, e apresenta ligações glicosídicas. É muito usual medicinalmente como um antitrombótico (anti-plaquetário), abrandando a viscosidade do sangue e tem vindo a ter bastantes aplicações na área farmacêutica e biomédica. O dextran aumenta a eletronegatividade das hemácias, plaquetas e do endotélio vascularizado, reduzindo assim a união das plaquetas e dos eritrócitos. As grandes vantagens da utilização deste composto residem na sua biodegradabilidade em seres humanos, na não toxicidade e na

inexistência de reações no organismo. Por outro lado, existem poucos efeitos colaterais, mas que podem ser graves, tais como diminuição dos níveis de hemoglobina e do hematócrito e inflamação da veia [89].

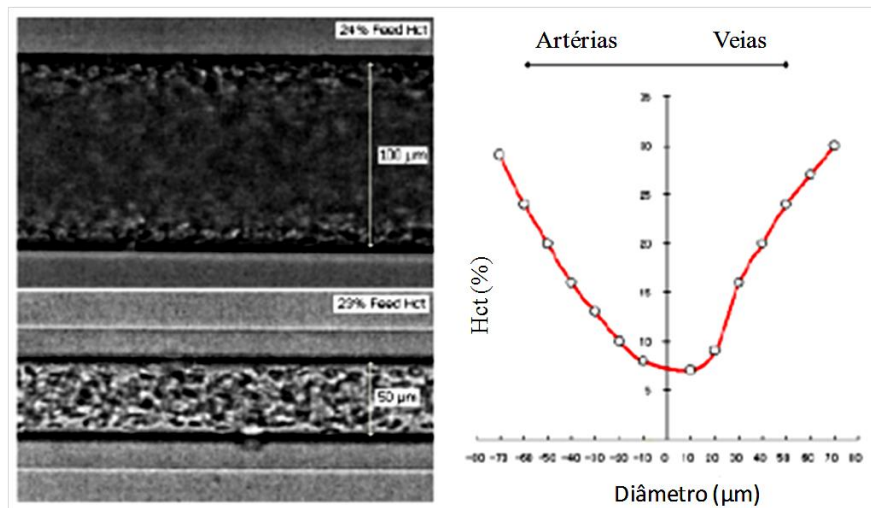
### 2.2.3.3 Soro Fisiológico

O soro fisiológico é uma solução de água destilada e cloreto de sódio (NaCl), sendo isotônica e contém 0,9% (em massa) de NaCl em água destilada, ou seja, cada 100 mL da solução aquosa envolve 0,9 gramas de sal. O sal faz com que a solução apresente, normalmente, um  $\text{pH} = 7$ . Devido às suas características é habitual em variadas situações. Em medicina, pode ser usado em pessoas que exibem sintomas diversos como gripes, respostas alérgicas, limpeza de ferimentos (cortes e queimaduras) e desidratação (meio intravenoso). Em laboratórios é usado como meio de soluções para observação ao microscópio [90].

Neste projeto o soro fisiológico foi utilizado para lavagem de células sanguíneas durante a centrifugação.

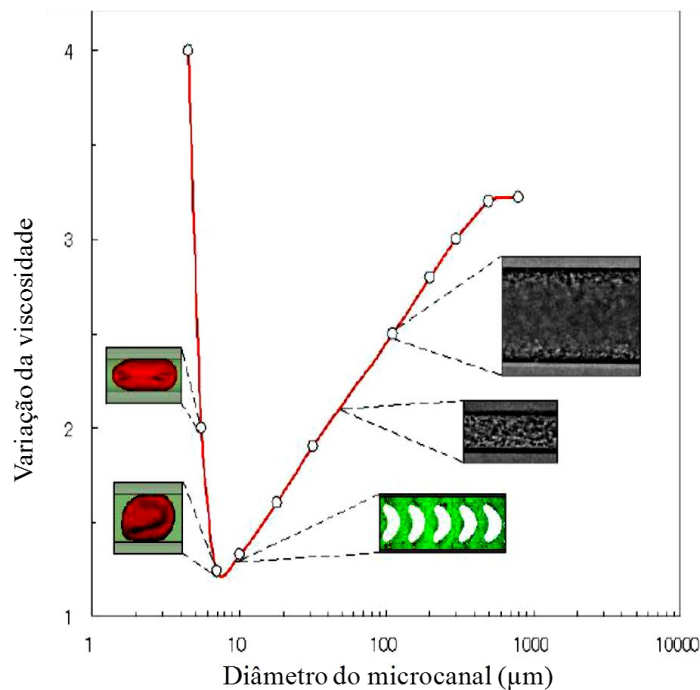
## 2.2.4 **Comportamento reológico em microcanais**

As características do escoamento sanguíneo mais admiráveis são conhecidas como efeito de Fahraeus e efeito Fahraeus-Lindqvist. Estes dois efeitos, para além de já terem sido presenciados em ensaios experimentais *in vivo*, estão fortemente relacionados com o diâmetro de micro-tubos. Na obra de *Robin Fahraeus*, apura-se que o comportamento do escoamento do sangue e o Hct são fortemente afetados por micro-tubos de diâmetros inferiores a 300  $\mu\text{m}$ , o que indica que o Hct diminui à medida que o sangue prossegue através de micro-vasos mais estreitos (Figura 14). Este fenómeno origina da migração axial dos GVs para o centro do micro-tubo e conseqüente do movimento mais rápido das células, quando comparado com o meio de suspensão, como o plasma ou o dextran [78, 91-93].



**Figura 14:** Efeito de Fahraeus em capilares de vidro. Distribuição do Hct no microcanal [86].

Tal como o fato anteriormente referido, o efeito de Fahraeus-Lindqvist, ocorre para diâmetros inferiores a 300 µm, observando-se a mudança da viscosidade do sangue com a alteração do diâmetro dos microcanais. Verificou-se que a viscosidade do sangue diminui com a diminuição do diâmetro do microcanal, todavia vários estudos posteriores mostraram que para diâmetros inferiores a 7 µm o efeito de Fahraeus-Lindqvist é invertido, tal como podemos observar na Figura 14. Foram apresentados pelos autores destes estudos vários fenômenos que podem influenciar a viscosidade aparente do escoamento sanguíneo, como a camada de plasma e os movimentos microscópicos realizados pelas hemácias [91, 94].



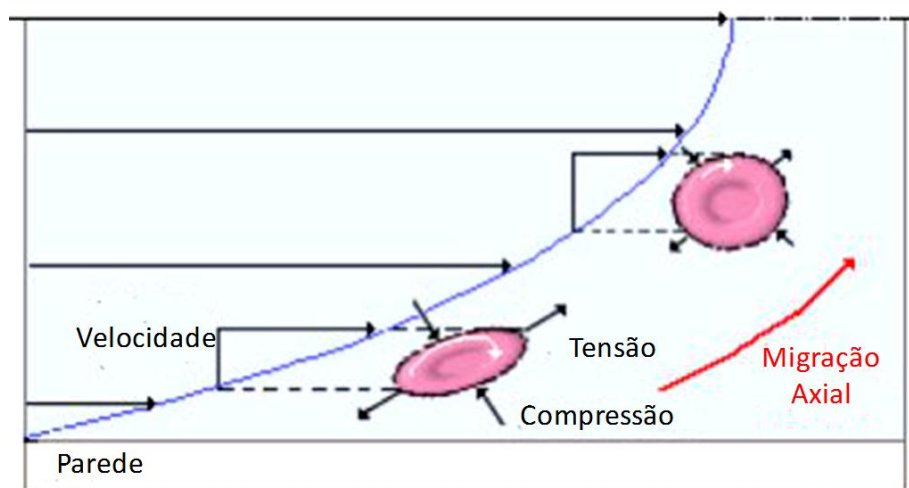
**Figura 15:** Efeito de Fahraeus-Lindqvist. Variação da viscosidade em função do diâmetro do microcanal, adaptada de [86].

O efeito Fahraeus-Lindqvist (Figura 15) pode ser causado pelo alinhamento das hemácias quando atravessam os vasos. As hemácias alinham-se no centro do vaso e o plasma permanece junto às paredes dos vasos, eliminando-se assim a resistência viscosa característica do sangue.

Este efeito é compensado pela velocidade do fluxo e pelo acoplamento de células. A viscosidade sanguínea aumenta significativamente quando há uma caída na velocidade do fluxo. Assim, como a velocidade do fluxo nos pequenos vasos é muito baixa, por vezes menor que 1 mm/s, a viscosidade pode aumentar até 10 vezes mais por este motivo. Este efeito pode ser causado pela aderência das hemácias entre si e às paredes dos vasos [80, 95].

Dois fatores podem explicar o efeito de Fahraeus-Lindqvist, a diminuição do diâmetro do microcanal que provoca um declínio do hematócrito a ser escoado devido à formação de uma camada livre de células (CLCs) junto às paredes do microcanal. A CLC originada junto as paredes ainda não possui uma justificação totalmente unânime, porém esta pode ser associada à tendência das hemácias migrarem para a zona central do microcanal como podemos observar na Figura 16. Assim sendo o plasma que se

encontra junto as paredes (local onde as forças de corte são máximas) irá reduzir o atrito entre as hemácias e as paredes dos microcanais, ajudando assim a diminuição da viscosidade do sangue [96].



**Figura 16:** Representação esquemática da migração axial das Hemácias, adaptada de [97].

## **Capítulo 3. PARTE EXPERIMENTAL**



## 3.1 Preparação das Nanopartículas

---

Neste projeto, as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foram sintetizadas por um processo solvotérmico aplicando procedimentos relatados na literatura [98]. Num procedimento próprio, dissolve-se 5 mmol de precursor  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em 20 mL de etilenoglicol (EG), sendo depois adicionados 20 mmol (0.80 g) de hidróxido de sódio (NaOH) na mistura resultante. Para dissolver o precursor  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , este é colocado em aquecimento a 60 °C sob agitação magnética. Para a dissolução do NaOH é necessário proceder à sua trituração e aquecimento em banho-maria. Faz-se a medição do pH da primeira mistura ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{EG}$ ) e da mistura final. De seguida, a mistura obtida é colocada num reator em aço inoxidável (Parr Acid Digestion Vessel, Model 4748) e aquecida a 180 °C durante 6 h. Concluído o tempo de exposição térmica, o reator é arrefecido até à temperatura ambiente.

Depois desta etapa, o conteúdo do reator é transferido para falcons para de seguida proceder à purificação e separação das nanopartículas obtidas. Primeiro por centrifugação, fazendo 4 lavagens, alternadamente com água e com etanol (5000 rpm, 10 minutos as duas primeiras lavagens e 15 minutos as restantes). De seguida usando um método da diálise numa manga de éster de celulose (CE) de MWCO:500-1000D da Spectra/Por Biotech imersas em água desionizada. As nanopartículas foram finalmente secas numa placa de petri.

Este procedimento foi repetido na síntese de cada amostra, tendo-se obtido, no final, 5 tipos distintos de nanopartículas, por variação da quantidade de precursor ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) ou da temperatura.

Os parâmetros experimentais variados na síntese das diferentes amostras de nanopartículas encontram-se resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Condições de preparação das nanopartículas.

Precursor	Precursor (mmol)	NaOH (mmol)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (NP1)	5	20	6	180
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (NP200)	5	20	6	200
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (NP4)	5	10	6	180
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O (NP1N)	5	20	6	180
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> .3H <sub>2</sub> O (NP1CN)	5	20	6	180
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> .3H <sub>2</sub> O (NP1CN24h)	5	20	24	180

## 3.2 Caracterização das Nanopartículas

A determinação da dispersão de tamanhos das nanopartículas por dispersão dinâmica da luz (DLS) foi efetuada em tampão fosfato salino (PBS, pH = 7,4), usando células de poliestireno descartáveis de percurso ótico reduzido (40µL) da Sigma, num equipamento da Malvern (Malvern, UK) Zeta Sizer Nano ZS. Antes de todas as medições as amostras foram diluídas para uma concentração de  $5,00 \times 10^{-4}$  g/L e colocadas em ultrassons durante 5 min à temperatura de 25 °C (viscosidade de 16 mPa/s) [60]. Posteriormente foram passadas por filtros moleculares de 200 nm da Sigma e colocadas nas células de poliestireno.

A morfologia e composição química dos óxidos de ferro purificados foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) e por espectroscopia dispersiva de Raios-X (EDS), num microscópio eletrônico de varrimento de alta resolução FEI Quanta 400FEG/EDAX Genesis X4M.

A análise XPS foi realizada utilizando uma unidade Kratos AXIS Ultra HSA, com *software* de aquisição de dados VISION e de análise de dados CASAXPS. A análise foi efetuada com uma fonte de raios X monocromática de Al K $\alpha$  (1486,7 eV), a funcionar a 15 kV (90 W), no modo FAT (Fixed Analyser Transmission), e com uma energia de passagem de 40 eV para as regiões e 80 eV para o survey. A aquisição de dados foi realizada a uma pressão inferior a  $1,0 \times 10^{-6}$  Pa e foi utilizado um sistema de neutralização de carga integral. O efeito de carga elétrica foi corrigido tomando por

referência o pico do carbono (285 eV). A modelação dos espectros foi realizada utilizando os programas XPSPEAK41, em que foi efetuado um ajuste de picos com uma forma Gaussiana-Lorentziana e subtração do fundo tipo Shirley.

### 3.3 Avaliação da Citotoxicidade sobre Hemácias

---

Para o estudo da citotoxicidade das nanopartículas sintetizadas foram recolhidas amostras de 5 mL de sangue venoso humano, bovino, caprino e ovino e colocadas em tubos de ensaio com 20 µL de heparina (anticoagulante). Depois realizou-se centrifugação por 15 minutos a 2000 rpm para separação do plasma e das hemácias. O plasma foi removido por aspiração cuidadosa, sendo acrescentado o mesmo volume de solução tampão salina (NaCl 0,85% 50 mM, pH = 7,4; PBS) ao concentrado, repetindo-se três vezes nas mesmas condições o processo descrito anteriormente.

O hematócrito foi determinado através de um tubo microcapilar, centrifugado durante 5 minutos a 2500 rpm, separando assim hemácias e plasma. O volume globular foi ajustado para 5%, através da diluição das hemácias em 50 mL de solução tampão (NaCl 0,85% 50 mM, glicose 6 mM, pH = 7,4), adicionado de 10 µL de solução de penicilina 30 mg/mL e 10 µL de solução de estreptomicina 50 mg/mL.

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas diferentes concentrações (0,25 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L e 2 g/L) de nanopartículas suspensas em PBS. Em cada ensaio misturou-se 980 µL do concentrado de hemácias e 20 µL da solução de nanopartículas. No ensaio controlo, misturou-se 980 µL do concentrado de hemácias e 20 µL de PBS. Os tubos foram incubados à 37 °C em constante agitação a 150 rpm. Após 24 h de incubação, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 4000 rpm, e realizou-se a leitura da absorbância do sobrenadante para determinação da hemoglobina libertada. A citotoxicidade sobre as hemácias é proporcional à quantidade de hemoglobina libertada.

### 3.4 Avaliação da Citotoxicidade sobre *E.coli*

---

O método de Kirby-Bauer é um método padronizado e muito utilizado em laboratório para a determinação da susceptibilidade de um microrganismo a um antibiótico, neste caso a uma suspensão de nanopartículas previamente preparada. Neste método, uma placa de Petri contendo meio sólido é inoculada com o organismo-teste. Seguidamente, o agente químico, aqui a suspensão, é colocado no centro da placa impregnado num disco de papel de filtro de 6 mm de diâmetro. Após um período de incubação de 18 h, a placa é observada e o diâmetro de inibição da solução é medido em relação a uma solução de PBS sem nanopartículas, chamada de branco.

Para a realização dos ensaios de avaliação da citotoxicidade sobre *E.coli* foram usadas as mesmas suspensões de nanopartículas em PBS referidas no teste de avaliação de toxicidade sobre as hemácias (0,25 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L e 2 g/L).

Num procedimento típico começa-se por agitar a suspensão da cultura a inocular utilizando um vórtex e por retirar assepticamente uma zaragatoa da embalagem para mergulhar na cultura. De seguida a zaragatoa é pressionada contra a parede do tubo de forma a retirar o excesso de líquido. Depois toda a superfície do agar é inoculada com a zaragatoa (espalhando repetidamente numa só direção e repetindo mais duas vezes em direções diferentes). Depois de esperar cinco minutos para o líquido da cultura ser embebido no ágar, é esterilizada uma pinça passando-a por álcool e, depois, flamejando-a brevemente na chama para depois aplicar, assepticamente, utilizando a pinça esterilizada, os discos da suspensão de nanopartículas. As placas inoculadas são incubadas (sem inverter) a 37 °C durante 18 h. No final, com uma régua medem-se os diâmetros das zonas de inibição da solução.

### 3.5 Escoamento Sanguíneo em Microcanais

---

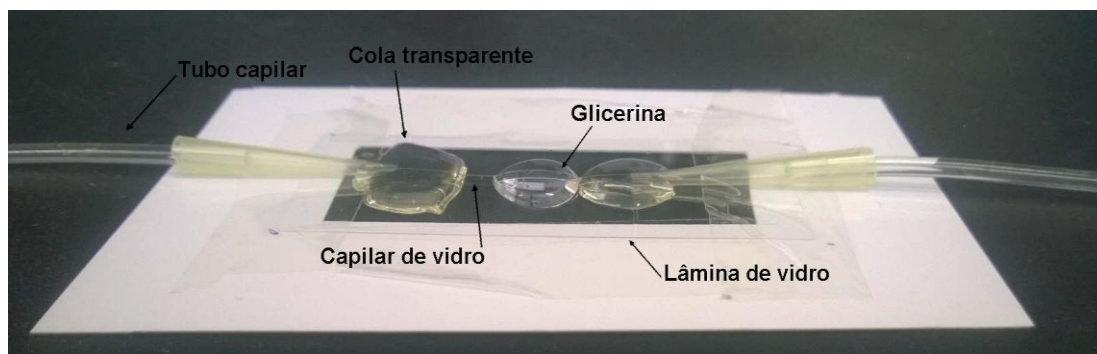
Para a realização dos ensaios de escoamento sanguíneo, recorreu-se a capilares de vidro produzidos ao longo deste projeto. O sangue utilizado é de origem ovina, tendo sido recolhido e colocado num tubo de recolha com anticoagulante.

---

Como preparação do sangue para se realizarem os testes, efetuaram-se duas lavagens para eliminar todos os elementos celulares de não interesse para este estudo e assim obter o Hct desejado. Inicialmente recolheram-se 3 mL da amostra de sangue, colocados num tubo de ensaio juntamente com 3 mL de soro fisiológico. Agitou-se gentilmente a amostra, de seguida é colocada numa centrífugadora a uma velocidade de 2000 rpm durante 15 min a 4 °C. No final da centrifugação foi removida a parte superior da amostra, que possuía o soro e os constituintes celulares não desejados. Efetuou-se novamente uma lavagem à amostra com a adição de 3 mL de soro e a respetiva centrifugação com os parâmetros já anteriormente indicados.

De forma a preparar a amostra de fluído com 5% de Hct, foi colocado num tubo de falcon 250  $\mu$ L de glóbulos vermelhos e adicionado dextran 40 até se completar 5 mL de amostra.

Os estudos de escoamento sanguíneo em microcanais foram realizados em capilares de vidro com diâmetro interno de 100  $\mu$ m (Figura 17). Com o auxílio de uma bomba de seringa e de um microscópio invertido associado com camara de alta velocidade, o sangue foi bombeado para o interior dos microcanais, efetuando-se a visualização do escoamento no interior dos microcanais e captando-se filmes e imagens para posterior análise.



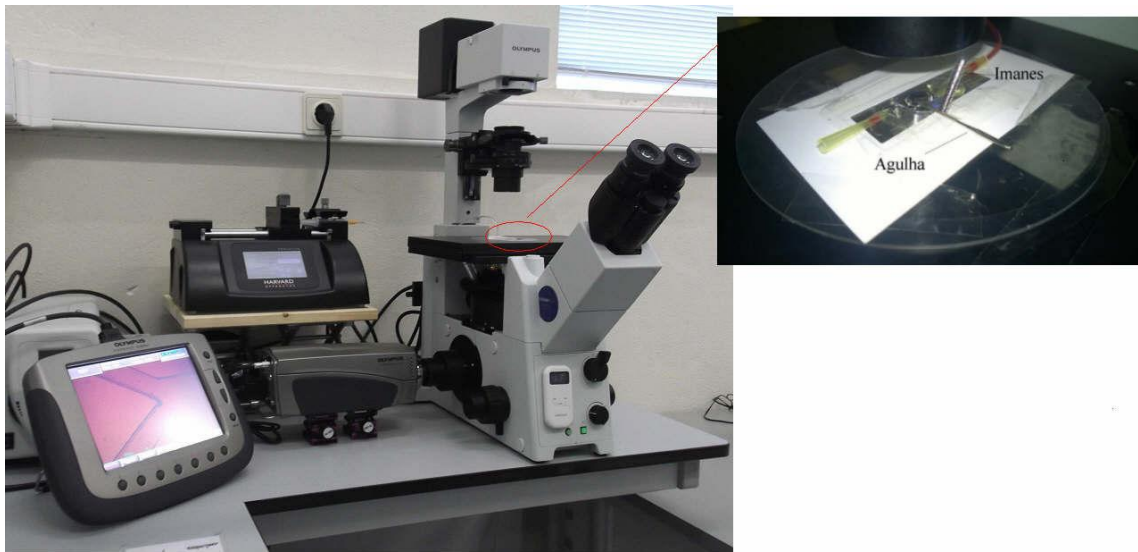
**Figura 17:** Dispositivo constituído com um capilar de vidro utilizado para efetuar as visualizações do escoamento.

Inicialmente estudou-se o comportamento da camada plasma (CP) num fluído fisiológico, dextran 40 com 5% Hct. De seguida misturou-se o sangue com os vários tipos de nanopartículas, suspensas em soro e com 1% de concentração, para verificar quais os seus efeitos na CP. Um outro estudo baseou-se na aproximação de uma agulha

magnetizada com vários ímanes, criando-se assim um campo magnético para estudar qual o efeito desse campo na área de nanopartículas aglomeradas à parede do microcanal e também o efeito deste na CP.

A camada de plasma é um fenómeno fisiológico que ocorre na microcirculação do sangue, quer *in vivo*, quer *in vitro*. Este facto deve-se à tendência dos glóbulos vermelhos se deslocarem através do escoamento do sangue para o centro do microvaso (migração axial). Esta migração ocorre principalmente devido às elevadas taxas de deformação que se verificam nas regiões adjacentes às paredes dos microvasos, fazendo com que os GVs se desloquem para a zona central do capilar. A CP é uma zona com concentração bastante reduzida de células ou até mesmo isenta. Esta pode ser influenciada pelo diâmetro do microcanal, pela deformabilidade dos GVs, pelo Hct, entre outros [110-111]. No entanto, neste trabalho foi apenas estudado para um tipo de diâmetro e de Hct.

Para todo este procedimento usaram-se seringas (*Terumo* 5 ml), uma bomba de seringa (*Harvard Apparatus PHD ULTRATM*) para bombear os fluidos para o microcanal e controlar o caudal, um microscópio invertido (IX71, *Olympus*, Portugal) e uma câmara de alta velocidade (*i-SPEED LT*) incorporada para se proceder à visualização dos escoamentos. No exterior dos microcanais de vidro também foi usado uma pequena quantidade de glicerina para uma melhor observação microscópica, visto que assim se minimiza a refração que possa existir das paredes do microcanal. Na Figura 18 pode ser observado o sistema de microscopia utilizado neste estudo.



**Figura 18:** Sistema para a visualização do escoamento no microscópio.

O campo magnético gerado pelo conjunto íman/agulha é de 138.5G usando um total de oito ímanes.



## **Capítulo 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## 4.1 Síntese de Nanopartículas

---

Neste trabalho foram sintetizadas 5 amostras de nanopartículas de óxido de ferro, alterando-se certos parâmetros, como precursor, quantidade de NaOH, temperatura e tempo de síntese, como detalhado na Tabela 2 apresentada anteriormente. Na Tabela 3 encontra-se a nomenclatura definida para cada amostra, as concentrações de precursor e de NaOH e os valores de pH das soluções de precursor antes e após adição de NaOH. O rendimento de síntese foi calculado pela equação (5) com o objetivo de determinar quais os parâmetros que maximizam a produção de nanopartículas magnéticas pelo processo solvotérmico considerado neste trabalho.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa de Ferro nas Nanopartículas}}{\text{Massa de Ferro no precursor}} \times 100 \quad (5)$$

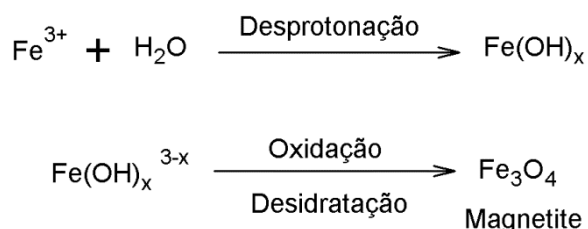
**Tabela 3:** Concentração de precursor, pH da solução de precursor e da solução final, e rendimento de síntese das nanopartículas

Amostra	Precursor	Precursor (mol/L)	NaOH (mol/L)	pH precursor	pH solução	Rendimento (%)
NP1	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.250	0.250	<1	9.8	96
NP200	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.250	0.250	<1	9.8	62
NP4	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.250	0.125	<1	2.5	96
NP1N	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	0.250	0.250	<1	10.7	89
NP1CN	K <sub>4</sub> Fe(NO) <sub>6</sub> .3H <sub>2</sub> O	0.250	0.250	7.7	11.1	94
NP1CN24h	K <sub>4</sub> Fe(NO) <sub>6</sub> .3H <sub>2</sub> O	0.250	0.250	7.7	11.1	94

Da Tabela 3 verifica-se que as amostras NP1, NP200, NP4 e NP1N resultaram de precursores (cloreto de ferro (III) e de nitrato de ferro (III)) cuja solução apresentava um pH extremamente ácido. No caso das amostras NP1CN e NP1CN24h, a solução de precursor (hexacianoferrato de potássio (II)) apresentava um pH básico. Com a adição de NaOH à solução de precursor, o pH da solução aumenta, sendo o valor do pH final dependente da razão molar NaOH/precursor. Para uma razão de 1, o pH da solução final é básico e próximo de 10-11. Quando a razão é de 0.5 (no caso da síntese de NP4), o pH da solução final manteve-se ácido, devido a uma menor concentração de NaOH

adicionado. O pH da solução tem influência no comportamento magnético das nanopartículas sintetizadas, sendo que a síntese em meio básico leva à formação de partículas com comportamento magnético, contrariamente ao observado na síntese em meio ácido. Relativamente ao rendimento de síntese, excetuando a amostra NP200, obteve-se sempre rendimentos próximos ou superiores a 90%, podendo-se atribuir às lavagens realizadas na centrifugadora alguma perda de material. A temperatura de um efeito direto sobre a síntese de NP isto porque quando se aumentou para 200°C, o rendimento diminuiu para razões molares iguais.

De mencionar que as várias amostras de nanopartículas sintetizadas revelaram visualmente um aspeto diferente. Nas amostras NP1 e NP200 o aspeto era negro, dando uma primeira indicação de se tratar de partículas magnéticas constituídas por magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). As restantes amostras obtiveram um aspeto diferente, castanho no caso das NP4, amarelo terroso nas NP1N, branco com tons de verde nas NP1CN e branco nas NP1CN24h. Estas tonalidades nas amostras NP4, NP1N e NP1CN evidenciam que a redução de  $\text{FeCl}_3$  a  $\text{FeCl}_2$  pelo etilenoglicol, fase crucial no mecanismo de formação de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , foi incompleta, obtendo-se óxidos de ferro sem comportamento magnético. Na Figura 19 pode-se observar o mecanismo para formar  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

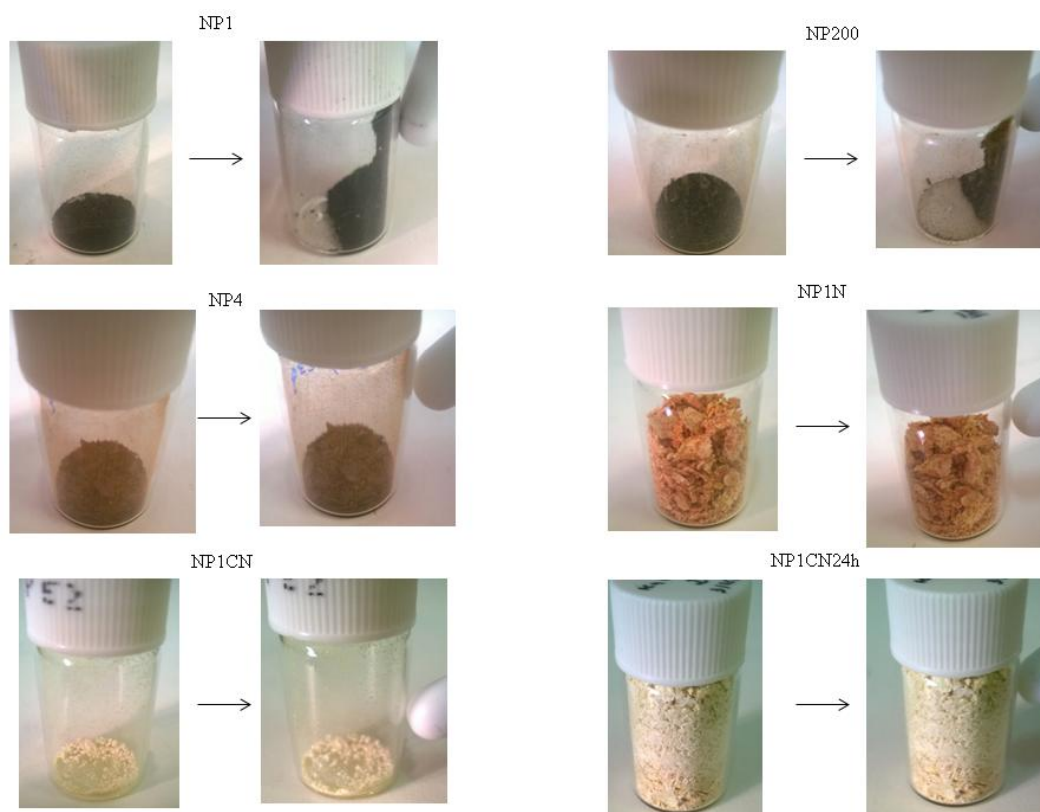


**Figura 19:** Mecanismo de formação de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , adaptada de [99].

Após a preparação das amostras, procedeu-se à sua caracterização de modo a determinar os tamanhos das partículas, morfologias e química superficial. Os resultados são apresentados e discutidos na secção 4.2.

## 4.2 Magnetismo das Nanopartículas

Visualiza-se na Figura 20, o comportamento magnético das nanopartículas com aproximação se um magnete. Verifica-se ainda o aspeto e cor das mesmas.



**Figura 20:** Aspecto e comportamento magnético das NP's sintetizadas

Pela Figura 20 observa-se claramente quais as NP's magnéticas e não magnéticas, sendo as NP1 e NP200 as únicas que se movem com a aproximação de um magnete. As restantes nanopartículas não se deslocam quando aplicado um campo magnético deve-se ao facto de possuir pouco Fe, como se irá verificar nas secções seguintes.

## 4.3 Caracterização das Nanopartículas

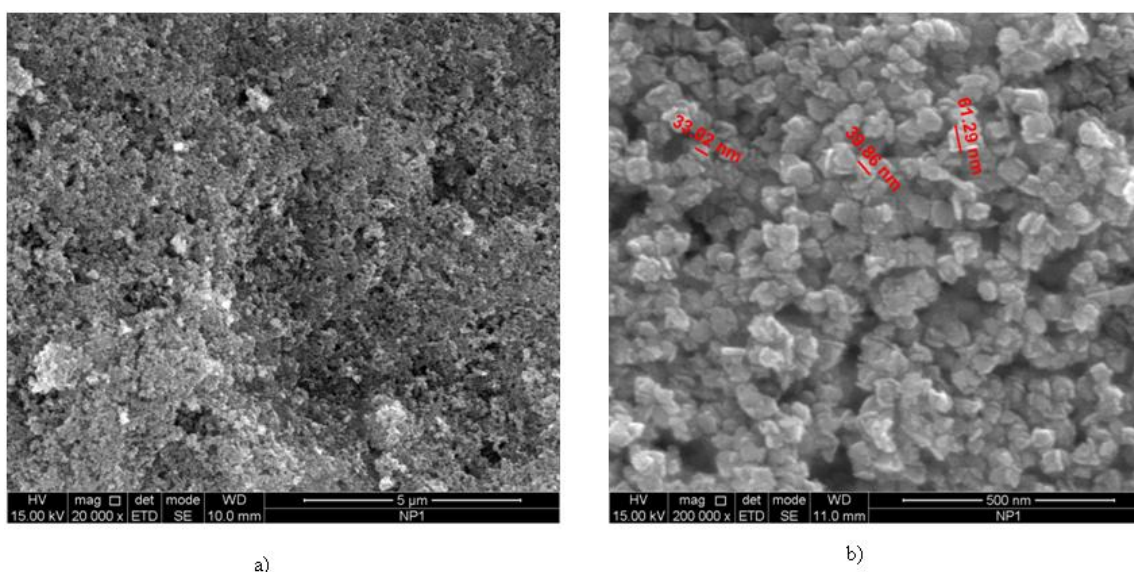
---

As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas relativamente à morfologia, arranjo tridimensional, tamanho e composição. Neste sentido usaram-se as seguintes técnicas de análise: Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM - *Scanning Electron Microscopy*), Microanálise por Raios-X (EDS – *Energy dispersive X-Ray Detection*), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS – *Dynamic Light Scanning*) e Espectroscopia Fotoeletrónica de Raios-X (XPS - *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*).

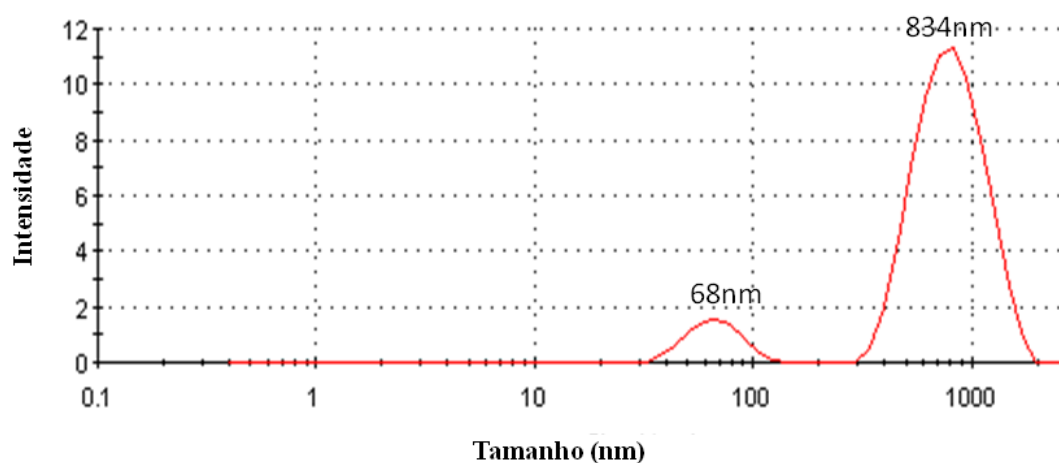
### 4.3.1 SEM e DLS

Na Figura 21 a) é possível observar as nanopartículas NP1 numa ampliação de 20 000 vezes. De acordo com esta figura é possível dizer que as nanopartículas formaram um filme poroso, o que indicia uma tendência para a agregação. Esta tendência é confirmada através da análise de DLS, pois previamente a esta análise as nanopartículas estiveram no ultrasons 5 minutos e posteriormente foram passadas por um filtro de 200 nm. Assim sendo, não seria de esperar obter nanopartículas acima do tamanho de *cutoff* dos filtros (200 nm). No entanto, e como se pode observar na Figura 22, a amostra NP1 apresenta duas populações discretas de nanopartículas, com uma média de tamanhos de  $68 \pm 18$  nm e  $834 \pm 288$  nm, confirmando assim a tendência das NP1 para agregação. De referir contudo que a obtenção de populações monodispersas de óxidos de ferro é pouco vulgar [100]. Quando se recorre a uma imagem de SEM com uma ampliação de 200 000 vezes, é possível observar nanopartículas com tamanhos entre os 33 e os 62 nm (Figura 21 b). Estes valores estão de acordo com os obtidos através de DLS, considerando que a população a 834 nm deverá resultar da agregação das partículas de menor tamanho.

Relativamente à morfologia, as nanopartículas NP1 apresentam-se como uma caixa retangular mas não necessariamente com as faces planas. Mais alongadas que o “equant” mas menos alongadas que a forma prismática.

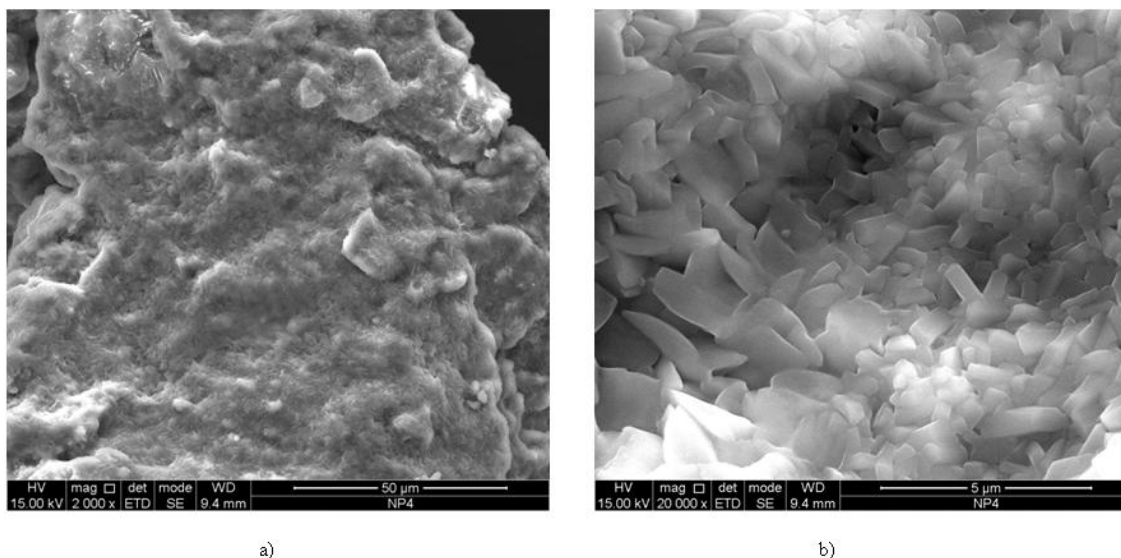


**Figura 21:** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento obtidas usando o modo de elétrons secundários (SE) das nanopartículas purificadas NP1 para a ampliação a) 20 000 vezes e b) 200 000 vezes.



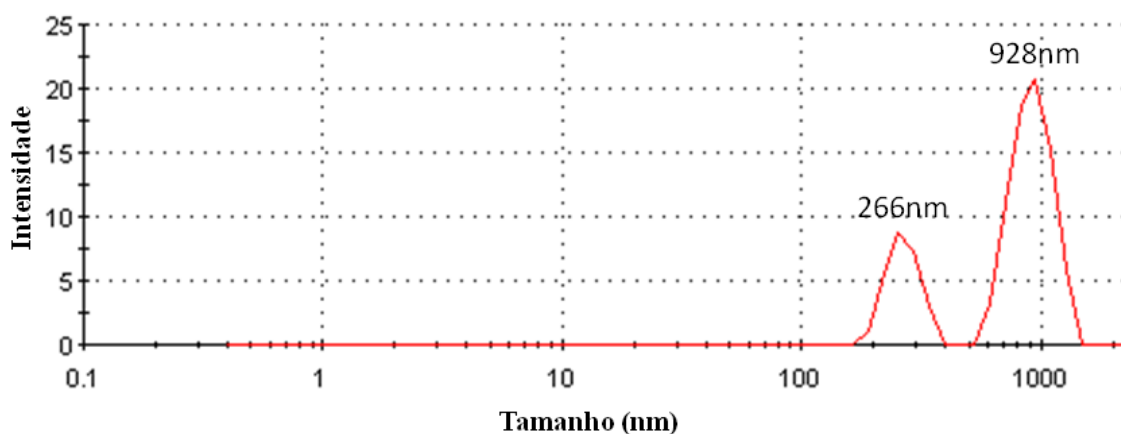
**Figura 22:** Dispersão de tamanhos das nanopartículas NP1 obtidas por DLS em três ensaios consecutivos.

De forma a avaliar o efeito da razão de NaOH/Fe, comparam-se as nanopartículas NP4 com as NP1 (sintetizadas usando o mesmo precursor,  $\text{FeCl}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , mas razões NaOH/Fe diferentes). Tal como se pode observar na Figura 23 as nanopartículas NP4 não são monodispersas, ao contrário do observado nas NP1.



**Figura 23:** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento obtidas usando o modo de elétrons secundários (SE) das nanopartículas purificadas NP4 para a ampliação a) 2 000 vezes e b) 20 000 vezes.

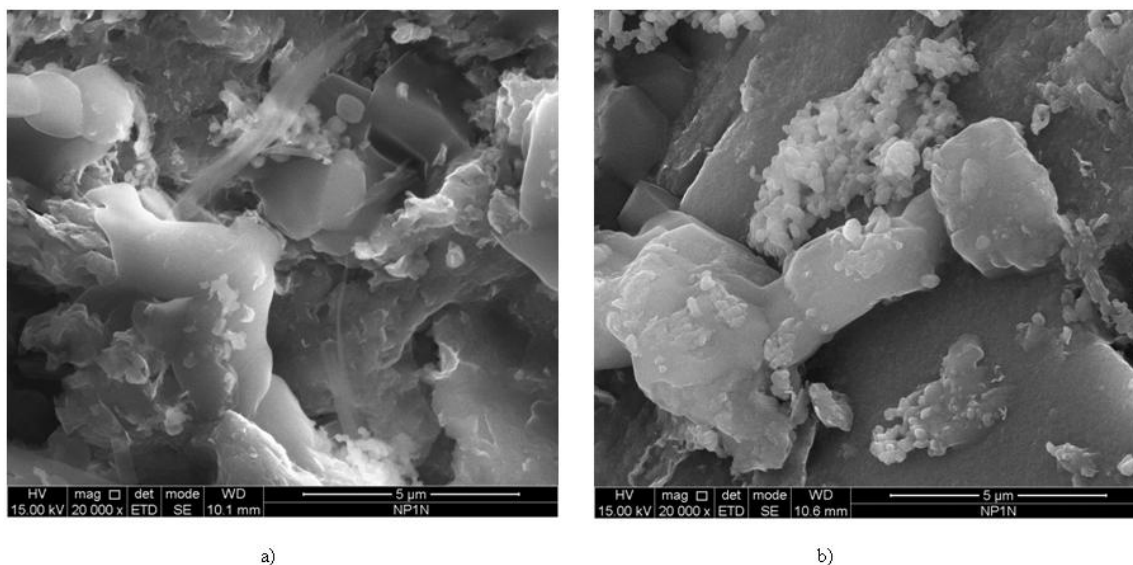
Similarmente ao verificado para as nanopartículas NP1, as NP4 apresentam duas populações discretas por DLS (Figura 24), com as seguintes médias:  $266 \pm 40$  nm e  $928 \pm 174$  nm. Verifica-se contudo que neste caso, as nanopartículas NP4 não só apresentam uma morfologia diferente, como são substancialmente maiores do que as NP1. De fato, ambas as populações obtidas no DLS são superiores a 200 nm, o que só poderá ser explicado por um fenómeno de agregação. Esta inferência é suportada pela análise da Figura 23 b) onde se podem observar nanopartículas de diferentes tamanhos. Independentemente da ocorrência de uma elevada dispersão de tamanhos nesta amostra, as características morfológicas parecem ser consistentes. De acordo com as imagens obtidas por microscopia electrónica, as NP4 apresentam-se como nanopartículas de forma alongada e finamente divididas, podendo ser caracterizadas como estruturas do tipo laminar. Dos resultados obtidos conclui-se que o aumento da razão NaOH/Fe na síntese de NP's favorece a produção de materiais monodispersos e com menor tamanho de partículas.



**Figura 24:** Dispersão de tamanhos das nanopartículas NP4 obtidas por DLS em três ensaios consecutivos.

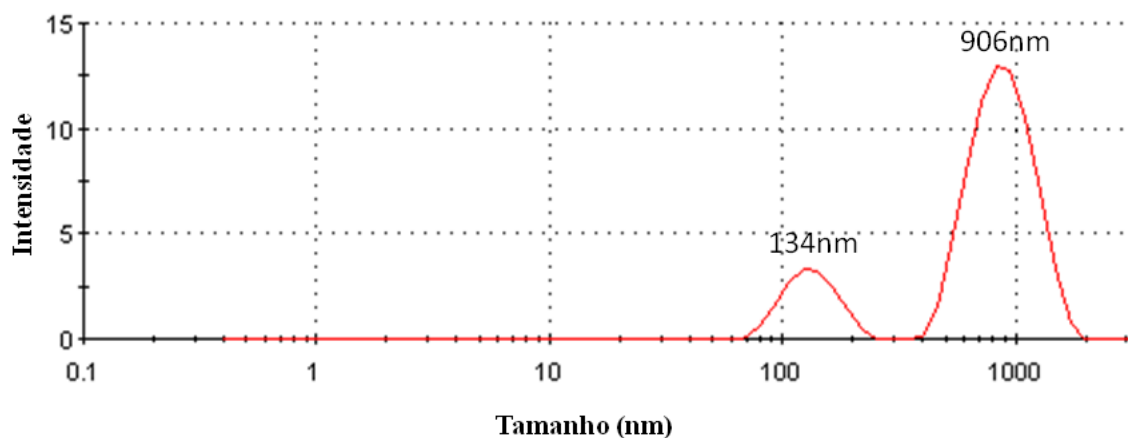
De modo a avaliar o efeito de diferentes precursores, compararam-se nanopartículas sintetizadas com a mesma razão molar NaOH/Fe das NP1 (razão = 1), variando o precursor:  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (NP1N) e  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (NP1CN).

Tal como se pode observar na Figura 25 e comparando com a Figura 21, as nanopartículas NP1N, verifica-se a mesma ausência de monodispersão das partículas, mas com a particularidade de que a mudança de precursor levou a uma perda da homogeneidade da morfologia. De facto, mesmo quando se recorreu a duas áreas distintas da grelha de SEM, a mistura de morfologias era uma constante.



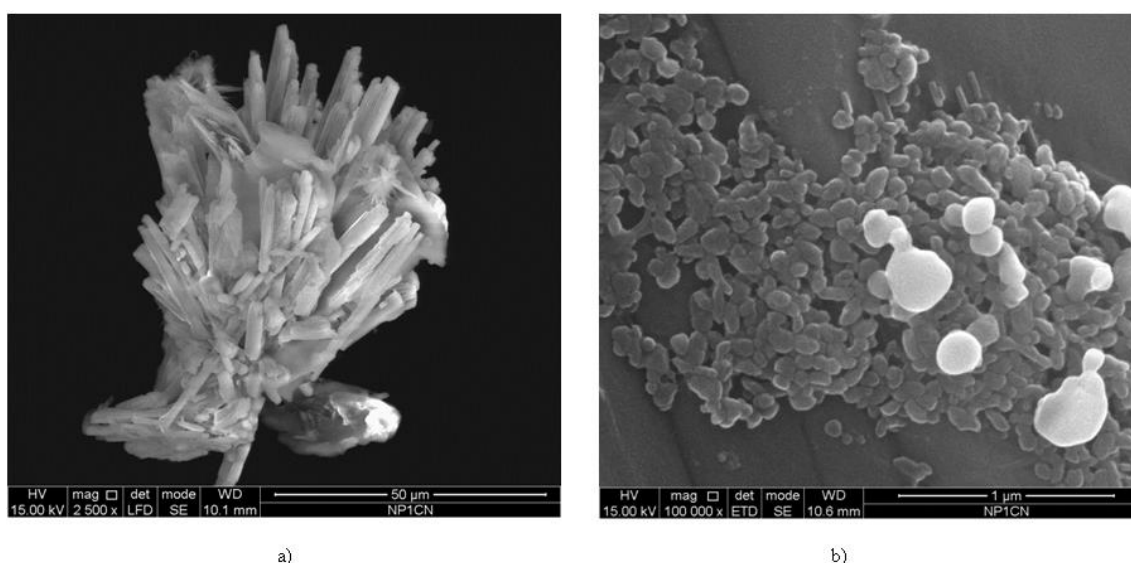
**Figura 25:** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento obtidas usando o modo de elétrons secundários (SE) das nanopartículas purificadas NP1N para a ampliação 20 000 vezes em duas áreas distintas da grelha de SEM.

No caso das NP1N, parece existir uma mistura da morfologia rectangular das NP1 e da morfologia laminar das NP4. Esta mistura de nanopartículas com diferentes morfologias e tamanhos é consistente com os dados obtidos por DLS (Figura 26), onde se verifica a presença de duas populações discretas, com uma média de tamanhos de  $134 \pm 16$  nm e  $906 \pm 72$  nm.



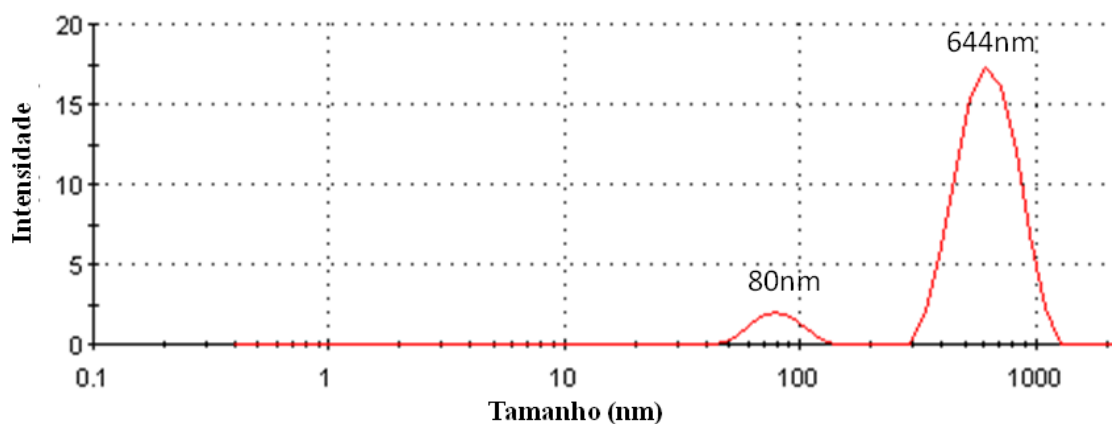
**Figura 26:** Dispersão de tamanhos das nanopartículas NP1N obtidas por DLS em três ensaios consecutivos.

No caso das NP1CN, a análise da Figura 27a permite verificar que estas nanopartículas se apresentam como estruturas cristalinas alongadas, que se aglomeram formando estruturas na ordem das dezenas de  $\mu\text{m}$ . Numa ampliação maior (escala de 100 000 vezes, Figura 27b), é possível observar a presença de nanopartículas quasi-esféricas com tamanhos substancialmente menores e que se depositam ao longo das estruturas mais alongadas. Deste modo é possível concluir que usando o precursor  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , e à semelhança do observado nas nanopartículas NP1N, não há homogeneidade de tamanhos nem de morfologias.



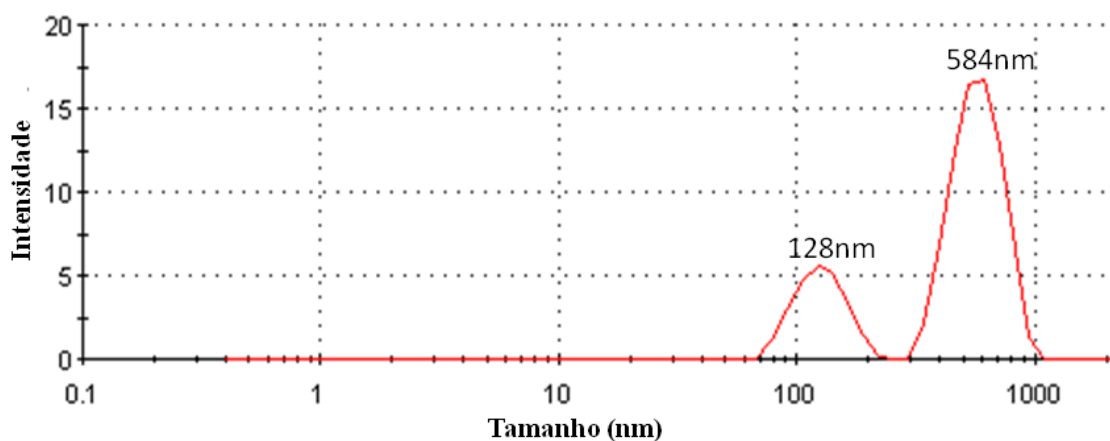
**Figura 27:** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento obtidas usando o modo de elétrons secundários (SE) das nanopartículas purificadas NP1CN para a ampliação a) 2 500 vezes e b) 100 000 vezes.

Tal como seria de esperar após a análise das imagens de SEM, a técnica de DLS confirma a dispersão de tamanhos de partículas (Figura 28). No entanto, nas NP1CN existe uma população discreta de partículas de tamanho inferior a 100 nm ( $80 \pm 9$  nm).



**Figura 28:** Dispersão de tamanhos das nanopartículas NP1CN obtidas por DLS em três ensaios consecutivos.

De forma a avaliar a influência do tempo de reacção no tamanho das nanopartículas, comparam-se os resultados de DLS obtidos com as nanopartículas NP1CN (tempo de síntese = 6 h) e NP1CN24h (tempo de síntese = 24 h). Tal como se pode observar na Figura 29, o tempo de reacção levou a um aumento do tamanho médio das nanopartículas mais pequenas. Efectivamente, as partículas aumentaram de  $80 \pm 9$  nm para  $128 \pm 5$  nm. Este efeito de aumento de tamanhos de nanopartículas por aumento do tempo de reacção está em concordância com os resultados obtidos por Gonçalves *et al.*, (2010) [101].



**Figura 29:** Dispersão de tamanhos das nanopartículas NP1CN com tempo de reacção de 24 h obtidas por DLS em três ensaios consecutivos.

Após a análise geral da morfologia e dispersão de tamanhos das várias amostras de nanopartículas sintetizadas, verifica-se que a morfologia varia não só de acordo com a razão molar NaOH/Fe, como também de acordo com os precursores de ferro usados na síntese. O efeito que a razão NaOH/Fe tem na morfologia das nanopartículas já foi previamente descrito por Liu *et al* (2010), sendo que os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com os expostos por estes autores. No entanto, não havia um conhecimento prévio do efeito que a variação do precursor de ferro iria proporcionar na morfologia das nanopartículas, sendo interessante verificar que quando se substitui o precursor  $\text{FeCl}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  por  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ou por  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , a morfologia obtida deixa de ser homogênea.

Relativamente à dispersão de tamanhos das nanopartículas obtidas, verificou-se uma tendência transversal para agregação em todas, sendo que quando se usam os precursores  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  se obtém mistura de morfologias acompanhada de um aumento do tamanho médio das partículas.

O número de estudos sobre métodos de síntese que proporcionem nanopartículas monodispersas é muito escasso [100], mas a procura por processos de síntese hidrotérmicos que proporcionem a obtenção de partículas monodispersas de tamanhos inferiores a 100 nm é uma área de investigação de elevado interesse. Uma das linhas de investigação que tem vindo a ser explorada recorre a surfactantes como o polietileno glicol (PEG) [102], dodecilamina (DDA) [27], dietileno glicol (DEG) [103], poli(vinilpirrolidona) (PVP) [104], ácido oleico [68] e a etilenodiamina (EDA) [105], de forma a controlar não só o tamanho, como também a forma das nanopartículas sintetizadas. No entanto, é frequente a funcionalização não intencional das nanopartículas com resíduos destes polímeros, o que altera as suas propriedades intrínsecas. No caso particular da magnetite, por exemplo, é frequente que o uso destes surfactantes leve a perda de magnetismo [106].

De forma a evitar os problemas associados ao uso de surfactantes, neste estudo recorreu-se a um método hidrotérmico sem surfactantes. No entanto, e tal como Liu *et al* (2010) [100] reporta só foi possível partículas de morfologia homogênea usando o precursor  $\text{FeCl}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ . Adicionalmente, verificou-se uma maior tendência para a obtenção de partículas de tamanhos similares com este precursor.

Após a análise dos efeitos que os parâmetros de síntese tiveram na morfologia e no tamanho das nanopartículas irá proceder-se à análise da composição química. Para tal usaram-se duas técnicas comuns na caracterização química de nanopartículas: EDS e XPS.

### 4.3.2 EDS

Para as partículas NP1, o espectro de EDS representado na Figura 30 indica a presença de oxigénio, ferro, sódio e carbono. Efetivamente, embora as amostras tenham sofrido vários ciclos de lavagens com água e etanol e posterior purificação em manga de diálise de forma a eliminar os reagentes de partida, a presença de sódio é um indicador de uma contaminação com hidróxido de sódio. Adicionalmente verifica-se uma percentagem relativamente grande de carbono, que só poderá ser explicado como um contaminante do etilenoglicol. Este tipo de contaminação poderá ser responsável por uma perda de magnetismo. Adicionalmente é possível observar a presença de alumínio proveniente do suporte onde o filme de nanopartículas foi depositado para esta análise. A presença deste elemento é indicadora de que a zona onde foi efetuada a análise de EDS não se encontrava homoganeamente coberta de nanopartículas.

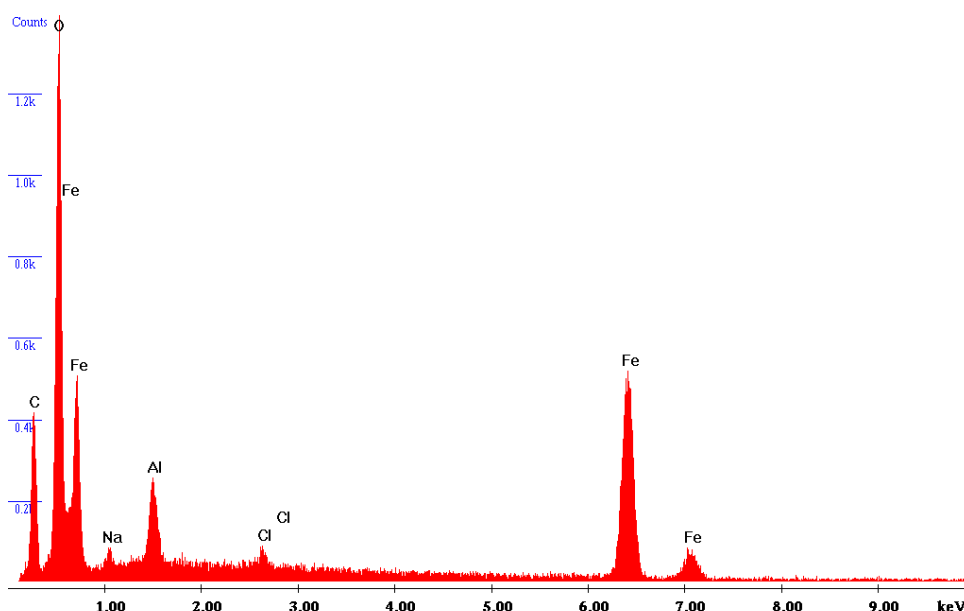
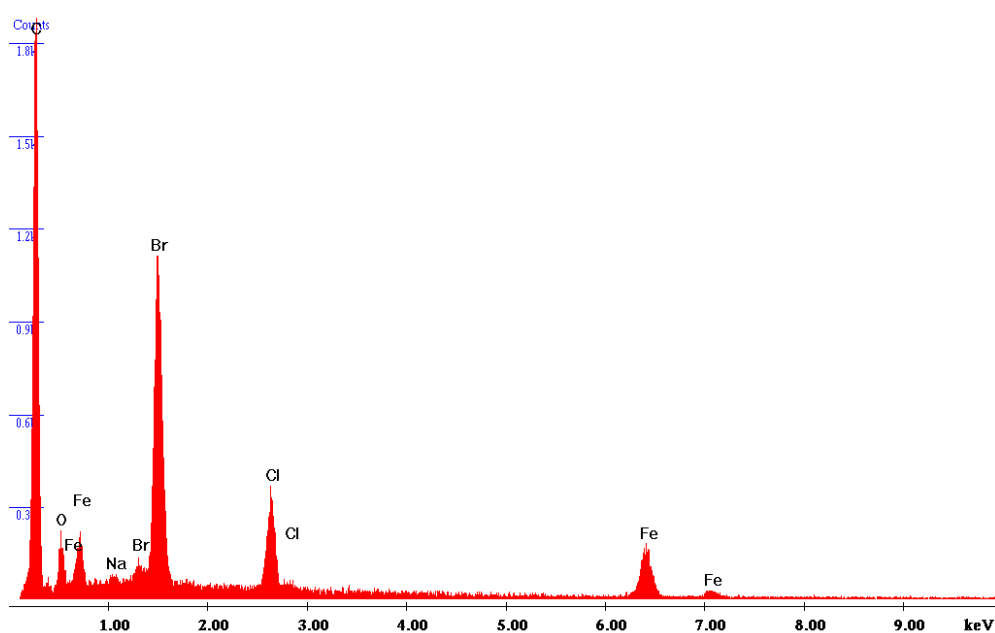


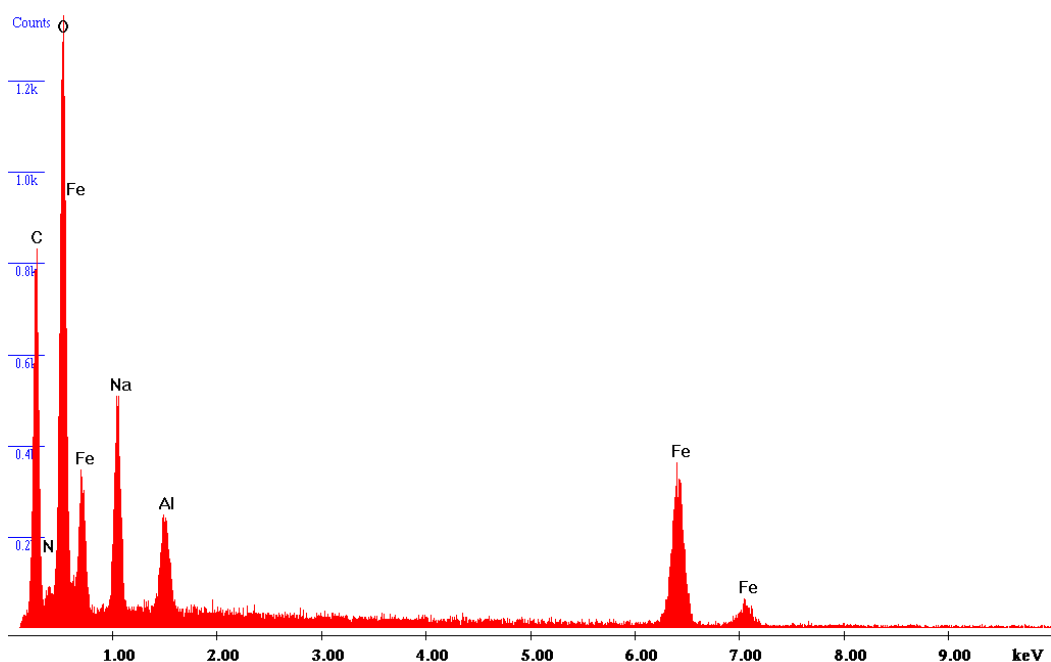
Figura 30: Espectro de EDS das nanopartículas NP1.

O espectro de EDS das NP4, mostrado na Figura 31, é de certo modo similar ao observado para as NP1. Neste espectro é igualmente possível encontrar uma contaminação de hidróxido de sódio proveniente do reagente de partida. Adicionalmente também se observou a presença de bromo que poderá estar provir do cloreto de ferro (III) usado, onde este elemento existe numa percentagem não desprezável.



**Figura 31:** Espectro de EDS das nanopartículas NP4.

Relativamente ao espectro de EDS das nanopartículas NP1N, que se encontra na Figura 32, é possível observar que, à semelhança do observado nas amostras anteriores, existe uma contaminação da amostra com elementos químicos provenientes da síntese, nomeadamente o sódio e o azoto. Adicionalmente verifica-se que a zona exposta à análise de EDS não se encontrava totalmente coberta com o filme de nanopartículas, tal como se havia verificado para as NP1.



**Figura 32:** Espectro de EDS das nanopartículas NP1N.

Por último analisou-se o espectro de EDS das nanopartículas NP1CN, Figura 33. Nesta amostra é possível observar, à semelhança do observado nas restantes amostras, uma contaminação com elementos químicos dos reagentes, nomeadamente de azoto, bromo, carbono, sódio e potássio.

De facto, e muito embora se tenha tido múltiplos cuidados na purificação das amostras, a presença de elementos provenientes dos reagentes nas análises de EDS indica que os processos de purificação escolhidos não foram 100% eficazes, pelo que em trabalhos futuros seria interessante explorar novas vias de purificação.

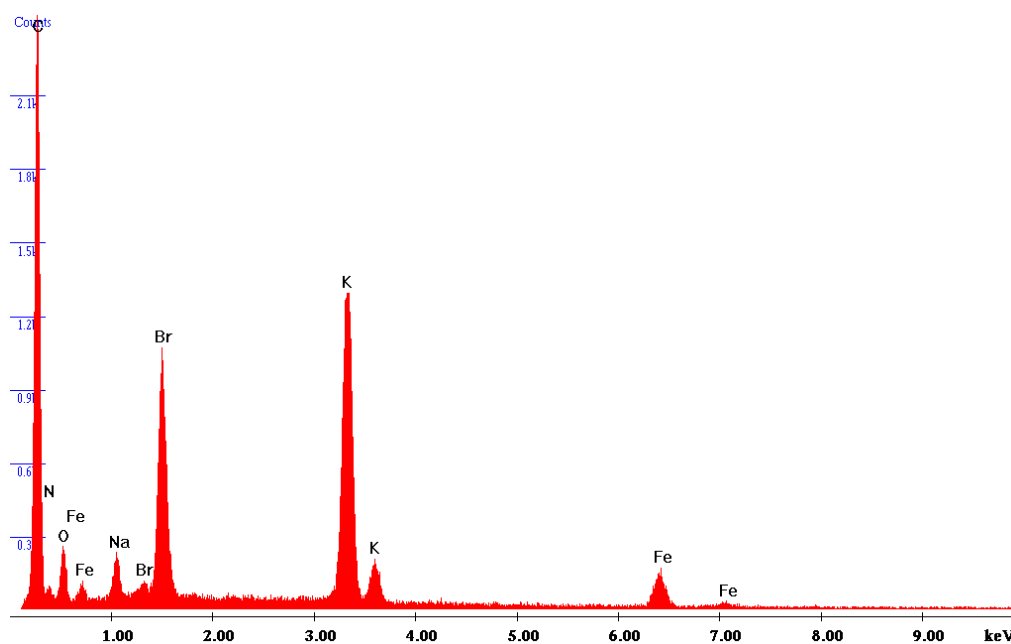


Figura 33: Espectro de EDS das nanopartículas NP1CN.

### 4.3.3 XPS

Após a identificação dos elementos químicos presentes nas diferentes amostras, tornou-se necessário determinar as suas percentagens e energias de ligação (BE – *Binding Energy*). Esta análise foi realizada apenas com as nanopartículas NP1, NP1CN e NP4, por não haver amostra suficiente para realizar as análises das restantes.

Com esta análise pretende-se concluir sobre possíveis correlações entre a composição química das nanopartículas formadas e a razão NaOH/Fe e o uso de diferentes precursores. Na Tabela 4 é possível observar as percentagens atómicas e as energias de ligação obtidas a partir da deconvolução dos dados de XPS para as diferentes nanopartículas.

## Resultados e Discussão

**Tabela 4:** Resumo das percentagens atômicas e energias de ligação (BE) para os elementos químicos C, Fe, N, Na e O, das nanopartículas NP1, NP1CN e NP4.

Elemento	NP1		NP1CN		NP4	
	% Atômica	B.E	% Atômica	B.E	% Atômica	B.E
C <sub>1s</sub>	25,1	285,0 (1,9)	51,9	285,0 (1,4)	21,4	285,0 (2,8)
Fe <sub>2p</sub>	12,9	726,0 (14,4)	1,7	711,0 (1,3)	14,3	715,3 (3,2)
N <sub>1s</sub>	0,93	403,1 (2,4)	21,6	395,2 (1,3)	0,79	395,8 (2,5)
Na <sub>1s</sub>	14,7	1070,0 (1,7)	12,6	1071,0 (1,5)	1,4	1069,9 (2,2)
O <sub>1s</sub>	46,4	531,5 (3,2)	12,2	529,2 (2,3)	62,1	529,2 (3,1)

Através da análise da Tabela 4 é possível verificar que o elemento químico que se encontra em maior percentagem nas NP1 é o oxigénio, com 46,4%, seguido do carbono com 25,1%, do sódio com 14,7%, o ferro com 12,9% e o azoto que se encontra numa percentagem vestigial de 0,9%. Efetivamente, a análise de EDS já havia indicado a presença de contaminantes provenientes dos reagentes de síntese, nomeadamente carbono do etilenoglicol e sódio do hidróxido de sódio. De facto, estes elementos representam uma percentagem conjunta de 39,8%, ou seja, cerca de 40% da superfície da amostra encontrava-se contaminada com estes elementos.

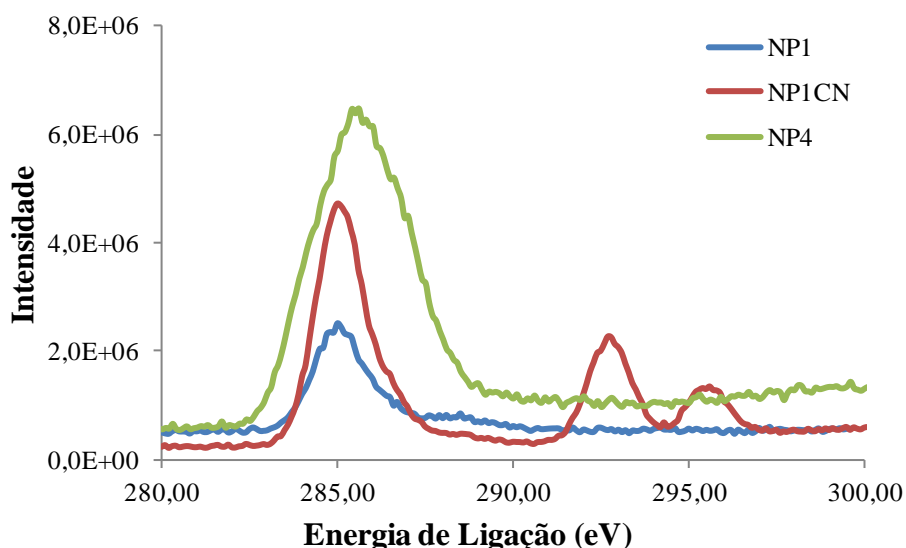
Por outro lado, as nanopartículas NP1CN apresentam uma percentagem atômica superior a 50% para o elemento carbono (51,9%). Este aumento de composição de carbono na superfície da amostra deverá estar relacionado não só com o carbono proveniente do etilenoglicol, como também com o carbono do grupo cianeto do precursor de ferro usado para a síntese destas nanopartículas ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ). Esta inferência será também a justificação para o aumento da percentagem de azoto, passando de vestigial nas NP1 para 21,6% nas NP1CN. Concomitantemente com este aumento de percentagens de elementos ocorre uma diminuição da percentagem de oxigénio e de ferro, indicando assim que a superfície da amostra estava bastante contaminada, quase não sendo possível obter uma boa definição do espectro de ferro.

Por último, as nanopartículas NP4 apresentam uma elevada percentagem de oxigénio (62,1%), seguida de carbono (21,4%), ferro (14,3%), sódio (1,4%) e azoto com uma percentagem vestigial de 0,79%. Será de ressaltar a diminuição da percentagem de sódio comparativamente com as nanopartículas anteriormente descritas. De acordo com

este resultado será possível afirmar que neste caso o método de purificação das nanopartículas terá sido mais eficiente do que o utilizado nas restantes sínteses, apesar de ter sido o mesmo método.

Quando se enquadra estes resultados das percentagens atómicas com os espectros de XPS obtidos para os elementos químicos mais relevantes, nomeadamente o carbono, o ferro e o oxigénio é possível inferir acerca dos grupos funcionais das impurezas que se encontram depositadas na superfície das nanopartículas analisadas.

Na Figura 34 é possível observar que o pico  $C_{1s}$  é muito similar para as nanopartículas NP1 e NP4, cujo precursor é o  $FeCl_3 \cdot 9H_2O$ . Por outro lado, quando o precursor das nanopartículas é o  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ , verifica-se não só a presença de um pico máximo a 284,96 eV, como dois outros picos adicionais e bem resolvidos para valores de energia mais elevados. Tendo em atenção as zonas em que estes picos surgem, é consistente atribuí-los ligações  $C \equiv N$  e  $C=O$ , respectivamente [107]. Por outro lado, o pico a 286 eV nas amostras NP1 e NP4, é coerente com a presença de ligações C-OH nas impurezas depositadas na superfície das nanopartículas.



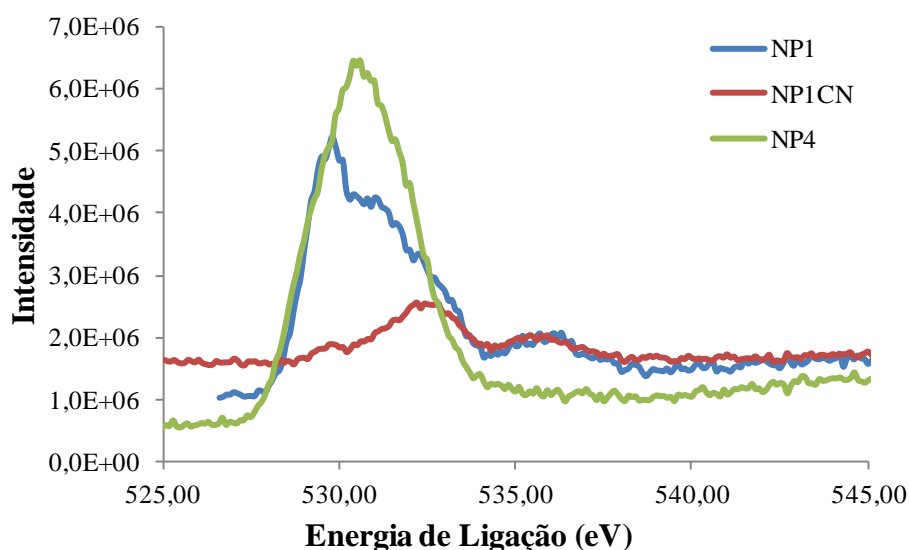
**Figura 34:** Espectro de XPS para o pico  $C_{1s}$  das nanopartículas NP1, NP1CN e NP4.

Por outro lado, a análise do pico  $O_{1s}$  presente na Figura 35 é substancialmente diferente para todas as amostras. As NP1 apresentam um pico mais intenso e com uma elevada

largura a meia altura (FWHM) a 530 eV e outro menos intenso a 533 eV. O primeiro pico é consistente com a presença de óxidos metálicos, nomeadamente com  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e o segundo pico com grupos hidroxilo. Tendo em atenção que estas nanopartículas apresentam um magnetismo intrínseco, será de prever que este pico se deva à presença da magnetite. Assim sendo é possível afirmar que na amostra analisada, a maior percentagem de oxigénio detetada se encontra sob a forma de magnetite e uma percentagem menos significativa na forma de hidróxidos.

Relativamente às NP4 é interessante verificar que o pico a 530 eV é melhor resolvido do que no caso das NP1. O pico a este valor de energia de ligação, à semelhança do que foi descrito para as NP1, está associado à presença de óxidos metálicos. No entanto, estas nanopartículas não apresentam características magnéticas, pelo que a existir magnetite, esta seria em quantidades muito vestigiais. Por outro lado a presença de  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  é bastante mais provável.

Por último, as NP1CN apresentam dois picos pouco intensos, o que é consistente com as baixas percentagens de oxigénio previamente apresentadas para estas nanopartículas. O primeiro pico surge aos 532 eV e o segundo a 534 eV. De acordo com [107] o primeiro pico corresponde à presença de nitratos (formam-se durante o processo de síntese das NP's) e o segundo a grupos hidroxilo. Tendo em atenção as percentagens atómicas previamente apresentadas, onde se verifica uma elevada percentagem de azoto para esta amostra, é possível que uma percentagem de azoto se encontre sob a forma de  $\text{C}\equiv\text{N}$  e outra na forma de N-O.

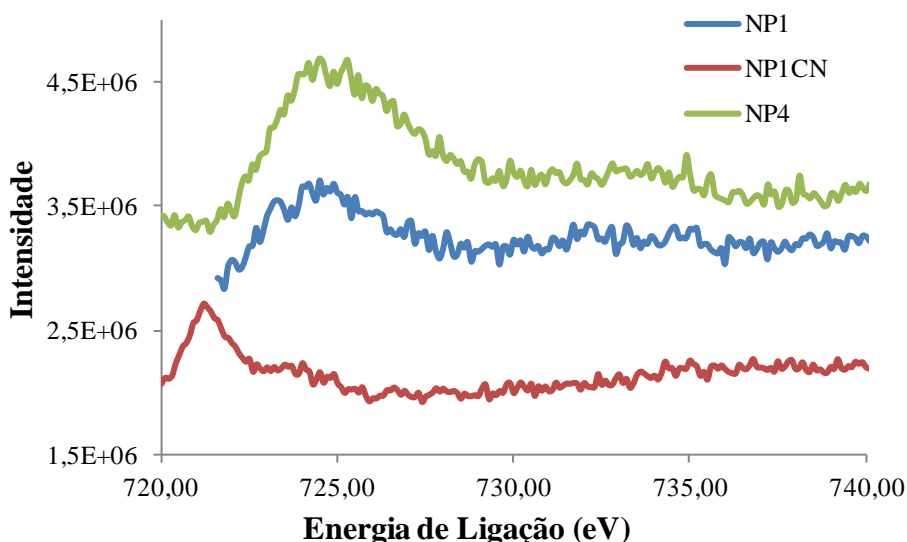


**Figura 35:** Espectro de XPS para o pico  $O_{1s}$  das nanopartículas NP1, NP1CN e NP4.

A análise dos espectros de XPS para o pico do  $Fe_{2p}$ , permite identificar o spin que a amostra apresenta. De facto, de acordo com a Teoria de Campo Cristalino, os compostos de ferro podem ser descritos como tendo um spin alto ou spin baixo. Os compostos de Ferro (III) têm sempre um spin alto, o que se reflete com o aparecimento de um multiplete dividido. Por outro lado, os compostos de Ferro (II) podem ter um spin alto ou baixo dependendo das ligações que estabelecem. Estes compostos podem ser discriminados através da presença ou ausência de satélites no espectro de XPS, respetivamente [108].

Na Figura 36 é possível observar o pico de  $Fe_{2p}$  para as nanopartículas sintetizadas. Numa primeira análise é possível verificar que os picos são pouco intensos para todas as nanopartículas, o que será consistente com a baixa percentagem de ferro existente nas amostras. Por outro lado, quando se compara os espectros obtidos para as nanopartículas NP1 e NP4, verifica-se que somente nas NP, o pico mais intenso apresenta um *sholder* que pode ser identificado como  $Fe(II)Fe_{2p1/2}$ . Adicionalmente, é possível identificar satélites a aproximadamente 735 eV que são consistentes com o  $Fe(III)Fe_{2p1/2}$ , em ambas as amostras. Assim sendo, verifica-se que os óxidos de ferro das nanopartículas NP1 e NP4 apresentam diferentes estados de oxidação, sendo que no caso das NP1 surgem os estados (+2) e (+3). Relativamente à amostra NP1CN observa-se um desvio do pico máximo para menores energias o que é consistente com um estado

de oxidação +2. Deste modo, verifica-se que o processo de síntese não levou à oxidação do ferro. Adicionalmente, é possível observar um satélite com uma elevada FWHM que corresponde a  $\text{Fe(II)Fe}_{2p_{1/2}}$  do composto  $\text{FeO}$ . Assim sendo, é possível afirmar o que ferro nas nanopartículas NP1CN se encontra num spin alto.



**Figura 36:** Espectro de XPS para o pico  $\text{Fe}_{2p}$  das nanopartículas NP1, NP1CN e NP4.

## 4.4 Citotoxicidade das NP's

As nanopartículas têm vindo a ser aplicadas em áreas tão diversas como a eletrónica e a biomedicina [101]. De facto, à medida que o número de aplicações foi crescendo, a preocupação sobre o efeito citotóxico que estas partículas podem ter na fauna e flora tem vindo a ser explorado. Atualmente existem inúmeros ensaios de toxicidade que variam na complexidade dos sistemas biológicos usados. Neste estudo pretendeu-se avaliar o efeito que o tamanho das partículas, forma, grupos de superfície e a estrutura têm na citotoxicidade, um parâmetro importante na avaliação da adequabilidade dos materiais sintetizados para posterior aplicação em hipertermia. Para a determinação da citotoxicidade das nanopartículas sintetizadas recorreu-se a dois testes, nomeadamente

---

citotoxicidade sobre hemácias de diferentes espécies animais e citotoxicidade no desenvolvimento de culturas de *Escherichia coli*.

#### 4.4.1 Citotoxicidade sobre Hemácias

Este é um ensaio de toxicidade simples e de prática aplicação. As hemácias são glóbulos anucleados, que contêm a hemoglobina. Por sua vez a hemoglobina tem na sua constituição uma parte não proteica que se designa de grupo heme, sendo este um complexo de ferro responsável pela captação do oxigénio para transporte intracelular. A vantagem de usar as hemácias para testes citotóxicos é a possibilidade de avaliar o efeito que as nanopartículas têm na membrana celular. De facto, as membranas das hemácias são consideradas como modelos primários para o estudo da membrana plasmática celular animal [109]. De uma forma geral é possível dizer que as membranas das hemácias funcionam como barreiras seletivas que asseguram a composição interna das células. Deste modo, verifica-se que as membranas são um sistema estrutural complexo, que envolve a célula e é responsável pela sua mobilidade, deformação e transporte de macromoléculas. Efetivamente, não se pode considerar que a hemácia seja um simples recipiente que contém hemoglobina, na realidade os lípidos e proteínas que constituem a sua membrana estão dispostos de forma bastante complexa e organizada.

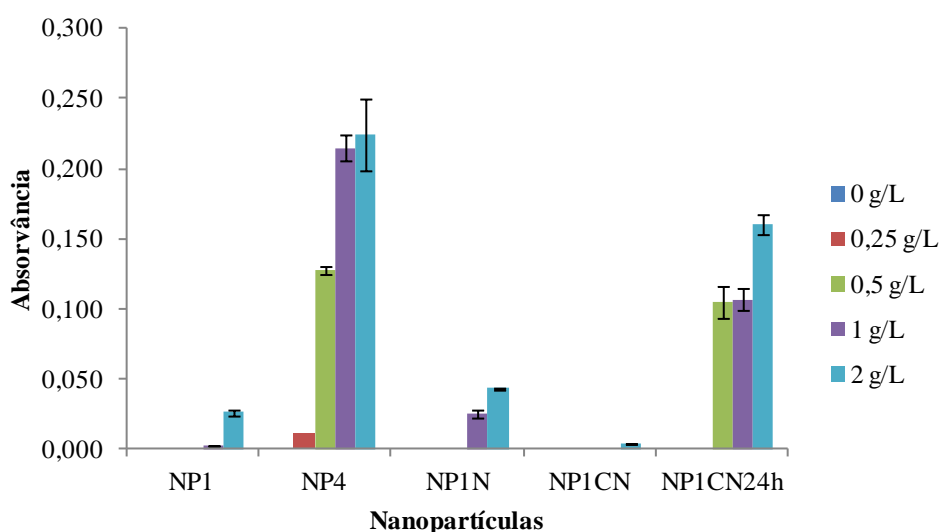
Neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito das nanopartículas sintetizadas na membrana das hemácias de diferentes espécies animais, nomeadamente, bovino, caprino, ovino e humano. Este ensaio baseou-se na determinação da hemoglobina libertada para o meio após 24 horas de incubação e posterior centrifugação. O efeito citotóxico das nanopartículas sobre as hemácias foi avaliado a partir da quantidade de hemoglobina libertada na amostra a diferentes concentrações de NP's (0,25, 0,5, 1 e 2 g/L). Deste modo, considerou-se que quando ocorre libertação de hemoglobina esta está associada à lise celular.

A libertação de hemoglobina foi avaliada usando espectrofotometria de UV-VIS a 540 nm, que permite avaliar a quantidade de ferro livre em solução após o período de incubação.

Na Figura 37 apresenta-se os resultados da avaliação do efeito citotóxico das diferentes nanopartículas na hemoglobina de bovino. Observa-se que as nanopartículas NP4

## Resultados e Discussão

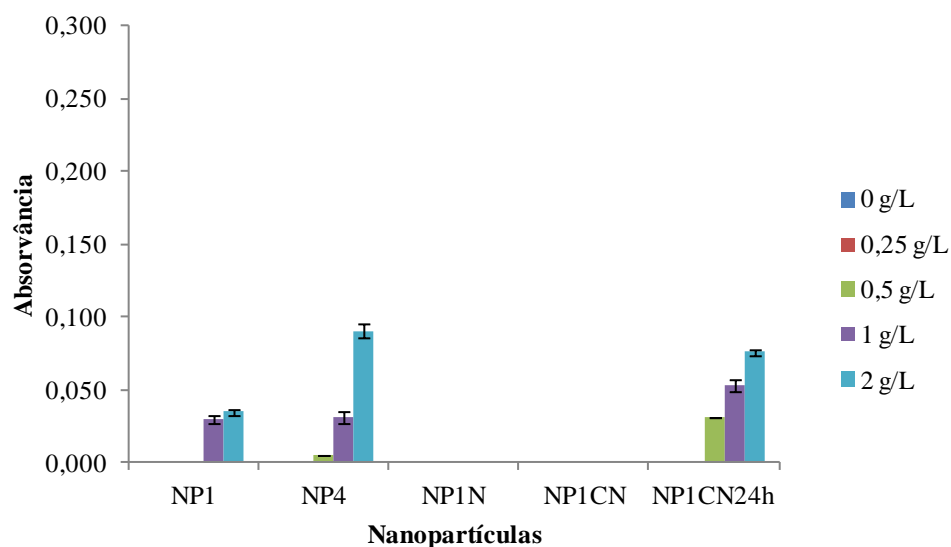
apresentam uma absorvância acima de 0 para a gama de concentrações usada (0-2 g/L), aumentando o valor de absorvância à medida que a concentração de nanopartículas aumenta. Uma tendência similar pode ser descrita para as nanopartículas NP1CN, muito embora os valores de absorvância sejam menores do que os observados para as NP4. Relativamente às restantes nanopartículas, verifica-se que somente quando a concentração destas é de 2 g/L é que existe absorvância superior a 0. Por outro lado, é ainda interessante verificar que muito embora a constituição das nanopartículas NP1CN e NP1CN24h seja a mesma, os resultados citotóxicos são marcadamente distintos, onde se destaca a ausência de toxicidade das NP1 abaixo de 1 g/L.



**Figura 37:** Representação gráfica do valor médio da absorvância da solução sobrenadante das NP's incubadas com hemácias de bovino com hematócrito de 5%, para três ensaios independentes.

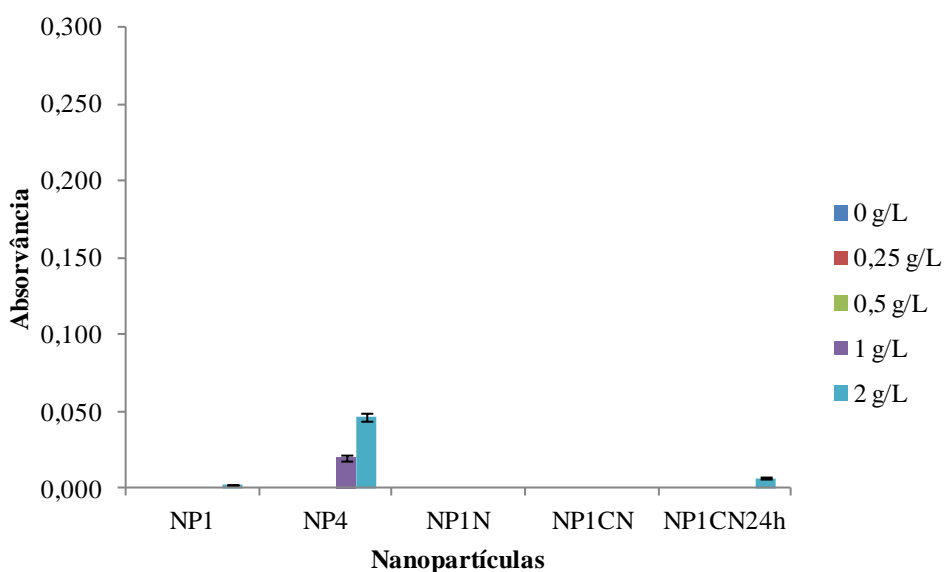
Quando mudamos de espécie e analisamos os resultados obtidos para a hemoglobina caprina, verifica-se a mesma tendência de citotoxicidade das NP4 e NP1CN24h, muito embora seja de ressaltar o facto da absorvância para a hemoglobina bovina ser 43% superior à absorvância da hemoglobina caprina (Figura 38). Por outro lado, as nanopartículas NP1N, que na hemoglobina bovina haviam dado resultado positivo para a citotoxicidade nas concentrações 1 e 2 g/L, não apresentam valores de absorvância estatisticamente significativos para nenhuma das concentrações usadas neste estudo. Ainda relativamente às diferenças de comportamento das nanopartículas sobre a hemoglobina das espécies bovinas e caprinas é de notar um aumento relativo da toxicidade das NP1 na concentração de 1 g/L. Uma característica comum a todas as

nanopartículas no sangue caprino é que nenhuma apresentou toxicidade para valores inferiores a 0,25 g/L.



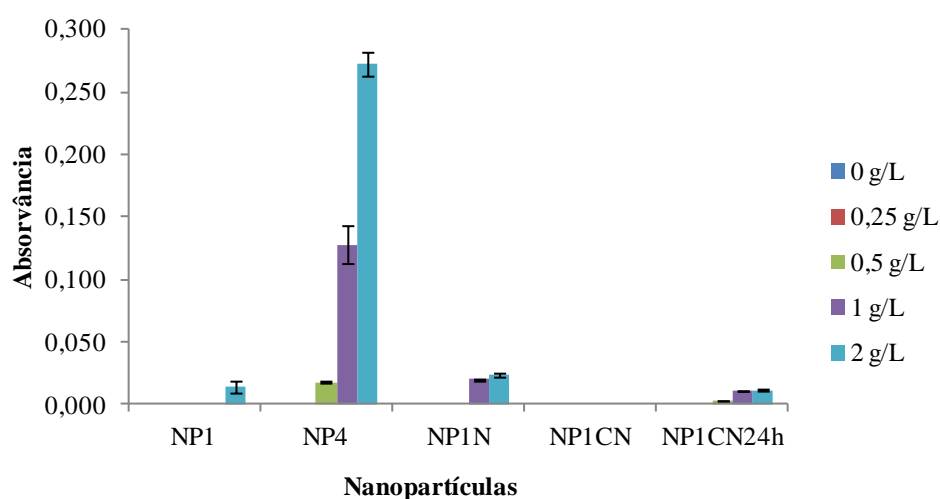
**Figura 38:** Representação gráfica do valor médio da absorvância da solução sobrenadante das NP's incubadas com hemácias de caprino com hematócrito de 5%, para três ensaios independentes.

Os resultados obtidos para a hemoglobina ovina são peculiares, quando comparados com os restantes (Figura 39). Neste caso somente as nanopartículas NP4 e NP1CN24h apresentaram valores de absorvância substanciais. No entanto, comparando os valores de absorvância para a hemoglobina bovina e caprina com os obtidos para a ovina usando as NP4 na concentração de 2 g/L, há uma diminuição de 78% e 50%, respectivamente. Adicionalmente, e ao contrário do que se havia verificado até aqui, nenhuma das nanopartículas usadas apresenta toxicidade para valores inferiores a 1 g/L.



**Figura 39:** Representação gráfica do valor médio da absorvância da solução sobrenadante das NP's incubadas com hemácias de ovino com hematócrito de 5%, para três ensaios independentes.

Por último analisou-se a citotoxicidade das nanopartículas sintetizadas na hemoglobina humana. Tal como se pode observar na Figura 40, o efeito das nanopartículas na hemoglobina humana é muito similar ao observado para bovino. Uma das principais diferenças entre os resultados para estas duas espécies é a diferença de valores de absorvância para concentrações de nanopartículas inferiores a 2 g/L. De tal como que no caso da hemoglobina humana, não se verificam valores de absorvância significativos para concentrações inferiores a 0,5 g/L, sendo que somente as NP4 apresentam toxicidade a este nível.



**Figura 40:** Representação gráfica do valor médio da absorvância da solução sobrenadante das NP's incubadas com hemácias de humano com hematócrito de 5%, para três ensaios independentes.

Em suma, os resultados obtidos relativamente à toxicidade das nanopartículas de óxido de ferro na hemoglobina de diferentes espécies animais permitem concluir que as nanopartículas NP4 são as que apresentam uma maior toxicidade. Estas nanopartículas foram sintetizadas a partir do mesmo precursor que as NP1, no entanto o efeito citotóxico destas duas nanopartículas não é de todo similar, o que sugere que estas diferenças não se prendem com o precursor de ferro usado na síntese das nanopartículas, nem com as impurezas na sua superfície. Uma das principais diferenças encontradas na caracterização destes dois óxidos de ferro é a sua morfologia. De facto, enquanto as NP1 se apresentam sob a forma de pequenos retângulos, as NP4 têm uma estrutura do tipo laminar, que poderão atuar de uma forma mais destrutiva sobre as membranas das células.

Por outro lado, as nanopartículas NP1CN24h apresentam uma toxicidade variável de espécie para espécie, no entanto, as nanopartículas NP1CN que são em tudo similares, com a exceção do tamanho, não apresentam a mesma citotoxicidade. Efetivamente, e tal como havia sido observado na caracterização das amostras, estes dois tipos de nanopartículas apresentam um tamanho médio diferente, sendo que quanto maior for o tempo de reação maiores são as nanopartículas. Assim sendo, uma hipótese para a diferença de citotoxicidade entre estas nanopartículas poderá estar relacionada com o efeito do tamanho, ou seja, quanto maiores as nanopartículas, maior a citotoxicidade. Este resultado é interessante, na medida em que uma das teorias mais discutidas no caso

da toxicidade das nanopartículas é precisamente a questão do tamanho. Existem alguns autores que afirmam que a toxicidade das nanopartículas é diretamente proporcional à diminuição do seu tamanho [110], na medida em que quanto menor for o tamanho maior é a probabilidade das nanopartículas passarem através das membranas por mecanismos de transporte simples.

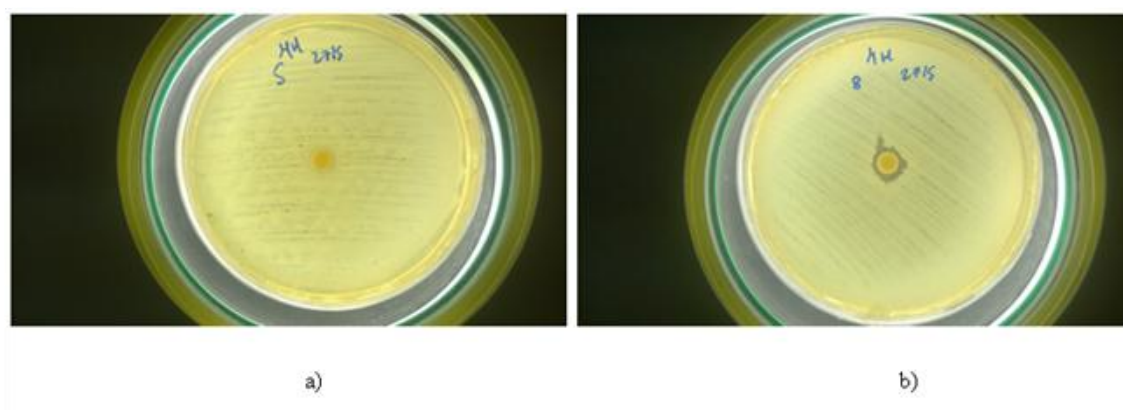
Por último, e tendo em atenção as potenciais aplicações biológicas das nanopartículas NP1, é interessante verificar que só se verifica toxicidade para valores iguais ou superiores 1 g/L na hemoglobina caprina. Para as restantes amostras sanguíneas não se verificaram valores de toxicidade relevantes para concentrações inferiores a 2 g/L. Deste modo, é possível concluir que as nanopartículas NP1, além de magnéticas, são inócuas para a membrana fosfolipídica das células, características essenciais para a sua aplicação em hipertermia.

### **4.4.2 Citotoxicidade sobre *Escherichia coli***

Após a análise dos dados obtidos para a citotoxicidade das nanopartículas sintetizadas, procedeu-se a um exame da possível toxicidade das nanopartículas sobre o crescimento da bactéria *Escherichia coli* (*E. Coli*).

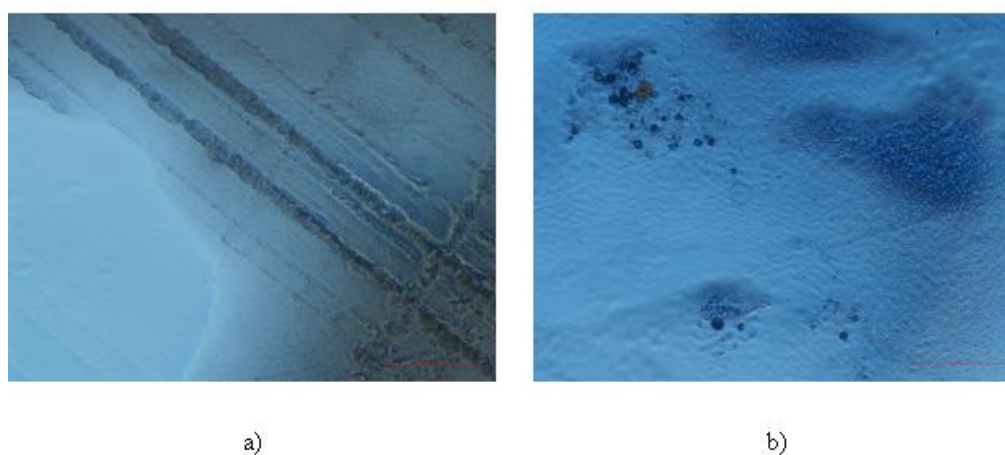
As bactérias têm uma parede celular que protege e dá forma. A membrana celular é muito similar às células eucarióticas, sendo constituída por uma bicamada fosfolipídica. No entanto, para poder atravessar a membrana e induzir algum tipo de toxicidade é necessário conseguir passar através da parede celular.

À semelhança do teste de eficácia de antibióticos sobre a *E. Coli*, mergulharam-se discos autoclavados em diferentes soluções de nanopartículas, sendo estes depois incubados juntamente com uma colónia da bactéria. O índice de toxicidade é determinado pelo diâmetro em volta do disco onde não ocorre crescimento da bactéria. A título de exemplo, pode-se observar na Figura 41 a) que as nanopartículas NP4 na concentração de 0.25 g/L não tiveram um efeito tóxico sobre o crescimento da *Escherichia coli*, pois o diâmetro de inibição de crescimento é o mesmo que o diâmetro do branco, ou seja, 8 mm. No entanto, as nanopartículas NP4, na concentração 2 g/L apresentam toxicidade (Figura 41 b).



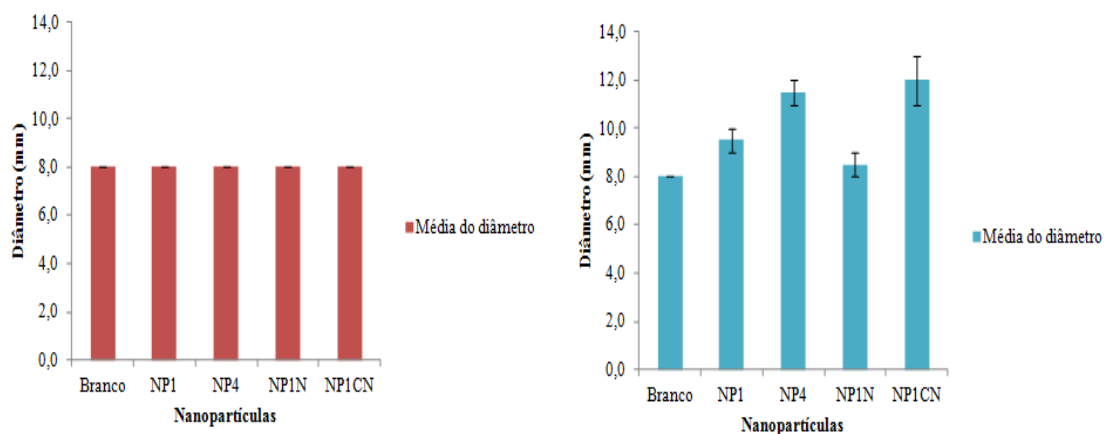
**Figura 41:** Avaliação da citotoxicidade sobre *Escherichia coli* em a) para 0,25 g/L e em b) para 2 g/L (NP4).

De forma a observar melhor as áreas de crescimento das bactérias e as áreas de inibição, recorreu-se ao microscópio eletrónico *Nikon eclipse 50i*, com uma ampliação 10x e obtiveram-se as imagens representadas na Figura 42.



**Figura 42:** Representação microscópica: a) limite da zona de ação das NP's; b) zona sem ação das NP's (NP4).

A análise da Figura 43 permite verificar que, à semelhança do ensaio de toxicidade na hemoglobina, as nanopartículas NP1CN e NP4 apresentam maior toxicidade. Relativamente às NP1N não é possível afirmar se existe ou não uma toxicidade estatisticamente significativa, uma vez que o seu valor médio associado ao desvio padrão da medição, está dentro do valor considerado como branco. As nanopartículas magnéticas (NP1) apresentam um valor de cerca de 10 mm, ou seja, 2 mm que o branco, para a concentração de 2 g/L.



**Figura 43:** Avaliação da toxicidade em *Escherichia coli* com uma concentração de a) 0 g/L e b) 2 g/L, para três ensaios independentes.

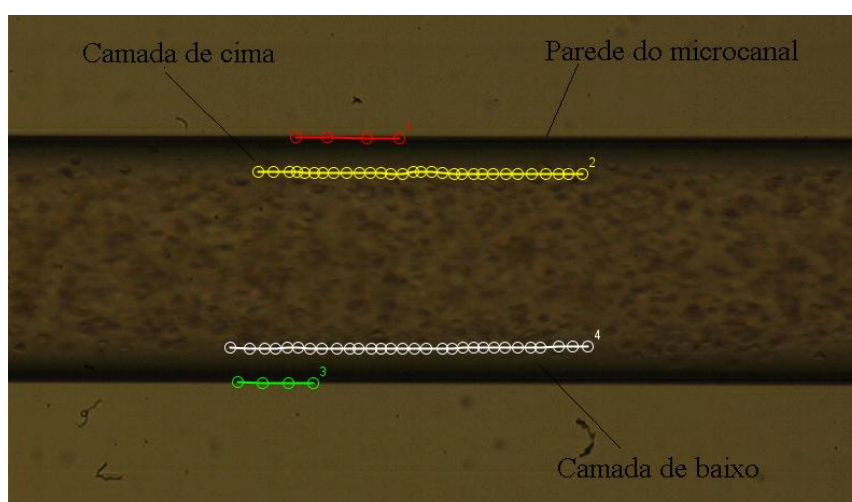
## 4.5 Escoamento Sanguíneo com Nanopartículas

---

Com o intuito de se visualizar a camada de plasma realizaram-se escoamentos com sangue com 5% Hct. A camada de plasma é um fenômeno fisiológico que acontece no ser humano e com o presente estudo pretende-se verificar este fenômeno sofre alguma alteração com a aglomeração de nanopartículas magnéticas. Os primeiros ensaios foram realizados sem nanopartículas e com um caudal de 2-15  $\mu\text{L}/\text{min}$ , usando uma objetiva de 20x com zoom (1.6). As imagens foram retiradas com resolução de 800x600 *pixels*, uma velocidade de 500 *frames/s* e um *shutter* de 5x. Estas imagens foram transferidas para o computador e avaliadas com o *software Image J*.

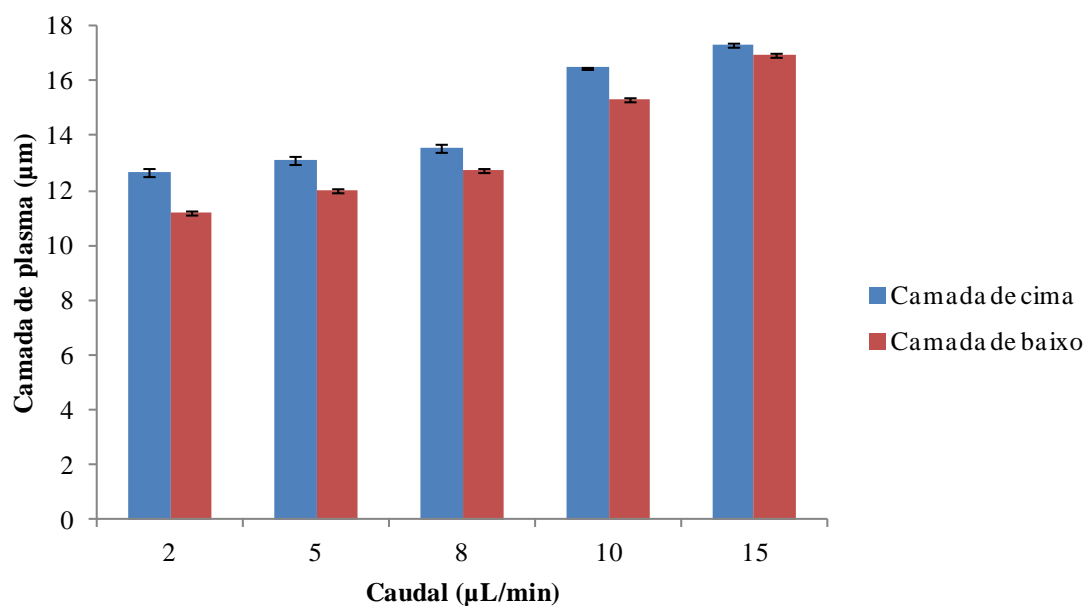
No *software* é necessário ter em atenção alguns passos importantes para uma correta análise das imagens pelo que em primeiro lugar converteu-se o vídeo numa sequência de imagens estáticas não sendo necessário, neste estudo, converter as imagens para níveis de cinzento.

Depois foi necessário calibrar a imagem, selecionando a opção *Set Scale* no comando *Analyze*. De seguida, usou-se no comando *Plugins* a opção *MTrackJ* para poder delimitar a camada de plasma (em cima e em baixo). Na Figura 44 pode-se visualizar uma imagem com a zona da camada de plasma selecionada junto às paredes do microcanal (ensaio sem nanopartículas).



**Figura 44:** Zona de camada de plasma obtida através do *Image J*, sangue com 5% Hct.

Para obter os valores da espessura foi necessário guardar os ficheiros obtidos pelo comando *measure* no *MTrackJ*. Os valores obtidos pelo *software* podem ser analisados na figura abaixo.



**Figura 45:** Camada de plasma para o fluido 5% Hct, com intervalo de confiança a 95 %.

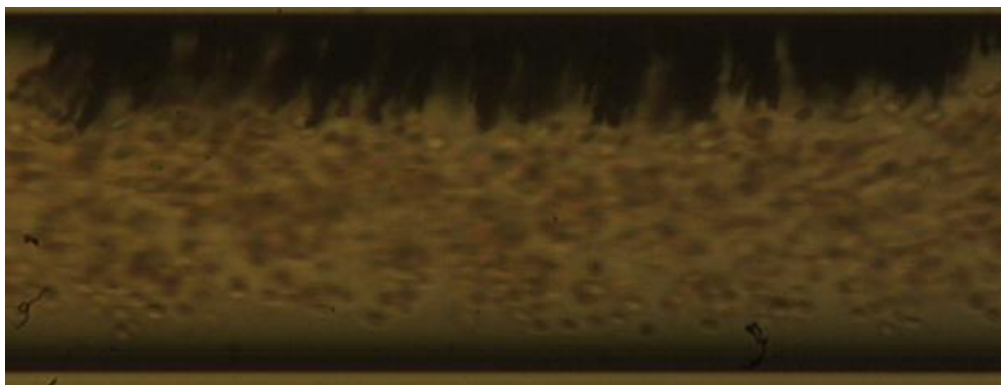
Como se pode verificar na Figura 45 a camada de plasma aumenta ligeiramente com o aumento do caudal. A camada de cima é sempre, neste caso, ligeiramente maior que a de baixo.

## Resultados e Discussão

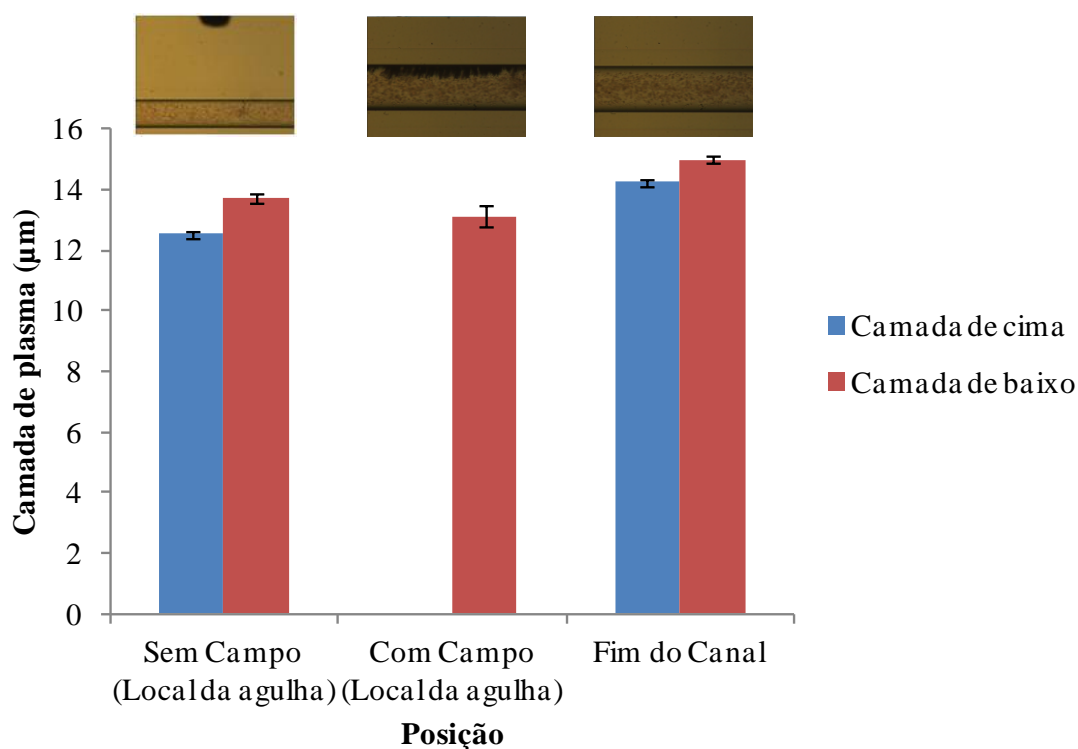
---

Posteriormente efetuaram-se escoamentos com o fluido com 5% Hct e 1% de nanopartículas em suspensão para investigar qual o efeito das nanopartículas na camada de plasma. As imagens foram adquiridas da mesma forma que o caso apresentado anteriormente, tendo sido efetuados os mesmos passos para se observar a espessura da camada de plasma. Neste caso, apenas se apresenta o exemplo das nanopartículas NP1 sintetizadas a 200 °C para os três caudais 2, 5 e 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , por serem aquelas que apresentam melhores características magnéticas. Foram retirados os dados na zona da agulha com e sem campo magnético e no final do canal com o campo magnético aplicado. Foram escolhidas estas três posições para poder comparar melhor a variação da camada de plasma.

Na zona da agulha e com a aplicação do campo, apenas foi calculada a camada de baixo pois a camada de cima não está perceptível devido a aglomeração das nanopartículas, como se pode observar na Figura 46.

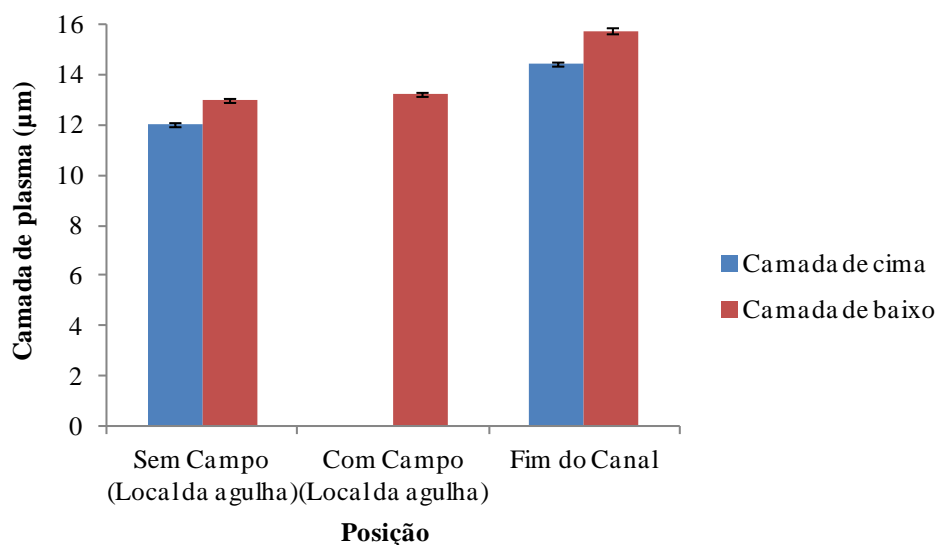


**Figura 46:** Escoamento de um fluido com 5% Hct e 1% de nanopartículas em suspensão na zona da agulha com campo magnético.



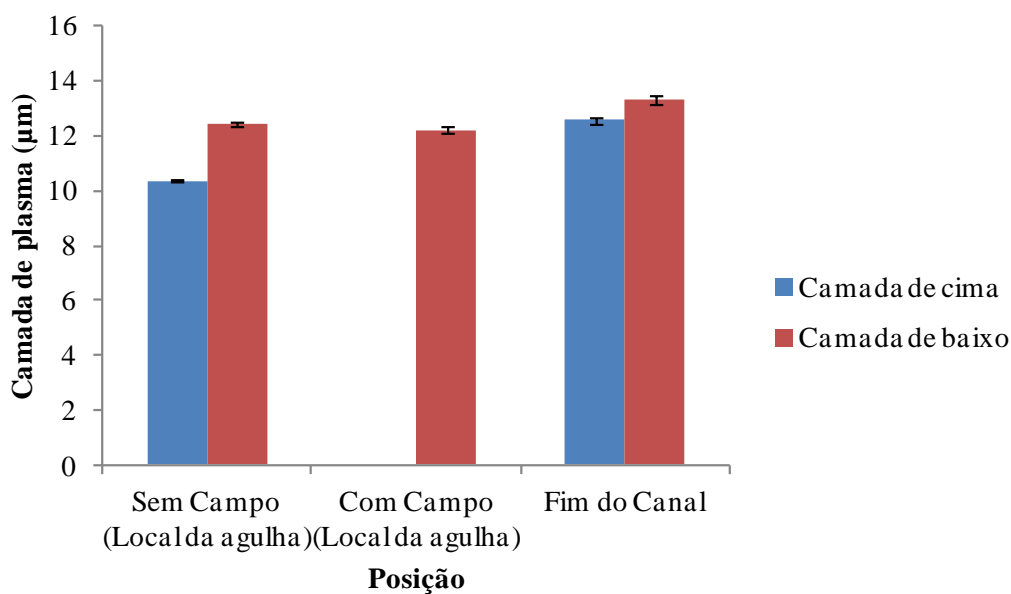
**Figura 47:** Espessura da camada de plasma para um caudal de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 5 % Hct, com intervalo de confiança a 95 %.

De referir que o fim do canal é na presença de campo magnético. Os resultados da Figura 47 sugerem que a presença de nanopartículas magnéticas proporciona uma ligeira variação da espessura da camada de plasma para um caudal de  $2\mu\text{L}$ , tendo-se obtido um valor de CP em cima da parede de  $12.52\ \mu\text{m}$  e CP em baixo de  $13.68\ \mu\text{m}$ . Após a aplicação do campo magnético, na zona a jusante do campo magnético verifica-se um ligeiro aumento da CP. Pode ser devido ao facto das nanopartículas fazerem mudar o comportamento dos glóbulos vermelhos no escoamento. Na zona onde é aplicado o campo magnético, observa-se que as nanopartículas começam a aglomerar, deixando de se observar a camada de plasma na parede de cima microcanal e levando a que a camada de plasma na parede de baixo diminua ligeiramente.



**Figura 48:** Espessura da camada de plasma para um caudal de 5 µL/min, hematócrito de 5 % e 1% de nanopartículas. Intervalo de confiança a 95 %.

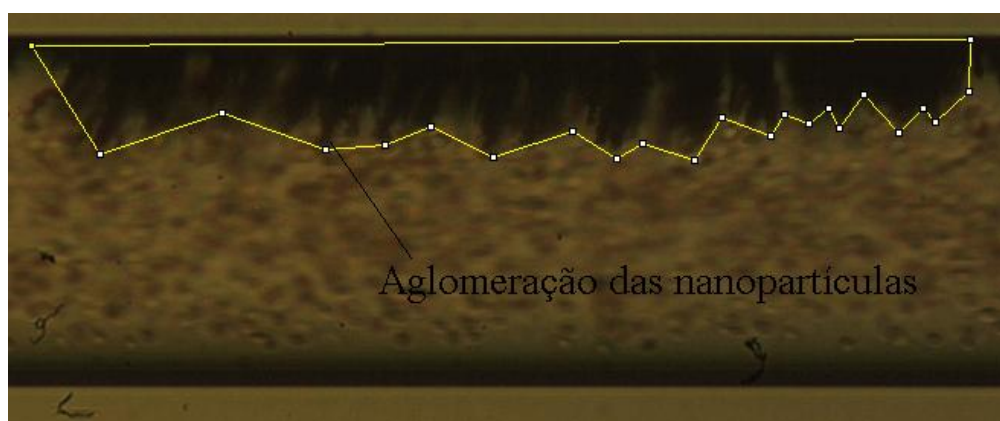
Na Figura 48, os resultados obtidos com um caudal de 5 µL/min são muito semelhantes relativamente aos obtidos com um caudal de 2 µL/min, com ligeira diferença na dimensão da camada de plasma. Isto, possivelmente, deveu-se ao facto de o aumento de caudal não ser significativo para se verificar grandes alterações no comportamento do escoamento.



**Figura 49:** Espessura da camada de plasma para um caudal de 10 µL/min, hematócrito de 5% e 1% de nanopartículas. Intervalo de confiança a 95 %.

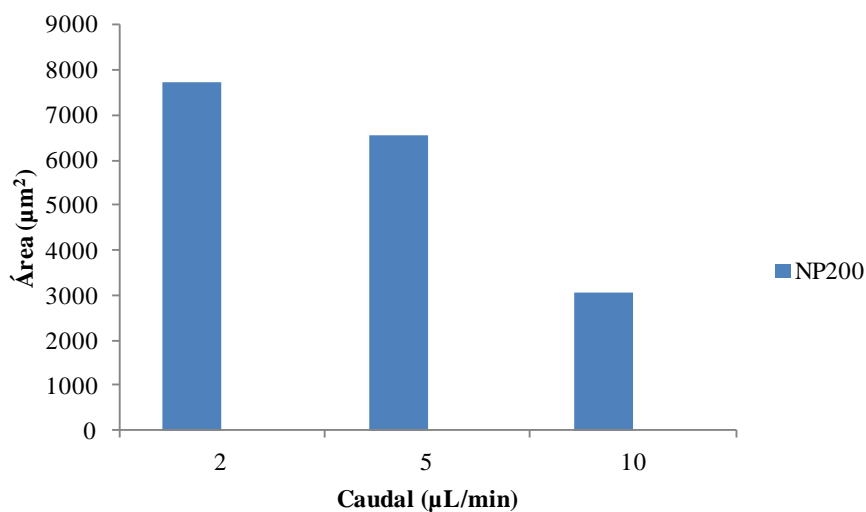
Os resultados obtidos com um caudal de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Figura 49), mostram que os valores das camadas baixam em todas as posições, onde a CP de cima é de 10.37  $\mu\text{m}$  e CP de baixo é de 12.44  $\mu\text{m}$  sem campo. No final do canal, a camada de cima aumenta mais de 2  $\mu\text{m}$ . Isto pode ser devido a aglomeração de partículas no centro do canal.

Depois de calcular os resultados relativos a camada de plasma, foi retirado uma imagem representativa de cada caudal e dos dois tipos de nanopartículas para comparar as áreas na zona do campo magnético. Para tal, usou-se o *software Image J* para efetuar-se os contornos da aglomeração das partículas como se pode observar na Figura 50.



**Figura 50:** Contorno da aglomeração das nanopartículas realizado pelo *software Image J*.

Após calcular todas as áreas foram obtidos os resultados representados na figura abaixo.



**Figura 51:** Área de aglomeração de nanopartículas NP200 para diferentes caudais.

Da análise da Figura 51 podemos verificar que quanto menor for o caudal maior será a área de aglomeração das nanopartículas. Isto deve-se ao facto do campo magnético não ser suficientemente forte para caudais maiores para aglomerar as nanopartículas e consequentemente as partículas serão arrastadas pelo escoamento.

## **Capítulo 5. CONCLUSÕES**



## Conclusões

---

As nanopartículas magnéticas são cada vez mais utilizadas em aplicações biomédicas devido às suas características e propriedades, nomeadamente no tratamento do cancro por hipertermia. Neste trabalho procedeu-se ao desenvolvimento de nanopartículas e à avaliação das suas características magnéticas e de citotoxicidade/toxicidade para aplicação em sistemas biológicos.

A toxicidade das nanopartículas está associada a diversos fatores, como por exemplo a composição química das nanopartículas, o estado de oxidação dos elementos metálicos, a natureza dos materiais que as constituem, a reatividade com as membranas celulares e o tamanho, entre outros. No sentido de tentar explorar a influência de parâmetros de síntese de nanopartículas e a sua toxicidade e características magnéticas, produziram-se óxidos de ferro a partir de diferentes precursores (nitrato de ferro (III), cloreto de ferro (III) ou hexacianoferrato de potássio (II)), diferentes temperaturas e tempos de síntese. De forma a avaliar a toxicidade das nanopartículas na membrana celular, escolheu-se como modelo a hemoglobina de diferentes espécies, nomeadamente, humano, bovino, ovino e caprino. Adicionalmente, efetuou-se um ensaio que visava verificar se as nanopartículas produzidas tinham um efeito mensurável na inibição do crescimento da bactéria *Escherichia coli*. A realização de escoamentos sanguíneos (capilares de vidro) com e sem campo magnético permitiu verificar a influência das nanopartículas na camada de plasma para diferentes caudais de escoamento, bem como a área de aglomeração das nanopartículas sob ação de um campo magnético.

A síntese pelo processo solvotérmico usando etilenoglicol como solvente e NaOH como base, permite obter nanopartículas magnéticas com elevado rendimento sendo favorecidas com a utilização de cloreto de ferro, numa razão NaOH/Fe = 1 e T= 200°C. Verificou-se ainda claramente que dos seis tipos de nanopartículas sintetizadas apenas duas eram magnéticas, as NP1 e NP200.

Os resultados de caracterização morfológica (SEM e DLS) permitem concluir que o precursor influencia notoriamente a forma das partículas sintetizadas. Enquanto que as

## Conclusões

---

nanopartículas sintetizadas a partir de  $\text{FeCl}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  apresentam homogeneidade na sua morfologia, as nanopartículas sintetizadas a partir de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  apresentam não homogeneidade. Quanto à dispersão de tamanhos das nanopartículas obtidas, verificou-se uma tendência transversal para agregação em todas as amostras, sendo que nas amostras com morfologia heterogênea apresentam também um maior tamanho médio das partículas. Muito embora se tenha tido múltiplos cuidados na purificação das amostras, a presença de elementos provenientes dos reagentes nas análises de EDS indica que os processos de purificação escolhidos não foram 100% eficazes, pelo que em trabalhos futuros seria interessante explorar novas vias de purificação. Com os dados do XPS verificou-se que existe alguma relação entre as nanopartículas formadas e a razão  $\text{NaOH}/\text{Fe}$  e o uso de diferentes precursores, isto é, quando se recorre ao  $\text{FeCl}_3$  como precursor é possível formar magnetite quando a razão  $\text{NaOH}/\text{Fe}$  é 4, por outro lado, quando a razão molar destes compostos é metade, produzem-se nanopartículas não magnéticas. Por outro lado, mantendo a razão molar  $\text{NaOH}/\text{Fe}$  igual a 4 e mudando o precursor, obtêm-se partículas de diferentes tamanhos e sem características magnéticas.

Em relação à toxicidade das nanopartículas (na membrana da hemoglobina e na inibição do crescimento da *Escherichia coli*) verificou-se que o aumento da concentração das NP's sobre *E.coli* aumenta a sua toxicidade, sendo neste caso as NP1CN e NP4 as NP's consideradas mais tóxicas. Sobre as hemácias a amostra NP4 também apresentou maior toxicidade, sendo a NP1CN apresentou a menor toxicidade tal. Em relação aos resultados obtidos relativamente à toxicidade das nanopartículas de óxido de ferro na hemoglobina de diferentes espécies animais conclui-se também que as nanopartículas que apresentam maior toxicidade em todas as espécies são as NP4. Apesar destas nanopartículas partilharem o mesmo precursor de síntese que as NP1, o efeito citotóxico destas duas nanopartículas não é de todo similar, o que sugere que estas diferenças não se prendem com o estado de oxidação do ferro, nem com as impurezas à superfície. Uma das principais diferenças encontradas na caracterização destes dois materiais é a sua morfologia. De facto, enquanto as NP1 se apresentam sob a forma de pequenos retângulos, as NP4 têm uma estrutura do tipo laminar, que poderão atuar de uma forma mais destrutiva sobre as membranas das células.

Finalmente os escoamentos das nanopartículas em microcanais permitiram verificar que, no caso da aplicação de um campo magnético, a camada de plasma diminui com o aumento do caudal, já a camada de plasma sem NP's aumenta com o aumento do caudal. Com e sem a aplicação de um campo magnético observou-se que a camada de plasma de baixo tem valores muito próximos no mesmo local. Verificou-se ainda que com a aglomeração das nanopartículas o aumento do caudal não é proporcional ao aumento da área.

Como conclusão final, obtém-se que as partículas NP1 e NP200 são as mais promissoras para aplicação em hipertermia magnética, devido às propriedades magnéticas que revelaram e à baixa toxicidade/citotoxicidade que apresentam.



## **Capítulo 6. REFERÊNCIAS**



## Referências

---

1. Arlington, V.A., *Nanotechnology grand challenge in the environment: research planning workshop report. Vision for nanotechnology R&D in the next decade*, in *National Science and Technology Council Committee on Technology Subcommittee on Nanoscale Science*, E.a. Technology, Editor. 2003.
2. Chaves, A., *Nanociência & Nanotecnologia. Nanociência e nanotecnologia*. 2002: Brasil.
3. Feynman, R.P., *There's plenty of room at the bottom.*, in *Annual meeting of the american physical society*. 1960, California Institute of Technology: Califórnia.
4. *Consulta Delphi em Nanociência e Nanotecnologia/NanoDelph*, in *Relatório Final*, C.C.d.G.e.E. Estratégicos, Editor. 2005, CGEE: Brasília.
5. Pestana, I.S., Alfredo; Castelão, Raul; Aguiar Santos, Luís *A nanotecnologia*, S. Portugal, Editor. 2014: Portugal.
6. *The National Nanotechnology Initiative National Nanotechnology Initiative/Strategic plan*, in *National Science and Technology Council (NSTC)*. 2004, NSTC: Washington.
7. Toma, H.E., *Interfaces e organização da pesquisa no Brasil: da química à nanotecnologia*. Quimica Nova, 2005. **28**.
8. *Nanotechnology Research Directions: IWGN Workshop Report*, in *National Science and Technology Council NSTC*, Editor. 1999: Washington.
9. Pankhurst, Q.A., et al., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2003. **36**(13): p. R167-R181.
10. Tartaj, P., et al., *The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2003. **36**(13): p. R182-R197.
11. Megens, M. and M. Prins, *Magnetic biochips: a new option for sensitive diagnostics*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005. **293**(1): p. 702-708.
12. Gruttner, C. and J. Teller, *New types of silica-fortified magnetic nanoparticles as tools for molecular biology applications*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1999. **194**(1-3): p. 8-15.

## Referências

---

13. Felinto, M.C.F.C., et al., *Magnetic polymeric microspheres for protein adsorption*. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 2005. **236**: p. 495-500.
14. Klem, M.T., M. Young, and T. Douglas, *Biomimetic magnetic nanoparticles*. Materials Today, 2005. **8**(9): p. 28-37.
15. Hildebrand, H.F., et al., *Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices*. Surface & Coatings Technology, 2006. **200**(22-23): p. 6318-6324.
16. Phan, N.T.S. and C.W. Jones, *Highly accessible catalytic sites on recyclable organosilane-functionalized magnetic nanoparticles: An alternative to functionalized porous silica catalysts*. Journal of Molecular Catalysis a-Chemical, 2006. **253**(1-2): p. 123-131.
17. Silva, J.B., et al., *Catalytic properties of nanocomposites based on cobalt ferrites dispersed in sol-gel silica*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2004. **348**: p. 201-204.
18. Fuentes, M., et al., *Preparation of inert magnetic nano-particles for the directed immobilization of antibodies*. Biosensors & Bioelectronics, 2005. **20**(7): p. 1380-1387.
19. Chong, A.S.M. and X.S. Zhao, *Functionalization of SBA-15 with APTES and characterization of functionalized materials*. Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(46): p. 12650-12657.
20. Airoidi, C. and R.F. de Farias, *The use of organofunctionalized silica gel as sequestering agent for metals*. Quimica Nova, 2000. **23**(4): p. 496-503.
21. Esteves, A.C.C., A. Barros-Timmons, and T. Trindade, *Polymer based nanocomposites: Synthetic strategies for hybrid materials*. Quimica Nova, 2004. **27**(5): p. 798-806.
22. Xiang, L., et al., *Bacterial magnetic particles (BMPs)-PEI as a novel and efficient non-viral gene delivery system*. Journal of Gene Medicine, 2007. **9**(8): p. 679-690.
23. Sershen, S. and J. West, *Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**(9): p. 1225-1235.
24. Finotelli, P.V., et al., *Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2010. **81**(1): p. 206-211.
25. Dash, A.K. and G.C. Cudworth, *Therapeutic applications of implantable drug delivery systems*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 1998. **40**(1): p. 1-12.

26. Pooja, G., *Magnetic Nanoparticles Enhance Medical Imaging*. The Journal of Young Investigators, 2006. **15**.
27. Yang, J., et al., *Preparation of poly epsilon-caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **324**(2): p. 185-190.
28. Zhao, D.L., et al., *Inductive heat property of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in AC magnetic field for local hyperthermia*. Rare Metals, 2006. **25**: p. 621-625.
29. Atsumi, T., et al., *Heating efficiency of magnetite particles exposed to AC magnetic field*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007. **310**(2): p. 2841-2843.
30. Jordan, A., et al., *Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1999. **201**: p. 413-419.
31. Kim, D.H., *Surface-modified magnetite nanoparticles for hyperthermia: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies*. Current Applied Physics, 2006.
32. Mahmoudi, M., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. **63**(1-2): p. 24-46.
33. Lin, M.M., et al., *Development of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) for Translation to Clinical Applications*. Ieee Transactions on Nanobioscience, 2008. **7**(4): p. 298-305.
34. Gupta, A.K. and M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3995-4021.
35. Willard, M.A., et al., *Chemically prepared magnetic nanoparticles*. International Materials Reviews, 2004. **49**(3-4): p. 125-170.
36. Lodhia, J.M., G.; Ferris, N. J.; Eu, P.; Cowell, S. F., *Development and use of iron oxide nanoparticles (part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI*. Biomedical Imaging and Intervention Journal, 2010. **6**.
37. Najjar, R., *Microemulsions: An introduction to properties and applications*. InTech, 2012.
38. Damasceno, B.P.G.L.S., J. A.; Oliveira, E. E.; silveira, W. L. L.; Araújo, I. B.; Oliveira, A. and E.S.T. G.; Egito, *Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis*. Rev. Ciênc. Farm. Apl., 2011. **32**: p. 9-18.

## Referências

---

39. Soppimath, K.S., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of Controlled Release, 2001. **70**(1-2): p. 1-20.
40. Reis, C.P.N., R. J.; Ribeiro, A. J; Veiga, F., *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2006. **2**: p. 8-21.
41. Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 1-18.
42. Maity, D., et al., *Studies of magnetite nanoparticles synthesized by thermal decomposition of iron (III) acetylacetonate in tri(ethylene glycol)*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2009. **321**(19): p. 3093-3098.
43. Chin, S.F.P., S. C.; Tan, C. H., *Green synthesis os magnetite nanoparticles (via thermal secomposition method) with controllable size and shape*. J. Mater. Environ. Sci., 2011. **2**: p. 299-302.
44. Yuan, Q., et al., *A stimulus-responsive magnetic nanoparticle drug carrier: Magnetite encapsulated by chitosan-grafted-copolymer*. Acta Biomaterialia, 2008. **4**(4): p. 1024-1037.
45. Natarajan, S., et al., *The use of hydrothermal methods in the synthesis of novel open-framework materials*. Journal of Chemical Sciences, 2006. **118**(6): p. 525-536.
46. Somiya, S. and R. Roy, *Hydrothermal synthesis of fine oxide powders*. Bulletin of Materials Science, 2000. **23**(6): p. 453-460.
47. Haw, C.Y.M., F.; Chia, C. H.; Radiman, S.; Zakaria, S.; Huang, N. M.; Lim, H. N, *Hidrothermal synthesis of magnetic nanoparticles as MRI contrast agents*. Ceramics International, 2010. **36**: p. 1417-1422.
48. Mizutani, N., et al., *Effect of ferrous/ferric ions molar ratio on reaction mechanism for hydrothermal synthesis of magnetite nanoparticles*. Bulletin of Materials Science, 2008. **31**(5): p. 713-717.
49. Mao, B.D., et al., *Synthesis of magnetite octahedrons from iron powders through a mild hydrothermal method*. Materials Research Bulletin, 2006. **41**(12): p. 2226-2231.
50. Wang, J., et al., *One-step hydrothermal process to prepare highly crystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with improved magnetic properties*. Materials Research Bulletin, 2003. **38**(7): p. 1113-1118.
51. Padilha, A.F., *Materiais de engenharia: microestrutura e propriedades*. 1997: p. 349.

- 
52. Ribeiro, G.A.P., *As propriedades magnéticas da matéria: um primeiro contato*. Rev. Bras. Ens. Fis., 2000. **22**(3): p. 299-305.
  53. Rodríguez, G.J.B., *O porque de estudarmos os materiais magnéticos*. Rev. Bras. Ens. Fis., 1998. **20**(4): p. 315-320.
  54. Sinnecker, J.P., *Materiais magnéticos doces e materiais ferromagnéticos amorfos*. Rev. Bras. Ens. Fis., 2000. **22**(3): p. 296-405.
  55. Bordini, C.V., *Caracterização, estabilidade e propriedades magnéticas do polímero quitosana ferro*, in *Departamento de Ciências da Saúde*. 2006, Universidade do Vale do Itajaí: Itajaí.
  56. Harris, L.A., *Polymer stabilized magnetite nanoparticles and poly(propylene oxide) modified styrene-dimethacrylate networks.*, in *Philosophy in Chemistry*. 2002, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University: Virginia.
  57. Lorrain, P.C., D.; Lorrain, F., *Campos e ondas electromagnéticas*. 2000, Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. p. 819.
  58. Callister, W.D., *Materials science and engineering: an introduction*, ed. ed. 2007, New York: John Wiley & Sons.
  59. Knobel, M.G., G. F., *Ferramentas magnéticas na escala do átomo*. Sci. Am. Bras., 2004: p. 58-66.
  60. Wang, Z.L., Zhou, W., *Scanning microscopy for Nanotechnology- Techniques and Applications*. 2006, New York: Springer.
  61. Deutsch, J.C., *Analytical Biochemistry*. Vol. 260. 1998.
  62. Seaton, A.M., W.; Donaldson, K.; Godden, D., *The Lancet*, 1995.
  63. Donaldson, K.B., P. H.; Gilmour, P. S., *Toxicol. Lett.*, 1996.
  64. Scheringer, M., *Nat. Nanotechnol.*, 2008. **3**: p. 322.
  65. Azevedo, F.A.C., A. A. M., *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. 2003, São Carlos.
  66. Kipen, H.M.L., D. L., *J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol*, 2005.
  67. Marmorato, P., et al., *Cellular distribution and degradation of cobalt ferrite nanoparticles in Balb/3T3 mouse fibroblasts*. Toxicology Letters, 2011. **207**(2): p. 128-136.
  68. Kashevsky, B.E., et al., *Study of cobalt ferrite nanosuspensions for low-frequency ferromagnetic hyperthermia*. Particuology, 2008. **6**(5): p. 322-333.
-

## Referências

---

69. Guglielmo, C.D.L., D. R.; Lapuente, J.; Mallafre, J. M. L.; Suárez, M. B. , *Embryotoxicity of cobalt ferrite and gold nanoparticles: A first in vitro approach*. . Reproductive Toxicology, 2010. **30**: p. 271-276.
70. Gupta, R.B.K., U. B., *Nanoparticle technology for drug delivery*. Taylor & Francis Group, 2006. **159**: p. 1-8.
71. Monteiro-R, N.A.T., C. L., *Nanotoxicology: characterization, dosing and health effects*. Informa Healthcare, 2007: p. 450.
72. Lima, R., et al., *Radial dispersion of red blood cells in blood flowing through glass capillaries: The role of hematocrit and geometry*. Journal of Biomechanics, 2008. **41**(10): p. 2188-2196.
73. Lima, R., et al., *Measurement of Individual Red Blood Cell Motions Under High Hematocrit Conditions Using a Confocal Micro-PTV System*. Annals of Biomedical Engineering, 2009. **37**(8): p. 1546-1559.
74. Fujiwara, H., et al., *Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel*. Journal of Biomechanics, 2009. **42**(7): p. 838-843.
75. Pinho, D.P., A.; Lima,R.; Ishikawa,T.;Imai, Y. and Yamaguchi T. , *Measurement of the red blood cell (rbc) dispersion in microchannels: The effect of the temperature*, in *6th World Congress of Biomechanics*. 2010: Singapore. p. 471.
76. Goldsmith, H.L. and V.T. Turitto, *Rheological Aspects of Thrombosis and Hemostasis - Basic Principles and Applications - Icth-Report - Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Hemostasis*. Thrombosis and Haemostasis, 1986. **55**(3): p. 415-435.
77. Meireles, C.P., A. I.; Yaginuma,T. and Lima R., *Analysis of the cell-free layer in a circular microchannels: Trajectories of labeled red blood cells*, in *Nano-BME Symposium*. 2011: Japan-Portugal. p. 39–40.
78. Fahraeus, R. and T. Lindqvist, *The viscosity of the blood in narrow capillary tubes*. American Journal of Physiology, 1931. **96**(3): p. 562-568.
79. Junqueira LC, C.J., *Histologia Básica*. 1999: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 223-283.
80. Macmillan, *Collier's Encyclopedia*. Vol. Volume 4, 6 e 11. 1989.
81. Waite, L., Fine, J., *Applied Biofluid Mechanics*, in *McGraw-Hill*. 2007: USA.
82. *Livraria digital SCIENCEphotoLIBRARY*. . [cited 2014; Available from: <http://www.sciencephoto.com/>].

- 
83. D.C.M., *Estudo numérico e experimental do escoamento sanguíneo em canais com bifurcações*. 2010, IPB.
84. *SoBiologia*. 2008-2014 [cited 2014; Available from: <http://www.sobiologia.com.br/>].
85. Standring, *Gray's Anatomy*, ed. t. Edition. 2004, Edinburgh: Churchill Livingstone.
86. Lima, R.I., T.; Imai, Y. and Yamaguchi T. , *Blood flow behavior in microchannels: Past, current and future trends*, in *Single and two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering*. 2010. p. 1-2.
87. Lima, R., et al., *In vitro confocal micro-PIV measurements of blood flow in a square microchannel: The effect of the haematocrit on instantaneous velocity profiles*. *Journal of Biomechanics*, 2007. **40**(12): p. 2752-2757.
88. Lima, R., et al., *Confocal micro-PIV measurements of three-dimensional profiles of cell suspension flow in a square microchannel*. *Measurement Science & Technology*, 2006. **17**(4): p. 797-808.
89. Cerdeira, T., *Estudo do Escoamento Sanguíneo em Microcanais*. 2009, Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Bragança: Bragança.
90. Galacho, C., *Soro fisiológico: Um exemplo de uma solução química*. Évora.
91. Chien, S., Usami, S., Skalak, R., *Blood flow in small tubes In: Handbook of Physiology— The cardiovascular system IV*. 1984: p. 217-249.
92. Pries, A.R., D. Neuhaus, and P. Gaehtgens, *Blood-Viscosity in Tube Flow - Dependence on Diameter and Hematocrit*. *American Journal of Physiology*, 1992. **263**(6): p. H1770-H1778.
93. Pries, A.R., et al., *Resistance to Blood-Flow in Microvessels in-Vivo*. *Circulation Research*, 1994. **75**(5): p. 904-915.
94. Maeda, N., *Erythrocyte rheology in microcirculation*. *Japanese Journal of Physiology*, 1996. **46**(1): p. 1-14.
95. Guyton AC, H.J., *Textbook of Medical Physiology*, ed. t. Edition. 2000, Philadelphia: WB Saunders Company.
96. Mchedlishvili, G. and N. Maeda, *Blood flow structure related to red cell flow: A determinant of blood fluidity in narrow microvessels*. *Japanese Journal of Physiology*, 2001. **51**(1): p. 19-30.
97. Gosstt, D.R., et al., *Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems*. 2010, Los Angeles, USA.
-

## Referências

---

98. Wu, W., Q.G. He, and C.Z. Jiang, *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies*. *Nanoscale Research Letters*, 2008. **3**(11): p. 397-415.
99. Hasany, S.F.A., I.; Rajan J.; Rehman A. , *Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles*. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2012. **2**(6): p. 148-158.
100. Liu, R.Z., et al., *Shape Evolution and Tunable Properties of Monodisperse Magnetite Crystals Synthesized by a Facile Surfactant-Free Hydrothermal Method*. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2010(28): p. 4499-4505.
101. Goncalves, H., et al., *Hg(II) sensing based on functionalized carbon dots obtained by direct laser ablation*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2010. **145**(2): p. 702-707.
102. Deng, H.L., X. L.; Peng,Q.;Wang, X.; Chen, J. P.; Li,Y. D., *Angewandte Chemie International Edition*, 2005. **44**: p. 2782–2785.
103. Xuan, S.W., Y. X. J.;Yu, J. C.; Leung, K. C. F. , *Chemistry of Materials*, 2009. **21**: p. 5079–5081.
104. Zhu, Y.Z., W.; Chen,H.; Shi, J., *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007. **111**: p. 5281–5285.
105. Zhu, L.P.X., H. M.; Zhang,W. D.; Yang,G.; Fu, X. Y. , *Crystal Growth & Design*, 2008. **8**: p. 957–963.
106. Liu, J.S., Z.; Deng,Y.; Zou, Y. ; Li,C.; Gao, X.; Xiong,L.; Gao,Y.; Li,F. ; Zhao, D. , *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. **48**: p. 1-6.
107. *X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Reference Pages*. [cited 2014; Available from: <http://www.xpsfitting.com>.
108. Biesinger, M.C., et al., *Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni*. *Applied Surface Science*, 2011. **257**(7): p. 2717-2730.
109. Murador, P.D., *Elenice Aspectos estruturais da membrana eritrocitária*. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2007. **29**(2): p. 168-178
110. Auffan, M., et al., *Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward Escherichia coli*. *Environmental Science & Technology*, 2008. **42**(17): p. 6730-6735.

