

**Desenvolvimento de Nanopartículas Magnéticas para
Aplicações Biomédicas**

Nuno Miguel Sampaio Pereira

Relatório Final de Projecto/Estágio apresentado na
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança**

Para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Novembro de 2012

Desenvolvimento de Nanopartículas Magnéticas para Aplicações Biomédicas

Nuno Miguel Sampaio Pereira

Relatório Final de Projecto/Estágio apresentado na
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança

Para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Orientadores:

Dr. Helder Gomes (IPB)

Co-orientadores:

Dr. Rui Lima (IPB), Dr. Pedro João Rodrigues (IPB), Dr. Sergio Arana e
Dr.^a Maite Mujika (CEIT)

Novembro de 2012

Este relatório encontra-se escrito com o antigo acordo ortográfico

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus queridos pais e avós por toda a ajuda que me deram, que sempre me encorajaram a não desistir e que me apoiaram, incondicionalmente, nesta importante etapa da minha vida.

Quero agradecer aos professores Helder Gomes, Pedro João Rodrigues e Rui Lima por toda a orientação, disponibilidade, simpatia, auxílio e encorajamento ao longo desta tese de mestrado. Foi um privilégio trabalhar com todos eles, tendo sido possível aprender novos conceitos e ideias em distintas áreas.

Agradeço também à instituição CEIT e aos professores Sergio Arana e Maite Mujika, pela ajuda disponibilizada ao longo do período *Erasmus*.

Agradeço também o apoio da FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) e do programa COMPETE no âmbito dos projetos PTDC/SAU-BEB/105650/2008, PTDC/SAU-BEB/108728/2008, PTDC/EME-MFE/099109/2008 e PTDC/SAU-ENB/116929/2010, e, ao Instituto Politécnico de Bragança o qual me atribuiu a bolsa “*Student Mobility Placements*” no âmbito do Programa Aprendizagem ao Longo da Vida, para realização da tese em cooperação com o CEIT, Universidade de Navarra, San Sebastian, Espanha.

Também deixo um muito obrigado a todos os colegas e amigos que me apoiaram e ajudaram, directa ou indirectamente, a terminar mais uma etapa.

Por fim, um agradecimento muito especial à minha querida namorada Susana, pois sem ela esta etapa tinha sido muito mais difícil de ultrapassar. Obrigado por todos os conselhos, carinho, simpatia, alegria, esperança, apoio que me deste ao longo destes anos.

Resumo

Este trabalho teve como objectivo a síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, estudando o efeito de alguns parâmetros (pH, massa do precursor e de NaOH, temperatura) no rendimento obtido. O rendimento é maximizado nas seguintes condições: pH básico, quando se verifica um aumento da temperatura e quando se observa um filtrado incolor, ou seja, existe a conversão completa do precursor.

As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas recorrendo a várias técnicas (DLS, FEG-SEM, AFM e XRD), com o intuito de verificar quais as suas principais características e saber as suas possibilidades para serem aplicadas em hipertermia magnética. Todos estes métodos foram comparados entre si para averiguar qual das nanopartículas obtiveram melhores resultados, sendo as nanopartículas sintetizadas a 200 °C, durante 6 h e com 5 mmol de precursor ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 20 mmol de NaOH as que obtiveram os melhores resultados em termos de tamanho de partículas e de características magnéticas.

Neste trabalho foram também realizados estudos de escoamentos em microcanais com sangue tendo-se verificado que as nanopartículas sintetizadas (magnéticas e não magnéticas) têm influência na camada de plasma. As nanopartículas com características magnéticas diminuem a espessura da camada de plasma, um comportamento contrário ao observado com as nanopartículas sem características magnéticas. Verificou-se também que, após a aplicação de distintos campos magnéticos, a camada de plasma desaparece em algumas zonas, dependendo do tipo de partícula. Aplicando distintos campos magnéticos foi também possível calcular a área de nanopartículas magnéticas aglomeradas à parede do microcanal de vidro, constatando-se que essa área aumenta à medida que aumenta o campo magnético.

Palavras-Chave: Nanopartículas Magnéticas, Hipertermia Magnética, Camada de Plasma, Campo Magnético

Abstract

This work was aimed at the synthesis of magnetic nanoparticles of iron oxide, studying the effects of some parameters (pH, mass of the precursor and NaOH, temperature) in the obtained yield. The yield is maximized under the following conditions: basic pH, when there is a temperature increase and when observing a colorless filtrate, i.e., there is a complete conversion of the precursor.

The synthesized nanoparticles were characterized using various techniques (DLS, FEG-SEM, AFM and XRD) in order to evaluate not only their main characteristics but also to verify their potential to be applied in magnetic hyperthermia. All these methods were compared in order to find the nanoparticles that can achieve the best results. The nanoparticles synthesized at 200 ° C for 6 h with 5 mmol of precursor (FeCl₃.6H₂O) and 20 mmol of NaOH were the ones that have achieved the best results in terms of particle size and magnetic characteristics.

In the blood flow studies within microchannels it was found that the nanoparticles synthesized (magnetic and non-magnetic) tend to influence the plasma layer. The results with nanoparticles with magnetic properties indicate that the thickness of the cell-free layer tend to decrease. This behavior is in contrast with the nanoparticles without magnetic properties. It was also observed that, after applying different magnetic fields, the cell-free layer tend to disappear in some areas depending on the type of nanoparticle. By applying different magnetic fields, it was possible to calculate the area of the magnetic nanoparticles attached to the wall of the microchannel, confirming that this area increases as the magnetic field increases.

Keywords: Magnetic Nanoparticles, Magnetic Hyperthermia, Plasma Layer, Magnetic Field

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Índice.....	iv
Índice de Figuras.....	vi
Índice de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Capítulo 1: Introdução.....	1
1.1 Nanopartículas Magnéticas (Óxido de Ferro).....	2
1.2 Aplicações Biomédicas.....	4
1.2.1 Libertação Controlada de Fármacos.....	5
1.2.2 Separação Magnética.....	6
1.2.3 Direcionamento de Fármacos (<i>Drug Delivery Systems</i>).....	7
1.2.4 Agentes de Contraste em Ressonância Magnética.....	7
1.2.5 Hipertermia.....	8
1.3 Tecnologias de Produção de Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro.....	9
1.3.1 Co-precipitação.....	10
1.3.2 Decomposição Térmica.....	10
1.3.3 Microemulsão.....	10
1.3.4 Síntese Hidrotérmica.....	11
1.3.5 Síntese Sonoquímica.....	11
1.4 Propriedades Magnéticas das Nanopartículas.....	13
1.5 Tipos de Magnetismo.....	15
1.5.1 Paramagnetismo.....	15
1.5.2 Diamagnetismo.....	15
1.5.3 Ferromagnetismo.....	16
1.5.4 Ferrimagnetismo.....	16
1.5.5 Antiferromagnetismo.....	17
1.6 Domínios magnéticos.....	17
1.7 Curva de Histerese.....	18

1.8	Influência do Tamanho da Partícula na Magnetização.....	19
1.9	Materiais Magnéticos Moles e Duros.....	19
1.10	Superparamagnetismo	20
1.11	Microcanais	21
1.11.1	Fotolitografia.....	22
1.11.2	Litografia Suave	23
1.12	Objectivos e Enquadramento	24
Capítulo 2: Parte Experimental		26
2.1	Preparação das Nanopartículas Magnéticas (Óxido de Ferro)	27
2.2	Caracterização das Nanopartículas Magnéticas	28
2.2.1	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	28
2.2.2	Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	31
2.2.3	Microscopia de Força Atômica (AFM)	32
2.2.4	Microscópio Electrónico de Varrimento (SEM)	35
2.2.5	Difracção de Raios-X (XRD).....	39
2.3	Fabricação e Estudo dos Microcanais	42
Capítulo 3: Resultados e Discussão		47
3.1	Preparação de Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro.....	48
3.2	DLS e UV-Vis.....	51
3.3	AFM.....	57
3.4	FEG-SEM e SEM.....	59
3.5	XRD	66
3.6	Estudo do Escoamento de Nanopartículas em Microcanais.....	71
3.6.1	Efeito das Nanopartículas na Camada de Plasma (Ausência de Campo Magnético) 73	
3.6.2	Efeito das Nanopartículas na Camada de Plasma (Campo Magnético Aplicado)...	75
3.6.3	Nanopartículas Aglomeradas Consoante o Campo Magnético Aplicado	83
Capítulo 4: Conclusões e Trabalhos Futuros.....		89
4.1	Conclusões	90
4.2	Trabalhos Futuros.....	91
Referências Bibliográficas		93
Anexos.....		100

Índice de Figuras

Figura 1: Áreas de investigação dos óxidos de ferro (Adaptado de [8]).	3
Figura 2: Estrutura da magnetite (Fe_3O_4) (Adaptado de [4]).	4
Figura 3: Alguns ligantes que se podem agregar nas nanoestruturas núcleo/coroa (Adaptado de [6]).	4
Figura 4: O perfil de concentração plasmático do fármaco varia com o tempo, segundo duas situações distintas (situação A e B) (Adaptado de [25]).	6
Figura 5: Imagem de um fígado obtido por ressonância magnética; esquerda: obtida por ressonância magnética sem agente de contraste; direita: obtida por ressonância magnética usando um líquido de nanopartículas de ferro como agente de contraste (Adaptado de [http://www.cienciamao.if.usp.br/cienciasfisicas/index.php?pai_nel=12]).	8
Figura 6: Representação esquemática de um material com multidomínios magnéticos (a) na ausência e (b) na presença de um campo magnético externo (H) (Adaptado de [50]).	16
Figura 7: Monodomínio magnético (Adaptado de [50]).	17
Figura 8: Curva de histerese (Adaptado de [52]).	18
Figura 9: Curva de histerese de uma partícula superparamagnética (Adaptado de [60]).	21
Figura 10: Representação da 2ª, 4ª e 5ª etapa da fotolitografia (Adaptado de [67]).	23
Figura 11: Estrutura química do PMDS (polidimetilsiloxano) (Adaptado de [http://www.escolainterativa.com.br/canais/18_vestibular/estude/quimi/tem/qui_tem134.asp]).	23
Figura 12: Etapas, após a fotolitografia, para a obtenção da estrutura final em PDMS. Este processo é designado de litografia suave (Adaptado de [68]).	24
Figura 13: Reactor Parr Acid Digestion Vessel, Model 4748.	27
Figura 14: Espalhamento de luz para partículas pequenas e grandes, em função do tempo (Adaptado de [73]).	29
Figura 15: Preparação das nanopartículas para observar no <i>Malvern Zetaziser Nano Series</i> .	31
Figura 16: Ilustração do funcionamento básico do espectrofotómetro (Adaptado de [76]).	32
Figura 17: Esquema de um AFM (Adaptado de [82]).	33

Figura 18: Representação esquemática, da esquerda para a direita, do modo de contacto, não-contacto e intermitente (Adaptado de [84]).....	34
Figura 19: Procedimento para observação das nanopartículas no AFM.	35
Figura 20: Esquema do microscópio electrónico de varrimento (SEM) (Adaptado de [92]).....	36
Figura 21: Tipos de radiação e respectivo volume de emissão (Adaptado de [http://www.iap.tuwien.ac.at/~werner/qes_tut_interact.html]).	37
Figura 22: Procedimento para efectuar a análise das nanopartículas no FEG-SEM e SEM.	39
Figura 23: Etapas do processo de XRD.....	41
Figura 24: <i>Wafer</i> com as respectivas geometrias após o processo da fotolitografia.	43
Figura 25: Geometria e microdispositivos com microcanais fabricados em PDMS.....	44
Figura 26: Sistema para a visualização do escoamento no microscópio.....	45
Figura 27: Nanopartículas sintetizadas e o seu comportamento magnético.....	50
Figura 28: Distribuição de tamanho de partículas para as partículas de poliestireno AJ10.	52
Figura 29: Espectro UV-Vis das NP1.	53
Figura 30: Distribuição de tamanho de partículas para NP1.	53
Figura 31: Distribuição de tamanho de partículas para NP2.....	54
Figura 32: Distribuição de tamanho de partículas para NP3.....	54
Figura 33: Distribuição de tamanho de partículas para NP4.....	54
Figura 34: Distribuição de tamanho de partículas para NP5.....	55
Figura 35: Distribuição de tamanho de partículas para NP6.....	55
Figura 36: Partículas de poliestireno observadas por AFM (a) AJ10; (b) AJ20.	57
Figura 37: Análise AFM à amostra de nanopartículas NP1.....	59
Figura 38: Resultados da amostra NP1 obtidos por FEG-SEM/EDS.....	60
Figura 39: Resultados da amostra NP2 obtidos por FEG-SEM/EDS.....	61
Figura 40: Resultados da amostra NP3 obtidos por FEG-SEM/EDS.....	62
Figura 41: Resultados da amostra NP4 obtidos por FEG-SEM/EDS.....	63

Figura 42: Resultados da amostra NP5 obtidos por FEG-SEM/EDS.....	64
Figura 43: Imagens SEM das amostras (a) NP1 e (b) NP2.	65
Figura 44: Imagens SEM das amostras (a) NP3 e (b) NP4.	65
Figura 45: Imagens SEM das amostras (a) NP5 e (b) NP6.	65
Figura 46: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP1.....	66
Figura 47: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP2.....	67
Figura 48: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP3.....	67
Figura 49: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP4.....	67
Figura 50: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP5.....	68
Figura 51: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP6.....	68
Figura 52: Exemplo de um valor FoM aceitável (a) e de um menos aceitável (b).....	68
Figura 53: Ilustração das constantes da equação de <i>Scherrer</i> , em que I_0 corresponde à intensidade no maior pico e β a diferença entre $2\theta_1$ e $2\theta_2$ a meio de I_0 (Adaptado de [116]).	70
Figura 54: Sangue com (a) 5% Hct e (b) com nanopartículas misturadas aplicando-se um campo magnético.	71
Figura 55: Sangue com 5% Hct, onde (a) é a imagem original e (b) imagem tratada com a zona correspondente à camada de plasma.	72
Figura 56: Tratamento de imagem realizado na camada de plasma (parte cima e parte baixo) no sangue com 5% de hematócrito com o objectivo de determinar as suas espessuras.	73
Figura 57: Amostra NP4, onde (a) é a imagem original e (b) a zona correspondente à camada de plasma.	73
Figura 58: Amostra NP6, onde (a) é a imagem original e (b) a zona correspondente à camada de plasma.	74
Figura 59: Espessura da camada de plasma para o sangue com 5 % Hct e este misturado com 4 tipos distintos de nanopartículas.	74
Figura 60: Microcanal de vidro borossilicato de 300 μ m e metodologia usada para aplicar o campo magnético.	75
Figura 61: Diferentes zonas do microcanal.....	76

Figura 62: Imagens obtidas no escoamento de nanopartículas da amostra NPCE nas várias zonas estudadas quando sujeitas a um campo magnético de 138.5 G.....	77
Figura 63: Imagens obtidas no escoamento de nanopartículas da amostra NP6 nas várias zonas estudadas quando sujeitas a um campo magnético de 138.5 G.....	78
Figura 64: Espessura da camada de plasma observada nos estudos com a nanopartículas NPCE, tendo em conta as distintas zonas estudadas e o campo magnético aplicado.....	79
Figura 65: Espessura da camada de plasma observada nos estudos com as nanopartículas NP6, tendo em conta as distintas zonas estudadas e o campo magnético aplicado.....	80
Figura 66: Espessura da camada de plasma observada nos estudos com as nanopartículas NPC, tendo em conta as distintas zonas estudadas e o campo magnético aplicado.....	80
Figura 67: Espessura da camada de plasma na zona “MM” observada nos estudos com as diferentes nanopartículas, tendo em consideração o campo magnético aplicado.....	81
Figura 68: Espessura da camada de plasma na zona “M” observada nos estudos com as diferentes nanopartículas, tendo em consideração o campo magnético aplicado.....	82
Figura 69: Espessura da camada de plasma na zona “C” observada nos estudos com as diferentes nanopartículas, tendo em consideração o campo magnético aplicado.....	82
Figura 70: Espessura da camada de plasma na zona “J” observada nos estudos com as diferentes nanopartículas, tendo em conta o campo magnético aplicado.	83
Figura 71: Área delimitada pelas nanopartículas NP6 em soro - (a) - e em sangue - (b) - quando sujeitas a um campo magnético de 138.5 G.	84
Figura 72: Visualização do escoamento contendo as nanopartículas NP4 quando se aplica um campo magnético.	85
Figura 73: Comportamento das nanopartículas (a) NP6, (b) NPC e (c) NPCE quando é retirado o campo magnético.	85
Figura 74: Área correspondente à aglomeração das nanopartículas nos estudos realizados em soro.....	86
Figura 75: Área correspondente à aglomeração das nanopartículas sintetizadas tendo em conta o diâmetro de cada uma delas.	87
Figura 76: Área correspondente à aglomeração das nanopartículas sintetizadas em função do campo magnético aplicado.....	87
Figura 77: Área correspondente à aglomeração da nanopartículas NP6, NPC e NPCE nos estudos conduzidos em sangue.....	88

Índice de Tabelas

Tabela 1: Resumo de trabalhos publicados sobre síntese de nanopartículas de óxido de ferro ..	13
Tabela 2: Condições para a preparação das amostras.	28
Tabela 3: Nanopartículas comerciais usadas neste trabalho.....	28
Tabela 4: Campo magnético obtido para o conjunto agulha/íman.	46
Tabela 5: Concentração, pH e rendimento de síntese das nanopartículas.	48
Tabela 6: Diâmetro, índice de polidispersão e erro relativo das partículas de poliestireno.	52
Tabela 7: Valores de absorção das amostras de nanopartículas sintetizadas, suspensas em água.	53
Tabela 8: Diâmetro, índice de polidispersão e desvio-padrão das amostras de nanopartículas sintetizadas, suspensas em água.	55
Tabela 9: Valores de absorção das amostras de nanopartículas sintetizadas, suspensas numa mistura água/etanol.	56
Tabela 10: Diâmetro e índice de polidispersão das amostras de nanopartículas sintetizadas, suspensas numa mistura água/etanol.....	56
Tabela 11: Diâmetro das partículas de poliestireno obtidas por AFM.....	58
Tabela 12: Tamanho médio de cada uma das nanopartículas.	70

Lista de Abreviaturas

T_c – Temperatura de Curie

MRI – Agentes de Contraste em Ressonância Magnética

M_s – Magnetização de Saturação

D_c – Diâmetro crítico

T_B – Temperatura de Bloqueio

PDMS – Polidimetilsilaxano

EG – Etilenoglicol

DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico

UV-Vis – Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível

AFM – Microscopia de Força Atômica

SEM – Microscopia Electrónica de Varrimento

FEG-SEM - Microscopia Electrónica de Varrimento com Emissão por Efeito de Campo

XRD – Difracção de Raios-X

Dx40 – Dextrano 40

EDS – Espectroscopia Dispersiva de Raios-X

ES – Electrões Secundários

ER – Electrões Retro-Difundidos

Hct – Hematócrito

Gvs – Glóbulos Vermelhos

CP – Camada de Plasma

pdi – Índice de Polidispersão

FoM – Figure-of-Merit

NPCE – Nanopartículas Comerciais Encapsuladas

NPC – Nanopartículas Comerciais

Capítulo 1: Introdução

1.1 Nanopartículas Magnéticas (Óxido de Ferro)

O desenvolvimento de estruturas à escala molecular e o manuseamento de materiais a uma escala atômica são características da nanotecnologia. Uma nanopartícula é um corpo com uma dimensão igual ou menor a 100 nm. 1 nm define-se como a bilionésima parte do metro [1].

As nanopartículas magnéticas são tipicamente compostas por elementos metálicos, dos quais se destacam o ferro, o níquel e o cobalto, podendo ser manuseadas pela aplicação de um campo magnético. A estrutura química e o processo de síntese são importantes para a determinação das propriedades químicas e físicas das nanopartículas. Estas podem ser encapsuladas por revestimentos poliméricos ou inorgânicos, tornando-as biocompatíveis e estáveis, operando como base de biomoléculas [2, 3].

Em certos casos as nanopartículas podem apresentar superparamagnetismo, característico de pequenas partículas ferromagnéticas ou ferrimagnéticas. Estas partículas possuem magnetização, até mesmo na inexistência de campo magnético externo, sendo caracterizadas por uma elevada susceptibilidade magnética e por ausência de histerese nesses materiais. O superparamagnetismo surge quando a magnetização da nanopartícula é vista como um só momento magnético (soma dos momentos individuais carregados pelos átomos das nanopartículas) e quando a nanopartícula tem um único domínio magnético. A passagem de materiais ferromagnéticos ou ferrimagnéticos para materiais superparamagnéticos dá-se a temperaturas inferiores à temperatura de Curie – T_C - (temperatura a partir da qual estes materiais se tornam paramagnéticos) [4, 5].

Existem vários tipos de nanopartículas magnéticas, como por exemplo nanopartículas metálicas, nanopartículas bimetálicas e nanopartículas de óxido de ferro, sendo estas últimas as que são abordadas ao longo do presente trabalho. Os óxidos de ferro têm um papel relevante em áreas como a indústria química, biologia, medicina, geologia, entre outras, sendo o seu desempenho afectado, quer pelo tamanho das partículas, quer pela estrutura do cristal. Na figura 1, apresenta-se um esquema de algumas áreas de investigação dos óxidos de ferro. Os óxidos de ferro usados como catalisadores são muito populares, uma vez que apresentam um baixo custo, um manuseamento simples, não possuem toxicidade e são de natureza ecológica [6-10].



Figura 1: Áreas de investigação dos óxidos de ferro (Adaptado de [8]).

De entre os óxidos de ferro destacam-se a hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, por possuir fracas características ferromagnéticas, não será abordada), a magnetite (Fe_3O_4) e a maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Juntamente com as propriedades magnéticas, também a biocompatibilidade e a biodegradabilidade favorável destas nanopartículas magnéticas têm contribuído extremamente para a sua utilização em aplicações biomédicas [11].

A magnetite é um dos minérios mais usados para a obtenção de ferro, é ferrimagnético à temperatura ambiente e paramagnético acima de $T_C = 850\text{ K}$, apresentando cor preta. É um óxido de ferro misto de FeO e Fe_2O_3 , surgindo a magnetização pela presença de um campo magnético externo, que desaparece quando o campo é afastado. Tal facto deve-se à não conservação da orientação magnética dos átomos individuais. O Fe_3O_4 tem propriedades eléctricas e magnéticas exclusivas, apresentando um pequeno hiato electrónico de 0.1 eV e uma condutividade eléctrica de $10^2\text{-}10^3\ \Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$. O facto dos electrões que são repartidos entre o ferro e o oxigénio nas fronteiras dos domínios octaédricos estarem deslocados para os iões Fe faz com que a condutividade seja elevada. Por ser bastante sensível às condições ambientais, o Fe_3O_4 facilmente sofre oxidação formando maghemite. Na figura 2 visualiza-se, da esquerda para a direita, o cristal natural e a estrutura cristalina da magnetite, onde O representa o oxigénio, A o catião tetraédrico de Fe^{3+} e B o catião octaédrico de Fe^{3+} [8, 12-16].

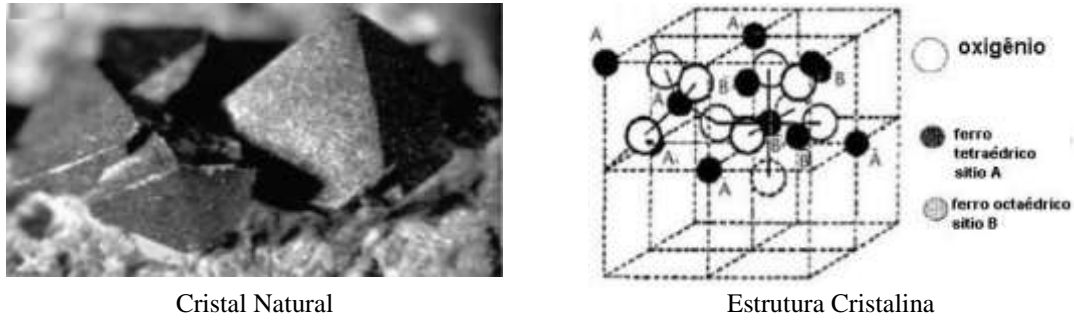


Figura 2: Estrutura da magnetite (Fe_3O_4) (Adaptado de [4]).

Por sua vez, a maghemite é instável a temperaturas elevadas, é ferrimagnético à temperatura de 25 °C e a sua susceptibilidade diminui com o tempo. Usufri da estrutura cristalina e natureza muito magnética da magnetite, contudo a composição é a mesma da hematite, exibindo cor castanha. Não possui Fe^{3+} suficientes para o preenchimento de todos os locais tetraédricos e octaédricos. Quando as temperaturas se encontram entre os 370 e 600 °C, o $\gamma-Fe_2O_3$ transforma-se em hematite [4, 15-19].

Face às inúmeras aplicações das nanopartículas em biomedicina e nanomedicina, foi necessário o desenvolvimento de nanoestruturas do tipo núcleo/coroa, às quais se podem agregar alguns ligantes, como se pode observar na figura 3. Estas são formadas por nanopartículas com um núcleo bem definido (*core*), cobertos com uma coroa (*shell*), que é possível funcionalizar, fazendo com que as nanoestruturas exibam especificidade nas propriedades e/ou funcionalidades [20, 21].

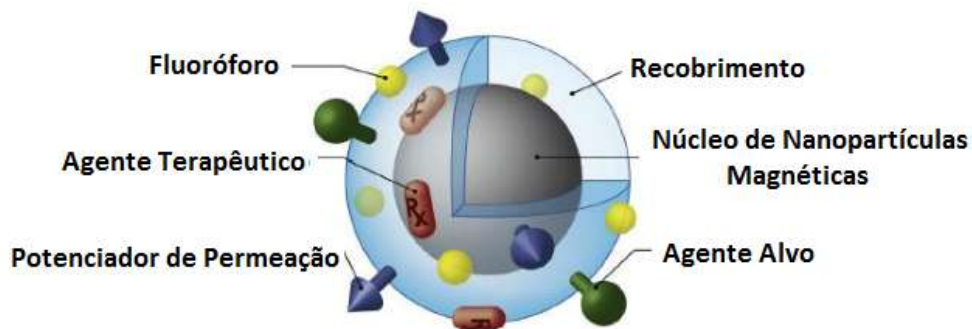


Figura 3: Alguns ligantes que se podem agregar nas nanoestruturas núcleo/coroa (Adaptado de [6]).

1.2 Aplicações Biomédicas

Actualmente, as nanopartículas magnéticas têm grande interesse em áreas como a biomédica e a bioengenharia, face às suas características físicas e propriedades químicas únicas. Têm sido usadas diversas nanopartículas biocompatíveis em

diagnósticos clínicos e terapêuticos, no tratamento do cancro (actuando nos tumores sem que os tecidos envolventes sejam atingidos) e de doenças cardiovasculares e neurológicas. Também podem ser usadas na libertação controlada de fármacos, em agentes de administração de medicamentos, em separação magnética, no direccionamento de fármacos, como agentes de contraste em ressonância magnética (MRI), em hipertermia, entre outros. Para estas aplicações, as nanopartículas devem ser superparamagnéticas, apresentar propriedades químicas e físicas uniformes, expondo então elevados valores de magnetização e tamanho inferior a 100 nm com uma distribuição estreita de tamanhos. No caso de nanopartículas usadas no combate a células cancerígenas, as nanopartículas podem receber um revestimento superficial com:

- Polímeros, que possibilitam o aumento do tempo de circulação no corpo;
- Ligantes, que identifiquem com clareza as células do cancro;
- Outras partículas magnéticas.

Podem também ser ligadas a anticorpos, proteínas, enzimas, fármacos, e serem direccionadas a um determinado órgão, tecido ou tumor pela aplicação de um campo magnético externo [6, 22, 23].

De seguida são descritas de uma forma sucinta algumas aplicações, dando principal ênfase à hipertermia, visto ser a aplicação estudada ao longo do presente trabalho.

1.2.1 Libertação Controlada de Fármacos

Sistemas de libertação controlada de fármacos são aqueles em que o agente activo é libertado não tendo em conta os factores externos e que possuem uma cinética bem identificada. Estes apresentam vantagens quando comparadas a outros sistemas de dosagem convencionais, possuindo uma maior eficiência terapêutica com libertação gradual e controlada do fármaco, a partir da deterioração da matriz ou externamente por difusão. Outras vantagens incluem uma menor toxicidade do fármaco no organismo quando comparado com administração convencional, permanência em circulação mais prolongada, administração segura, não se verificando reacções inflamatórias locais, pois é administrado num menor número de doses, pode integrar substâncias hidrofílicas ou lipofílicas e não se verifica imobilização das espécies bioactivas quando os fármacos são encaminhados a determinados alvos característicos.

Na figura 4 apresenta-se uma figura onde o perfil de concentração plasmático do fármaco varia com o tempo, segundo duas situações distintas (situação A e B). Na situação A, um certo medicamento é libertado de forma inspeccionada, verificando-se que dispositivos de libertação controlada conseguem manter um nível desejado no plasma, por longos períodos de tempo, sem atingir o nível tóxico e o nível de ineficiência. Por outro lado, a situação B representa um medicamento a ser libertado de forma convencional. Neste caso, depois da ingestão ou injeção de formas de dosagem padrão, o nível sanguíneo do fármaco aumenta (vai até um nível tóxico) e reduz exponencialmente quando o fármaco é excretado ou metabolizado (atinge um nível de ineficácia), fazendo com que seja necessário a administração de várias doses ao longo do dia [13, 24, 25].

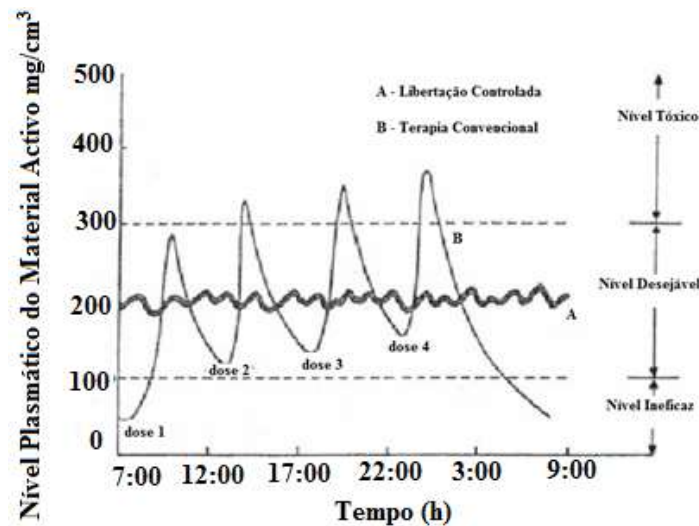


Figura 4: O perfil de concentração plasmática do fármaco varia com o tempo, segundo duas situações distintas (situação A e B) (Adaptado de [25]).

1.2.2 Separação Magnética

Usada quando se pretende separar uma determinada substância biológica de uma mistura, de outras substâncias distintas, podendo ser conseguida pelo uso de nanopartículas magnéticas biocompatíveis, sendo um processo que envolve duas etapas:

- 1ª Etapa: marcação da entidade biológica pretendida com um determinado material magnético;
- 2ª Etapa: separação dessas entidades marcadas através de um fluido-base de separação magnética.

Esta aplicação é extremamente sensível para a escolha de espécies raras de células tumorais do sangue, sendo apropriada para a separação de um pequeno número de células alvo [26].

1.2.3 Direccionamento de Fármacos (*Drug Delivery Systems*)

Actualmente, os principais problemas associados com a administração de fármacos sistémicos incluem a biodistribuição de fármacos a todo o corpo, a falta de especificidade do fármaco para um determinado sítio patológico, a necessidade de uma dose grande para atingir concentrações locais elevadas e efeitos secundários que podem surgir devido a elevadas doses de fármacos. Entre os esquemas actuais, o princípio de segmentação de fármacos é magnético, ou seja, a entrega de um fármaco imobilizado em materiais magnéticos dá-se sob a acção de um campo magnético externo. Para aumentar a especificidade, o fármaco é associado a outra molécula capaz de reconhecimento específico e vincutivo ao local de destino. Este reconhecimento pode ocorrer ao nível de todo o órgão, ao nível de certos tipos de células específicas para um determinado órgão ou ao nível de componentes individuais próprias dessas células. O tipo de moléculas associadas usadas, normalmente, são anticorpos, proteínas, lectinas, hormonas, moléculas carregadas e alguns ligantes de baixo peso molecular [27, 28].

1.2.4 Agentes de Contraste em Ressonância Magnética

A imunolocalização de células tumorais, em conjunto com as nanopartículas superparamagnéticas, possibilita a detecção prematura de tumores usando ressonância magnética nuclear. Estas nanopartículas têm como vantagem o facto de poderem ser modificadas quimicamente, tornando-as não tóxicas, injectáveis, compatíveis com o corpo e com capacidade para se concentrarem num elevado nível no tecido ou órgão. A natureza fortemente magnética dessas nanopartículas torna-as excelentes agentes de contraste. Existe, hoje em dia, uma grande diversidade de partículas que têm sido produzidas, diferindo no tamanho e no tipo de material de revestimento (como amido, albumina, silicones, dextran, poli(etilenoglicol), entre outros). Podem ser classificadas em dois grupos diferentes, consoante o seu tamanho e como isso afecta a meia-vida plasmática e a biodistribuição, podendo ser usadas em imagens do fígado, baço, etc. Um dos grupos é denominado de SPIOs (óxidos de ferro superparamagnéticos), sendo caracterizados por nanopartículas de tamanho maior que 50 nm (revestimento incluído).

O outro grupo é conhecido como USPIOs (óxidos de ferro superparamagnéticos muito pequenos), onde as nanopartículas são inferiores a 50 nm. Na figura 5, visualiza-se, do lado esquerdo, uma imagem de fígado obtida por ressonância magnética e do lado direito, um líquido de nanopartículas de ferro que funciona como agente de contraste na mesma imagem, permitindo a detecção de um cancro [29-32].

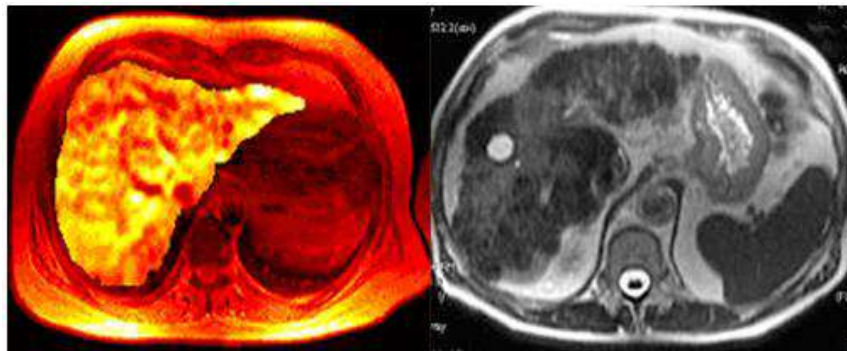


Figura 5: Imagem de um fígado obtido por ressonância magnética; esquerda: obtida por ressonância magnética sem agente de contraste; direita: obtida por ressonância magnética usando um líquido de nanopartículas de ferro como agente de contraste (Adaptado de [<http://www.cienciamao.if.usp.br/cienciasfisicas/index.php?pai nel=12>]).

1.2.5 Hipertermia

A hipertermia é uma terapia para a cura e tratamento do cancro, como já foi referido, onde se provoca um aumento da temperatura numa determinada região do corpo afectada por uma neoplasia, com o intuito de provocar a lise (rebenamento) das células cancerígenas. Estas células, comparadas com as células “vizinhas” normais, são pouco resistentes a aumentos bruscos da temperatura, provocando assim a destruição das células tumorais a uma temperatura de 41-42 °C. Este aumento brusco da temperatura é conseguido, por exemplo, através da utilização de nanopartículas magnéticas, com tamanhos inferiores a 50 nm, que aquecem quando sujeitas à acção de um campo magnético externo de frequências alternadas, sendo a quantidade de corrente proporcional ao tamanho do campo magnético e do tamanho do objecto. O metal resiste ao fluxo de correntes que se encontra no seu interior, dando origem a um processo chamado de aquecimento indutivo, que é bastante fortalecido se esse metal for magnético (por exemplo, ferro). Assim, quando um fluido magnético é exposto a um campo magnético alternado, as partículas tornam-se poderosas fontes de calor, destruindo as células do tumor. O nível de aquecimento é verificado pela temperatura de

Curie (temperatura acima da qual os materiais perdem as suas propriedades magnéticas, e consecutivamente, a sua capacidade de calor) [33, 47].

As nanopartículas magnéticas são empregues em detrimento das micropartículas, uma vez que as primeiras absorvem mais energia de campos externos de uma forma muito mais eficaz [33].

Desde a primeira utilização de óxidos de ferro no aquecimento de tumores que existem duas abordagens distintas. A primeira é chamada de hipertermia magnética e envolve a geração de temperatura, pelas partículas, até aos 45-47 °C, sendo um tratamento aplicado em conjunto com quimioterapia ou radioterapia. A segunda é designada de termoablação magnética, que usa temperaturas entre os 43 e 55 °C, tendo fortes efeitos citotóxicos, quer no tumor, quer nas células normais. Esta técnica é utilizada, pois cerca de 50% dos tumores regridem temporariamente após tratamento de hipertermia com temperaturas até 44 °C, sendo o problema dos efeitos citotóxicos nas células normais reduzido pela injeção intra-tumoral das partículas. Na hipertermia magnética, as nanopartículas magnéticas biocompatíveis são agregadas a anticorpos monoclonais (característicos para proteínas da membrana das células tumorais), que quando aplicados potencializam, no seu conjunto, o contraste de imagens de ressonância magnética, fazendo com que as metástases sejam detectadas de maneira mais eficaz e prematura [38-40].

A potência de aquecimento das partículas é quantificada como a taxa de absorção específica (SAR) e relata a quantidade de energia convertida em calor, por unidade de tempo e de massa.

Para além do tamanho e da forma das partículas, que influenciam as suas propriedades magnéticas (e, conseqüentemente, a sua potência de aquecimento), há também uma dependência entre o aumento da temperatura e a amplitude do campo magnético, que deve ser apreciado quando se comparam experiências com parâmetros de diversos tecidos [41].

1.3 Tecnologias de Produção de Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro

Nos últimos anos têm sido desenvolvidas muitas pesquisas com o intuito de produzir nanopartículas de óxido de ferro estáveis, biocompatíveis e monodispersas. De entre os métodos mais comuns destacam-se a co-precipitação, a decomposição térmica,

a síntese hidrotérmica, a microemulsão e a síntese sonoquímica. Todos estes produzem nanopartículas de óxido de ferro de elevada qualidade e serão referidos neste texto. Para além destes, as nanopartículas podem ser sintetizadas por métodos de síntese electroquímica, síntese bacteriana e pirólise induzida por laser [42].

1.3.1 Co-precipitação

A co-precipitação é o método mais usado para a preparação de Fe_3O_4 e de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Este método baseia-se na mistura de iões férricos e ferrosos numa proporção molar de 1:2 em soluções muito básicas, a temperaturas elevadas ou à temperatura ambiente. A forma e o tamanho das nanopartículas de óxido de ferro dependem do tipo de sal usado (cloretos, sulfatos, nitratos, etc.), da relação dos iões férricos e ferrosos, da temperatura de reacção, do valor do pH, da força iónica e dos parâmetros das outras reacções (velocidade de agitação ou velocidade de adição da solução básica). Este método afecta as propriedades físicas e químicas das partículas de óxido de ferro nanométricas. As nanopartículas de Fe_3O_4 não são muito estáveis sob condições ambientais, sendo facilmente oxidadas a Fe_2O_3 ou dissolvidas em meio ácido. Para evitar a provável oxidação no ar, a síntese de nanopartículas de Fe_3O_4 é feito sob condições anaeróbias [42].

1.3.2 Decomposição Térmica

Têm sido usadas soluções orgânicas na síntese de nanopartículas de óxido de ferro por decomposição térmica. Por outro lado, a decomposição de $\text{Fe}(\text{cup})_3$ (cup = N-nitrosofenilhidroxilamina), de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (acac = acetilacetato) ou de $\text{Fe}(\text{CO})_5$, seguido de oxidação, permite a síntese de nanopartículas monodispersas de óxido de ferro, de elevada qualidade, que normalmente necessitaria de elevadas temperaturas [47].

Apesar deste método possuir imensas vantagens para a produção de partículas monodispersas e com uma distribuição estreita de tamanhos, tem o inconveniente das nanopartículas resultantes serem, habitualmente, dissolvidas em solventes apolares [42].

1.3.3 Microemulsão

Uma microemulsão é uma dispersão isotrópica termodinamicamente estável de duas fases imiscíveis (água e óleo) sob um surfactante presente. As moléculas deste último podem formar uma monocamada na interface entre o óleo e a água, com as

caudas hidrofóbicas das moléculas de surfactante dissolvidas na fase do óleo e os grupos da cabeça hidrofílica dissolvidas na fase aquosa. Nos sistemas binários (água/surfactante ou óleo/surfactante) podem ser formados diferentes tipos de estruturas, variando, por exemplo, as micelas esféricas e cilíndricas para fases lamelares e microemulsões bicontínuas, podendo coexistir com a fase de óleo ou aquosa. Assim sendo, podem ser obtidas nanopartículas de óxido de ferro com forma e tamanho controlado.

Contudo, apesar da presença de surfactantes, a agregação das nanopartículas produzidas necessitam de vários processos de lavagem e tratamentos de estabilização [42].

1.3.4 Síntese Hidrotérmica

A síntese de nanopartículas de óxido de ferro com tamanho e forma controladas é tecnologicamente importante, devido à forte conexão entre estes parâmetros e as suas propriedades magnéticas. A síntese hidrotérmica pode ser realizada recorrendo a várias tecnologias, e consiste na cristalização das substâncias desejadas num recipiente selado a partir da solução aquosa que se encontra a temperaturas elevadas (entre os 130 e 250 °C) e a altas pressões de vapor (entre os 0.3 e 4 MPa). Esta técnica possibilita uma melhor cristalinidade, quando comparada com outros métodos, obtendo-se assim óxidos de ferro altamente cristalinos [42].

Para além disso, a síntese hidrotérmica é propícia à preparação de nanoestruturas incomuns de óxido de ferro, como por exemplo esferas ocas de óxido de ferro [42].

1.3.5 Síntese Sonoquímica

A síntese sonoquímica tem sido uma alternativa competitiva para produzir novos materiais com propriedades incomuns. Os efeitos químicos do ultra-som surgem da cavitação acústica, ou seja, da formação, crescimento e colapso de bolhas em meio líquido. Este colapso cria uma zona quente localizada devido à compressão adiabática ou formação de ondas de choque dentro da fase de gás das bolhas em colapso. Nesta zona, as condições formadas foram determinadas experimentalmente, tendo-se registado temperaturas transientes na ordem dos 5000 K, pressões de 1800 atm e taxas de refrigeração em excesso de 10^{10} K/s. Estas condições são benéficas para formar uma

nova fase, tendo um efeito de corte para a aglomeração, que é apto para a preparação de nanopartículas monodispersas.

Este método tem sido aplicado para a síntese de diversos nanocompósitos, sendo a sua versatilidade manifestada, com êxito, na preparação de nanopartículas de óxido de ferro [42].

Os cinco métodos acima referidos têm várias vantagens e desvantagens para a preparação de nanopartículas de óxido de ferro. Em termos de tamanho e controlo da morfologia destas nanopartículas, a decomposição térmica e hidrotérmica são os melhores métodos a aplicar. Caso se pretenda obter óxido de ferro solúvel em água e nanopartículas biocompatíveis, a co-precipitação é muitas vezes usada, contudo apresenta pouco controlo na forma e na agregação das partículas. Para a obtenção de nanopartículas de óxido de ferro com propriedades magnéticas incomuns, é comum usar-se a síntese sonoquímica [42].

Na tabela 1 apresenta-se uma listagem de trabalhos, discriminando as condições usadas na síntese de nanopartículas de óxido de ferro através dos diferentes métodos conhecidos (reagentes, temperaturas, precursores, métodos e tempo de síntese).

Tabela 1: Resumo de trabalhos publicados sobre síntese de nanopartículas de óxido de ferro

Método	Tipo de Partículas	Precursor	Outros Agentes	T (°C)	Tempo (h)	Referência
Solvotérmico	Magnetite	FeCl ₃ .6H ₂ O	EG NaOH	60 200	10, 4	[43]
Hidrotérmico	Óxidos de ferro	PVP ou CTAB	Nitrato de ferro (III) nonahidratado cloreto de bário, H ₂ O	180 60	24, 12	[44]
—	Óxidos de ferro	Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	EDTA	80, 450	10, 4	[10]
Co-precipitação	Óxidos de ferro	FeCl ₂ .4H ₂ O FeCl ₃ .6H ₂ O	NaOH	72	3	[45]
Co-precipitação	Magnetite	FeCl ₂ .4H ₂ O FeCl ₃ .6H ₂ O	H ₂ O NH ₄ OH DMSA	80	24	[46]
Co-precipitação	Magnetite	Fe ³⁺ Fe ²⁺	NaOH Mistura de alcoxissilanos	—	1	[47]
Co-precipitação	Maghemite	FeCl ₂ .4H ₂ O, FeCl ₃ .6H ₂ O	N(CH ₃) ₄ OH	200	2 ou 24	[48]
Co-precipitação	Maghemite	FeCl ₂	FeCl ₃ Mg(NO ₃) ₂ NaOH HNO ₃	—	—	[49]

Pela tabela 1, verifica-se que por distintos métodos é possível sintetizar nanopartículas magnéticas, sendo que para os mesmos métodos de produção também são usados diferentes parâmetros.

1.4 Propriedades Magnéticas das Nanopartículas

As propriedades magnéticas dos materiais estão correlacionadas com os seus momentos magnéticos (μ), oriundos da dinâmica das cargas eléctricas presentes nos

átomos. Estes momentos magnéticos resultam, em essência, do “movimento” de electrões nos átomos, quer em “torno” do seu núcleo, quer em “volta” do seu próprio “eixo” (spin). Este valor μ deriva parcialmente do magnéton de *Bohr* (μ_B) (valor muito próximo do momento magnético em *spin*), equação (1), onde e representa a carga do electrão, h a constante *Planck*, m a massa do electrão e c a velocidade da luz [50-51].

$$\mu_B = \frac{eh}{4\pi \cdot mc} = 9.27 \times 10^{-24} J \cdot T^{-1} \quad (1)$$

Porém, o momento magnético de um átomo depende também do momento magnético translacional. A conjugação deste momento com o momento de spin produz o momento magnético de um átomo com uma determinada amplitude e direcção.

O comportamento, dependente de vários factores internos e externos (ex. temperatura), entre os átomos de um tipo de material, define o somatório vectorial dos momentos parciais caracterizando magneticamente o material.

Um descritor magnético importante é a indução magnética. A equação (2) mostra a indução magnética (B), que é a resposta dos momentos magnéticos face à colocação do material magnético num campo de intensidade magnética (H). Nesta equação, M representa a magnetização do material, podendo ser designada como o momento magnético resultante por unidade de volume, como mostra a equação (3).

$$B = H + 4\pi M \quad (2)$$

$$M = \frac{\mu}{V} \quad (3)$$

A susceptibilidade magnética (κ), dada pela equação (4), caracteriza a magnetização de um material, sendo definida como aquela que avalia a resposta do material quando sujeito a um campo magnético. Assim sendo, quando o mesmo campo magnético é empregue em dois materiais distintos, o que possui maior magnetização é aquele que tiver um valor de κ superior [50-52].

$$\kappa = \frac{M}{H} \quad (4)$$

1.5 Tipos de Magnetismo

Existem diferentes tipos de comportamentos magnéticos, sendo identificados tendo em conta a forma como actuam na presença de um campo magnético externo, onde se destacam o paramagnetismo, o diamagnetismo, o ferromagnetismo, o ferrimagnetismo e o antiferromagnetismo.

1.5.1 Paramagnetismo

Em materiais paramagnéticos, a magnetização é reduzida através do aumento da temperatura, que também contribui para o aumento da desordem dos momentos magnéticos, sendo que a relação entre a magnetização (M), a temperatura (T) e o campo magnético externo (H), é dada pela equação (5), conhecida como lei de *Curie*, sendo C a constante de *Curie*.

$$M = C \cdot \frac{H}{T} \quad (5)$$

Os materiais paramagnéticos não mostram uma magnetização espontânea, uma vez que os seus momentos magnéticos, que interagem fracamente entre eles, em vez de estarem alinhados, encontram-se desalinhados. E, caso o campo magnético não seja aplicado, eles direccionam-se ao acaso, sendo a magnetização nula. No entanto, quando é aplicado um campo magnético externo, verifica-se uma magnetização do material, resultante do alinhamento (paralelo ao campo aplicado) de alguns dos seus momentos magnéticos, apresentando assim uma magnetização paralela ao campo magnético de reduzida intensidade e valores positivos e pequenos de susceptibilidade magnética [50-52, 53].

1.5.2 Diamagnetismo

Este tipo de magnetismo é relativamente fraco e só é visível na presença de um campo magnético externo. Os átomos deste tipo de materiais também não possuem magnetização, no entanto, quando é aplicado um campo, os momentos do dipolo magnético dos átomos orientam-se no sentido contrário ao desse campo, originando valores de susceptibilidade magnética negativos e pequenos e uma magnetização de pequena intensidade e oposta ao campo magnético aplicado [50-51, 53].

1.5.3 Ferromagnetismo

Os materiais ferromagnéticos possuem momentos atômicos magnéticos que se alinham paralelamente, possibilitando o acoplamento entre estes momentos devido à sua estrutura cristalina e apresentando valores positivos e elevados de susceptibilidade magnética. Depois de ordenados e da extinção do campo externo, o material subsiste magnético para manter, de forma natural, um estado de mais baixa energia. Quando uma substância ferromagnética atinge ou ultrapassa uma certa temperatura crítica (temperatura de Curie), a energia térmica passa a ser suficiente para originar uma direcção casual dos momentos magnéticos, “transformando-se” numa substância paramagnética [50].

A existência de domínios magnéticos no ferromagnetismo também é uma particularidade relevante. Estes domínios são pequenas regiões que se direccionam aleatoriamente umas às outras e em que os momentos magnéticos se ordenam em direcções análogas [50].

Na figura 6 (a), visualiza-se uma amostra sem magnetização em que os momentos magnéticos dos domínios estão alinhados ao acaso (momento resultante é nulo), enquanto na figura 6 (b) se apresenta uma amostra sujeita a um campo magnético externo, o que faz com que os momentos magnéticos se orientem na direcção do campo, atingindo-se assim, um valor de magnetização máximo (M_S – magnetização de saturação).

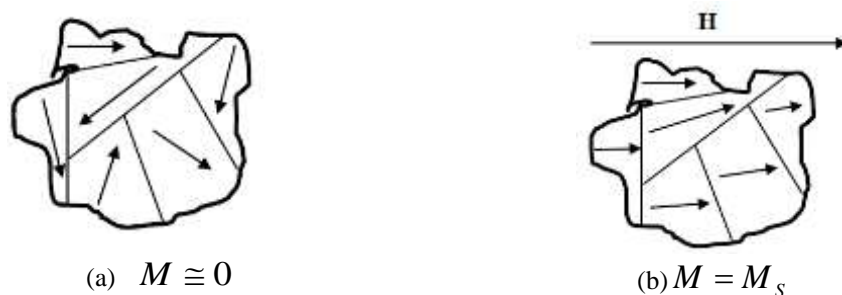


Figura 6: Representação esquemática de um material com multidomínios magnéticos (a) na ausência e (b) na presença de um campo magnético externo (H) (Adaptado de [50]).

1.5.4 Ferrimagnetismo

Este tipo de magnetismo está presente em materiais que possuem momentos magnéticos orientados anti paralelamente e com magnitudes distintas, apresentando, na presença de um campo magnético externo, valores positivos e elevados de

susceptibilidade magnética. Também aqui, tal como no ferromagnetismo, os materiais tornam-se paramagnéticos acima da T_C [50-51].

1.5.5 Antiferromagnetismo

No antiferromagnetismo verifica-se uma magnetização nula, uma vez que este tipo de magnetismo dá-se em materiais que têm momentos magnéticos orientados em direcções contrárias. Quando um campo magnético é aplicado, os momentos alinham-se na direcção do campo, possuindo valores positivos e reduzidos de susceptibilidade magnética, contrariamente ao ferromagnetismo e ferrimagnetismo (que apresentam valores elevados). Neste caso, acima da temperatura de *Néel* os materiais antiferromagnéticos perdem o alinhamento oposto, expondo um comportamento paramagnético [50].

1.6 Domínios magnéticos

Domínios magnéticos são pequenas zonas de magnetização uniforme, características, não específicas, das nanopartículas magnéticas, que reduzem a energia magnetostática dos materiais, podendo estes ser monodomínios ou multidomínios. A energia magnetostática relaciona-se com o número de domínios magnéticos, sendo que, quanto mais pequeno o número destes domínios, maior a energia magnética [54-55].

Nas partículas multidomínios estão presentes paredes do domínio. Estas são regiões de fronteira entre os domínios, que mudam progressivamente o seu alinhamento, fazendo com que a energia essencial para continuar com esta configuração vá reduzindo [53].

Quando a energia para conceber paredes de domínios é maior que a diminuição da energia magnetostática, as partículas de baixas dimensões (entre 10 e 100 nm) são propícias à presença de um só domínio (monodomínio), como se vê na figura 7. Nestes casos, a M_S é atingida com menores campos magnéticos quando comparados a materiais macroscópicos similares.



Figura 7: Monodomínio magnético (Adaptado de [50]).

A rotação coesa dos momentos magnéticos que possibilita a restituição da magnetização é designada de coercividade, possuindo as partículas de monodomínio uma grande coercividade devido ao tamanho das partículas (quanto maior, maior a coercividade) e às anisotropias magneto cristalinas (em materiais de monodomínio, tem a ver com o nível de complexidade de restituição da direcção de magnetização) [53-54].

Num nível mais global, a anisotropia magnética relaciona-se com o alinhamento, numa dada direcção, dos momentos magnéticos, mostrando a equação (6) a energia necessária para esse alinhamento. Nesta equação, K representa a constante de anisotropia magnética e θ o ângulo entre a magnetização de saturação (M_S) e o eixo de magnetização mais acessível [54].

$$E_a = Ksen^2\theta \quad (6)$$

1.7 Curva de Histerese

As propriedades dos materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos podem ser representadas, de uma forma sucinta, pela curva de histerese, podendo um exemplo desta ser visualizada na figura 8.

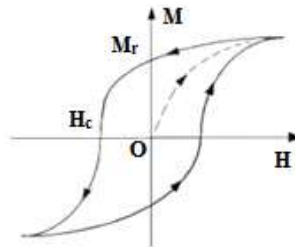


Figura 8: Curva de histerese (Adaptado de [52]).

A linha a tracejado presente na figura 8, que segue uma curva de magnetização, representa um material desmagnetizado. Se o campo magnético (H) for diminuindo, a magnetização também irá reduzir, alcançando-se um valor residual de magnetização remanescente (M_r) quando $H = 0$. Quando o campo é aplicado no sentido oposto, a magnetização é reduzida a zero, bastando para tal que o campo coercivo (H_c) seja aplicado [52].

O aumento do número de regiões que possuem as direcções de magnetização alinhadas com o campo magnético faz com que os movimentos das paredes dos

domínios magnéticos surjam. Por outro lado, a rotação dos momentos magnéticos que se alinham com o campo magnético aparece quando o fenómeno do mecanismo do movimento das paredes se torna inviável. Estes dois procedimentos estão presentes na varredura de M em função de H , visível na figura 8. Por sua vez, o tamanho da partícula é essencial (em alguma parte, não na totalidade) na determinação da forma da curva. Para partículas grandes (multidomínios) a curva de histerese obtida é estreita, visto que a energia essencial para mover as paredes do domínio magnético é baixa. A curva de histerese será larga para partículas pequenas (monodomínio), pois para rodar os momentos na direcção do campo magnético é preciso muita energia [50, 52].

1.8 Influência do Tamanho da Partícula na Magnetização

Existem alguns estudos em que se constata que a magnetização em materiais macroscópicos é maior que a magnetização em nanopartículas, como os exemplos descritos a seguir.

Segundo Coey e Kodama [56-57], em materiais macroscópicos, o efeito da comparência de ligações quebradas e da anisotropia com intensidade e direcção definida, que provocam a desordem da superfície das partículas, não é tao notório como no caso de partículas mais pequenas. Nestas últimas partículas, os momentos magnéticos, quer das camadas superficiais, quer do interior, são igualmente relevantes, visto que existe um aumento da relação área/volume. Por seu lado, segundo Sato [58], as camadas magneticamente mortas (cerca de 1 nm de espessura) possuem uma constante de anisotropia magneto cristalina mais pequena, fazendo com que a magnetização diminua.

Contudo, as causas que contribuem para que a magnetização diminua com a redução do tamanho das partículas ainda gera bastantes incertezas, sendo necessário uma investigação mais detalhada.

1.9 Materiais Magnéticos Moles e Duros

Os materiais que mantêm o magnetismo mesmo após a magnetização são denominados de materiais magnéticos duros ou imanes permanentes, usufruindo de um campo coercivo de, aproximadamente, 10 kA/m. Por outro lado, os materiais que ficam magnetizados e que perdem a magnetização, ambas de uma maneira bastante simples, são materiais magnéticos moles. Estes, para além de possuírem uma baixa coercividade,

também exibem permeabilidade magnética elevada e uma baixa perda por histerese, sendo bastante influenciados pela presença de contaminações [50, 59].

1.10 Superparamagnetismo

As nanopartículas magnéticas ferromagnéticas e ferrimagnéticas sofrem uma mudança de comportamento quando são menores que um determinado diâmetro crítico (D_c), deixando de apresentar comportamento ferrimagnético e ferromagnético para passarem a ter um comportamento superparamagnético, acontecendo tal facto a temperaturas inferiores a T_C . Nessas zonas em que o tamanho é inferior a D_c , a redução da energia relativa à anisotropia acontece até que surja um valor de energia térmica capaz de “combater” a direcção preferida do momento da partícula. Este comportamento superparamagnético surge em nanopartículas monodomínio, sendo a magnetização vista como um grande e só momento magnético. A coerência da magnetização pode ser conseguida num curto espaço de tempo e sob temperaturas experimentais, verificando-se valores de susceptibilidade magnética elevados, ou seja, são magnetizadas de uma forma bastante acessível [5, 7, 50, 53, 60].

As energias térmicas e magnéticas contribuem para saber se o material se situa no estado superparamagnético ou bloqueado, podendo ser reconhecido pelas curvas de magnetização (a coercividade, a magnetização nula e a temperatura de bloqueio são as principais características). As curvas de magnetização em função da temperatura (com arrefecimento em campo nulo - *ZFC* e no campo de medida - *FC*) são responsáveis pela obtenção da temperatura de bloqueio (T_B). Esta proporciona uma passagem, ou seja, abaixo de T_B os momentos magnéticos encontram-se bloqueados e acima as partículas deixam de estar no estado bloqueado, comportando-se como partículas superparamagnéticas [50, 53, 60-61].

Numa curva *FC*, a amostra estudada é arrefecida até uma temperatura muito reduzida, sob a acção de um campo magnético. Posteriormente, a magnetização é medida enquanto a amostra volta a ser aquecida até perfazer uma temperatura mais elevada que T_B . Por outro lado, na curva *ZFC*, a amostra também é arrefecida, mas neste caso na ausência de campo magnético. Contudo, é aplicado um campo muito reduzido de forma a possibilitar a execução da medida. Em seguida, e durante a avaliação da magnetização, a amostra é aquecida, mas contrariamente à curva *FC*, até ultrapassar a T_B média [62].

Em partículas superparamagnéticas não existe histerese, pois os momentos magnéticos de cada uma das partículas orientam-se paralelamente num único sentido, levando a que a magnetização residual (M_r) e o campo coercivo (H_c) sejam nulos, como se pode observar na figura 9 [60].

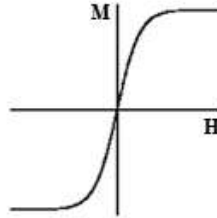


Figura 9: Curva de histerese de uma partícula superparamagnética (Adaptado de [60]).

No superparamagnetismo existe a possibilidade de alterar e reverter a orientação da magnetização das nanopartículas. A equação (7) representa a equação de *Néel-Arrhenius*, onde τ_N é o tempo médio entre duas variações de direcção (designado de tempo de relaxação de *Néel*, podendo tomar valores de nano segundos ou até mesmo anos), τ_0 é o tempo ou período de tentativa (toma valores de 10^{-9} ou 10^{-10} s), K representa a anisotropia magnética da partícula, V o volume da partícula, T a temperatura e k_B a constante de *Boltzman* [4, 63].

$$\tau_N = \tau_0 e^{\left(\frac{KV}{k_B T}\right)} \quad (7)$$

Quando o tempo de medida da magnetização é menor que τ_N , a magnetização assume os valores do momento magnético das partículas. Por outro lado, a magnetização medida é zero quando o seu tempo de medida for muito superior a τ_N [64].

Nas seguintes secções, visando o estudo do escoamento das nanopartículas produzidas em sangue sob a acção de um campo magnético externo aplicado, descreve-se sumariamente o que são microcanais, bem como o material e a técnica usada para a sua fabricação.

1.11 Microcanais

Os microcanais são uma parte integrante de um microdispositivo, sendo projectado com uma determinada geometria com o intuito de possibilitar o transporte de fluidos contendo suspensões de células ou partículas, de um local do dispositivo para outro. Os microcanais na maioria das vezes funcionam de uma forma semelhante aos vasos capilares existentes no corpo humano, sendo estes frequentemente fabricados por litografia suave. O PDMS é o material mais utilizado neste tipo de microfabricação. Contudo, numa primeira fase o desenho da estrutura dos microcanais deve ser realizado por intermédio de um *software* de desenho designado por *AutoCAD* [65].

1.11.1 Fotolitografia

A fotolitografia foi uma tecnologia desenvolvida pela indústria microelectrónica, nas décadas de 70 e 80, sendo o silício o primeiro material a ser empregue. No entanto, face aos seus custos elevados e a algumas das suas propriedades (inércia química, propriedades eléctricas, etc.) o silício foi sendo substituído, ao longo do tempo, pelo vidro e quartzo. Apesar destes materiais possuírem características de superfície ajustadas para várias aplicações, a sua utilização é bastante limitada a poucos grupos de investigação, uma vez que, para a fabricação de microcanais, para além da instrumentação necessária ser de elevado valor monetário, também são imprescindíveis a utilização de salas “limpas” [66].

Esta técnica, inicialmente, foi desenvolvida para a reprodução de gravuras e fotografias, sendo actualmente empregue na fabricação de constituintes de sistemas de microfluídica. A fotolitografia baseia-se na gravação de estruturas/desenhos micrométrica(o)s (entre os 10 e 100 μm) sobre um substrato, sendo que estas estruturas são primeiramente criadas com o auxílio de um software de modelação geométrica (*AutoCAD*) e, posteriormente, impressas numa placa transparente (máscara) [65-66].

A primeira etapa propriamente dita desta técnica, consiste em limpar o substrato de silício, usando por exemplo, álcool isopropílico, solução piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$), entre outros. Esta é uma etapa crucial, pois numa escala tão pequena (na ordem dos 10^{-6} m), qualquer impureza ou pó pode afectar, quer o processo, quer impedir uma má adesão do fotorresiste (resina) ao substrato. Na segunda etapa distribui-se, regularmente sobre esse substrato, uma camada de fotorresiste, usando para tal um equipamento de rotação (*spin-coating*), sendo que os fotorresistes podem ser negativos ou positivos. O fotorresiste positivo, à medida que é exposto à luz ultravioleta (UV), torna-se mais

solúvel, enquanto o fotorresiste negativo resiste a ligações cruzadas e é cada vez menos solúvel. Na terceira etapa é necessário proceder-se a um tratamento térmico, por forma a eliminar o excesso de solvente e possibilitar que a resina fique mais fortemente aderida. Depois, na quarta etapa, o fotorresiste é exposto a uma determinada radiação (UV) onde a resina vai tomar a forma desejada pelo uso da máscara. Na quinta etapa, conhecida como revelação, o fotorresiste é imerso numa solução química que vai remover, ou as partes que não foram polimerizadas, ou as regiões que toleraram decomposição. Na figura 10 pode observar-se algumas destas etapas [65, 67].

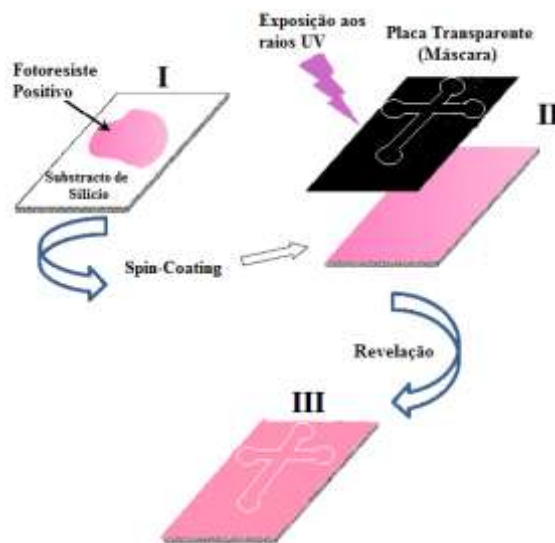


Figura 10: Representação da 2ª, 4ª e 5ª etapa da fotolitografia (Adaptado de [67]).

1.11.2 Litografia Suave

Como já foi referido, o material mais usado na fabricação dos microcanais é o PDMS, estando representado na figura 11 a sua estrutura química.

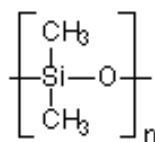


Figura 11: Estrutura química do PMDS (polidimetilsiloxano) (Adaptado de [http://www.escolainterativa.com.br/canais/18_ vestibular/estude/quimi/tem/qui_tem134.asp]).

Este torna-se um elastómero sob a acção de um agente de cura e de aquecimento, sendo durante a passagem de líquido para sólido que o PDMS se modela às

in correcções e estruturas da superfície onde é depositado, visualizando-se este processo na figura 12 e ocorrendo após as etapas de fotolitografia, anteriormente descritas [67].

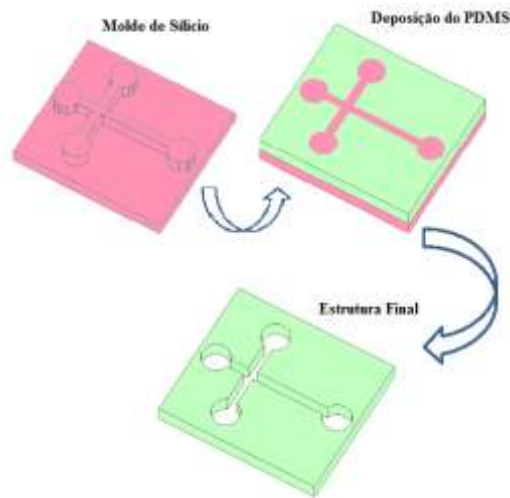


Figura 12: Etapas, após a fotolitografia, para a obtenção da estrutura final em PDMS. Este processo é designado de litografia suave (Adaptado de [68]).

Este material polimérico possui um tempo de vida prolongado, é um material barato, quimicamente estável e com boas propriedades ópticas (muito importante na observação de escoamento), reduzidas absorções de água e condutividade, termicamente estável até aos 186 °C (permitindo que ocorra a cura térmica), com uma elevada temperatura de deformação e uma baixa energia potencial, possibilitando que o desprendimento dos moldes (nos processos de microfabricação por moldação) seja um processo bastante mais acessível. Outra das principais vantagens é a habilidade de adesão do PDMS contra alguma superfície, fazendo com que os canais resultantes não sofram nenhuma deformação. O facto de possuir características hidrofóbicas constitui o seu principal inconveniente, uma vez que assim é mais difícil que toda a superfície do canal seja molhada, emergindo bolhas de ar aprisionadas nos cantos dos canais. Outro dos inconvenientes é que a elevados caudais, devido à elevada pressão, pode ocorrer a expansão e a deformação dos canais [68-72].

1.12 Objectivos e Enquadramento

Neste trabalho pretende-se, primeiramente, sintetizar nanopartículas magnéticas por um processo hidrotérmico em que se faz variar alguns parâmetros, nomeadamente a quantidade de precursor ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), a quantidade de NaOH e a temperatura de síntese. Posteriormente, procede-se à caracterização de cada uma das partículas

produzidas, recorrendo a várias técnicas, como o Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), a Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV-Vis), a Microscopia de Força Atómica (AFM), a Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e a Difracção de Raios-X (XRD), com o objectivo de verificar se possuem características para serem aplicadas no tratamento de células cancerígenas (hipertermia magnética). Numa segunda fase estudou-se o escoamento do sangue, contendo nanopartículas em suspensão, com o intuito de verificar a influência destas na camada de plasma. Utilizaram-se para o efeito microcanais de vidro para simular os vasos sanguíneos. Por razões explicadas mais à frente não foi possível utilizar microcanais em PDMS (objectivo original) fabricados usando fotolitografia suave. Nos estudos de escoamento foram aplicados diferentes campos magnéticos para verificar os efeitos sobre a camada de plasma. Por outro lado, o escoamento em soro fisiológico também foi estudado, com o intuito de verificar a influência do campo magnético na área de partículas que se aglomeram junto à parede do microcanal.

Capítulo 2: Parte Experimental

2.1 Preparação das Nanopartículas Magnéticas (Óxido de Ferro)

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro usadas neste trabalho foram sintetizadas por um método solvotérmico adaptando procedimentos descritos na literatura [43]. Num procedimento típico, dissolve-se 5 mmol de precursor $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ou 1.3515 g) em 20 ml de etilenoglicol (EG), sendo posteriormente adicionado 20 mmol (ou 0.80 g) de hidróxido de sódio (NaOH) na mistura resultante. Para a dissolução do NaOH é necessário proceder à sua trituração e aquecimento em banho-maria, visto que assim a sua dissolução é muito mais rápida. 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 depositada num reactor em aço inoxidável (Parr Acid Digestion Vessel, Model 4748, figura 13) e colocada numa estufa a 180 °C durante 6h. Terminado o tempo de exposição térmica, retira-se o reactor deixando-se arrefecer até à temperatura ambiente. Após esta fase, abre-se o reactor e procede-se à filtração sob vácuo do conteúdo do reactor, seguido de lavagem com água e secagem em estufa a uma temperatura de 40 °C durante 24 h. A massa das partículas assim obtidas permite o cálculo do rendimento da síntese. Todo este procedimento foi repetido na síntese de cada amostra (mais 5 vezes), tendo-se obtido, no final, 6 tipos distintos de nanopartículas, por variação da quantidade de precursor (entre 2.5 mmol e 10 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), da quantidade de NaOH (entre 10 e 30 mmol) e da temperatura de síntese (180 ou 200 °C). Na tabela 2 resumem-se as condições usadas na preparação de cada uma das amostras e apresenta-se a nomenclatura definida para cada uma delas.



Figura 13: Reactor Parr Acid Digestion Vessel, Model 4748.

Tabela 2: Condições para a preparação das amostras.

Nomenclatura Definida	Precursor (mmol)	NaOH (mmol)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
NP1	5	20	6	180
NP2	2.5	20	6	180
NP3	10	20	6	180
NP4	5	10	6	180
NP5	5	30	6	180
NP6	5	20	6	200

Neste trabalho, mais propriamente no escoamento sanguíneo com nanopartículas, também vão ser estudadas dois tipos de nanopartículas comerciais, estando estas representadas na tabela 3.

Tabela 3: Nanopartículas comerciais usadas neste trabalho.

Nome do Produto	Nomenclatura Definida	Fórmula
Óxido de Ferro (III)	NPC	Fe ₂ O ₃
Fluid-MAG-CT ¹	NPCE	Fe ₃ O ₄

2.2 Caracterização das Nanopartículas Magnéticas

Existem variadíssimas formas para proceder à caracterização de Nanopartículas Magnéticas, contudo, neste trabalho foram usados 5 métodos: o Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), a Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV-Vis), a Microscopia de Força Atômica (AFM), a Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e a Difracção de Raios-X (XRD).

2.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O DLS, também designado de espectroscopia de fotões (PCS), é uma técnica invasiva usada para medir o tamanho de partículas que se “encontram” na faixa dos nanómetros ou dos micrones, em soluções coloidais. Esta técnica usa um laser que é

¹ Partículas superparamagnéticas com revestimento de ácido cítrico e sal de sódio.

responsável pela iluminação da amostra, sendo a intensidade da luz espalhada dependente do tamanho da partícula [73-75].

As partículas que se encontram suspensas num líquido nunca estão paradas, movem-se constantemente, devido ao movimento *Browniano* e às colisões casuais com as moléculas do meio de dispersão. As partículas pequenas, comparativamente com as de maior dimensão, movimentam-se mais rapidamente, sendo que as maiores, pelo facto de se deslocarem mais lentamente, dispersam mais o laser. Na figura 14 visualiza-se um esquema de espalhamento de luz para partículas pequenas e grandes, em função do tempo [73-74].

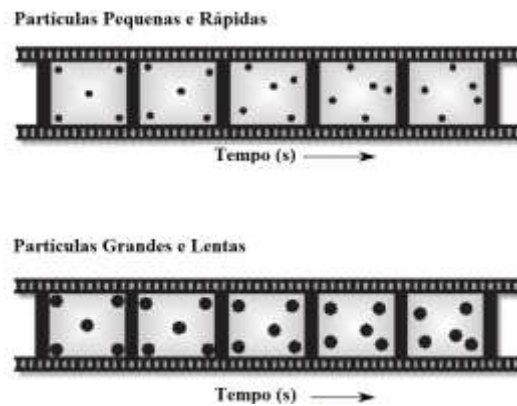


Figura 14: Espalhamento de luz para partículas pequenas e grandes, em função do tempo (Adaptado de [73]).

A equação (8) representa a equação de *Stokes-Einstein*, que é definida como a relação entre o tamanho da partícula e a velocidade resultante do movimento *Browniano*, onde D_H representa o diâmetro hidrodinâmico, k a constante de *Boltzmann*, T a temperatura absoluta, η a viscosidade e D o coeficiente de difusão translacional [73-74].

$$D_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (8)$$

O espalhamento de luz dinâmico permite adquirir conhecimentos relativamente à composição superficial das partículas (o método é sensível ao diâmetro hidrodinâmico efectivo), viabiliza a determinação da distribuição do diâmetro das partículas (e não apenas do diâmetro médio - caso do espalhamento de luz estático), sendo estas algumas das vantagens desta técnica. Contudo apresenta alguns inconvenientes, sendo um deles

o facto de a concentração da amostra ter de ser razoavelmente elevada, de forma a assegurar um sinal alto [74].

No presente trabalho, para realizar a caracterização das nanopartículas magnéticas foi necessário, primeiramente, otimizar o procedimento com partículas de poliestireno (prepararam-se amostras com concentração de 0.02% num volume de 3 ml de H₂O). Testou-se com este tipo de partículas, uma vez que o equipamento usado (*Malvern Zetaziser Nano Series*) para esta caracterização requeria a introdução de certos parâmetros (número de *ensaios* e *medidas* que se queria efectuar, o tempo que se queria esperar até a máquina começar com a medida e o tempo que demoraria a efectuar cada *ensaio*). Assim, os melhores parâmetros foram escolhidos comparando-se os diâmetros obtidos nestes testes com os valores reais (dados fornecidos pelo fabricante, IKERLAT polymers). Após vários testes, optou-se por fazer 13 *ensaios* e 3 *medidas*, usando um *tempo de estabilização* de 300 s e um *tempo de ensaio* de 120 s.

De seguida efectuou-se o estudo das nanopartículas magnéticas, tendo-se preparado amostras de 1% de concentração num volume de 1 ml (depois de preparada esta concentração, pode-se fazer diversas diluições para a concentração que se deseja, nomeadamente de 0.02%). Como solvente testou-se a utilização de H₂O, Dextrano 40 (Dx40), PBS, Etanol e misturas de H₂O com Etanol, sendo, posteriormente, a suspensão obtida agitada no vórtex. Para a correcta caracterização dos materiais foi necessário introduzir também no equipamento os valores do índice de refacção e de absorção (no poliestireno não houve esta necessidade, pois são valores que já se encontram incorporados no software). O índice de refacção foi atribuído segundo [73], enquanto que para a absorção se utilizou um espectrofotómetro de ultravioleta-visível (UV-Vis) (*Perkin – Elmer Spectrum*) para a determinação dos valores individuais de cada amostra. Por fim, introduz-se uma cuvette de plástico no equipamento de DLS com uma altura entre os 10 e os 15 mm. Na figura 15 visualiza-se um esquema da preparação das partículas magnéticas para a visualização das mesmas.

Este tipo de caracterização foi realizada no laboratório do CEIT (Instituição de acolhimento no âmbito do programa Erasmus), utilizando o equipamento *Malvern Zetaziser Nano Series*.

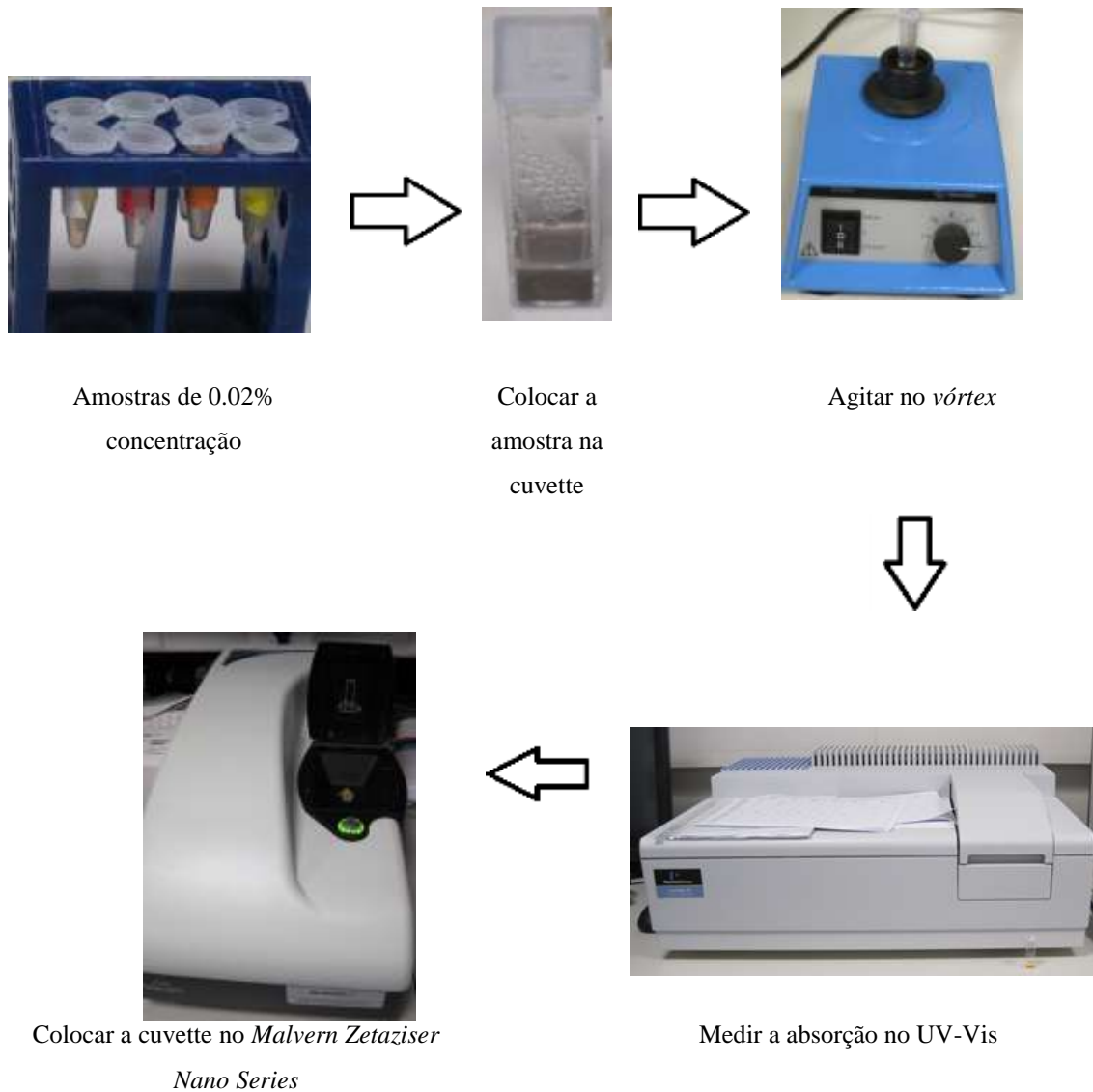


Figura 15: Preparação das nanopartículas para observar no *Malvern Zetasizer Nano Series*.

2.2.2 Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Esta técnica consiste no uso de fótons na gama do ultravioleta ($200 < \lambda < 400$ nm) e na gama da luz visível ($400 < \lambda < 800$ nm) para a determinação dos valores de absorção individuais de cada amostra, como mencionado anteriormente. Nesta gama de energias as moléculas sofrem interações com os fótons, sendo as partículas em suspensão influenciadas pela onda electromagnética incidente [76].

O espectrofotómetro, instrumento empregue nesta técnica, é constituído por uma fonte de radiação electromagnética (luz), um agregado de componentes ópticos responsáveis pelo “encaminhamento” da luz à amostra, um compartimento para a amostra (*cuvette*) e por um ou mais detectores que têm a função de mensurar a

intensidade da radiação. Na figura 16 encontra-se uma imagem do funcionamento básico do espectrofotómetro [76].

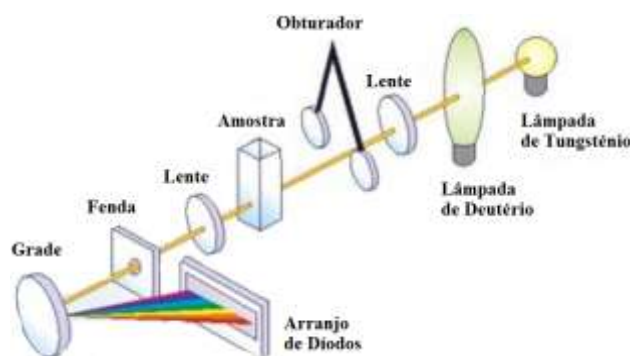


Figura 16: Ilustração do funcionamento básico do espectrofotómetro (Adaptado de [76]).

A análise espectrofotométrica consiste na aplicação da Lei de *Lambert-Beer*, equação (9), que traduz a proporcionalidade da absorvância A com o caminho óptico b e a concentração c das espécies absorventes. ϵ é uma constante de proporcionalidade que se modifica consoante a substância, sendo designada de coeficiente de extinção ou absortividade molar [76].

$$A = \epsilon * b * c \quad (9)$$

A espectrofotometria UV-Vis é bastante popular, visto que é uma técnica de fácil manuseamento, que possui baixo custo operacional e em que os resultados obtidos são bastante compreensíveis e rápidos de obter [77].

Como já foi referido, esta técnica foi utilizada neste trabalho como técnica complementar da técnica DLS apresentada anteriormente. Deve-se ter particular atenção ao facto de, neste processo, apenas se estudar os valores na gama da luz visível, uma vez que o comprimento de onda relevante situa-se nos 623.8 nm (valor do laser que o *Zetasizer* consegue ler). Todo este procedimento foi feito no laboratório do CEIT, com o equipamento *Perkin – Elmer Spectrum*.

2.2.3 Microscopia de Força Atómica (AFM)

O microscópio de força atómica (AFM), também designado de SFM (*Scanning Force Microscope*), serve-se das forças sonda-amostra para delinear o mapa da superfície, sendo apto para conceber imagens de superfícies condutoras e não condutoras [78-82].

O AFM baseia-se na avaliação dos desvios de um suporte (na sua ponta livre encontra-se a sonda), sendo estes desvios originados pelas forças que actuam entre a sonda e a amostra. Estas forças são principalmente de atracção (forças de *Van Der Walls*) e de repulsão. As primeiras operam a uma distância de cerca de 100 nm e as segundas actuam no momento em que a ponta toca a superfície, sendo oriunda do princípio de exclusão de *Pauli* (dois corpos não podem habitar o mesmo lugar no espaço) [79-81].

Na figura 17, observa-se um esquema do sistema de microscopia óptica.

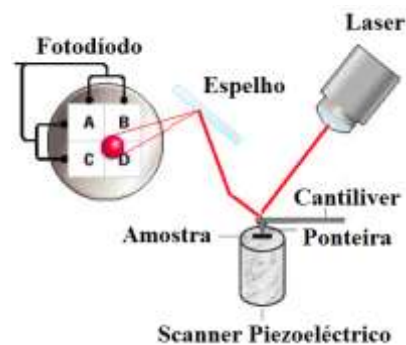


Figura 17: Esquema de um AFM (Adaptado de [82]).

A técnica de microscopia de força atômica possui três modos de funcionamento:

- **Modo de contacto:** o cantilever (braço de apoio para a ponteira) encontra-se a uma distância muito próxima (poucos Å) da superfície da amostra, sendo a força repulsiva a dominante. Neste modo de funcionamento a ponta toca muito levemente a amostra;
- **Modo de não-contacto:** a força dominante é a força atractiva, situando-se o braço a algumas centenas de Å da superfície da amostra. Nesta situação a ponteira oscila a elevadas frequências (100 KHz a 1 MHz). Devido a estas oscilações, a sensibilidade do microscópio vai aumentar, fazendo com que as foças electrostáticas e de *Van Der Walls* sejam reveladas;
- **Modo de contacto intermitente (*tapping*):** a única diferença para o modo de não-contacto, é que aqui a ponteira fica mais perto da amostra, garantindo que exista um contacto intermitente. Neste modo de operação

a agulha do cantilever vibra sobre a superfície da amostra em elevadas frequências (centenas de KHz) [83-84].

Na figura 18, pode-se visualizar uma representação esquemática destes três modos de operação.

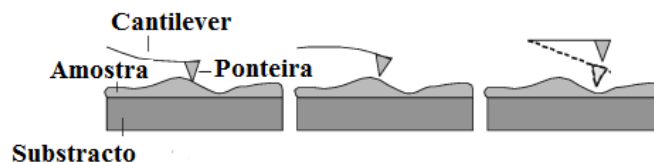


Figura 18: Representação esquemática, da esquerda para a direita, do modo de contacto, não-contacto e intermitente (Adaptado de [84]).

O facto de o AFM permitir o uso de amostras condutoras e não condutoras e de não existir necessidade de um recobrimento antecipado da superfície, o que proporciona a análise de diferentes materiais, é a principal vantagem da aplicação desta técnica. Outras das vantagens, é o facto de no AFM não ser necessário nenhum método específico na preparação das amostras, o possibilitar a quantificação directa da rugosidade da amostra e o estudo de amostras submersas em meio líquido, entre outras. No entanto, esta técnica possui algumas limitações quando se trabalha com polímeros, como por exemplo, o elevado grau de complexidade da estrutura, a pouca organização e o baixo módulo de elasticidade e de cristalinidade deste tipo de materiais [85-87].

Neste trabalho, tal como no DLS, testou-se inicialmente a técnica AFM com partículas de poliestireno, com o intuito de averiguar se os diâmetros obtidos estariam de acordo com os encontrados no *Zetasizer*, analisando-se, posteriormente, as nanopartículas magnéticas. O modo de preparação das amostras e a concentração empregue é exactamente igual ao das técnicas anteriores.

No entanto, antes de fazer a visualização das partículas no AFM é necessário lavar os cristais com solução piranha ($H_2SO_4 + H_2O_2$) a uma temperatura de cerca de 80 °C para que as impurezas não interfiram nos resultados, demorando esta etapa cerca de 30 min. Depois, os cristais são lavados com água e colocados em ultra-sons durante 30 min. De seguida, procede-se a uma lavagem com acetona (em ultra-sons durante 5 min) e etanol (também durante 5min em ultra-sons), secando-se, por fim, os cristais com uma bomba de ar de nitrogénio. Posteriormente aplica-se uma gota da amostra num cristal e leva-se ao *spin coating*, que tem como objectivo espalhar as partículas. Aqui, usou-se

uma velocidade de rotação de 1500 rpm e um tempo de 120 s. Por último, coloca-se o cristal no microscópio de força atómica, estando todo este processo ilustrado na figura 19.

Esta técnica de caracterização efectuou-se na sala limpa do CEIT, com o equipamento *JPK Instruments TopView Optics™*.

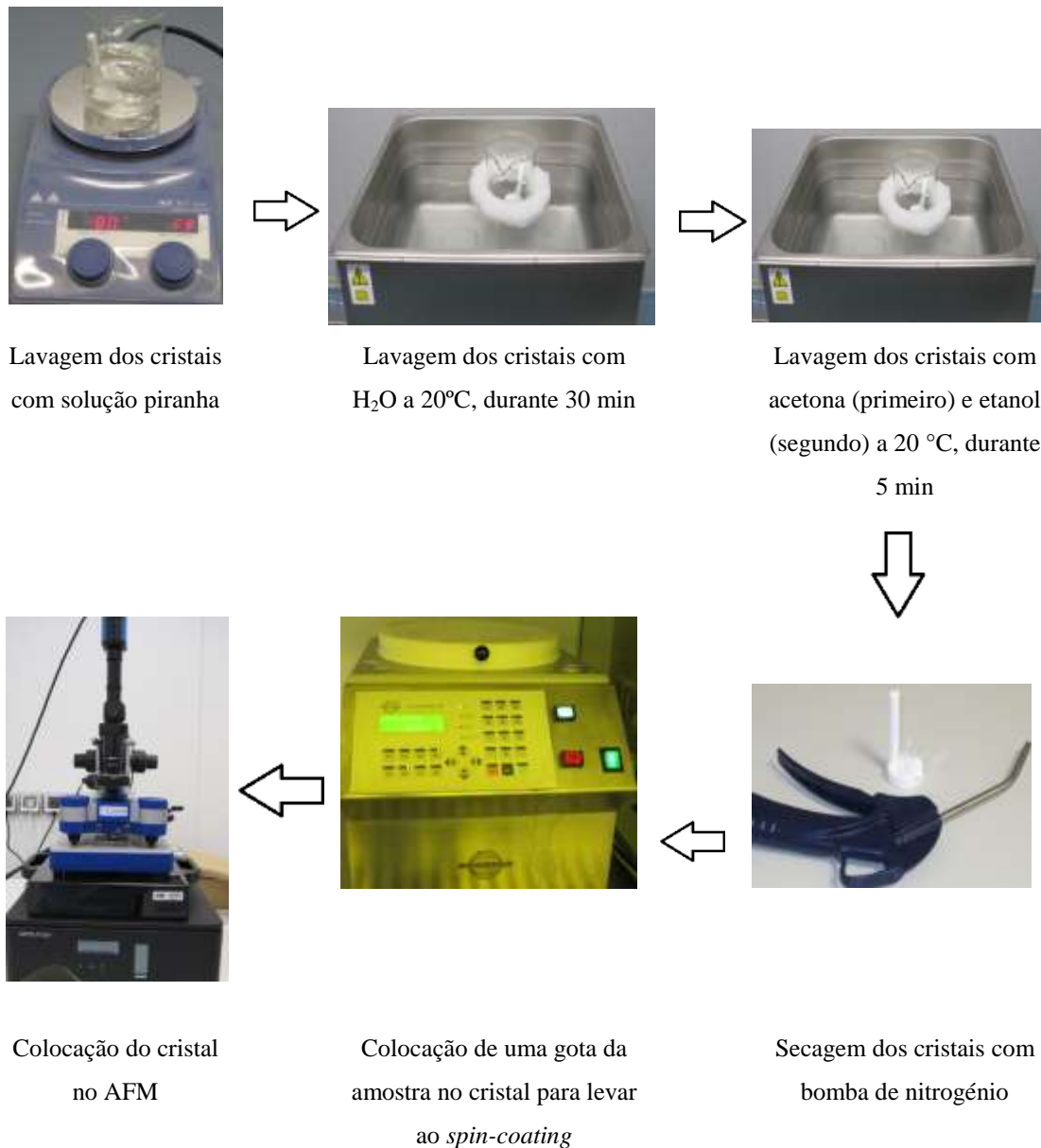


Figura 19: Procedimento para observação das nanopartículas no AFM.

2.2.4 Microscópio Electrónico de Varrimento (SEM)

O facto de o microscópio electrónico de varrimento (*Scanning Electron Microscope – SEM*) emitir um feixe de electrões e permitir que estes entrem em

contacto com a amostra, torna possível a observação e caracterização (ao nível da morfologia e da organização ultra-estrutural) de materiais heterogêneos (orgânicos e inorgânicos), ao nível nanométrico (nm) ou micrométrico (μm). Esta técnica proporciona a aquisição de imagens numa gama de ampliações entre 10x e 18000x, com profundidade de campo de cerca de 30 μm . Em certos casos, a espectroscopia dispersiva de Raios-X (EDS) está aliada à técnica de SEM, possibilitando um estudo das propriedades e uma análise química do material [88].

O microscópio electrónico de varrimento é formado por uma fonte monocromática de electrões, que são condensados pelas lentes condensadoras e pela lente objectiva, permitindo que a amostra colocada na câmara de amostras (local onde se realizam varrimentos) seja atingida pelo feixe de electrões. Também fazem parte do SEM detectores para os sinais e sistemas de vácuo e de arrefecimento, podendo-se observar na figura 20 um esquema geral deste microscópio. [89-91]

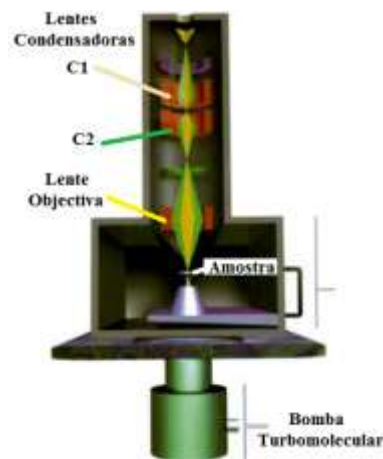


Figura 20: Esquema do microscópio electrónico de varrimento (SEM) (Adaptado de [92]).

Neste tipo de microscopia é usada uma fonte termo-iónica e uma fonte de emissão por efeito de campo (FEG – *Field Emission Gun*) para a criação de electrões.

No primeiro caso (SEM com uma fonte termo-iónica), um feixe de electrões (de diâmetro reduzido) incide num ponto da superfície da amostra e, subsequentemente procede-se à recolha dos sinais electrónicos emitidos pelo material. O feixe de electrões utilizados para percorrer as amostras originam-se de um filamento de tungsténio (W) aquecido, actuando a uma tensão entre valores de 1 e 50 kV e são focados por um sistema de lentes electromagnéticas [91, 93-96].

No segundo caso (SEM com uma fonte de emissão por efeito de campo - FEG), o principal modo de funcionamento consiste na geração de campos eléctricos intensos em formas pontiagudas. Aqui a amostra é submetida a altíssimo vácuo e é atingida por um feixe de electrões, sendo empregues uma série de lentes electromagnéticas com o intuito de evidenciar esse mesmo feixe e de amplificar o sinal transmitido [93].

Os electrões secundários (ES) e retro-difundidos (ER) são os sinais mais relevantes para a formação de imagens no SEM (ES usados na formulação da imagem da amostra e ER diferencia, na amostra, as regiões de átomos leves e pesados), visto que são aqueles que interagem na zona superficial da amostra, facultando a topografia da superfície. Na figura 21, observa-se estes e outros tipos de radiações, bem como o volume de emissão para cada um deles [91, 96].

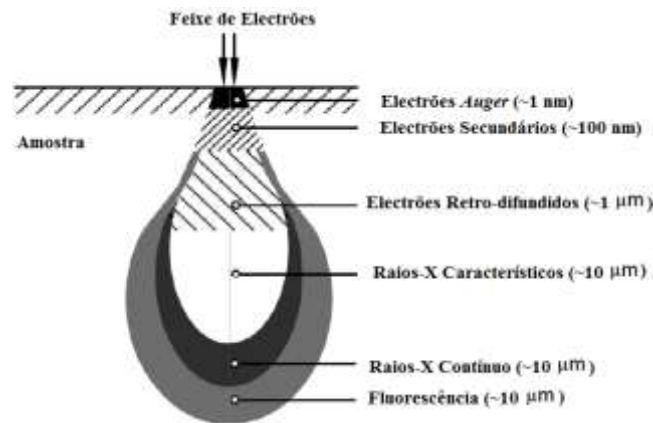


Figura 21: Tipos de radiação e respectivo volume de emissão (Adaptado de [http://www.iap.tuwien.ac.at/~werner/qes_tut_interact.html]).

Os electrões secundários são electrões de baixa energia (menores que 50 eV), oriundos da interacção não elástica dos electrões primários com electrões fracamente ligados. Formam imagens com elevada resolução (3-5 nm), visto que a emissão de ES está restringida a uma área pequena, perto da zona de impacto do feixe de electrões e permitem a visualização da topografia da amostra com uma profundidade de foco elevada. Os electrões retro-difundidos são electrões emergentes das camadas profundas do material (energia análoga ao feixe incidente), com elevados ângulos de difusão, consequentes de colisões elásticas e têm um valor de energia cinética elevado (maior que 50 eV), gerando imagens de menor resolução espacial comparativamente às obtidas com ES. [88, 92, 94-95, 96]

Para que as amostras possam ser caracterizadas pelo uso do SEM têm de estar sujeitas a algumas condições, como por exemplo, apresentar boa condutividade, fazendo com que os electrões do feixe possam varrer a superfície e interagir com o material, devem ser sólidas, com dimensões compatíveis com as da câmara do microscópio, apresentarem alguma condutibilidade e possuírem estabilidade em vácuo (pressão a rondar 10^{-4} Pa). Caso a amostra não seja condutora é essencial aplicar uma camada ultrafina de um material condutor sobre a amostra, como por exemplo ouro, platina, tungsténio, carbono ou grafite. Tal é alcançado através do aquecimento do metal sob vazio, depositando-se sobre a amostra à medida que se vai vaporizando, usando-se para tal um *sputter*. [88-89, 91, 94, 96, 97]

Nesta técnica, para o caso FEG-SEM, prepararam-se suspensões de nanopartículas com uma concentração de 0.5% num volume de 400 μ l de H₂O. Para o caso SEM, usou-se como solvente uma mistura de H₂O (30 ml) com Etanol (70 ml) e considerou-se uma concentração de 1% num volume de 1 ml desse solvente (preparando-se, depois, uma amostra de 0.02%). Depois de preparadas as suspensões anteriores, num procedimento típico, coloca-se de seguida uma gota da amostra num *stubb* (utensilio requerido para visualizar a amostra) e deixa-se secar durante 2 dias em estufa. Após esta etapa, leva-se o *stubb* ao *sputter* para que as amostras sejam recobertas por uma película de ouro e paládio, tornando-as assim condutoras. Estes dois procedimentos são realizados, quer no FEG-SEM, quer no SEM. Por último, coloca-se a amostra nos microscópios e visualiza-se a geometria das partículas, sendo que o FEG-SEM também tem associado uma EDS. Na figura 22 pode observar-se um esquema deste procedimento.

Para a realização deste procedimento, utilizaram-se dois equipamentos distintos, sendo o equipamento do SEM o *G2 Pro* e do FEG-SEM o *JEOL JSM 7000F*, usando-se neste último uma pressão dentro da câmara de 1.91×10^{-4} Pa.

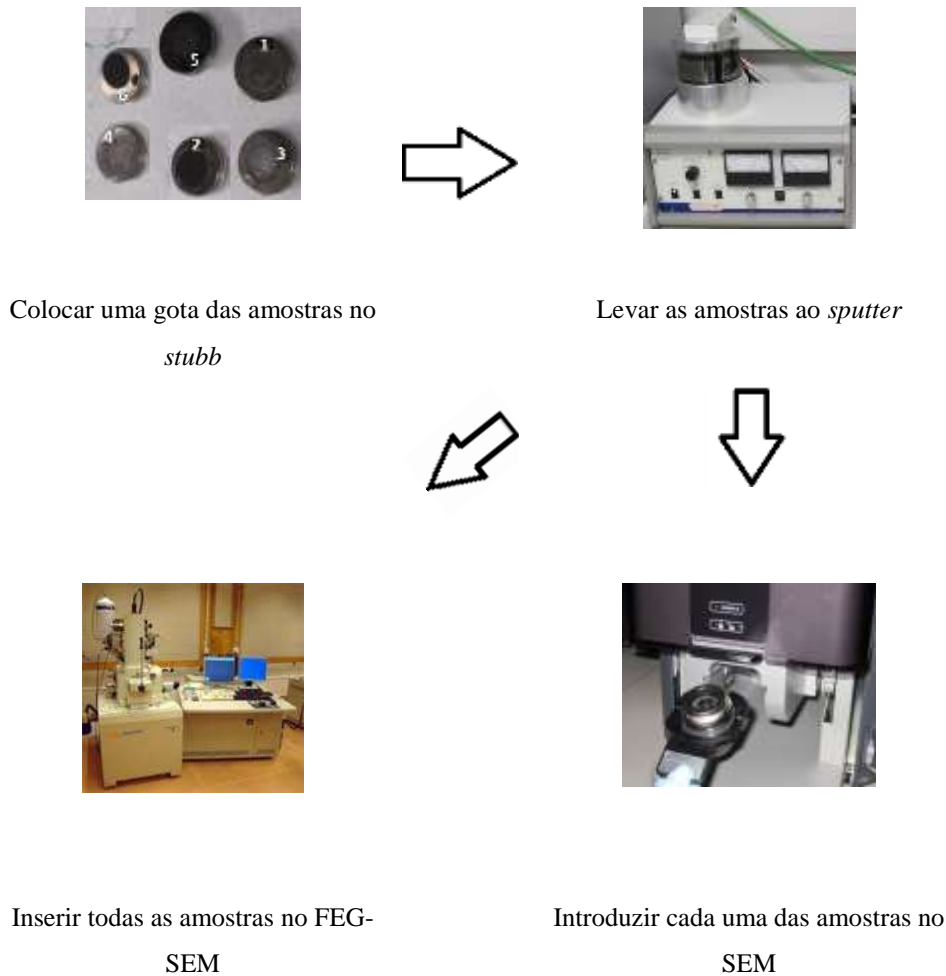


Figura 22: Procedimento para efectuar a análise das nanopartículas no FEG-SEM e SEM.

2.2.5 Difracção de Raios-X (XRD)

Os raios-X são radiações electromagnéticas (localizadas no espectro electromagnético entre a radiação dos raios γ e dos ultravioleta (UV)), que possuem uma energia entre os 100 eV e 1 MeV e um comprimento de onda bastante pequeno (0.1-10 Å). Da interacção dos raios-X com a amostra surge a dispersão inelástica (transferência de energia) e a dispersão elástica (conservação de energia), sendo devido a esta que advém a difracção [98-104].

Habitualmente, um difractómetro de raios-X é formado por uma fonte de radiação, um porta-amostras, um detector da radiação difractada (responsável pela sua conversão em impulsos eléctricos) e um sistema de registo [105].

A difracção de raios-X (*X-ray Diffraction, XRD*) é uma técnica experimental, versátil, não destrutiva, que fornece informações importantes sobre a estrutura cristalográfica de materiais sólidos (naturais e sintéticos). Deve-se à incidência destes

raios num plano de átomos de um determinado cristal, separados por uma determinada distância d , sendo uma parte da radiação reflectida pelo primeiro plano de átomos e a outra parte, que penetra na estrutura, reflectida pelos planos de átomos interiores que sobram. Quando a diferença de itinerário entre os raios difractados ($2d\sin\theta$) for igual a um múltiplo inteiro (n) do comprimento de onda da radiação incidente (λ), verifica-se a lei de *Bragg*, ou seja, acontece interferência construtiva entre os diferentes feixes difractados por distintos planos da mesma família. A lei de *Bragg* encontra-se traduzida pela equação (10), onde n representa o número inteiro determinado pela ordem dada, λ o comprimento de onda dos raios-X, d o espaçamento entre os planos e θ o ângulo entre o raio incidente e os planos de espalhamento [98, 106-107].

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (10)$$

Existem algumas condições, como o tamanho do grão e as tensões uniformes e não uniformes, que influenciam a extensão dos padrões de difracção. A largura do pico de difracção é afectada pelo volume do cristal (número de átomos), sendo que o pico é mais largo quanto mais pequeno for o grão. As tensões uniformes paralelas à superfície geram uma redução do espaçamento d entre os planos, provocando um deslocamento dos picos de difracção e uma contracção da célula unitária. Por fim, as tensões não uniformes no cristal causam deformações não homogéneas que alteram ao longo do volume do material, provocando o alargamento dos picos de difracção [98-108].

A XRD é uma técnica bastante útil no estudo de nanomateriais. Estes têm um tamanho particular de estrutura, conferindo-lhes propriedades ópticas, mecânicas e electrónicas singulares. Quando as amostras são de pequenas dimensões (inferiores a 100 nm), os picos de difracção de raios-X surgem com formas aumentadas. Nestas situações, o tamanho médio do cristal é calculado através da equação (11), que representa a fórmula de *Scherrer*, onde τ corresponde ao tamanho, em nm, do cristal, k o factor de *Scherrer* (depende da forma e pode variar entre 0.84 e 0.94, neste trabalho considera-se 0.90, por ser o valor tipicamente utilizado em estudos similares), λ o comprimento de onda dos raios-X (nm), β a largura a meio altura do pico de difracção (radianos) e θ o ângulo de Bragg, também ele em radianos [106, 109].

$$\tau = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (11)$$

Para a preparação da amostra para esta técnica deve-se preencher um suporte com as nanopartículas, considerando uma área de cerca de 2 cm^2 . Contudo, como a quantidade de nanopartículas magnéticas sintetizadas neste trabalho era reduzida, optou-se por outro método alternativo. Este consistia em espalhar, num pedaço de papel, as nanopartículas até perfazer uma área de cerca de 2.5 cm^2 (aproximada à área de uma moeda de 2 cêntimos), conseguindo-se assim que todos os 6 tipos de nanopartículas fossem analisados ao mesmo tempo. De seguida, o micrómetro, que possui uma ponta, incide sobre as amostras para saber qual a espessura de cada uma delas. Após esta etapa coloca-se as amostras, ao acaso, no equipamento com um certo espaçamento, evitando que os valores de x , y e z interfiram nas medidas de cada uma das amostras. Posteriormente introduz-se os parâmetros que se pretendem, para que a medida possa ser iniciada, fazendo-se no final uma comparação de resultados com os valores padrão referentes à magnetite, maghemite e hematite (fornecidos pelo *International Centre for Diffraction Data*). Na figura 23 observam-se algumas das etapas deste processo.

Neste caso, para este procedimento foi usado o equipamento *Philips PW 1710* com uma corrente de 40 mA, uma tensão de 40 kV, um ângulo 2θ de 3° , um passo de 0.02° e um tempo por passo de 10 s.

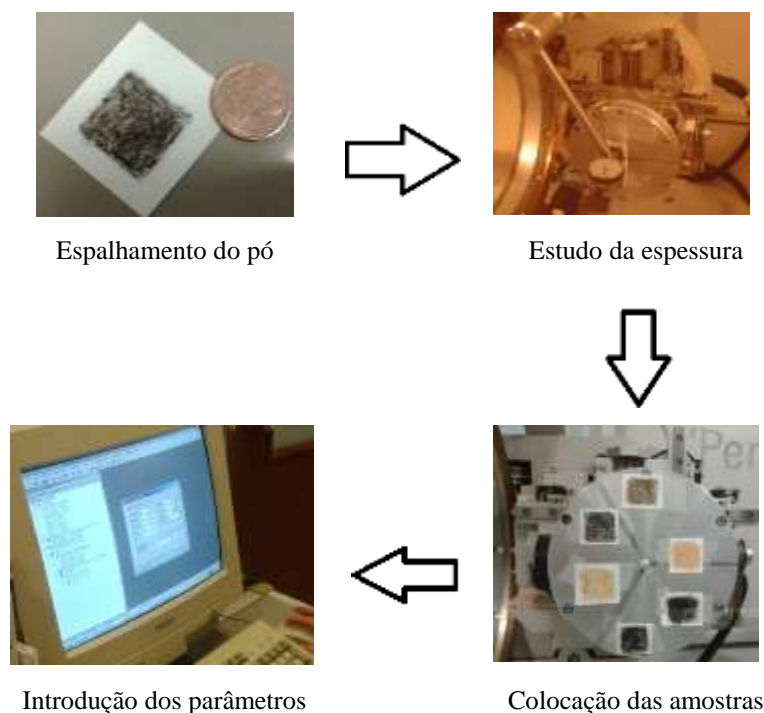


Figura 23: Etapas do processo de XRD.

2.3 Fabricação e Estudo dos Microcanais

Inicialmente teve de se recorrer ao *software AutoCAD* para projectar a geometria dos microcanais. De seguida, para a fabricação dos microcanais, utilizou-se a fotolitografia, tendo esta sido realizada na sala limpa do CEIT. Esta técnica comporta 7 etapas.

A 1ª etapa consiste na limpeza da *wafer* de silício (não oxidável e de 4 polegadas), usando-se para tal um gobelé com solução piranha (lavar durante 5 min) e 3 gobelés com H₂O (a *wafer* permanece em cada gobelé cerca de 1.30 min). Após a passagem por estes 4 gobelés seca-se a *wafer* com a pistola de nitrogénio para retirar a água. A etapa 2 é usada para retirar toda a água que ainda possa ter ficado presente, utilizando-se para o efeito uma placa de aquecimento (*Isotemp®*, *Fisher Scientific*) a 200 °C durante 25 min. Após esperar 5 min passa-se para a etapa 3. Nesta etapa deita-se 4.5 ml de resina no centro da *wafer* colocando-se esta no *spin coating*, que actua em 2 passos: no 1º o *spin coating* roda a 500 rpm durante 20 s e no 2º a 1500 rpm durante 30 s. A etapa 4 é utilizada para fixar bem a resina e consiste em pôr a *wafer* na placa de aquecimento (*EVG 620*) durante 1 min a 65 °C, retirando-se, de seguida, a *wafer* para outra placa que actua a uma temperatura de 95 °C durante 4 min. A etapa 5 baseia-se em colocar a *wafer* no equipamento de fotolitografia, onde é feita a exposição aos raios UV. Esta etapa foi realizada em 3 ciclos, em que cada uma possui uma energia de 45 mJ (o total de energia foi 135 mJ), com uma espessura de 27 µm. Posteriormente retira-se a *wafer*, espera-se 3 min e passa-se à etapa 6. Na etapa 6 coloca-se a *wafer*, novamente, na placa de aquecimento e emprega-se os mesmos parâmetros da etapa 4. Por último, a etapa 7 é realizada para que as geometrias pretendidas fiquem salientes sendo removido todo o material envolvente. Consiste em introduzir a *wafer* num gobelé contendo o revelador do SU-8, agitando-se gentilmente durante 4 min. Depois, a *wafer* é inserida noutro gobelé, mas neste caso com IPA (isopropanol), para que os resíduos do revelador sejam retirados. Na figura 24 observa-se a *wafer* com as respectivas geometrias após o processo da fotolitografia.

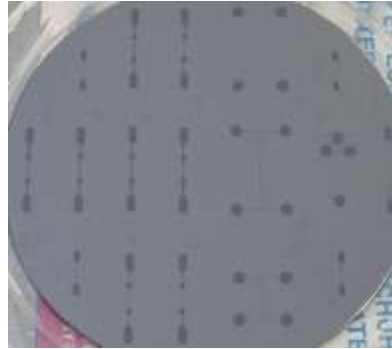


Figura 24: *Wafer* com as respectivas geometrias após o processo da fotolitografia.

A próxima etapa consiste na fabricação em PDMS dos microdispositivos e no estudo de vários tipos de escoamentos em microcanais, tarefas executadas na unidade de biofluidos do LMFH da ESTIG. Para a fabricação dos microcanais é necessário pesar uma certa quantidade de PDMS e de agente de cura numa razão de 20:1 (aquele que é depositado sobre a *wafer*). Depois é feito exactamente o mesmo processo, mas neste caso a quantidade de PDMS e agente de cura deve ser numa razão de 10:1 (é utilizado nas lâminas onde, posteriormente, vão ser aderidas aos moldes de PDMS). De seguida, com o auxílio de uma bomba de vácuo, as bolhas são retiradas, podendo-se deitar o PDMS na *wafer* e, seguidamente, colocá-lo num forno durante 20 min a uma temperatura de 80°C. O segundo PDMS preparado é aplicado no centro de uma lâmina e introduzido no *spin coating* (VTC-100, MTI Corporation), que actua durante 1 min a 3000 rpm e 1 min a 4000 rpm, com o intuito de se espalhar uniformemente o PDMS. Esta lâmina também é levada ao forno nas mesmas condições que a anterior. Por fim, corta-se e adere-se o PDMS na respectiva lâmina.

De seguida procede-se ao escoamento de fluidos nos microcanais onde, inicialmente, se usou dois fluidos (sangue com 5% de hematócrito (Hct) e Dx40), procurando-se verificar qual o comportamento destes fluídos num microcanal com duas entradas e saídas, sendo esta etapa realizada em microcanais fabricados em PDMS (ver figura 25). No entanto, como será referido na secção 3.6, o estudo de escoamentos em microcanais de PDMS não correu como o esperado pelo que foram realizados somente ensaios preliminares.

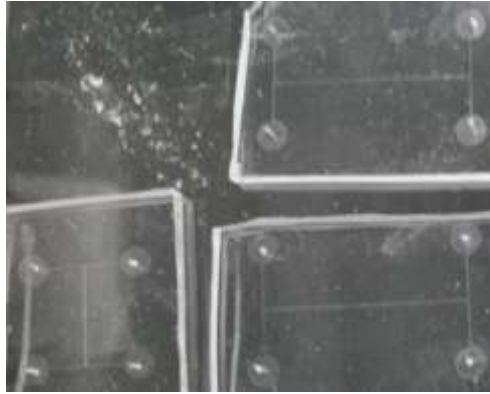


Figura 25: Geometria e microdispositivos com microcanais fabricados em PDMS.

Para separar os glóbulos vermelhos (GVs) dos outros componentes do sangue é necessário realizar duas lavagens com soro, levando à centrífuga (*Centrifuge MPW-260R*) com uma velocidade de 2000 rpm durante 15 min. Por último, é necessário juntar Dx40 aos GVs (caso se queira preparar 5 ml de GVs com 5% Hct, junta-se 0.25 ml de GVs a 4.75 ml de Dx40).

Após realizar ensaios preliminares em microcanais de PDMS e verificar uma elevada tendência das nanopartículas em aderirem às paredes do PDMS, foi decidido numa primeira fase deste estudo realizar os escoamentos em microcanais de vidro. Inicialmente, estudou-se o comportamento da camada plasma (CP) (*cell-free layer*) num fluido fisiológico (sangue) com 5% de Hct. De seguida misturou-se o sangue com os vários tipos de nanopartículas (comerciais – Fe_2O_3 e Fe_3O_4 encapsuladas, e sintetizadas – NP1, NP2, NP3, NP4, NP5 e NP6), suspensas em soro e com 1% de concentração, para verificar quais os seus efeitos destas 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 fenómeno deve-se à tendência dos glóbulos vermelhos migrarem através do escoamento do sangue para o centro do microvaso (migração axial). Esta migração ocorre devido principalmente 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 microvaso. A CP é uma zona com concentração bastante reduzida de célula. Esta pode ser influenciada pelo diâmetro do

microcanal, pelo %Hct, pela deformabilidade dos GVs, entre outros. No entanto, neste trabalho foi apenas estudado para um tipo de diâmetro e de Hct [110-111].

Para todo este procedimento usaram-se seringas (*Teruno* 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 26 pode ser observado o sistema de microscopia utilizado neste estudo.

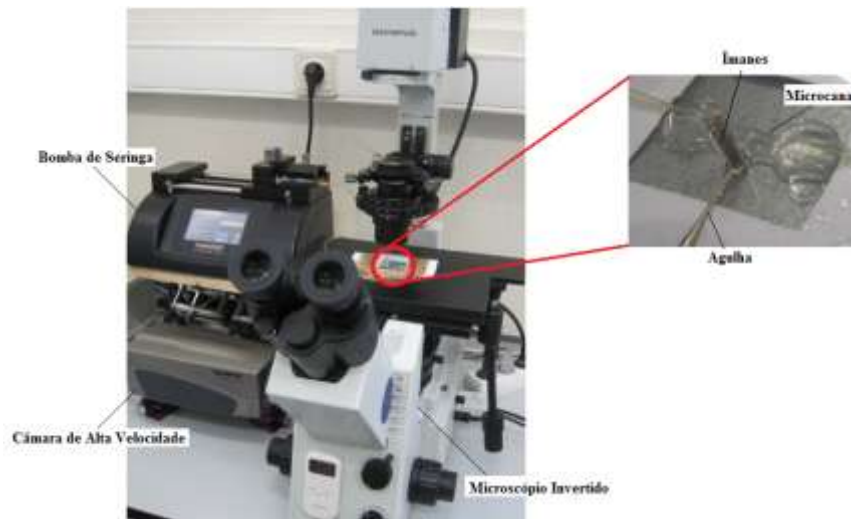


Figura 26: Sistema para a visualização do escoamento no microscópio.

Nesta etapa do trabalho também se procedeu ao cálculo do campo magnético aplicado nos vários ensaios descritos, utilizando para tal o Sensor de Efeito de *Hall* A1302 (*Allegro MicroSystems*, EUA). Este sensor pode funcionar em regime de tempo contínuo, é linear e a sua sensibilidade e o seu valor quiescente de saída são função da tensão de entrada. O sensor de *Hall* A1302 é otimizado para fornecer, com precisão, uma tensão de saída proporcional ao campo magnético aplicado e possui uma saída quiescente igual a 50% da tensão de alimentação. Este opera a uma sensibilidade de 1.3 mV/G.

Neste trabalho o sensor de *Hall* foi ligado e alimentado com 5 volts (V), usando para tal uma pilha de 9 V e um regulador de tensão (78L05). Para saber qual o valor do

campo magnético, encostou-se o conjunto agulha/íman (o íman encontra-se a uma distância de cerca de 1 mm do início da agulha) à parede lateral do sensor, medindo-se através de um multímetro a diferença de potencial entre a saída do sensor e o potencial de referência num circuito eléctrico, o Ground (GND). O campo magnético é calculado pela equação (12), em que V_0 representa o potencial observado com a colocação dos ímanes (toma valores consoante o número de ímanes colocados sobre a agulha) e V_1 o potencial de repouso (sem ímanes), e tem como unidades o Gauss (G). V_0 tomou valores de 2.55 V (2 ímanes), 2.63 V (5 ímanes) e 2.55 V (8 ímanes), enquanto V_1 tem um valor considerado fixo de 2.47 V. [112]

$$\text{Campo_Magnético} = \frac{(V_0 - V_1) * 1000}{1.3} \quad (12)$$

Na tabela 4, apresenta-se os valores do campo magnético para cada um dos conjuntos agulha/íman.

Tabela 4: Campo magnético obtido para o conjunto agulha/íman.

Número de Ímanes	Campo Magnético (Gauss)	Designação do Campo
2	61.5	G1
5	123.1	G2
8	138.5	G3

O campo magnético, na superfície dos ímanes, sem agulha, para o diferente número de ímanes também poderia ser quantificado, no entanto, verificou-se que o limite máximo de intensidade de campo suportado pelo sensor era alcançado nesta configuração. Contudo, sabe-se que os ímanes neodímio empregues ao longo deste trabalho têm uma magnetização (*Grade*) de N48, possuindo um valor de campo magnético, à sua superfície, que pode variar entre os 13700 e 14200 G, segundo *Datasheet article S-03-01-N*.

Capítulo 3: Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos na síntese das várias amostras de nanopartículas estudadas neste trabalho, a respectiva caracterização e as diferentes técnicas usadas para tal, bem como o estudo do escoamento em microcanais dessas mesmas nanopartículas e de nanopartículas comerciais.

3.1 Preparação de Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro

Como já foi referido na parte experimental, neste trabalho foram sintetizadas 6 amostras de nanopartículas de óxido de ferro, variando-se determinados parâmetros (quantidade de precursor, quantidade de NaOH e temperatura de síntese), como detalhado na tabela 2 apresentada anteriormente. Na tabela 5 encontra-se a nomenclatura definida para cada nanopartícula, as concentrações do precursor e de NaOH e os valores de pH das soluções de precursor antes e após adição de NaOH. Também se apresenta o valor do rendimento, calculado segundo a equação (13), com o intuito de determinar quais os parâmetros que possibilitam uma maior produtividade de nanopartículas magnéticas pelo processo solvotérmico (usado neste trabalho).

$$Rendimento (\%) = \frac{MassaFerroNanopartículas}{MassaFerroPrecursor} \times 100 \quad (13)$$

Tabela 5: Concentração, pH e rendimento de síntese das nanopartículas.

Amostra	Concentração do Precursor (mol/L)	Concentração de NaOH (mol/L)	pH _{precursor}	pH _{solução}	Rendimento (%)
NP1	0.125	0.500	1.4	10.6	22.8
NP2	0.063	0.500	1.6	11.4	69
NP3	0.250	0.500	1.3	2.8	18.2
NP4	0.125	0.250	1.3	3.2	85.1
NP5	0.125	0.750	1.4	11.6	76.9
NP6	0.125	0.500	1.4	10.6	85.8

Após a preparação destas 6 amostras, segundo [43], espera-se a obtenção de partículas de óxido de ferro Fe₃O₄ com diferentes morfologias e tamanhos, o que será discutido com os resultados apresentados nas secções seguintes. Relativamente aos valores de pH obtidos, constata-se que o pH do precursor é extremamente ácido, independentemente da concentração utilizada, e que o pH da solução aumenta com o aumento da razão molar NaOH/precursor. De uma forma geral, o pH da solução afecta o rendimento de síntese, sendo maior o rendimento em meio básico (excepto para as NP1 e NP4). O pH da solução também tem influência no comportamento magnético das

nanopartículas, como será discutido nas secções seguintes, sendo que a síntese em meio básico leva à formação de partículas com comportamento magnético, contrariamente ao observado na síntese em meio ácido. Relativamente à influência da temperatura verifica-se que esta tem muita relevância nos rendimentos de síntese, visto que para razões molares NaOH/precursor iguais (pH solução = 10.6), o aumento da temperatura de 180 °C (NP1) para 200 °C (NP6) leva a um aumento significativo do rendimento (de 22.8 para 85.8%), o que pode ser explicado pelo aumento da velocidade de síntese, cujo mecanismo será detalhado adiante.

Durante a filtração de cada uma destas nanopartículas, reparou-se que algumas delas adquiriram um filtrado muito mais incolor que outras, sendo estes indicadores de uma conversão completa do precursor, ou seja, de uma síntese com elevado rendimento. De entre todas estas nanopartículas, as que obtiveram um filtrado incolor foram as NP2, NP5 e NP6, o que está de acordo com os rendimentos calculados (Tabela 5). Após secagem em estufa, as várias amostras de nanopartículas apresentavam quase todas uma cor preta, característica do Fe_3O_4 , à excepção das amostras NP3 e NP4 (cor esverdeada, o que pode indicar neste caso que a redução de FeCl_3 a FeCl_2 pelo etilenoglicol, etapa essencial no mecanismo de formação de Fe_3O_4 , foi incompleta, obtendo-se óxidos de ferro sem comportamento magnético), sendo que nestes 2 casos as amostras formaram uma espécie de filme fazendo com que fosse necessário o recurso ao almofariz para moer as partículas. Nos restantes casos (NP1, NP2, NP5 e NP6), as partículas obtidas apresentavam um aspecto granulado. Na figura 27 pode-se visualizar, para além do aspecto e cor das nanopartículas obtidas, o comportamento magnético destas (aproximou-se um íman observando-se se as partículas se movem), confirmando-se que todas as nanopartículas sintetizadas, excepto NP3 e NP4 apresentam comportamento magnético.

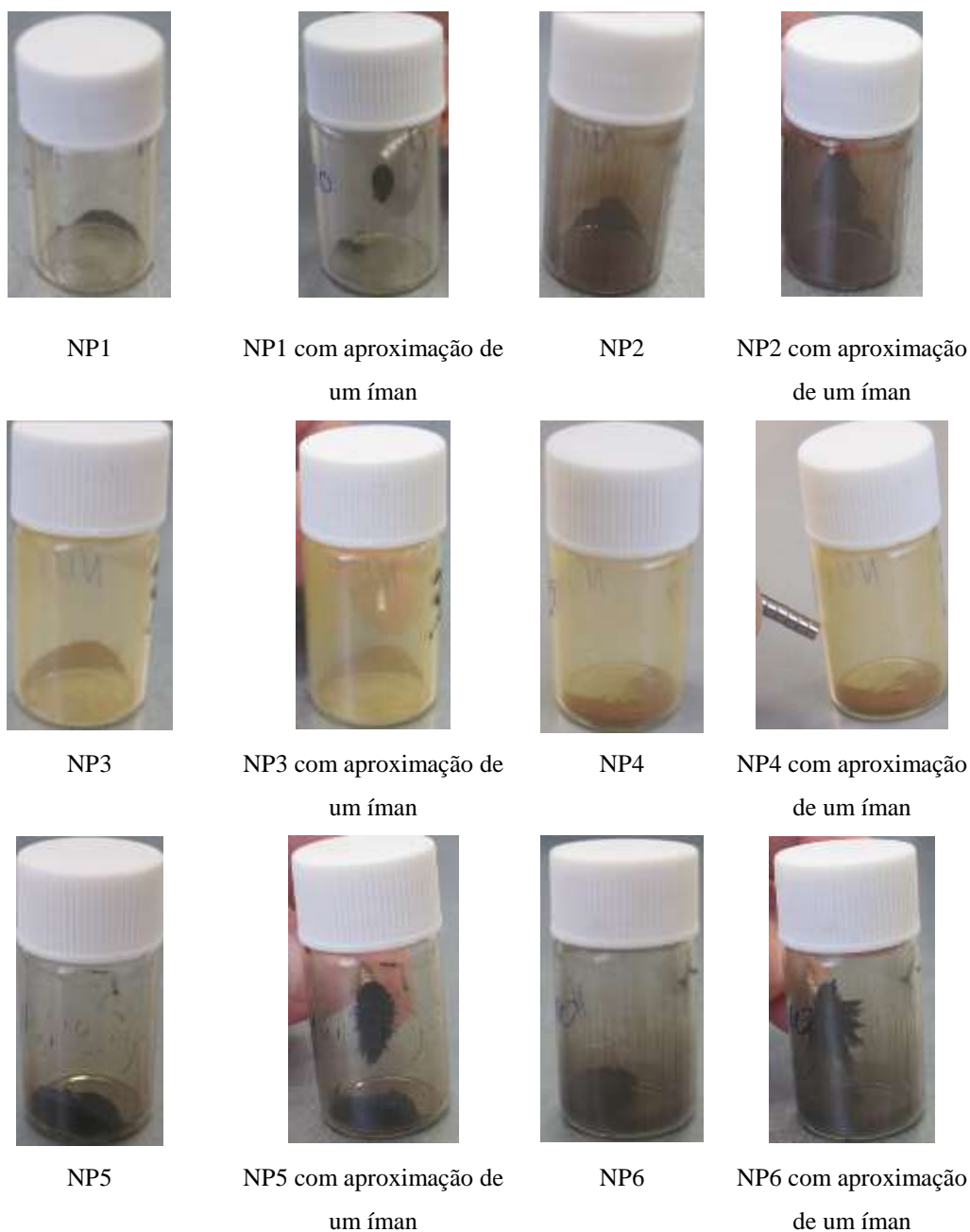
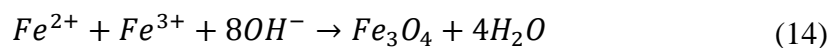


Figura 27: Nanopartículas sintetizadas e o seu comportamento magnético.

A equação (14) apresentada a seguir mostra, de uma forma muito geral, a reacção de formação de Fe_3O_4 .



Pela equação (14) verifica-se que, para além de Fe^{3+} é necessária a presença de Fe^{2+} para se obter Fe_3O_4 . Neste trabalho apenas se usou o precursor $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ que fornece iões Fe^{3+} . Por este motivo foi também utilizado o etilenoglicol como solvente, uma vez que este, para além de ser um bom solvente do precursor, é também um forte

agente redutor, reduzindo Fe^{3+} a Fe^{2+} . Outro dos parâmetros importantes para a reacção se dar com sucesso, e visível na equação química apresentada, reside no facto de haver hidrólise (libertação de uma molécula de água) na presença de NaOH, ou seja, em meio alcalino (básico), facto que explica a não obtenção de partículas com comportamento magnético nas amostras NP3 e NP4, cuja síntese foi conduzida em meio ácido [43, 113-114].

Em termos de rendimento, averigua-se que as NP5 obtiveram o maior valor e as NP3 o menor. Relativamente às partículas magnéticas, com excepção das NP1 verifica-se que todas elas têm um rendimento aceitável.

Nas próximas secções mostram-se os resultados de caracterização das nanopartículas, cujo principal objectivo visa compreender a influência dos parâmetros de síntese estudados no tamanho e na composição das nanopartículas sintetizadas.

3.2 DLS e UV-Vis

Como foi mencionado anteriormente, o objectivo desta técnica é determinar a distribuição de tamanhos de partículas das amostras obtidas, um parâmetro importante para a avaliação da sua adequabilidade em hipertermia, uma vez que este processo é favorecido com partículas com tamanhos inferiores a 50 nm. Como referido na secção experimental, optimizou-se inicialmente a técnica usando partículas de poliestireno (AJ10 e AJ20) para se escolher quais os melhores parâmetros a usar. Dos resultados obtidos nesses testes, ver exemplo na figura 28 para as partículas de poliestireno AJ10, correspondendo a 3 medições, obtém-se o valor médio do diâmetro das partículas analisadas. O índice de polidispersão (um indicador que permite avaliar a dispersão dos tamanhos de partículas) é outro dos parâmetros que se obtém, estando todos estes resultados expressos na tabela 6, onde também se faz uma comparação com os diâmetros originais das partículas, o que permite o cálculo do erro relativo da medição.

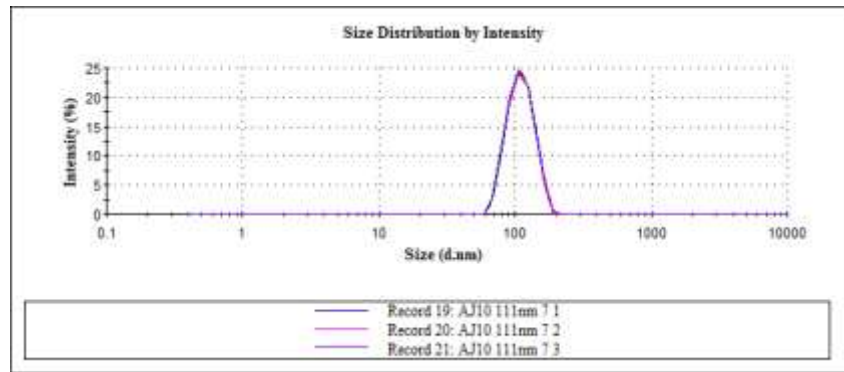


Figura 28: Distribuição de tamanho de partículas para as partículas de poliestireno AJ10.

Tabela 6: Diâmetro, índice de polidispersão e erro relativo das partículas de poliestireno.

Partícula	Diâmetro (nm)	Índice Polidispersão	Diâmetro Fornecido (nm)	Erro Relativo %
AJ10	108.8	0.004	111	2.02
AJ20	201.7	0.013	199	1.34

O único pico presente na figura 28 e o facto dos índices de polidispersão (*pdi*) serem menores que 0.3, indica que a amostra é monodispersa. Pelos resultados da tabela 6, também se verifica que os erros obtidos são pequenos, ou seja, os diâmetros obtidos e os fornecidos são bastante próximos. Assim constata-se que os parâmetros utilizados nestes ensaios são bastante aceitáveis.

Pelas razões já referidas usaram-se os mesmos parâmetros nas análises das amostras sintetizadas. Contudo, um dos problemas foi saber quais os valores dos índices de refração e de absorção de cada uma delas. Considerando que as amostras NP1, NP2, NP5 e NP6 são constituídas por magnetite, usou-se um índice de refração de 2.42 [73], enquanto que para as amostras NP3 e NP4 (constituídas por hematite) se usou um valor de 3.08. Para se obter os valores de absorção recorreu-se a espectrofotometria UV-Vis, determinando-se os valores apresentados na tabela 7. Estes valores foram obtidos da análise à figura 29 (representa os dados para NP1), sendo retirados os valores da absorvância correspondentes ao comprimento de onda 623.8 nm. No entanto, como o gráfico não começa em zero absoluto foi necessário fazer, para cada nanopartícula, a diferença entre o valor da absorvância em 700 nm e o valor da absorvância em 623.8 nm, sendo que os resultados negativos consideram-se zero.

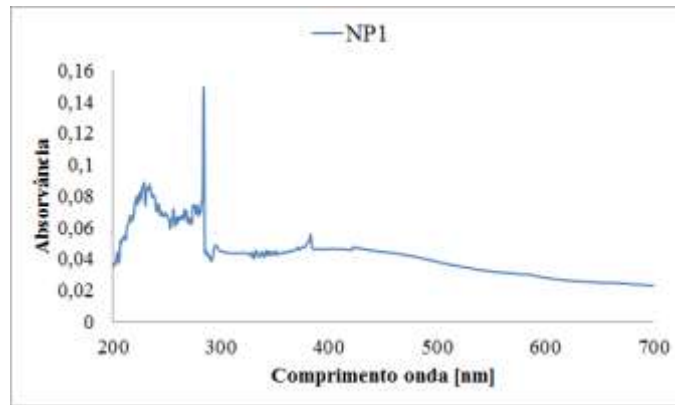


Figura 29: Espectro UV-Vis das NP1.

Tabela 7: Valores de absorção das amostras de nanopartículas sintetizadas, suspensas em água.

Amostra	Absorção
NP1	0.03312
NP2	0
NP3	0.00290
NP4	0.00585
NP5	0
NP6	0.02613

Após análise DLS, obtiveram-se, para cada amostra, os diâmetros e os índices de polidispersão apresentados na tabela 8, podendo-se observar nas figuras 30 à 35 as distribuições de tamanhos de partículas das amostras analisadas.

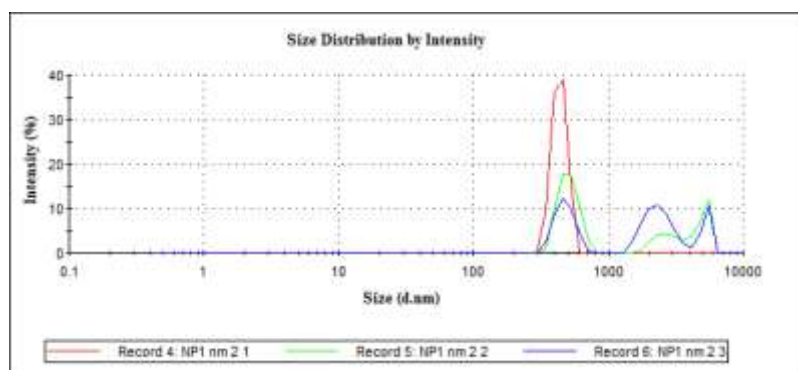


Figura 30: Distribuição de tamanho de partículas para NP1.

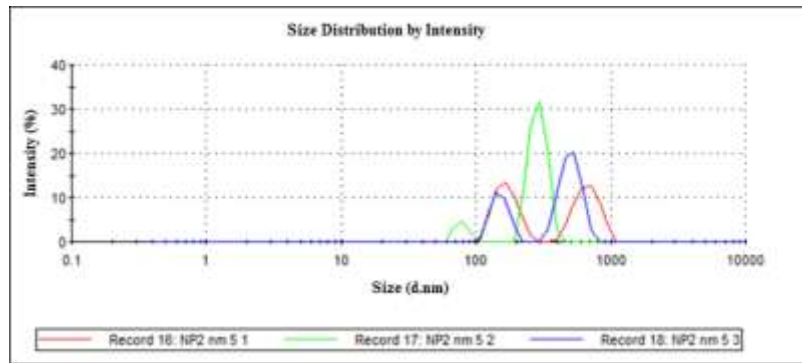


Figura 31: Distribuição de tamanho de partículas para NP2.

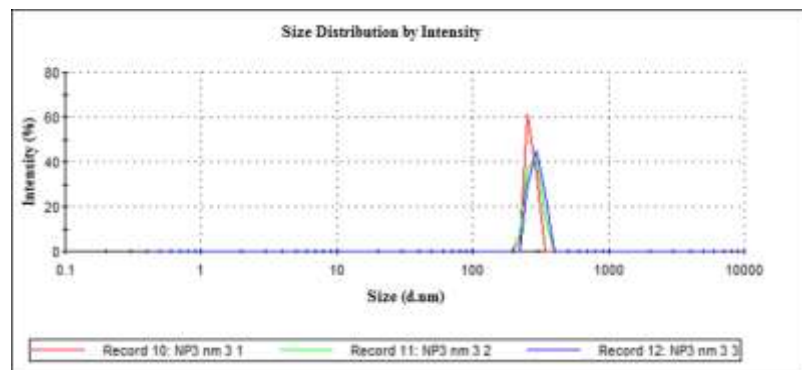


Figura 32: Distribuição de tamanho de partículas para NP3.

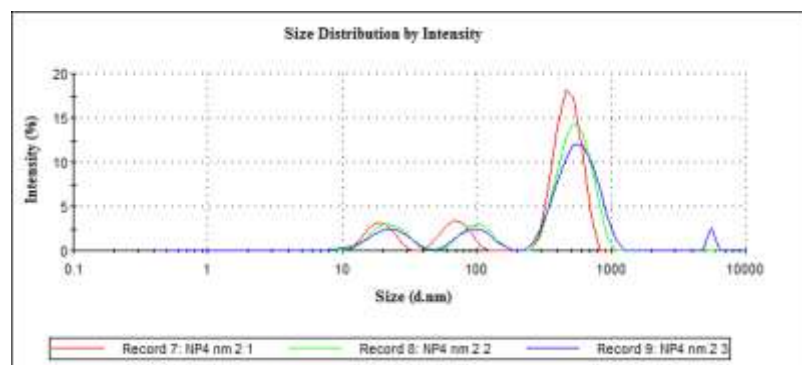


Figura 33: Distribuição de tamanho de partículas para NP4.

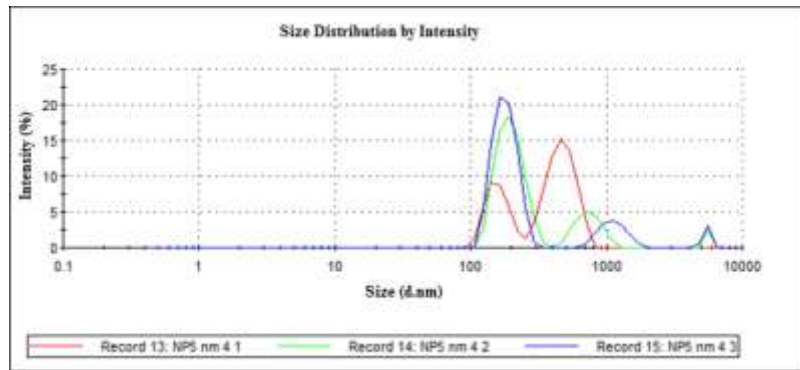


Figura 34: Distribuição de tamanho de partículas para NP5.

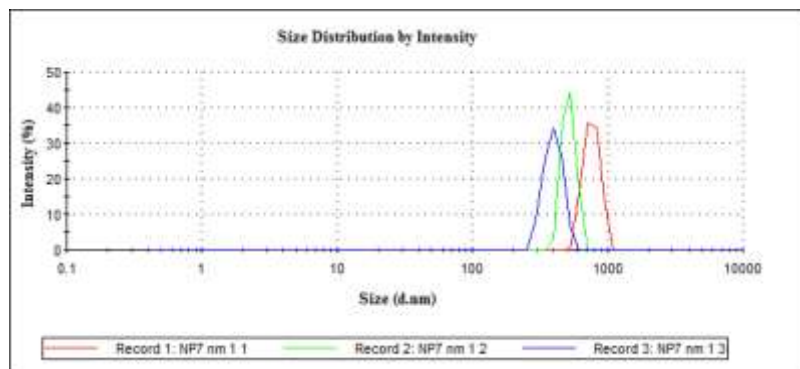


Figura 35: Distribuição de tamanho de partículas para NP6.

Tabela 8: Diâmetro, índice de polidispersão e desvio-padrão das amostras de nanopartículas sintetizadas, suspensas em água.

Amostra	Diâmetro (nm)	Índice Polidispersão	Desvio Padrão
NP1	1415	0.952	170.21
NP2	783.5	0.918	204.37
NP3	809.4	0.731	399.03
NP4	427.3	0.646	56.35
NP5	373.3	0.572	105.84
NP6	1705	0.960	606.37

Pela observação das figuras 30 à 35 repara-se que apenas as amostras NP3 e NP6 possuem um único pico, no entanto, como o índice de polidispersão é bastante elevado (tabela 8), as amostras não são monodispersas. Pela análise dos resultados apresentados na tabela 8 conclui-se que as NP6 são as que possuem um maior diâmetro e as NP5 as que têm um diâmetro menor, sendo também o índice de polidispersão indicativo de tal facto, pois quanto maior o valor de *pdi*, maior o tamanho médio das partículas. Contudo, este valor tem de ser inferior a 1, visto que o *software Malvern* apenas apresenta valores até 1 e, caso seja superior a 0.7 os resultados não podem ser

validados. Ou seja, nestes casos apenas os resultados das NP4 e NP5 podem ser validados. Em termos de desvio-padrão pode-se constatar que as NP4 e NP5 são aquelas que possuem menores valores, ou seja, o valor médio do diâmetro obtido é aceitável podendo tomar valores de $427.3 \text{ nm} \pm 56.35 \text{ nm}$ (NP4) e $373.3 \text{ nm} \pm 105.84 \text{ nm}$ para as NP5. Por outro lado, as NP6 são as que possuem um diâmetro menos fiável (pode ter valores que vão desde os 1098.63 nm até aos 2311.37 nm). Devido a isto e ao facto de as partículas depositarem muito rapidamente, optou-se por preparar suspensões de partículas noutros tipos de solvente, como PBS, Dx40, Etanol, no entanto não foi possível melhorar os resultados obtidos. Misturando Água com Etanol observou-se que as nanopartículas demoravam um pouco mais a depositar, pelo que foi possível, nestas condições, obter os resultados apresentados na tabela 10. Para este novo estudo houve necessidade de obter novos valores da absorção, podendo-se verificar os valores obtidos na tabela 9. Os valores do índice de refração são exactamente os mesmos que os utilizados no estudo anterior.

Tabela 9: Valores de absorção das amostras de nanopartículas sintetizadas, suspensas numa mistura água/etanol.

Amostra	Absorção
NP1	0.03552
NP2	0
NP3	0.00858
NP4	0.03868
NP5	0.04916
NP6	0

Tabela 10: Diâmetro e índice de polidispersão das amostras de nanopartículas sintetizadas, suspensas numa mistura água/etanol.

Amostra	Diâmetro (nm)	Índice Polidispersão	Desvio-Padrão
NP1	2979	0.291	497.09
NP2	3591	0.283	630.93
NP3	3486	0.825	377.77
NP4	1677	0.715	83.54
NP5	5058	0.259	887.47
NP6	8909	0.518	1011.97

Pela análise dos valores da tabela 10, conclui-se que, nestas condições, as partículas NP6 são as que possuem um maior diâmetro e as NP4 o menor. Tendo em

consideração o índice de polidispersão, apenas os resultados das NP3 e NP4 não podem ser validados (*pdi* superior a 0.7). No entanto, constata-se que aumentando o índice de polidispersão o diâmetro médio não é maior (com exceção das NP6), podendo dever-se ao solvente usado ou a algum erro ocorrido durante a medição. Neste caso, as NP4 e as NP3 são aquelas que possuem um diâmetro mais aceitável (desvio-padrão menor), sendo as NP6 (como no caso anterior) aquelas em que o desvio padrão é maior.

Comparando os resultados obtidos nos estudos com os 2 solventes, verifica-se que, quando é usada a mistura água/etanol, apesar das partículas demorarem mais tempo a sedimentar, os diâmetros são muito maiores que no caso em que é usada água nas suspensões. Em relação aos valores do desvio-padrão averigua-se que são muito maiores no caso em que o solvente é uma mistura água/etanol. Os resultados obtidos não permitem assim concluir com fiabilidade quais os tamanhos das partículas sintetizadas, pelo que foram consideradas outras técnicas para poder aferir esse parâmetro, como AFM, SEM e XRD, apresentadas no seguimento.

3.3 AFM

Como descrito anteriormente, à semelhança da metodologia considerada na análise DLS, começou-se por usar partículas de poliestireno para otimizar a técnica AFM. As imagens resultantes do AFM (diferentes regiões do cristal) foram tratadas no programa *JFK Data Processing*, tendo sido medidos os diâmetros de 100 partículas (25 partículas em 4 zonas distintas). Estudaram-se 4 zonas para assim se poder diminuir o erro obtido comparativamente à medida de 100 partículas numa única zona. Na figura 36, observa-se uma imagem do AFM (uma região) de AJ10 e AJ20 e na tabela 11 os diâmetros obtidos.

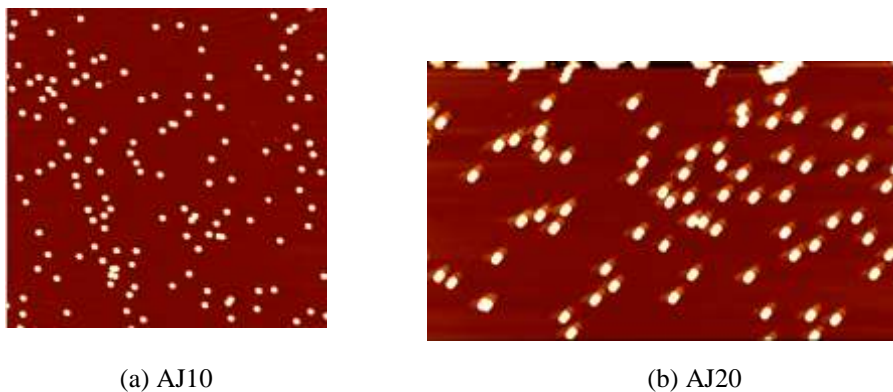


Figura 36: Partículas de poliestireno observadas por AFM (a) AJ10; (b) AJ20.

Tabela 11: Diâmetro das partículas de poliestireno obtidas por AFM.

Partícula	Diâmetro (nm)	Diâmetro Fornecido (nm)	Erro Relativo %
AJ10	105.81	111	4.91
AJ20	199.65	199	0.33

Ao observar-se a figura 36 verifica-se que as partículas AJ10 são mais redondas que as AJ20 (mais alongadas). Observa-se ainda que existem algumas situações estranhas na imagem das partículas AJ20 (riscos, sombras), não se sabendo a sua origem, podendo, no entanto, ser devido a artefactos do próprio AFM, sujidade do cristal, entre outros. Pela análise da tabela 11, confirma-se o maior diâmetro das partículas AJ20 relativamente ao das partículas AJ10, o que seria de esperar pelos valores reais fornecidos pelo fabricante. Relativamente à técnica DLS constata-se que no AFM, para as partículas AJ10 o erro relativo obtido foi superior, enquanto nas partículas AJ20 foi menor, o que revela que a precisão da medição por AFM será tanto melhor quanto maior for o diâmetro das partículas.

Uma vez otimizada a técnica de AFM com as partículas de poliestireno, procedeu-se à análise das amostras de nanopartículas suspensas em água e numa mistura água/etanol. No primeiro caso não foi possível obter nenhuma imagem. Tal pode ser devido ao facto do cristal (após limpeza) se tornar polar e como as partículas têm uma natureza apolar, após a colocação de uma gota da amostra no cristal, a água sai, devido a forças de repulsão, não ficando nenhuma partícula no cristal. No segundo caso foi possível observar as amostras, como se pode ver na figura 37 (apenas se apresenta o caso da análise da amostra NP1, visto que nas restantes amostras as imagens são muito similares), mas não foi possível obter o diâmetro das nanopartículas, pois não é possível identifica-las individualmente, uma vez que se encontram bastante aglomeradas. Tal situação vai de encontro aos resultados obtidos no *Malvern Zetaziser Nano Series* com a mistura água/etanol, onde os elevados valores do diâmetro podem estar associados ao tamanho médios dos aglomerados de partículas e não ao diâmetro médio individual das mesmas. Procurou-se assim a utilização de uma técnica mais adequada, como SEM e XRD para se obter o diâmetro médio das nanopartículas sintetizadas.

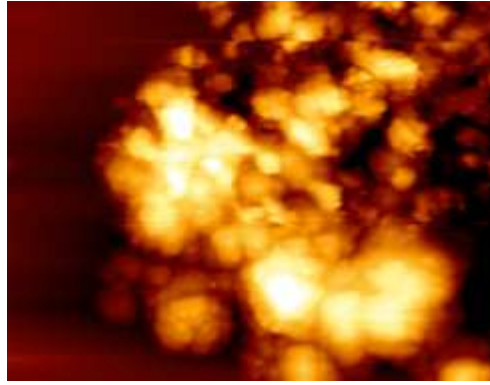


Figura 37: Análise AFM à amostra de nanopartículas NP1.

3.4 FEG-SEM e SEM

No FEG-SEM observaram-se as nanopartículas imersas em água. Juntamente com as imagens da geometria de cada partícula, também é possível determinar o seu diâmetro médio. Para o efeito faz-se uma contagem para obter a distribuição de tamanhos de partículas de cada amostra, contudo nestes casos não foi possível estudar tal parâmetro, como se mostra a seguir. Ao FEG-SEM utilizado está associado um analisador EDS (como já referido), sendo possível fazer a análise dos elementos presentes em cada amostra de nanopartículas e determinar a respectiva composição atômica. Nas figuras 38 a 42 observa-se a geometria das amostras NP1 a NP5 e os respectivos EDS.

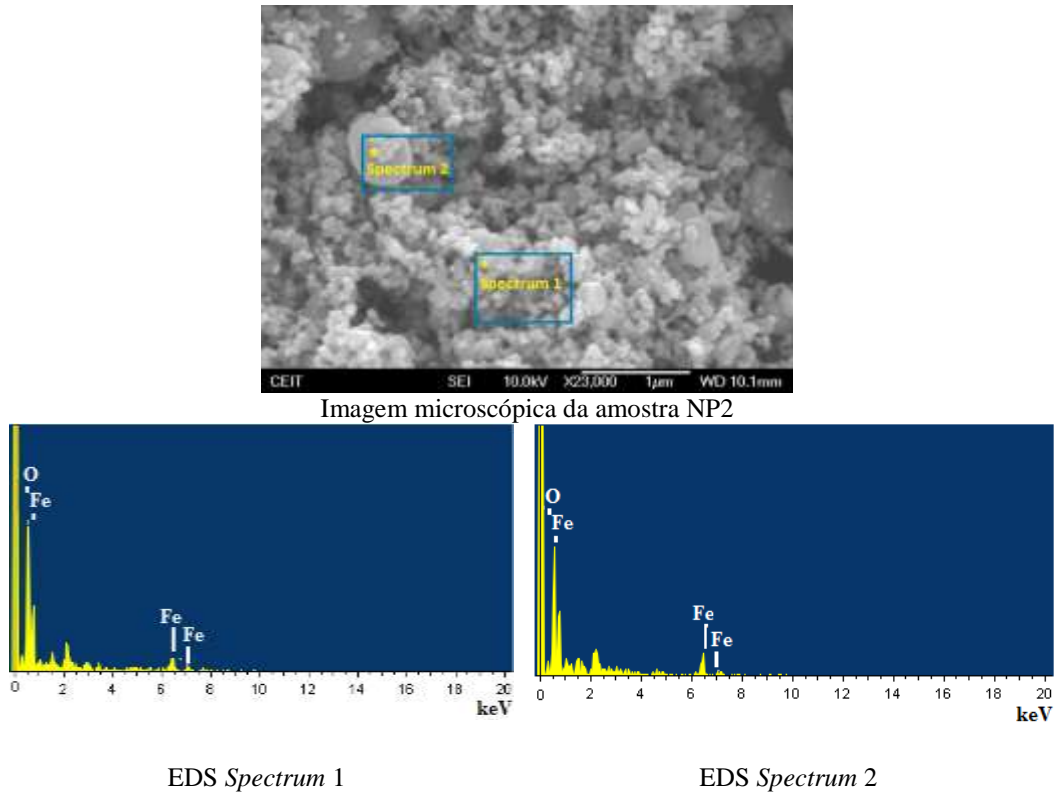


Figura 39: Resultados da amostra NP2 obtidos por FEG-SEM/EDS.

Da análise da amostra NP2 (figura 39), verifica-se que estas nanopartículas, apesar de estarem muito aglomeradas, tornando muito difícil a sua análise individualmente, é possível observar que possuem uma forma quase esférica. Repara-se também que a amostra não é muito monodispersa, uma vez que se observam facilmente partículas com diferentes tamanhos, o que está de acordo com os resultados obtidos por DLS. Dos resultados da EDS para as duas zonas estudadas, averigua-se que a amostra NP2 é essencialmente constituída por Fe (39.52% na região *Spectrum 1* e 44.04% na região *Spectrum 2*) e O (60.48% na região *Spectrum 1* e 55.96% na região *Spectrum 2*), não existindo, neste caso, qualquer outro elemento (ao contrário do observado na amostra NP1), um bom indicador de uma adequada purificação da amostra. Na região *Spectrum 1*, a relação atómica Fe/O tem um valor de 0.65, estando muito próximo da relação apresentada pelo Fe_2O_3 (0.66), enquanto que na região *Spectrum 2* a relação Fe/O tem um valor de 0.787 (próximo da relação apresentada pelo Fe_3O_4). Ou seja, pode-se concluir que a amostra NP2 tem Fe_2O_3 e Fe_3O_4 na sua constituição.

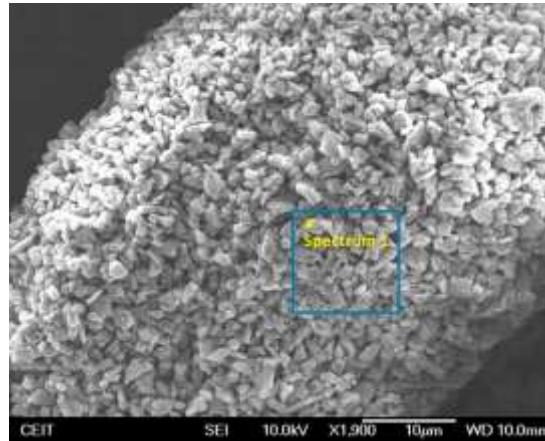
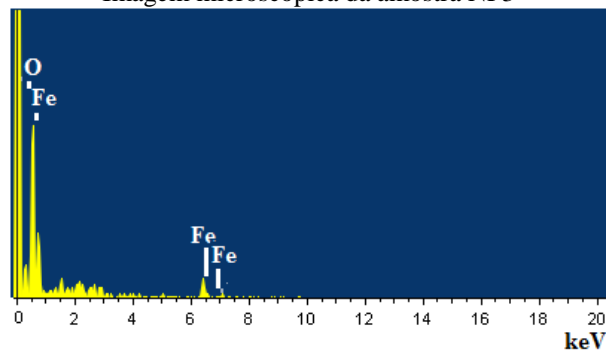


Imagem microscópica da amostra NP3



EDS *Spectrum 1*

Figura 40: Resultados da amostra NP3 obtidos por FEG-SEM/EDS.

Pela observação da figura 40 é difícil perceber qual a forma geométrica das partículas na amostra NP3, aparecendo mais uma vez bastante aglomeradas. Por EDS na região designada *Spectrum 1* observa-se que os elementos presentes são O (66.73%) e Fe (33.27%), com uma relação Fe/O de 0.499, o que poderá revelar também a presença de uma mistura de óxidos nesta amostra.

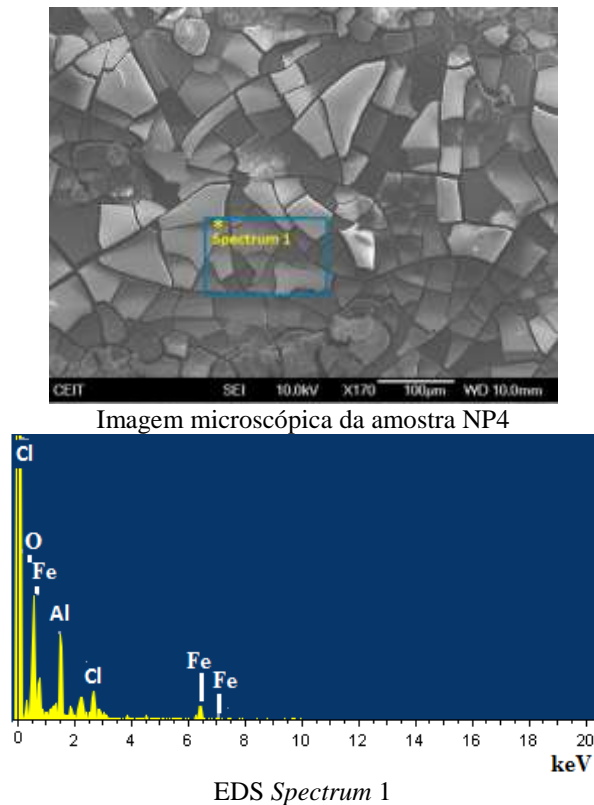


Figura 41: Resultados da amostra NP4 obtidos por FEG-SEM/EDS.

Os resultados obtidos na análise FEG-SEM/EDS da amostra NP4 apresentam-se na figura 41, sendo possível observar que as partículas da amostra NP4 se encontram aglomeradas sob a forma de filme. A respectiva análise EDS evidencia, na região analisada, a presença de O (48.64%), Fe (23.10%), 9.83% de Cl (proveniente do precursor $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) que pode ser devido a uma má lavagem e 18.63% de Al que indica que existe uma pequena zona do *stubb* que não foi “preenchida” com amostra. O valor da relação Fe/O (0.47) não indica a presença de apenas um dos tipos de óxidos de ferro já referidos, mas sim uma possível mistura.

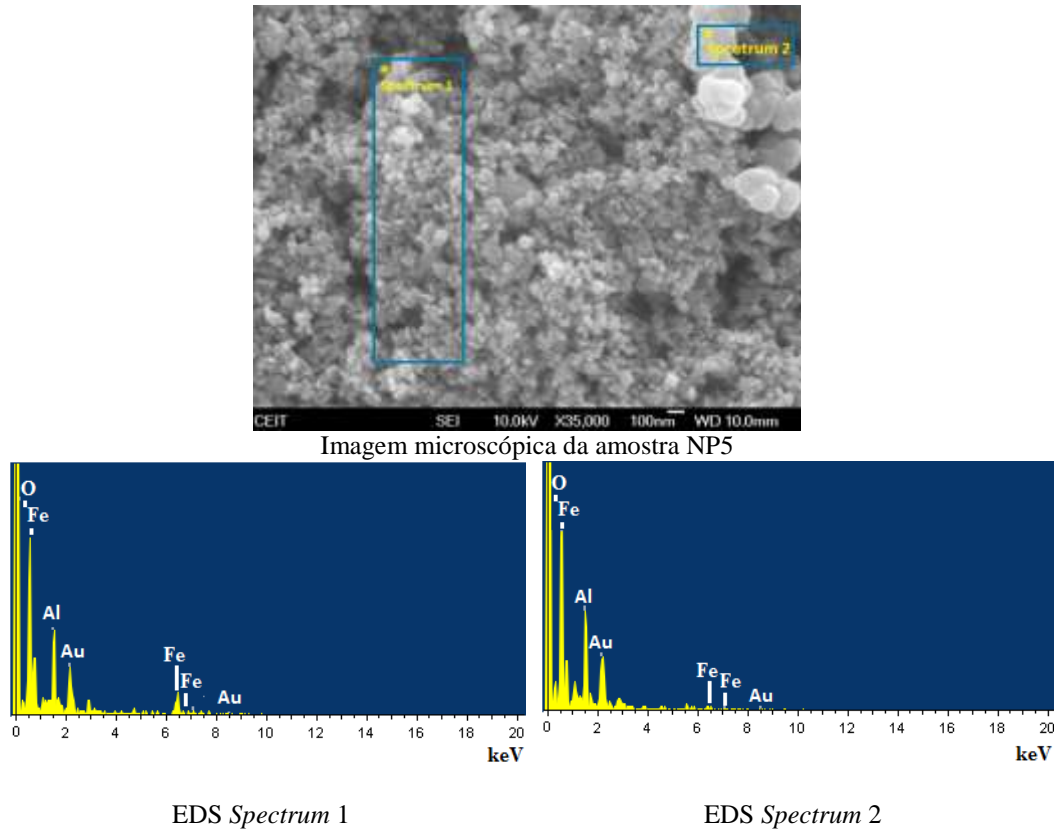


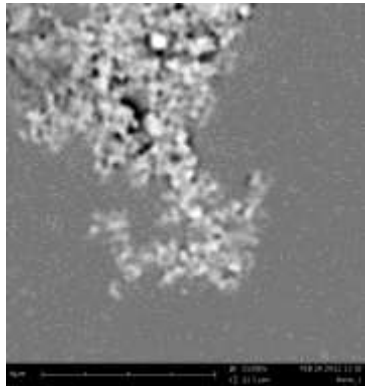
Figura 42: Resultados da amostra NP5 obtidos por FEG-SEM/EDS.

Ao examinar-se a figura 42, correspondente à amostra NP5, observa-se que existem partículas mais pequenas e outras um pouco maiores, podendo estas últimas ser aglomerados das partículas mais pequenas, sendo difícil concluir sobre a sua forma. A amostra NP5 possui na sua composição O e Fe, com valores de percentagem atómica de 59.60 e 24.61%, (região *Spectrum 1*) e 61.53 e 21.92% (região *Spectrum 2*), respectivamente. A relação Fe/O toma valores de 0.413 (região *Spectrum 1*) e 0.356 (região *Spectrum 2*), o que poderá revelar a presença de uma mistura de óxidos nesta amostra. Também se observa a presença de Al (12.56% na região *Spectrum 1* e 11.82% na região *Spectrum 2*), que corresponde a zonas do *stubb* que não contem amostra (como já referido para casos anteriores), e Au (3.23% na região *Spectrum 1* e 4.73% na região *Spectrum 2*) que pode advir do facto de as amostras terem sido levadas ao *sputter* (tendo sido revestidas por uma película de ouro e paládio para as tornar condutoras).

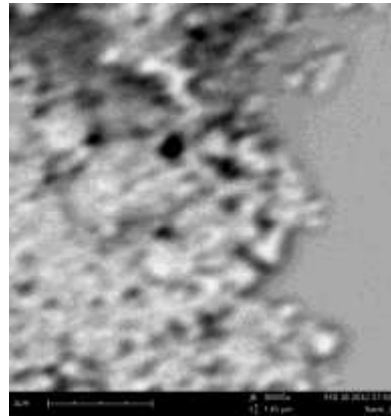
Relativamente ao diâmetro médio das nanopartículas, não sendo possível realizar medições e contagens individuais das nanopartículas, com as imagens disponíveis, não foi possível por este método obter esses valores. Foi possível contudo verificar que as partículas estão muito aglomeradas, o que pode indicar que os diâmetros

obtidos com a técnica de DLS sejam referentes aos aglomerados de partículas e não às partículas individuais.

Por SEM examinaram-se as amostras de nanopartículas suspensas na mistura água/etanol, observando-se os resultados para todas as amostras nas figuras 43 a 45.

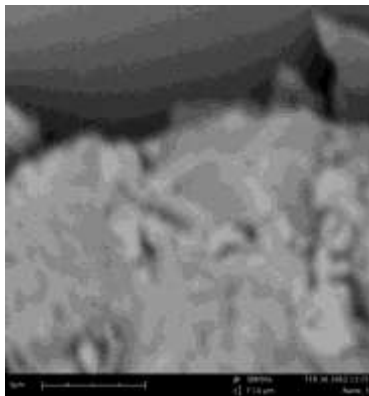


(a) NP1

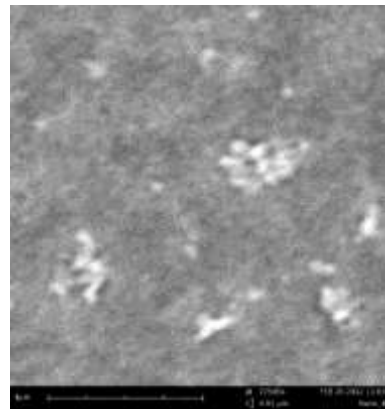


(b) NP2

Figura 43: Imagens SEM das amostras (a) NP1 e (b) NP2.

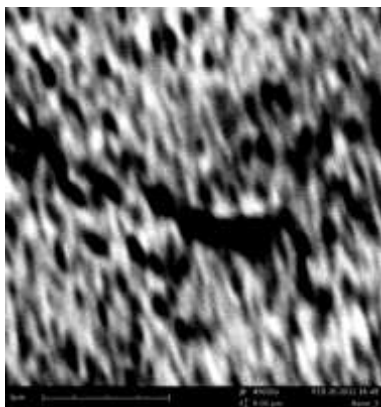


(a) NP3

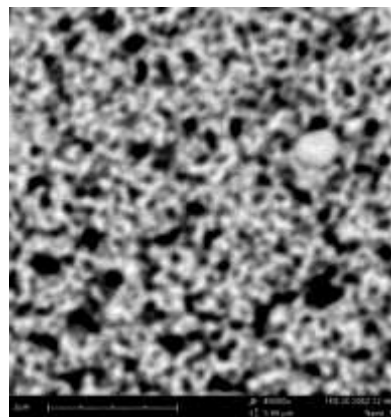


(b) NP4

Figura 44: Imagens SEM das amostras (a) NP3 e (b) NP4.



(a) NP5



(b) NP6

Figura 45: Imagens SEM das amostras (a) NP5 e (b) NP6.

Observando as figuras 43 a 45, verifica-se que as imagens de SEM têm muito menos qualidade e resolução que as obtidas por FEG-SEM. Nestes casos, ainda é mais difícil observar partículas individuais. Em todos os tipos de nanopartículas verifica-se que as partículas estão muito aglomeradas, não se conseguindo descobrir quais as suas formas geométricas.

Com esta técnica analítica também não se consegue efectuar o cálculo do diâmetro das nanopartículas, visto que a ampliação é muito pequena (ainda mais que a das imagens de FEG-SEM).

3.5 XRD

No sentido de tentar obter o tamanho médio do cristal das nanopartículas por um outro método e a composição de cada uma das amostras, fez-se a análise de todas as amostras sintetizadas por XRD. Os resultados obtidos são apresentados nas figuras 46 à 51 e foram, posteriormente, analisados no *software Match!2*, com o intuito de verificar quais os elementos presentes em cada amostra e quais os planos (*hkl*) correspondentes a cada partícula (aqui, para além do *software Match!2*, também se compara com os valores padrão da difracção, fornecidos pelo CEIT para os elementos Fe_3O_4 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

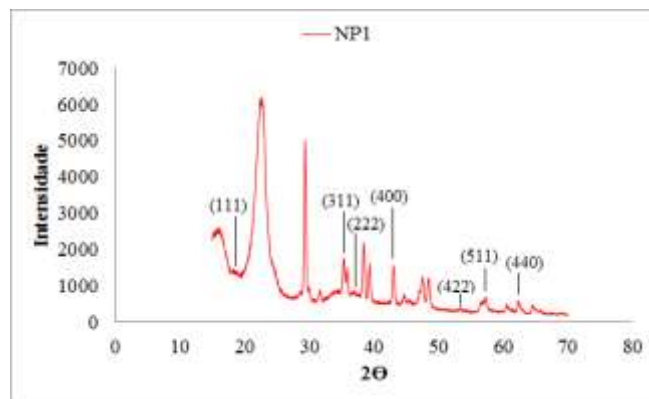


Figura 46: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP1.

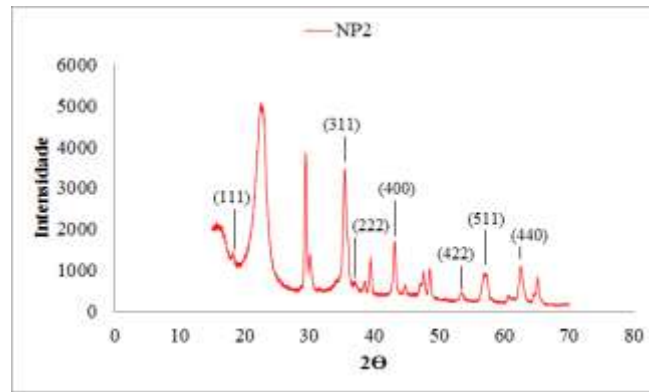


Figura 47: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP2.

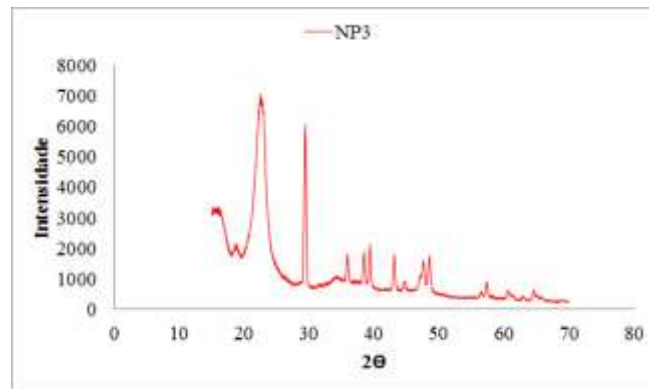


Figura 48: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP3.

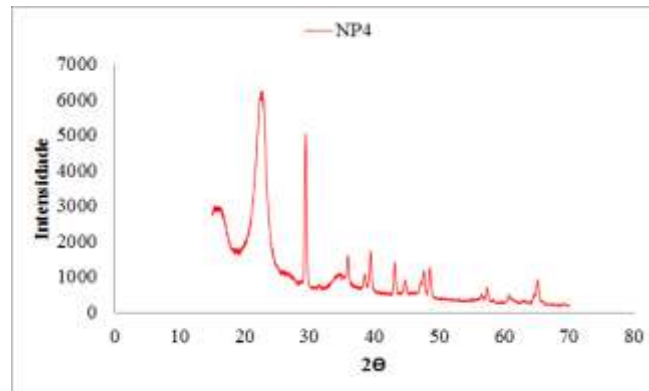


Figura 49: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP4.

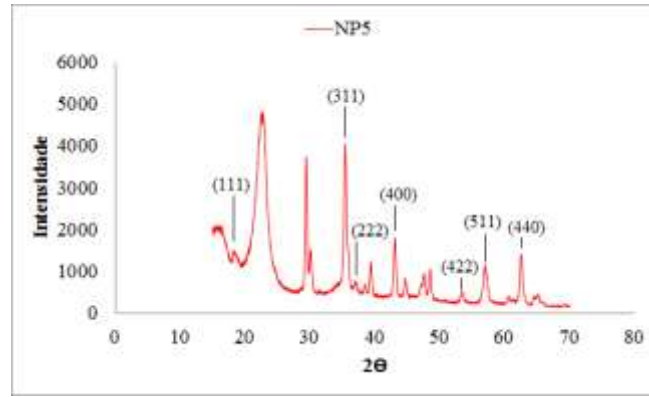


Figura 50: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP5.

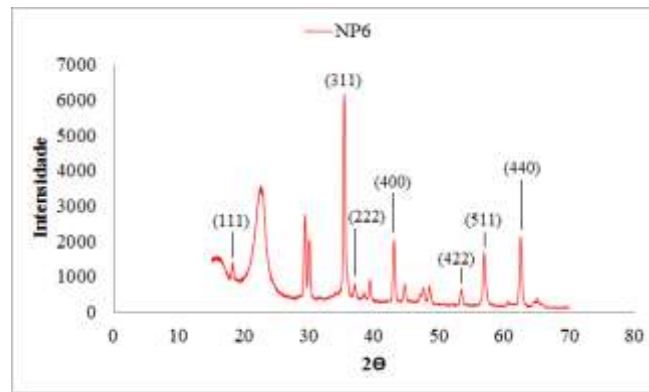
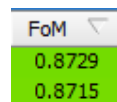
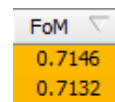


Figura 51: XRD Intensidade vs. 2θ da amostra NP6.

Através do *software Match! 2* é possível identificar as fases presentes em cada amostra (apenas interessa os compostos de Fe e O), tendo especial atenção aos valores de *FoM* (*figure-of-merit*) apresentados pelo software e à sua cor (um valor elevado de *FoM* indica uma maior probabilidade de esse composto estar presente, ou seja, um valor aceitável aparecerá a verde, caso apareça a laranja avermelhado não é tão provável a presença de tal composto na amostra), como se pode exemplificar na figura 52 [115].



(a)



(b)

Figura 52: Exemplo de um valor *FoM* aceitável (a) e de um menos aceitável (b).

Assim sendo, constata-se que a amostra NP1 é constituída maioritariamente por Fe_3O_4 , apresentando um valor de *FoM* de 0.7403. A amostra NP6 é também constituída maioritariamente por Fe_3O_4 , possuindo um valor de *FoM* bastante superior (0.8729). Nestas duas amostras, comparando-se com os valores padrão de difracção, também se

constata que há maior probabilidade do Fe_3O_4 estar presente na amostra NP6. Tal é revelado na figura 51 pelo facto dos planos (311) e (440), característicos da magnetite, serem os maiores picos existentes, indo de encontro aos valores padrão. As amostras NP3 e NP4 apenas têm um valor aceitável de *FoM* (0.78118 e 0.7875, respectivamente), considerando a presença de Fe metálico, possuindo contudo também magnetite e Wustite (valores de *FoM* baixos, 0.6841 e 0.6614). Nestas duas amostras não se exibem os planos cristalográficos nas figuras 48 e 49, visto que não existem óxidos de ferros com valores de *FoM* aceitáveis que indiquem uma grande probabilidade de estarem presente na amostra. Por sua vez, a amostra NP2 tem na sua composição 61.6% de magnetite e 38.4% de maghemite com valores de *FoM* de 0.8528 e 0.7399, respectivamente, acontecendo o mesmo na amostra NP5. Contudo, neste caso a composição da amostra é de 56.9% em magnetite (*FoM* de 0.8516) e 43.1% em maghemite (*FoM* de 0.7673). Nestes dois últimos casos, por comparação com os valores padrão de difracção não é possível retirar conclusões, visto que os planos cristalográficos, observados nas figuras 47 e 50, que são característicos da magnetite e maghemite, se sobrepõem. Ainda no caso da amostra NP2, os resultados estão de acordo com os obtidos por FEG-SEM/EDS, onde também se verificou a presença de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e de Fe_3O_4 .

Conclui-se assim que as amostras NP1 e NP6 são as que apresentam maior composição em magnetite. No entanto, as nanopartículas da amostra NP6 são as que apresentam uma maior pureza, visto que o valor de *FoM* é muito mais elevado, o que indica uma maior possibilidade da existência de magnetite nessa amostra. Em sentido contrário, ou seja, as que não contêm vestígios de magnetite são as amostras NP3 e NP4, o que está em linha com a ausência de comportamento magnético observado por estas amostras.

Em relação ao efeito da razão molar NaOH/precursor na quantidade de Fe_3O_4 sintetizado, constata-se que uma razão molar NaOH/precursor de 4 (casos das amostras NP1 e NP6) conduz a bons resultados. Por outro lado, quando esse valor é de 2 (amostras NP3 e NP4) os resultados, como já foi referido, não foram de encontro ao pretendido, não se conseguindo, nestas condições, sintetizar Fe_3O_4 . No caso de valores de razão molar NaOH/precursor superiores (8 para a amostra NP2 e 6 para a amostra

NP5) os resultados revelam nestas amostras, para além de Fe_3O_4 , também a presença de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Por XRD é também possível saber qual o tamanho médio dos cristais de cada uma das amostras sintetizadas, usando para tal a equação (11) apresentada na subsecção 2.2.5. Na figura 53 representam-se as constantes dessa equação e sua relação com os picos de XRD obtidos. Nos anexos, mostra-se como se efectuou o cálculo para todas as amostras. Na tabela 12 encontra-se os diâmetros obtidos para todas as nanopartículas.

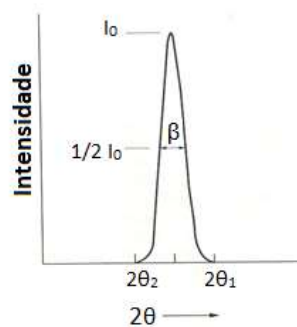


Figura 53: Ilustração das constantes da equação de Scherrer, em que I_0 corresponde à intensidade no maior pico e β a diferença entre $2\theta_1$ e $2\theta_2$ a meio de I_0 (Adaptado de [116]).

Tabela 12: Tamanho médio de cada uma das nanopartículas.

Amostra	Tamanho médio (nm)
NP1	22.8
NP2	25.7
NP3	21.6
NP4	21.6
NP5	16.0
NP6	21.9

Pela análise da tabela 12, conclui-se que as nanopartículas da amostra NP5 são as que possuem um menor diâmetro, enquanto que as nanopartículas da amostra NP2 são as que têm o maior diâmetro. Comparando estes resultados com os obtidos na técnica de DLS (única em que foi possível obter valores para o diâmetro), verifica-se que os valores obtidos são bastante díspares, obtendo-se neste caso tamanhos médios na casa das duas dezenas, enquanto que no DLS se obteve valores na casa das centenas e, em alguns casos, na dos milhares. Assim sendo, pode-se afirmar uma vez mais que os resultados da técnica de DLS dizem respeito não a partículas individuais, mas sim a

aglomerados de partículas. Em comparação com os valores obtidos na literatura, os diâmetros aqui obtidos são bastante inferiores [43].

3.6 Estudo do Escoamento de Nanopartículas em Microcanais

Como já foi referido, em primeiro lugar foi estudado o escoamento de dois fluidos (Dx40 e Dx40 com GVs em suspensão) num microcanal em PDMS com duas entradas e saídas com o intuito de se verificar se existe mistura destes dois fluidos. As imagens foram capturadas com uma objectiva de 10x (abertura numérica de 0.25), com uma resolução de 800x400 *pixels*, com uma velocidade de 400 frames/s e um caudal de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Como se pode visualizar na figura 54 (a), não houve mistura dos dois fluidos. De seguida introduziram-se as nanopartículas comerciais de Fe_3O_4 (concentração de 1%) ao sangue e aplicou-se um campo magnético, com o objectivo de verificar se estas se aglomeram na zona da parede em que é aplicado esse campo. Tal facto não acontece, como se observa na figura 54 (b), que foi adquirida com os mesmos parâmetros anteriores.

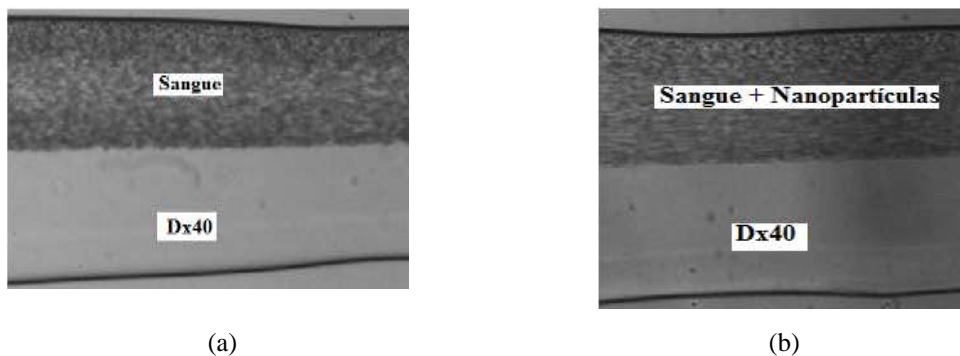


Figura 54: Sangue com (a) 5%Hct e (b) com nanopartículas misturadas aplicando-se um campo magnético.

Numa segunda fase foi também testado com um único fluido com nanopartículas em suspensão. No entanto, neste caso, foi observado a formação de uma grande quantidade de aglomerados contendo GVs e nanopartículas junto das paredes dos microcanais. Assim, optou-se por efectuar novos estudos usando microcanais circulares de vidro em borosilicato com 300 μm (*Vitrocom*, EUA). Como já referido anteriormente, com o intuito de se visualizar a camada de plasma fez-se o escoamento só com sangue (5%Hct). A visualização da camada de plasma é um fenómeno

fisiológico que acontece no ser humano e pretende-se verificar se este mesmo fenómeno sofre alguma alteração com a junção de nanopartículas magnéticas.

Estes testes foram efectuados com um caudal de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, usando uma objectiva de 20x, com uma resolução de 800x600 *pixels* e uma velocidade de 1000 frames/s. As imagens obtidas foram transferidas para o computador e avaliadas com o *software Image J*. Em primeiro lugar converte-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, seleccionando a opção *Set Scale* no comando *Analyze*. De seguida procede-se ao seu realce por aplicação de um filtro (*Unsharp Mask*) e delimitou-se a área correspondente à CP (em cima e em baixo). Para tal, desenhou-se um quadrado em que se seleccionou a opção *Draw* (presente no comando *Edit*) com o objectivo de apenas se visualizar as linhas desse rectângulo. Na figura 55 (a) pode-se observar a imagem original retirada num plano próximo ao centro do microcanal, enquanto que na figura 55 (b) pode-se visualizar a mesma imagem tratada com a área da camada de plasma seleccionada junto às paredes do microcanal.

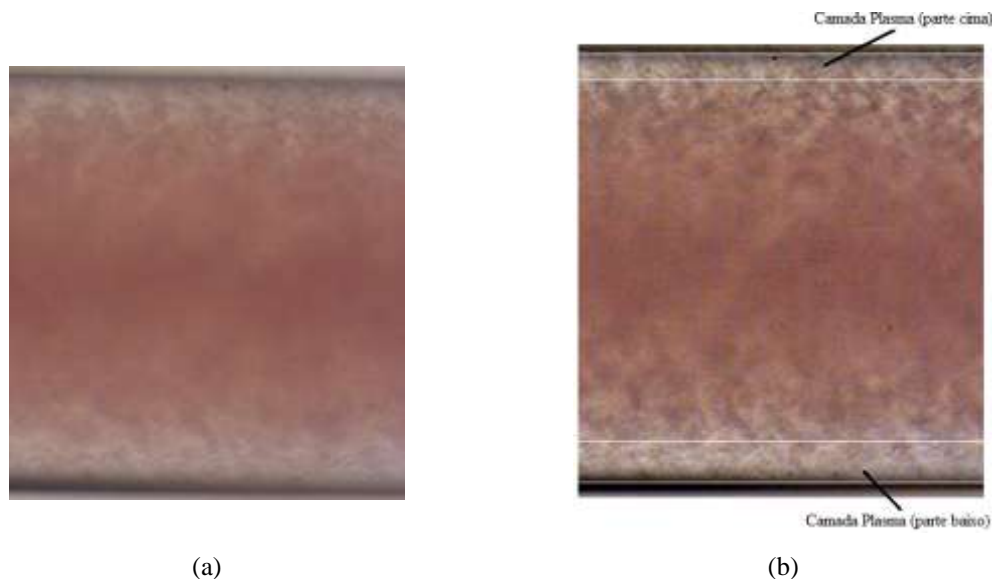


Figura 55: Sangue com 5% Hct, onde (a) é a imagem original e (b) imagem tratada com a zona correspondente à camada de plasma.

De seguida, para retirar os valores da espessura é necessário redesenhar o rectângulo, mas neste caso foi seleccionada a opção *Fill* (também presente no comando *Edit*), ficando o rectângulo com a área preenchida como se pode observar na figura 56.

De seguida, seleccionou-se a ferramenta de rastreamento (varinha) para obter os valores da espessura da camada de plasma que foram posteriormente tratados em *Excel*.



Figura 56: Tratamento de imagem realizado na camada de plasma (parte cima e parte baixo) no sangue com 5% de hematócrito com o objectivo de determinar as suas espessuras.

3.6.1 Efeito das Nanopartículas na Camada de Plasma (Ausência de Campo Magnético)

Posteriormente, introduziram-se nanopartículas juntamente com o sangue para averiguar qual o efeito destas na camada de plasma, como já mencionado. As imagens foram obtidas da mesma forma que o caso apresentado anteriormente, tendo sido efectuadas as mesmas etapas para se observar a espessura da CP. Neste caso, apenas se apresenta o exemplo de duas nanopartículas sintetizadas neste trabalho (amostra NP4, representativa das partículas não magnéticas e amostra NP6, representativa das partículas magnéticas). Nas figuras 57 e 58 observa-se, respectivamente, as imagens obtidas com as amostras NP4 e NP6, onde (a) representa a imagem original e (b) a área demarcada da camada de plasma. Mais uma vez estas figuras correspondem a uma zona central do microcanal.



(a)



(b)

Figura 57: Amostra NP4, onde (a) é a imagem original e (b) a zona correspondente à camada de plasma.



Figura 58: Amostra NP6, onde (a) é a imagem original e (b) a zona correspondente à camada de plasma.

Na figura 59 são apresentados os valores correspondentes à espessura da camada de plasma destas duas amostras e das nanopartículas comerciais já referidas, misturadas com o sangue.

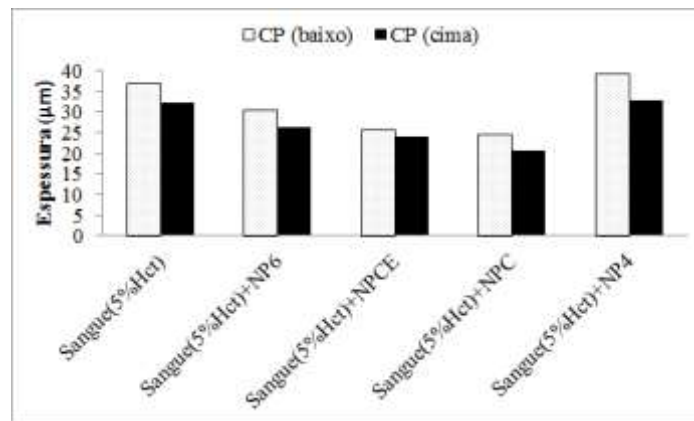


Figura 59: Espessura da camada de plasma para o sangue com 5 %Hct e este misturado com 4 tipos distintos de nanopartículas.

Os resultados da figura 59 sugerem que a presença de nanopartículas magnéticas proporciona a diminuição da espessura da camada de plasma, tendo o escoamento com sangue obtido um valor de CP (cima) de 32.07 µm e CP (baixo) de 37.06 µm. Estes resultados sugerem que as nanopartículas no plasma diminuem, de alguma forma, a tendência dos Gvs em migrarem axialmente. Por outro lado, a presença de nanopartículas não magnéticas (NP4) proporcionou um ligeiro aumento da espessura da camada de plasma (CP (cima) tem uma espessura de 32.78 µm e CP (baixo) de 39.19 µm), podendo dever-se quer ao facto de a densidade das nanopartículas na amostra NP4 ser menor que a densidade das nanopartículas na amostra NP6 (visível nas figuras 57 e 58, em que a parte central da figura 58 é muito mais uniforme e mais densa que a da

figura 57), quer ao facto de as NP4 formarem aglomerados de GVs e nanopartículas (partes mais escuras na figura 57).

De salientar ainda, que em termos gerais, a camada de plasma da parte de baixo possui valores ligeiramente superiores quando comparados com os valores da parte de cima dos microcanais. Esta discrepância, pode dever-se a erros provenientes do tratamento de imagem e devido ao facto de o microcanal não se encontrar completamente horizontal e conter uma ligeira inclinação devido à construção adoptada. Na figura 60 é possível observar não só o microcanal como também, com o campo magnético que foi empregue nas próximas etapas.

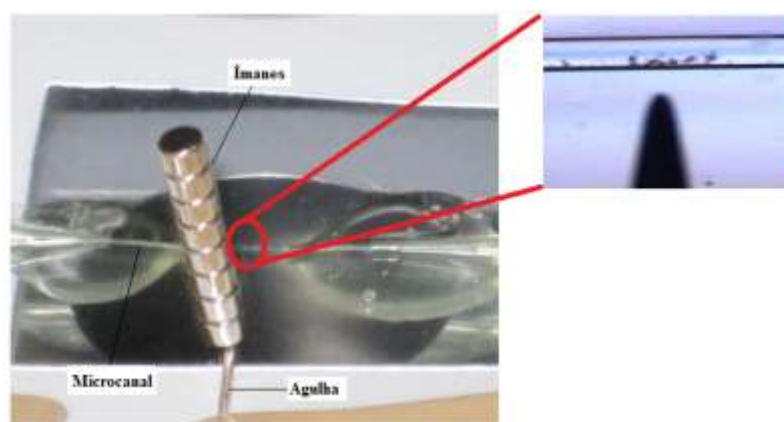


Figura 60: Microcanal de vidro borosilicato de 300µm e metodologia usada para aplicar o campo magnético.

3.6.2 Efeito das Nanopartículas na Camada de Plasma (Campo Magnético Aplicado)

Na etapa seguinte aplicou-se um campo magnético ao escoamento de cada uma dessas nanopartículas misturadas com sangue (com 5% Hct), como se pode observar na figura 60. Em todos os casos variou-se o campo magnético, tendo valores de 61.5, 123.1 e 138.5 G, como mostrado anteriormente, obtendo imagens minuto a minuto à medida que se aumentava o campo magnético. Isto apenas não sucedeu no caso do estudo realizados com as nanopartículas da amostra NPCE, na zona central, para a situação em que foi aplicado um campo magnético de 138.5 G.

As imagens correspondentes a cada uma destas misturas foram adquiridas e tratadas usando o mesmo procedimento das etapas anteriores. Foram retiradas imagens de distintas zonas do microcanal de vidro, como se pode observar na figura 61 (na zona onde é aplicado o campo magnético - “meio central (C)” -, na zona imediatamente

anterior e posterior a este campo – “antes montante (M) ” e “depois jusante (J) ”, respectivamente – e numa zona a montante mais afastada do campo magnético, cerca de 650 μm para trás – “mais montante (MM)” (ver figuras 62 e 63). Para estas situações apenas se mostram as imagens obtidas para dois tipos de nanopartículas (NPCE e NP6) para o caso em que é aplicado um campo magnético de 138.5 G, como se observa nas figuras 62 e 63, onde (a), (c), (e) e (g) correspondem às imagens originais correspondente a cada uma das 4 zonas e (b), (d), (f) e (h) à área da espessura da camada de plasma nessas mesmas zonas.

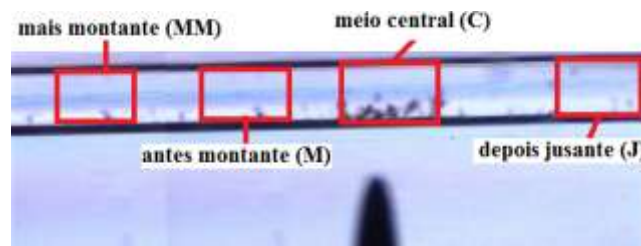
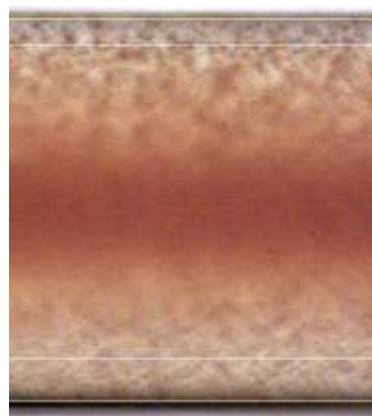


Figura 61: Diferentes zonas do microcanal.



(a)

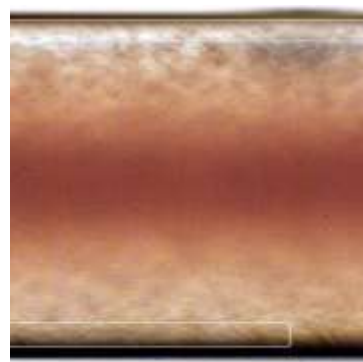


(b)

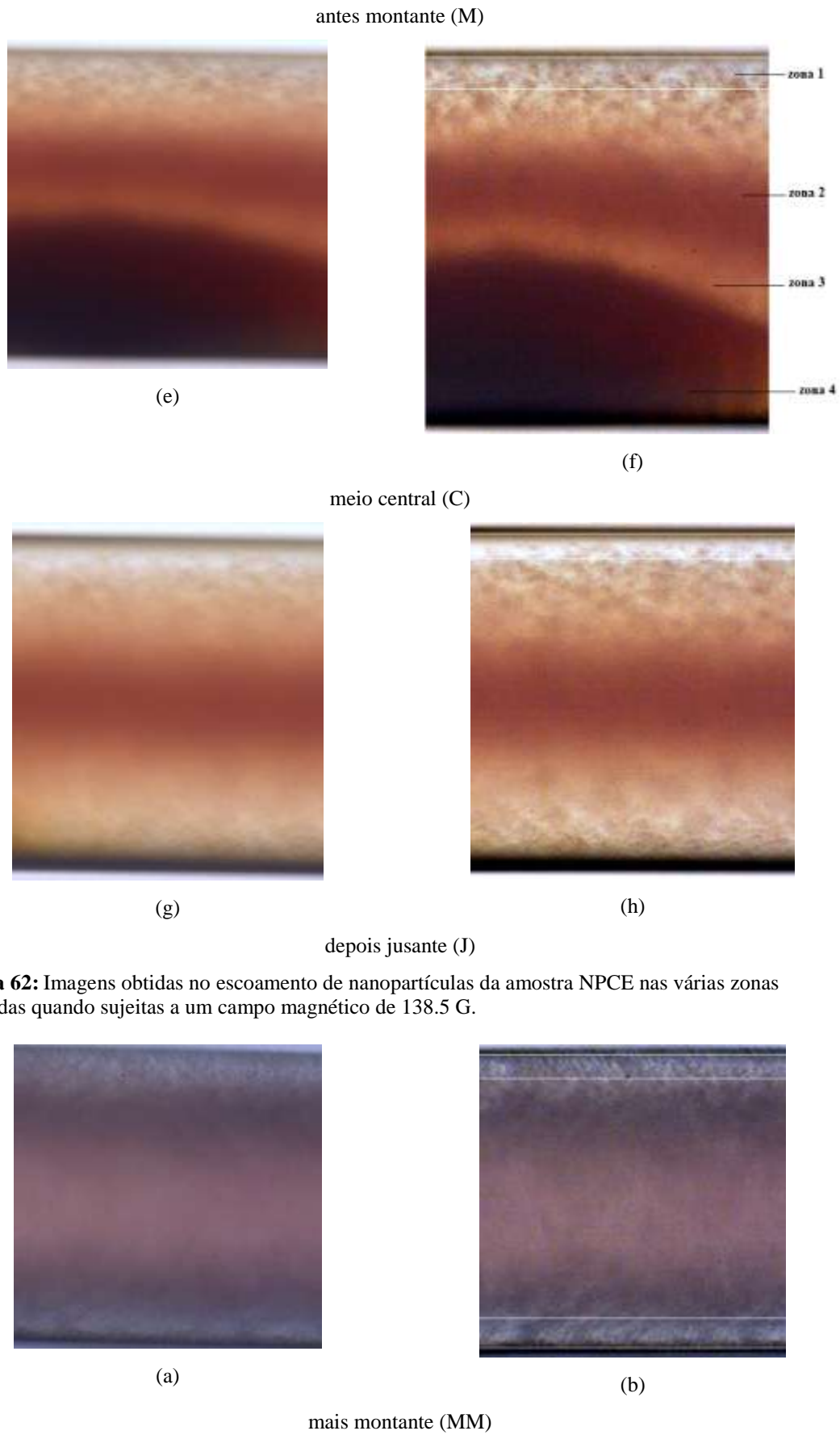
mais montante (MM)



(c)



(d)



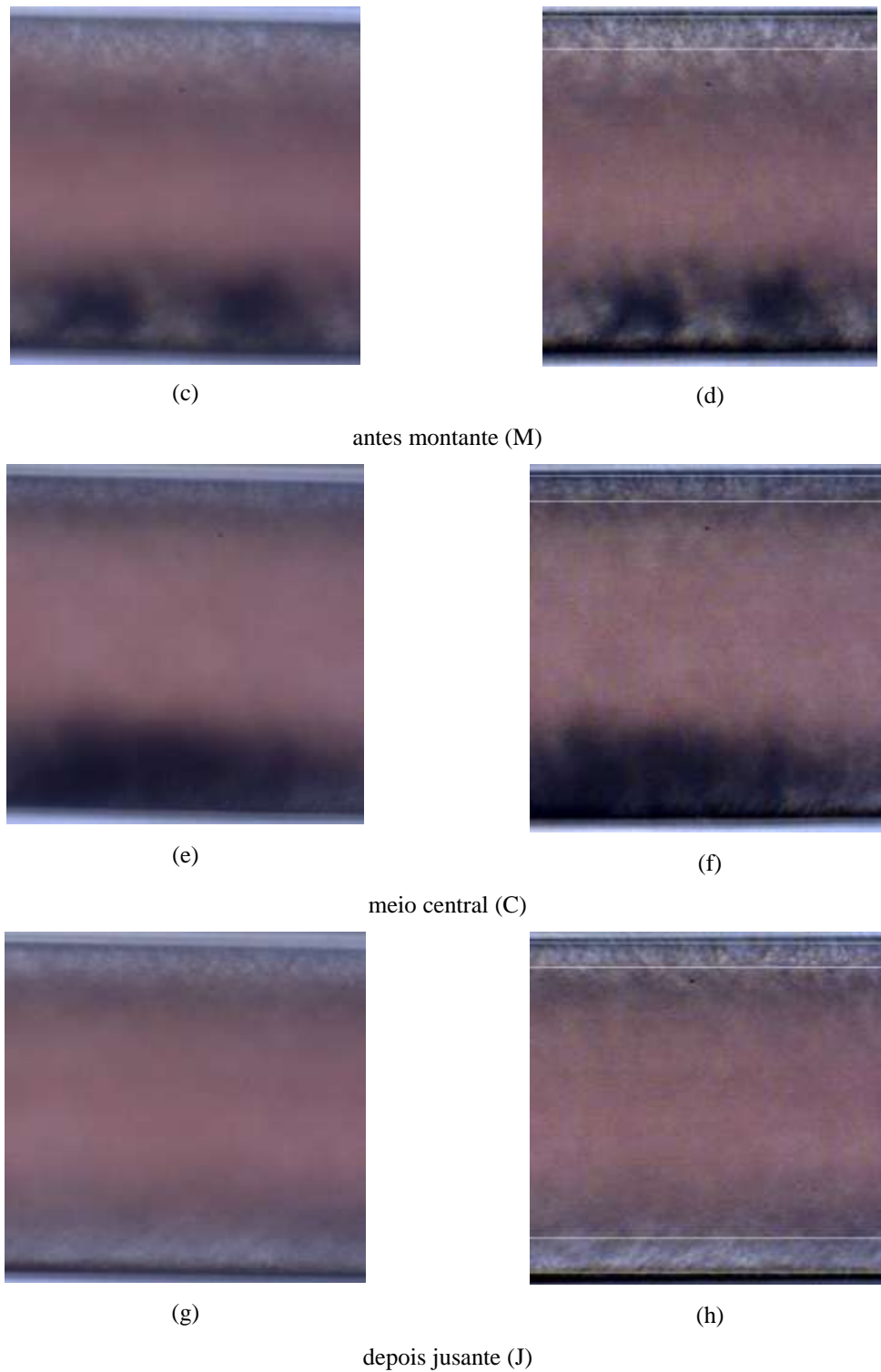


Figura 63: Imagens obtidas no escoamento de nanopartículas da amostra NP6 nas várias zonas estudadas quando sujeitas a um campo magnético de 138.5 G.

Nas figuras 64 à 66 podem ser observados os valores correspondentes à camada de plasma para estas duas amostras e para a amostra NPC. Estes gráficos representam a

espessura da camada de plasma tendo em consideração a zona estudada e o campo magnético aplicado.

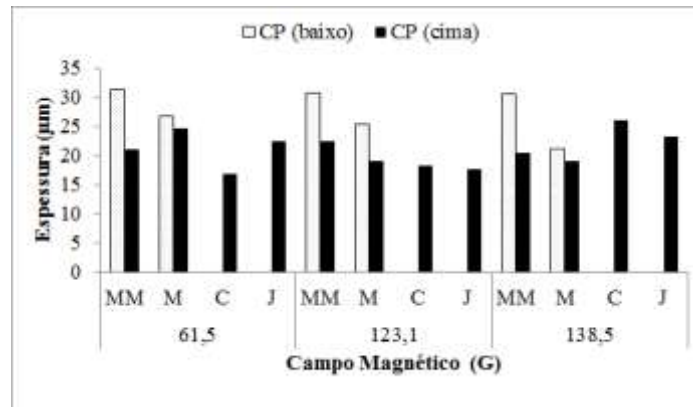


Figura 64: Espessura da camada de plasma observada nos estudos com a nanopartículas NPCE, tendo em conta as distintas zonas estudadas e o campo magnético aplicado.

Tendo em consideração a figura 62 e os resultados da figura 64, para o caso dos estudos conduzidos com a amostra NPCE, verifica-se a existência de camada de plasma na parte de baixo na zona “MM”, diminuindo a sua espessura na zona seguinte (“M”) para desaparecer por completo nas zonas a seguir (“C” e “J”), verificando-se isto independentemente do campo aplicado. Na zona onde é aplicado o campo magnético (“C”), observa-se que as nanopartículas começam a aglomerar, ocorrendo um fenómeno fluídico bastante interessante. Este é visível na figura 62 (e) e (f), em que se observa um escoamento trifásico. A primeira fase é uma parte com zonas praticamente sem células (zona 1) e corresponde à camada de plasma, a fase seguinte é uma zona mais evidente (zona 2) e corresponde à zona central (cor “avermelhada) onde se pode observar uma elevada concentração de GVs devido à tendência destas células em migrarem para o centro do microcanal. Uma terceira fase (zona 3) corresponde a uma zona com uma menor concentração de células sanguíneas, verificando-se uma mistura do “plasma” (soro fisiológico e Dx40) juntamente com as nanopartículas magnéticas que estão a migrar na direcção do campo magnético situado na parede inferior. Adicionalmente existe uma outra zona mais escura (zona 4) que diz respeito à aglomeração das nanopartículas devido às forças magnéticas geradas pelo campo magnético aplicado exteriormente.

Por sua vez, para a camada de plasma existente na parede de cima e na zona “C”, quando sujeitas a um campo magnético de 138.5 G, verifica-se um aumento relativamente grande em relação aos outros 2 casos. Isto pode dever-se ao facto de aqui

a imagem ter sido adquirida com mais de 1 min de intervalo, como já referido. Aqui também se averigua que quanto maior o número de ímanes existe uma ligeira tendência da camada de plasma na parte superior aumentar, podendo dever-se ao facto de os GVs conterem Fe na sua composição, fazendo com que os GVs também se aproximem da zona do campo magnético.

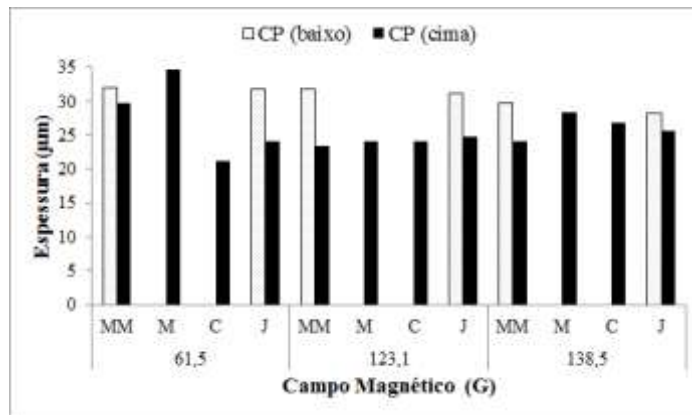


Figura 65: Espessura da camada de plasma observada nos estudos com as nanopartículas NP6, tendo em conta as distintas zonas estudadas e o campo magnético aplicado.

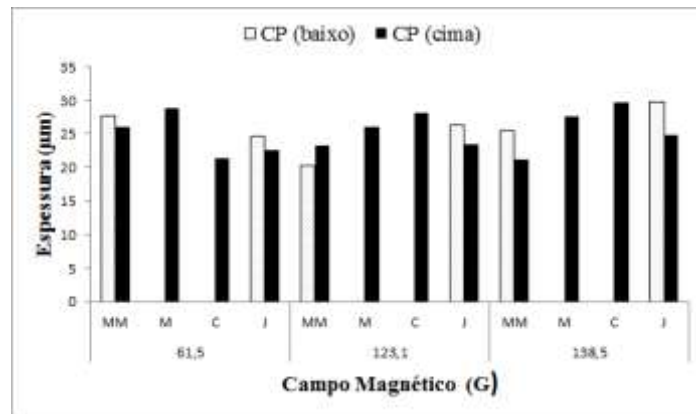


Figura 66: Espessura da camada de plasma observada nos estudos com as nanopartículas NPC, tendo em conta as distintas zonas estudadas e o campo magnético aplicado.

Analisando as figuras 63, 65 e 66, verifica-se que, contrariamente ao observado nos estudos com as nanopartículas NPCE, a camada de plasma existente na parte de baixo da zona “MM”, tem tendência a desaparecer nas duas zonas seguintes (“M” e “C”), pois as partículas NP6 e NPC começam logo a aglomerar-se na zona anterior onde é aplicado o campo magnético (“M”). Contudo, a CP reaparece novamente depois da zona onde se aplica o campo magnético (“J”), uma vez que, contrariamente às NPCE, não existe, possivelmente, micro-turbulências que proporcionam o aumento da mistura

dos vários elementos que constituem o fluido. Na região “J”, a mistura das nanopartículas NPCE com os GVs promove a formação de uma zona com uma baixa concentração de GVs quando comparada com a zona axial do microcanal.

Relativamente à camada de plasma na parte de cima, também aqui, como no caso dos estudos conduzidos com as nanopartículas NPCE, quanto maior o campo magnético maior a camada de plasma na zona “C”.

Nas figuras 67 à 70 apresentam-se novamente os resultados com as espessuras da camada de plasma (cima e baixo), mas neste caso organizados tendo em conta as diferentes partículas e o campo magnético aplicado.

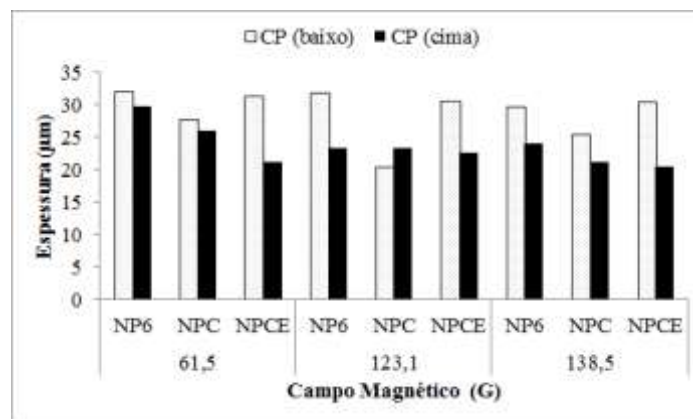


Figura 67: Espessura da camada de plasma na zona “MM” observada nos estudos com as diferentes nanopartículas, tendo em consideração o campo magnético aplicado.

Pela observação da figura 67, verifica-se que em todas as nanopartículas existe camada de plasma quer em cima quer em baixo. Tendo em conta a espessura da camada de plasma na parte inferior, repara-se que esta é sempre menor quando se utilizam as nanopartículas NPC, enquanto que a utilização das nanopartículas NPCE levam a uma menor camada de plasma em cima (caso em que o campo magnético é de 61.5 G). Nos casos em que são aplicados um campo de 123.1 e 138.5 G nada se pode concluir, pois as pequenas diferenças que se verificam podem dever-se a erros cometidos durante o processamento de imagem.

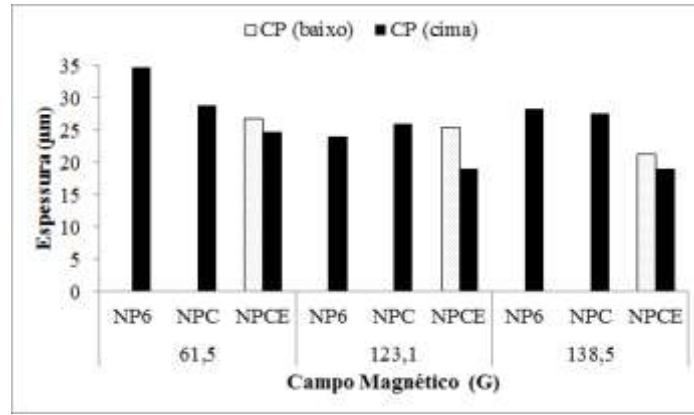


Figura 68: Espessura da camada de plasma na zona “M” observada nos estudos com as diferentes nanopartículas, tendo em consideração o campo magnético aplicado.

Na figura 68, constata-se que apenas as NPCE levam à formação de camada de plasma na parte inferior da zona “M” e que a espessura da camada de plasma na parte superior é sempre inferior comparativamente aos estudos conduzidos com as nanopartículas NP6 e NPC.

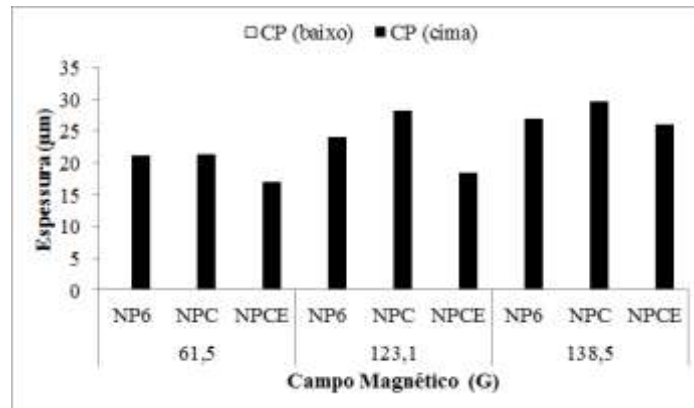


Figura 69: Espessura da camada de plasma na zona “C” observada nos estudos com as diferentes nanopartículas, tendo em consideração o campo magnético aplicado.

Analisando os resultados obtidos na zona “C”, figura 69, observa-se que não existe camada de plasma na parte de baixo, independentemente do tipo de partículas utilizadas nos estudos, uma vez que em todas elas se verificou a formação de um aglomerado de partículas junto à parede, quando sujeitas a um campo magnético. Nesta situação verifica-se que a camada de plasma na parte de cima aumenta com o campo magnético, sendo que é no caso dos estudos conduzidos com as nanopartículas NPC que se obtém os maiores valores para a espessura da CP. Em sentido contrário, as nanopartículas que conduzem a menores valores da CP são as NPCE. Esta situação

pode acontecer pelo facto da área de partículas aglomeradas junto à parede ser maior nos estudos com as nanopartículas NPC e menor no caso em que foram utilizadas as nanopartículas NPCE, como vamos discutir mais à frente.

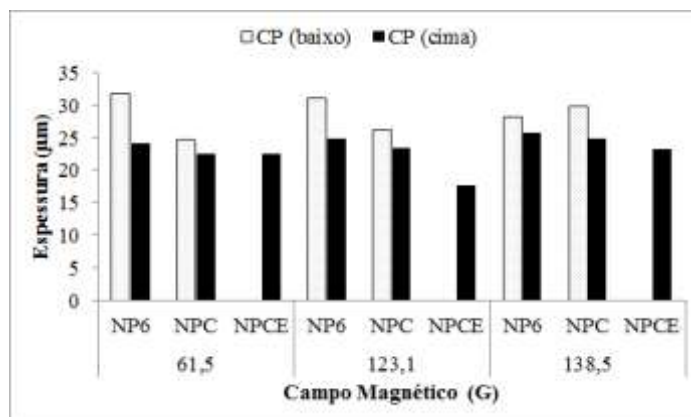


Figura 70: Espessura da camada de plasma na zona “J” observada nos estudos com as diferentes nanopartículas, tendo em conta o campo magnético aplicado.

Por último pela análise da figura 70, verifica-se que na zona “J” apenas nos estudos com as nanopartículas NPCE não se observa camada de plasma na parte de baixo. Em relação à camada de plasma na parte superior, vê-se que, nos casos em que são aplicados um campo magnético de 61.5 e 138.5 G, as espessuras são bastante próximas, podendo indicar que nesta zona não existe muita influência do campo magnético e do tipo de partículas utilizadas. O facto desta situação não acontecer com um campo magnético de 123.1 G pode indicar que foi cometido algum erro durante a aquisição e/ou tratamento da imagem.

3.6.3 Nanopartículas Aglomeradas Consoante o Campo Magnético

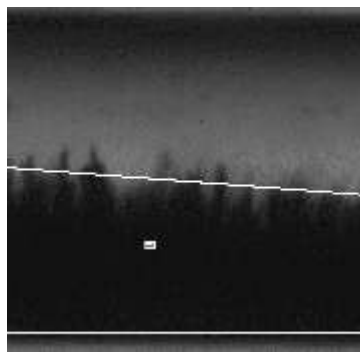
Aplicado

A última etapa deste trabalho teve como objectivo o cálculo da área de nanopartículas aglomeradas junto à parede em que foi aplicado o campo magnético. Foram utilizadas todas as nanopartículas sintetizadas neste trabalho (NP1, NP2, NP3, NP4, NP5 e NP6), as NPC e as NPCE, todas elas com uma concentração de 1% e suspensas em soro, como já mencionado anteriormente. Foi estudado o escoamento em soro de todas estas nanopartículas e o escoamento em sangue com 5% Hct das NP6, NPC e NPCE. Para as nanopartículas misturadas com GVs usou-se os mesmos parâmetros utilizados anteriormente. De referir que as nanopartículas misturadas em

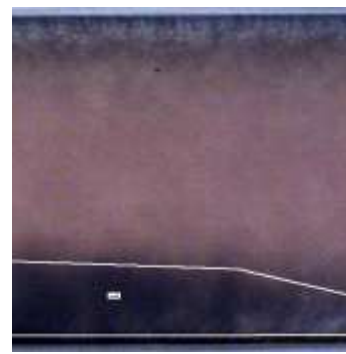
soro foram observadas com uma objectiva de 10x com zoom de 1.6, com uma resolução de 800x600 *pixels* e com um caudal de 10 μ l/min.

Para o tratamento destas imagens (com soro e sangue) recorreu-se uma vez mais ao *software Image J*, onde se converteu o vídeo numa sequência de imagens estáticas, não sendo uma vez mais necessário converter as imagens em níveis de cinzento. É indispensável, novamente, calibrar a imagem e aplicar o filtro *Unsharp Mask*. De seguida traça-se as áreas correspondentes às nanopartículas com o auxílio da ferramenta *Polygon selections*, seleccionando-se no menu *Plugins* e submenu *Analyze* o comando *Measure and Label* para se obter o valor da área (μm^2).

Na figura 71 observa-se a área delimitada para o caso dos estudos realizados com as nanopartículas NP6 em soro - (a) - e em sangue - (b) -, quando sujeitas a um campo magnético de 138.5 G.



(a) Soro



(b) Sangue

Figura 71: Área delimitada pelas nanopartículas NP6 em soro - (a) - e em sangue - (b) - quando sujeitas a um campo magnético de 138.5 G.

Para o escoamento em soro das nanopartículas NP3 e NP4 (comportamento não magnético) não são apresentados os resultados do cálculo da área visto que, como não apresentam comportamento magnético, não ocorre aglomeração de partículas junto à zona onde se aplicou o campo magnético, como se pode visualizar na figura 72.



Figura 72: Visualização do escoamento contendo as nanopartículas NP4 quando se aplica um campo magnético.

Outros dos fenómenos que ocorreram nos estudos realizados estão apresentados na figura 73, onde se observa os comportamentos das nanopartículas NPC, NPCE e NP6 após ser retirado o último campo magnético (138.5 G). De salientar que as nanopartículas NP1, NP2 e NP5 têm o mesmo comportamento das nanopartículas NPC e NP6, mas não são aqui apresentadas.

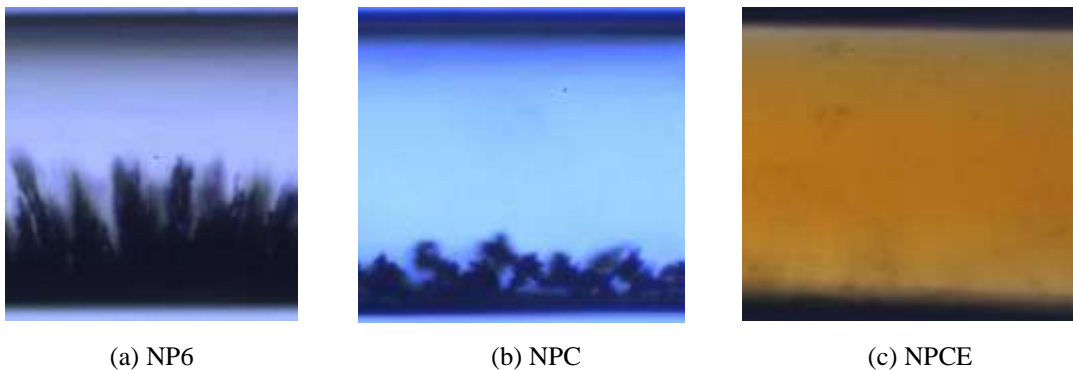


Figura 73: Comportamento das nanopartículas (a) NP6, (b) NPC e (c) NPCE quando é retirado o campo magnético.

Analisando a figura 73 observa-se que, após remover o campo magnético, as nanopartículas NP6 e NPC continuam aglomeradas à parede, se bem que essa quantidade diminui ligeiramente, enquanto que as nanopartículas NPCE desaparecem por completo, entrando na corrente normal da suspensão. Tal pode dever-se ao facto de estas possuírem um encapsulamento de ácido cítrico e sal de sódio, o que impede que haja interacção entre as partículas e a superfície do microcanal e que as partículas mantenham magnetização entre elas aquando da ausência do campo, uma vez que existe um revestimento que impossibilita o contacto directo entre elas.

Nas figuras 74 e 77 visualiza-se, respectivamente, as áreas aglomeradas das diferentes nanopartículas suspensas em soro e em sangue com 5%Hct, nos diferentes estudos de escoamento conduzidos.

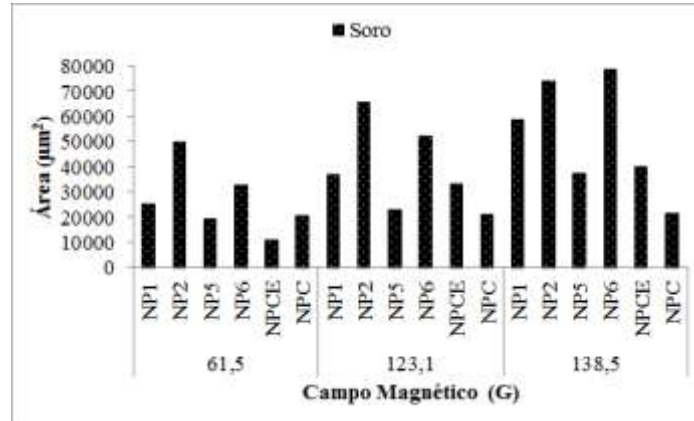


Figura 74: Área correspondente à aglomeração das nanopartículas nos estudos realizados em soro.

Analisando a figura 74 constata-se que à medida que aumenta a intensidade do campo magnético, a área de nanopartículas aglomeradas é cada vez maior. Para o caso das nanopartículas NPC, com exceção da situação em que é aplicado um campo magnético de 61.5 G, estas são aquelas que têm uma área menor. No caso em que é aplicado este campo, só as nanopartículas NPCE é que possuem uma área de aglomeração inferior. Por outro lado, as nanopartículas que possuem uma área de aglomeração superior são as NP2 (caso em que é aplicado um campo de 61.5 G e 123.1 G) e as NP6 (campo aplicado de 138.5 G). Entre as partículas sintetizadas, as NP5 são as que formam o menor aglomerado de nanopartículas.

Nas figuras 75 e 76 analisa-se a influência do tamanho das nanopartículas sintetizadas, da sua composição e do campo magnético aplicado na área de aglomeração.

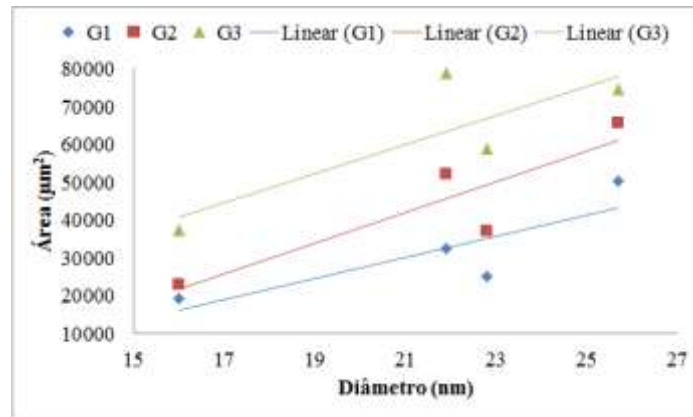


Figura 75: Área correspondente à aglomeração das nanopartículas sintetizadas tendo em conta o diâmetro de cada uma delas.

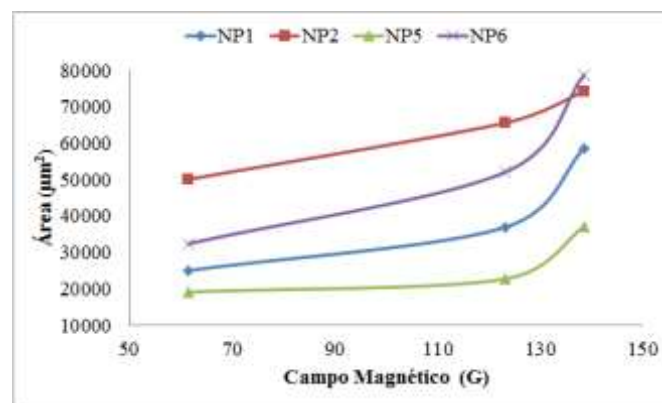


Figura 76: Área correspondente à aglomeração das nanopartículas sintetizadas em função do campo magnético aplicado.

Pela análise da figura 75 verifica-se, de uma forma geral, que a área das nanopartículas aglomeradas junto à parede aumenta à medida que aumenta o tamanho das nanopartículas. No entanto, pela observação da figura 76 constata-se que a composição das nanopartículas também tem influência na área. Ou seja, para as nanopartículas compostas somente por magnetite (NP1 e NP6), verifica-se um aumento muito pronunciado da área aglomerada com o aumento do campo magnético, aumento esse não tão pronunciado nos ensaios realizados com as partículas compostas por uma mistura de magnetite e maghemite (NP2 e NP5). Nas NP6 e nas NP1 verifica-se um aumento de área superior a 100% quando se aumenta o campo magnético de 61.5 G para 138.5 G, enquanto que nas NP2 esse crescimento é inferior a 50%. Tal comportamento pode ser devido ao facto da magnetite pura ser um material mais magnético que a mistura de magnetite com maghemite, fazendo com que as

características magnéticas da magnetite se intensifiquem aquando do aumento da intensidade do campo magnético.

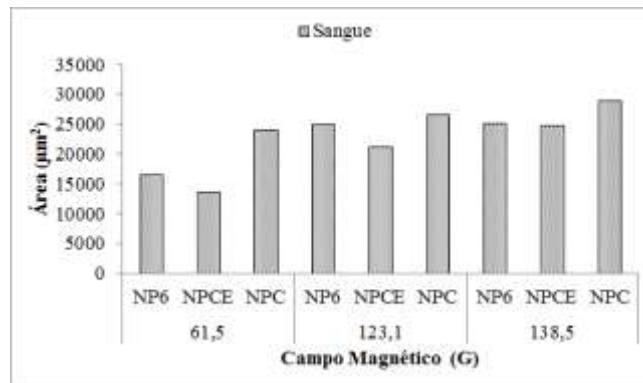


Figura 77: Área correspondente à aglomeração da nanopartículas NP6, NPC e NPCE nos estudos conduzidos em sangue.

Por análise da figura 77, verifica-se que as áreas de aglomerados aqui formadas são de uma maneira geral inferiores às obtidas nos estudos em soro. Contudo, tal como no caso anterior, à medida que se aumenta o campo magnético também aumenta a área de aglomerado de nanopartículas. Repara-se também que as nanopartículas NPC são as que formam uma área superior, enquanto as nanopartículas NPCE são as que originam uma área menor.

Capítulo 4: Conclusões e Trabalhos Futuros

4.1 Conclusões

Este trabalho teve como objectivos principais a síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e o estudo do seu comportamento num fluido composto por células sanguíneas a escoarem num microcanal sujeitos a um campo magnético. As principais conclusões retiradas deste trabalho são as seguintes:

A síntese pelo processo solvotérmico usando FeCl_3 como precursor, etilenoglicol como solvente e NaOH como base, permite obter nanopartículas magnéticas com elevado rendimento. O pH básico, o aumento da temperatura e a conversão completa do FeCl_3 (filtrado incolor) fazem com que o rendimento de síntese seja superior. Do estudo da influência do pH do meio no processo de síntese, conclui-se que o comportamento magnético é afectado pelo pH do meio, sendo que as partículas com comportamento magnético são formadas em meios com pH básico.

Em relação às técnicas empregues na sua caracterização reparou-se que as técnicas usadas não permitiram retirar muitas conclusões, principalmente no que toca à determinação do diâmetro médio das nanopartículas, como aconteceu nas técnicas de DLS, AFM e FEG-SEM. O problema comum a todas estas técnicas residiu no facto de se ter verificado uma elevada aglomeração das partículas, impedindo assim uma correcta avaliação dos resultados. A difracção de raios-X foi de entre as várias técnicas aplicadas aquela que permitiu tirar conclusões elucidativas. Foi assim possível conhecer a composição das amostras, bem como o tamanho médio das nanopartículas. Em termos de tamanho conclui-se que todas elas possuem um tamanho inferior a 50 nm, indicando que poderão ser aplicadas em hipertermia magnética. Em termos de composição verificou-se que apenas nas amostras NP6 e NP1 se conseguiu obter nanopartículas compostas somente por Fe_3O_4 . Assim sendo, tendo em consideração a composição em Fe_3O_4 e o rendimento obtido conclui-se que as nanopartículas NP6 são aquelas que obtiveram melhores resultados.

Nos estudos de escoamento realizados verificou-se que as nanopartículas, magnéticas e não magnéticas, têm influência na espessura da camada de plasma do sangue, sendo que as nanopartículas magnéticas promovem a diminuição dessa espessura enquanto as nanopartículas não magnéticas promovem o aumento dessa espessura. Conclui-se também que, dependendo do tipo de nanopartículas e das zonas que se analisa, se obtém distintos comportamentos. No caso das nanopartículas NPCE a

camada de plasma após a zona “M” deixa de existir, enquanto que com as nanopartículas NP6 e NPC a camada de plasma desaparece na zona “M” e “C”, mas reaparece na zona “J”. Relativamente à área de nanopartículas aglomeradas junto à parede, quando se aplica um campo magnético, conclui-se que esta área aumenta com o aumento do campo magnético, com o tamanho das partículas e quando são compostas apenas por magnetite. No caso em que, posteriormente, se retira o campo magnético verifica-se que existe influência quando as nanopartículas são encapsuladas (o aglomerado de nanopartículas NPCE desaparece).

Após a realização de todos estes estudos, pode-se concluir que de todas as nanopartículas magnéticas sintetizadas ao longo deste trabalho, apenas as NP1, NP2, NP5 e NP6 têm propriedades que podem permitir que estas sejam aplicadas na hipertermia magnética. Contudo, seria necessário efectuar mais alguns testes ao nível do escoamento, de forma a provar que quando é aplicado um campo magnético alternado, a temperatura aumenta para os valores pretendidos.

4.2 Trabalhos Futuros

Como trabalhos futuros seria interessante, na parte da síntese de nanopartículas, variar mais parâmetros como os tipos de precursor, o tempo de reacção e novas formas de lavagem e separação das partículas, mais eficazes, de modo a procurar aumentar assim o respectivo rendimento.

Na parte de caracterização das nanopartículas devia-se procurar um solvente, ou uma técnica mais eficaz, de forma a impedir que as partículas depositem rapidamente e se aglomerem, influenciando negativamente os ensaios que foram efectuados (*Malvern Zetasizer Nano Series*, AFM, FEG-SEM e SEM). Na técnica de FEG-SEM também seria importante conseguir imagens com uma maior resolução, de modo a permitir identificar as formas das nanopartículas e a medição do seu diâmetro, comparando assim os resultados com os obtidos nos outros métodos. No que diz respeito à técnica de XRD, e nos casos em que não se conseguiu determinar o tipo de óxido de ferro presente em algumas amostras magnéticas (caso em que os planos da magnetite e maghemite se sobrepõem) podia-se aplicar a espectroscopia de Mossbauer.

No estudo do escoamento sanguíneo em microcanais era interessante perceber melhor a razão pela qual o escoamento não funcionou quando se usou o PDMS e tentar aperfeiçoar novas técnicas de fabricação para este material poder ser usado em estudos

futuros. Também se podiam testar diferentes hematócritos, diferentes caudais e um novo microcanal de vidro com outro diâmetro, verificando assim a influência destas variáveis na camada de plasma. Para a análise da espessura da camada de plasma deve-se procurar um novo *software* para tratar as imagens, de forma a cometer menos erros de avaliação. Em termos de campo magnético podia-se aplicar um campo magnético alternado, vendo assim a influência das nanopartículas na geração de temperatura, ou seja, verificar se as nanopartículas desenvolvidas neste trabalho geram temperaturas suficientes para serem aplicadas em hipertermia magnética.

Referências Bibliográficas

- [1] Earl Boysen, “*Understanding Nanotechnology*”, consultado em <http://www.understandingnano.com/>, em Outubro de 2011;
- [2] LU, A. H., Salabas, E. L. and Schuth, F., “*Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application*”, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 46, page 1222-1244, 2007;
- [3] Arruebo, M., Fernandez Pacheco, R., Ibarra, M. R. and Santamaria, J., “*Magnetic nanoparticles for drug delivery*”, *Nano Today* vol.2 (3), page 22-32, 2007;
- [4] Schulz, M. J. and Shanov, V. N., “*Nanomedicine Design of Particles, Sensors, Motors, Implants, Robots, and Devices*”, artech house, 2009;
- [5] Pirota, K. R., “*Introdução ao Nanomagnetismo*”, 2009;
- [6] Sun, C., Lee, J.S.H. and Zhang, M., “*Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery*”, Vol. 60, page 1252-1265, 2008;
- [7] Schwertmann, U. and Cornell, R. M., “*Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*”, Wiley-VCH, Weinheim, 2000;
- [8] Cornell, R. M., Schwertmann, U., “*The Iron Oxides: structure, properties, reactions occurrence and uses*”, Wiley-VCH, Weinheim, 2003;
- [9] Hoffmann, M. R., Martin, S. T., Choi, W. and Bahnemann, D. W., “*Environmental applications of semiconductor photocatalysis*”, *Chem. Rev.*, page 69-96, 1995;
- [10] Liu, Y. and Song, Y., “*Synthesis of iron oxide nanoclusters and its catalytic oxidation for carbon monoxide*”, China University of Petroleum, 2011;
- [11] Weissleder, R., Stark, D. D., Engelstad, B. L., Bacon, B. R., Compton C. C., White, D. L., Jacobs, P. and Lewis J., “*Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity*”, *AJR. American Journal of Roentgenology*, page 167-173, 1989;
- [12] Sidhu, P. S. Gilkes, R. J. and Posner, A. M., “*The synthesis and some properties of Co, Ni, Zn, Cu, Mn and Cd substituted Magnetites*”, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 40, page 429-435, 1978;
- [13] Finotelli, P. V., Tese de Doutorado, “*Microcápsulas de Alginato contendo Nanopartículas Magnéticas para Liberação Controlada de Insulina*”, UFRJ, Instituto de Química, 2006;
- [14] Wiesner, M. R. and Bottero, J-Y, “*Environmental Nanotechnology: Applications and Impacts of Nanomaterials*”, McGraw-Hill, New York, page 40, 2007;
- [15] Trinchi, A., Muster, T. H., Dunlop J. B. and Collocott, S. J., “*Aging of Magnetite Nanoparticles in Aqueous Solutions of Differing pH*”, Australia, 2008;
- [16] Teja, A. S. and Koh, P. Y., “*Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles*”, *Prog Cryst Growth*, page 22-45, 2009;
- [17] Helgason, O., Greneche, J. M., Berry, F. J. and Mosselmans, F., “*The influence of ruthenium on the magnetic properties of g-Fe₂O₃ (maghemite) studied by Mossbauer spectroscopy*”, *J. Phys. Condens. Matt.*, page 2907-2915, 2003;
- [18] Zhang, Y., Huang, Z., Tang, F. and Ren, J., “*Thin Solid Films*”, page 2555-2561, 2006;
- [19] Evans, M. E. and Heller, F., “*Environmental Magnetism: Principles and Applications of Enviromagnetics*”, Academic Press, California, page 40, 2003;
- [20] Vollath, D., “*Nanomaterials: An Introduction to Synthesis, Properties and Applications*”, Wiley-VCH, Weinheim, 2008;

- [21] Pradeep, T., *"Nano: The Essentials"*, Tata McGraw-Hill, New Delhi, page 215, 2007;
- [22] Guo, D, Song, W. Wang, X and Chen B., *"Enhanced Cytotoxicity Suppression of Arsenic Trioxide to Leukemia Cancer Cells by Using Magnetic Nanoparticles"*, China, 2009;
- [23] Jain, K. K., *"Handbook of Nanomedicine In: Nanomolar Diagnostic and Nano-Oncology"*, Ed. Humana Press. Estados Unidos, 2008;
- [24] Kumar,R., *"Nano and microparticles as controlled drug delivery devices"*, J Pharm Sci, page. 234-258, 2000;
- [25] Dash, A. K. and Cudworth, G. C., *"Therapeutic applications of implantable drug delivery system"*, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Vol. 40, page 1-12, 1998;
- [26] Parton, E., Palma, R. and Borghs G., *"Leuven Biomedical applications using magnetic"*, Belgium, 2011;
- [27] Torchilin, V. P., *"Drug Targeting"*, Eur. J. Pharm. Sci. **11**, page 81–91, 2000;
- [28] Sudimack, J. and Lee, R., J. *"Targeted drug delivery via the folate receptor"*, Adv. Drug Del. Rev. 41, page 147–62, 2000;
- [29] Pooja, G. *"Magnetic Nanoparticles Enhance Medical Imaging"*, The Journal of Young Investigators, vol.15 (2), 2006;
- [30] Van Beers, B. E., Pringot, J. and Gallez, B., *"Iron oxides as contrast agents for MRI of the liver"*, J. Radiol. 76, page 991-9955, 1995;
- [31] Babes, L., Denzot, B., Tanguy, G., Le Jeune, J. J. and Jallet, P., *"Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: a parametric study"*, J. Coll. Inter.Sci. 212, page 474-482, 1999;
- [32] Brigger, Dubernet, C. and Couvreur, P., *"Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis"*, Adv. Drug Del. Rev. 54, page 631-651, 2002;
- [33] Tartaj, P., Morales, M. P., Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzales-Carreño, T. and Serna, J. C., *"The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine"*, J Phys D Appl Phys. 36, page 182-197, 2003;
- [34] Yanase, M., Shinkai, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J. and Kobayasho, T., *"Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: an in vivo study"*, Jpn J Cancer Res. 89(4), page 463-469, 1998;
- [35] Hiergeist, R., Andrä, W., Buske, N., Hergt, R., Hilger, I. and Richter U., *"Application of magnetite ferrofluids for hyperthermia"*, J Magn Mater., page 420-422, 1999;
- [36] Babincova, M., Leszczynska, D., Sourivong, P. and Babinec, P., *"Selective treatment of neoplastic cells using ferritin-mediated electromagnetic hyperthermia"*, Med. Hypoth. 54, page 177-179, 2000;
- [37] Rehman, J., Landman, J., Tucker, R. D., Bostwick, D. G., Sundaram, C. P. and Clayman, R. V., *"Ferromagnetic self-regulating reheatable thermal rod implants for in situ tissue ablation"*, J. Endourol. 16, page 523-531, 2002;
- [38] Hilger, I., Andra, W., Hergt, R., Hiergeist, R., Schubert, H. and Kaiser, W. A., *"Electromagnetic heating of breast tumours in interventional radiology: in vitro and in vivo studies in human cadavers and mice"*, Radiology 218, page 570-575, 2001;
- [39] Jordan, A., Wust, P., Scholz, R., Tesche, B., Fahling, H., Mitrovics, T., Vogl, T., Cervos-Navarro, J. and Felix, R., *"Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro"*, Int. J. Hyperthermia 12, page 705-722, 1996;

- [40] Schütt, W., Thomaneck, U., Grummer, G., Kraeft, S. K., Reinholz, F. and Waldschlager, U., “New methods for investigation of blood biomaterial interaction”, *Artif Organs*, page 847-851, 1995;
- [41] Moroz, P., Jones, S. K. and Gray, B. N., “Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions”, *Int. J. Hyperthermia* 18, page 267-284, 2002;
- [42] Wu, W. He, Q. and Jiang, C., “Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies”, *Nanoscale Res Lett*, 2008;
- [43] Liu, R., Zhao, Y., Huang, R., Zhao, Y. and Zhou H., “Shape Evolution and Tunable Properties of Monodisperse Magnetite Crystals Synthesized by a Facile Surfactant-Free Hydrothermal Method”, *Eur. J. Inorg. Chem.*, page 4499 – 4505, 2010;
- [44] Guo, X., Zhong, S., Zhang, J., Wang, W., Mao, J and Xie, G., “Synthesis, phase transition, and magnetic property of iron oxide materials: effect of sodium hydroxide concentrations”, *J Mater Sci* 2010;
- [45] Herea, D., Chiriac, H and Lupu, N., “Preparation and characterization of magnetic nanoparticles with controlled magnetization”, *J Nanopart Res*, 2011;
- [46] Cha, Y., Kim, M., Choa, Y., Kim, J., Nam, B, Lee, J, Kim, D. and Kim, K., “Synthesis and Characterizations of Surface-Coated Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles”, *IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS*, Vol. 46, 2010;
- [47] Costa, T. P., Junior, M. J., Bini, R. and Marques, R.F.C., “Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro: Funcionalização de Superfície com Alcoxissilanos para Controle de Densidade de Amina”, Unesp, Campus Araraquara;
- [48] Horner, O., Neveu, S. Montredon, S., Siaugue, J. and Cabuil, V., “Hydrothermal synthesis of large maghemite nanoparticles: influence of the pH on the particle size”, *J Nanopart Res*, 2009;
- [49] Wen, B., Li, J., Lin, Y., Liu, X., Fu, J., Miao, H. and Zhang, Q., “A novel preparation method for γ -Fe₂O₃ nanoparticles and their characterization”, *Materials Chemistry and Physics*, page 35-38, 2011;
- [50] Cullity, B. D., “Introduction to magnetic materials”, Addison Wesley Publishing Company, London, 1972;
- [51] Jiles, D., “Introduction to magnetic and magnetic materials”, Chapman & Hall, 1991;
- [52] Ribeiro, G. A. P., “As propriedades magnéticas da matéria: Um primeiro contato”, *Revista Brasileira de Ensino de Física*, Vol. 22, page 299-305, 2000;
- [53] Earnshaw, A., “Introduction to magnetochemistry”, Academic Press Inc., 1968;
- [54] Guimarães, A.P., “Propriedades magnéticas de sistemas granulares”, *Revista Brasileira de Ensino de Física*, page 382-386, 2000;
- [55] Néel, L., “Propriétés magnétique des ferrites; ferrimagnétisme et antiferromagnétisme”, *Annales de Physique*, 1948;
- [56] Coey, J.M.D., “Noncollinear spin arrangement in ultrafine ferromagnetic”, *Crystallites. Physical Review Letters*, page 1140-1142, 1971;
- [57] Kodama, R.H., Berkowitz, A.E., Mcniff, E.J. and Foner, S., “Surface spin disorder in NiFe₂O₄ nanoparticles”, *Physical Review Letters*, page 394-397, 1996;
- [58] Sato T., Iijima, T., Sekin, M. and Inagaki, N., “Magnetic properties of ultrafine ferrite particles”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, page 252-256, 1987;
- [59] Jiles, D.C, “Acta Materialia”, page 5907-5939, 2003;

- [60] Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K. and DOBSON, J., “*Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*”, Journal of Physics D: Applied Physics, page 167-181, 2003;
- [61] Sellmyer, D. and Skomski, R., “*Advanced Magnetic Nanostructures*”, Springer, New York, page 185, 2006;
- [62] Zhang, Y.D., Budnick, J.I., Hines, W.A. Hines, Chien, C.L. Xiao and J.Q., J. Appl. Phys., 1998;
- [63] Neel, L. “*Theorie du trainage magnetique des ferromagnetiques en grains fins avec applications aux terres cuites*”, Ann. Geophys., page 99-136, 1949;
- [64] Morup, S. and Tronk, E., “*Superparamagnetic Relaxation of Weakly Interacting Particles*”, Physical Review Letters 72, page 3278-3821, 1994;
- [65] Maiellaro, K.A., Tese de Mestrado, “*Microfabricated Silicon Microchannels for Cell Rheology Study*”, University of Florida, 2003;
- [66] Coltro, W.K.T., Piccin, E., Carrilho, E., Jesus, D.P., Da Silva, J.A.F., Silva, H.D.T. and Do Lago, C.L., “*Microssistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações*”, Química Nova, page 1986-2000, 2007;
- [67] Dantas, C.A.R., Tese de Mestrado, “*Fabricação de microcanais para integração de uma “língua eletrônica” em um sistema lab-on-a-chip*”, Universidade Estadual Paulista, 2009;
- [68] Xia, Y. and Whitesides, G., “*Soft Lithography*”, Angewandte Chemie International Edition, Vol. 37, page 550-575, 1998;
- [69] Rolland, J.P., Van Dam, R.M., Shorzman, D.A., Quake, S.R. and DeSimone, J.M., “*Solvent-resistant photocurable “liquid teflon” for microfluidic device fabrication*”, Journal of American Chemical Society, page 2322-2323, 2004;
- [70] Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A. and Whitesides, G. M., “*Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*”, Analytical Chemistry, page 4974-4984, 1998;
- [71] McDonald, J.C. and Whitesides, G. M., “*Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices*”, Accounts of Chemical Research, page 491-499, 2002;
- [72] Bokhorst, E., Integrated Master in Chemical Engineering, “*Microfluidic Flow in Porous Medium Analogues*”, FEUP, Porto, 2010;
- [73] “*Zetasizer Nano Series*”, User Manual, Malvern Instruments, 2004;
- [74] Pecora, R., “*Dynamic Light Scattering-Applications of Photon Correlation Spectroscopy*”, Plenum Press, New York, London, 1985;
- [75] Xu, R., “*Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential Measurement*”, Particology, page 112–115, 2007;
- [76] Skoog, D. A., Holler, F. J. and Nieman, T. A., “*Princípios de Análise Instrumental*”, Porto Alegre, 2002;
- [77] Galo, A.L. and Colombo, M.F., “*Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa*”, Química Nova, vol. 32, São Paulo, 2009;
- [78] Mironov, V.L., “*Fundamentals of Scanning Probe Microscopy*”, Nizhniy Novgorod, Russian, 2004;
- [79] Tusset, A.M. and Balthazar, J.M., “*Microscopia de Força Atômica: Controle de uma Microviga Modelada Matematicamente com Comportamento Não-Linear e sob a ação de Amortecimento Hidrodinâmico*”, 2010;

- [80] Fukui, M., “Técnicas de Microscopia de Tunelamento de Elétrons (MTE) e Microscopia de Força Atômica (MFA) aplicadas ao estudo de superfícies de grafite e diamante”, T/UNICAMP, 1992.
- [81] Eisenschitz, E. and London, F., “Teoria Quântica para as Forças de Van der Waals”, Zs.Phys., 1930;
- [82] Worcester, D. L., Miller, R. G., Bryant, P. J., *J. Micros.*, 1988;
- [83] Meyer, E., “*Atomic force microscopy*”, Surface Science, page 3-49, Oxford, 1992.
- [84] Chichester, B. L., “*Procedures in Scanning Probe Microscopies*”, John Wiley & Sons, Inc.: England, 1998;
- [85] Herrmann, P.S.P., Da Silva, M.A.P., Bernardes, R., Job, A.E., Colnago, L.A, Frommer, J.E. and Mattoso, L.H.C., “Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros”, 2010;
- [86] Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber Ch., Physical Review Letters, 1986;
- [87] Morris, V. J., Mackie, A. R., Wilde, P. J., Kirby, A. R., Mills, E. C. N., and Gunning P., “*Atomic force microscopy as a tool for interpreting the rheology of food biopolymers ate molecular level*”, Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, page 3-10, London, 2001;
- [88] Sá, C., “A microscopia electrónica de varrimento e a micro análise por raios-x”, CEMUP, Porto, 2010;
- [89] Gabriel, B. L., “*SEM: A User’s Manual for Materials Science*”, Ed. American Society for Metals, USA, 1985.
- [90] Thornton, P.R., Chapman and Hall, “*Scanning Electron Microscopy, Applications to materials and device science*”, 1968;
- [91] Reimer, L., “*Scanning Electron Microscopy, Physics of Image Formation and Microanalysis*”, Springer-Verlag, 1985;
- [92] Goldstein, J.I., et al, “*Scanning Electron Microscopy an X-ray Microanalysis*”, Plenum Press, New York, 1992;
- [93] Maliska, A.M., “Microscopia electrónica de varredura e microanálise”, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001;
- [94] Sá, C., “*Digital analyses of SEM images for materials characterization and interface/surface studies of biological materials*”, CEMUP, Porto;
- [95] Dedavid, B.A., Gomes, C. I. and Machado, G., “Microscopia Electrónica de Varredura: Aplicações e Preparação de Amostras”, EDIPUCRS, Porto Alegre, 2007;
- [96] Watt, I.M., “*The principles and practice of electron microscopy*”, Cambridge University Press, 1985;
- [97] Varela, M., Lupini, A.R., Van Benthram, K., Borisevich, A.Y. and Shibata, N., “*Material Characterization in the Aberration – corrected Scanning Transmission Electron Microscope*”, Rev. Master, page 539-569, 2005;
- [98] Ejiri, S., Sasaki, T. and Hirose Y., Thin Solid Films, 1997;
- [99] Smart, L. and Moore, E., “*Solid state chemistry – an introduction*”, Nelson Thornes Ltd., U.K., 2001;
- [100] Pecharsky, V.K. and Zavalij, P.Y., “*Fundamentals of powder diffraction and structural characterization of materials*”, Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, USA, 2003;
- [101] Suryanarayana, C. and Norton, M.G., “*X-Ray diffraction: a pratical approach*”, Plenum Press, New York, USA, 1998;

- [102] West, A.R., “*Basic solid state chemistry*”, John Willey and Sons Ltd., Chichester, England, 1999;
- [103] He, B. B., “*Two-dimensional x-ray diffraction*”, John Wiley & Sons, Inc., page 13, 2009;
- [104] Lynch, C., “*Physico-Chemical analysis of Industrial Catalysts: A Practical Guide to Characterization*”, Editions Technip, Paris, page 1, 2001;
- [105] Tarey, R.D., Rastogi, R.S., Chopra, K.L. and *Rigaku J.*, 1987;
- [106] Cullity, B.D., “*Elements of X-Ray Diffraction*”, Second Edition, Addison-Wesley Publishing Company, Inc. 1978;
- [107] Ingard, K. U., “*Fundamentals of waves and oscillations*”, Cambridge University Press, page 340, 1988;
- [108] Moreira, D.C.F., Sigoli, F.A. and Mazali, I.O., “Avaliação da influência da cristalinidade sobre a determinação do tamanho do cristalito do óxido semiconductor ZnO”, UNICAMP, Campinas, Brasil, 2011;
- [109] Punyawudhoa, K., Blomb, D.A., Van Zeec, J.W. and Monnier, J.R., *Electrochim. Acta*, 2010;
- [110] Kim, S., et al., “A computer-based method for determination of the cell-free layer width in microcirculation. *Microcirculation*”, page 199-207, 2006;
- [111] Lima, R., et al, “*Radial dispersion of red blood cells in blood flowing through glass capillaries: role of hematocrit and geometry*”, *Journal of Biomechanics*, page 2188-2196, 2008;
- [112] “Continuous-Time Ratiometric Linear Hall Effect Sensor ICs”, Allegro MicroSystems, Inc., 2009;
- [113] Ge, J., Hu, Y., Biasini, M., Dong, C., Guo, J., Beyermann, W. and Yin, Y., “*One-Step Synthesis of Highly Water-Soluble Magnetite Colloidal Nanocrystals*”, *Chem. Eur. J.*, page 7153-7161, 2007;
- [114] Compeán-Jasso, M.E., Ruiz, F., Martínez, J.R. and Herrera-Gómez, A., “*Magnetic properties of magnetite nanoparticles synthesized by forced hydrolysis*”, *Materials Letters* 62, page 4248-4250, 2008;
- [115] Dr. Putz, H., “MATCH! Phase Identification from Powder Diffraction – Version 2”, Tutorial Handbook, Version 2.0, CRYSTAL IMPACT, Germany, 2012;

Anexos

NP1

Dados:

$$\lambda = 1.5406$$

$$\beta = \frac{(29.57 - 29.21) * \pi}{180}$$

$$\cos\theta = \cos\left(\frac{29.4}{2}\right)$$

Tamanho Médio:

$$\tau = \frac{0.9 * 1.5406}{6.2832 * 10^{-3} * 0.9673} = 22.8 \text{ nm}$$

NP2

Dados:

$$\lambda = 1.5406$$

$$\beta = \frac{(29.57 - 29.25) * \pi}{180}$$

$$\cos\theta = \cos\left(\frac{29.38}{2}\right)$$

Tamanho Médio:

$$\tau = \frac{0.9 * 1.5406}{5.5851 * 10^{-3} * 0.9673} = 25.7 \text{ nm}$$

NP3

Dados:

$$\lambda = 1.5406$$

$$\beta = \frac{(29.59 - 29.21) * \pi}{180}$$

$$\cos\theta = \cos\left(\frac{29.4}{2}\right)$$

Tamanho Médio:

$$\tau = \frac{0.9 * 1.5406}{6.6323 * 10^{-3} * 0.9673} = 21.6 \text{ nm}$$

NP4

Dados:

$$\lambda = 1.5406$$

$$\beta = \frac{(29.59 - 29.21) * \pi}{180}$$

$$\cos\theta = \cos\left(\frac{29.4}{2}\right)$$

Tamanho Médio:

$$\tau = \frac{0.9 * 1.5406}{6.6323 * 10^{-3} * 0.9673} = 21.6 \text{ nm}$$

NP5

Dados:

$$\lambda = 1.5406$$

$$\beta = \frac{(35.69 - 35.17) * \pi}{180}$$

$$\cos\theta = \cos\left(\frac{35.44}{2}\right)$$

Tamanho Médio:

$$\tau = \frac{0.9 * 1.5406}{9.0757 * 10^{-3} * 0.9526} = 16.0 \text{ nm}$$

NP6

Dados:

$$\lambda = 1.5406$$

$$\beta = \frac{(35.59 - 35.21) * \pi}{180}$$

$$\cos\theta = \cos\left(\frac{35.38}{2}\right)$$

Tamanho Médio:

$$\tau = \frac{0.9 * 1.5406}{6.2832 * 10^{-3} * 0.9527} = 21.9 \text{ nm}$$