



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**DESENVOLVIMENTO DE SONDAS NANOESTRUTURADAS DE
ÓXIDO DE FERRO PARA IMAGEAMENTO BIOMÉDICO NÃO
INVASIVO**

ELISA MAGNO NUNES DE OLIVEIRA
QUÍMICA INDUSTRIAL E LICENCIATURA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre
Fevereiro, 2014



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

DESENVOLVIMENTO DE SONDAS NANOESTRUTURADAS DE ÓXIDO DE FERRO PARA IMAGEAMENTO BIOMÉDICO NÃO INVASIVO

ELISA MAGNO NUNES DE OLIVEIRA

Química Industrial e Licenciatura

Prof.Dr. Ricardo Meurer Papaléo

Prof^a. Dra. Nara Regina de Souza Basso

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

A presente tese de mestrado foi alcançada em cooperação com a Hewlett-Packard Brasil Ltda. e com recursos provenientes da Lei de Informática (Lei nº 8.248, de 1991).

**Porto Alegre
Fevereiro, 2014**

“Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã”.

Psicografia de Chico Xavier.
Livro: Indicações do Caminho.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

DESENVOLVIMENTO DE SONDAS NANOESTRUTURADAS DE ÓXIDO DE FERRO PARA IMAGEAMENTO BIOMÉDICO NÃO INVASIVO

CANDIDATA: ELISA MAGNO NUNES DE OLIVEIRA

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DR. RICARDO MEURER PAPALÉO - ORIENTADOR

DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - CO-ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA

DR. AGENOR HENTZ DA SILVA JUNIOR - DO INSTITUTO DE FÍSICA - UFRGS

DRA. CARLA MARIA NUNES AZEVEDO - DA FACULDADE DE QUÍMICA - PUCRS

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 103 - CEP: 90619-900
Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625
E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br
www.pucrs.br/feng

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, principalmente, aos meus pais, Luiz Fernando Almeida de Oliveira e Janine Magno Nunes de Oliveira, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os meus passos nesse percurso da minha vida. Agradeço do fundo do meu coração por tudo. Sem o incentivo deles aos meus estudos, não teria êxito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade oferecida nesta vida.

Aos meus pais, Luiz Fernando e Janine por terem me apoiado desde o início, me incentivado a estudar e me aperfeiçoado em minha profissão.

Aos meus irmãos, Marcelo e Lívia, e também ao Léo e ao Floquinho.

Ao Giovani pela paciência, apoio, incentivo e compreensão nesta fase.

Ao Prof. Ricardo M. Papaléo por ter me aceitado ao grupo de pesquisa, pela orientação e pelos ensinamentos ao longo deste trabalho. Agradeço a confiança necessária a mim depositada para realização deste trabalho.

A Prof.^a Nara Regina de Souza Basso por ter me ajudado a ingressar numa pós-graduação. Agradeço pela co-orientação, auxílio nas atividades de síntese e discussões dos resultados obtidos.

Ao Prof.^a Mara Lize Zanini pelo auxílio nas atividades de laboratório e de síntese.

Ao Prof. Agenor e ao Maurício pela ajuda nas análises de RBS.

Ao Laboratório de Magnetismo da UFRGS

Ao Centro de Microscopia da Eletrônica da UFRGS.

A Ana Paula e a Vanessa do Hospital São Lucas da PUCRS no auxílio nas medidas da relaxividade no MRI.

A Elisa Simon pela ajuda na análise de citometria.

Aos funcionários do almoxarifado da Faculdade de Química da PUCRS e ao LOR pelo auxílio nas atividades realizadas nos laboratórios.

Ao aluno de iniciação científica Maximiliano pela ajuda na realização das atividades deste projeto e a interpretação dos resultados.

A todos os colegas do grupo Nanopuc, pelo apoio e ajuda nas atividades desenvolvidas no projeto e também pelo companheirismo em diversas situações, tanto profissional quanto em momentos divertidos, principalmente na hora do cafezinho.

Aos meus colegas e amigos do mestrado, Vanessa, Manoela, Daniela Fabiana, Cristiane, entre outros, que estiveram ao meu lado em várias etapas do mestrado, principalmente na hora do desespero com os estudos.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
SUMÁRIO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	15
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos Específicos	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Aspectos Gerais do Magnetismo.....	24
3.1.1 Propriedades Magnéticas dos Materiais	26
3.1.2. Curvas de Magnetização	27
3.1.3. Domínios Magnéticos	28
3.1.3. Superparamagnetismo.....	30
3.2. Estrutura do Óxido de Ferro	32
3.3. Nanopartículas e Nanoestruturas.....	35
3.3.1. Características Gerais das Nanoestruturas	35
3.3.2. Classificação das Nanopartículas de Óxido de Ferro	36
3.3.3. Estabilização Coloidal das Nanopartículas de Óxido de Ferro	38
3.3.4. Dextran	40
3.4. Métodos de Síntese de Nanopartículas de Óxido de Ferro	42
3.4.1. Síntese pelo Método de Coprecipitação.....	43
3.2. Marcação de Nanopartículas de Óxido de Ferro com Fluoróforos.....	45
3.5. Nanopartículas Magnéticas em Aplicações Biomédicas.....	46
3.6. Princípio Básico de Imagens por Ressonância Magnética	48
3.6.1. Nanopartículas como Agentes de Contraste em MRI	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54

4.1. Reagentes Utilizados	54
4.2. Síntese das Nanopartículas pelo Método de Coprecipitação	55
4.2.1. Incorporação do Corante Cy5.5 nas nanopartículas.....	58
4.3. Técnicas de Caracterização	58
4.3.1. Espectrofotometria Ultravioleta-visível (UV-vis).....	59
4.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	60
4.3.3. Espectrometria de Retroespalhamento de Rutherford (RBS)	62
4.3.4. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	65
4.3.5. Potencial Zeta (PZ)	66
4.3.6. Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	68
4.3.7. Magnetômetro de Gradiente de Força Alternada (AGFM).....	69
4.3.8. Citometria de Fluxo	70
4.4. Medidas de Relaxação Magnética	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	73
5.1. Síntese pelo método de coprecipitação.....	73
5.2. Análise da Concentração de Ferro	74
5.3. Análise Morfológica e Distribuição de Tamanhos	76
5.4. Caracterização Elementar por RBS	82
5.5. Análise por Espectroscopia IV.....	86
5.6. Estabilidade Coloidal.....	89
5.7. Medidas Magnéticas	92
5.8. Incorporação do Fluoróforo	95
5.9. Teste Celular.....	95
5.10. Medida da Relaxividade – MRI.....	96
6. CONCLUSÃO.....	108
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	110
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Esquema representativo das orientações dos dipolos magnéticos e as respectivas curvas de magnetização para materiais diamagnéticos, paramagnéticos e ferromagnéticos (A) [23]. Curva de magnetização M versus campo magnético H de um material ferromagnético. M_r : magnetização remanescente. M_s : magnetização de saturação. H_c : campo magnético coercitivo (B).28
- Figura 3.2. Representação de domínios magnéticos de um material magnético [adaptado de 18].29
- Figura 3.3. Magnetização de uma partícula com um ângulo θ em relação ao eixo fácil de magnetização.31
- Figura 3.4. Curva de um material superparamagnético [adaptado de 25].32
- Figura 3.5. Estrutura de uma célula unitária de magnetita [adaptado de 20].34
- Figura 3.6. Representação de alguns materiais nanoestruturados. 1. 0-D - pontos quânticos; 2. 1-D nanotubos de carbono; 3. 2-D filme ultrafino; 4. 1-D partículas coloidais; 5. 3-D nanomateriais compactados.36
- Figura 3.7. Representação de uma nanopartícula de óxido de ferro em sistema núcleo-casca (do inglês, *core-shell*), composto de um núcleo de óxido de ferro e um revestimento de dextran [adaptado de 38].37
- Figura 3.8. Estrutura química do dextran.41
- Figura 3.9. Representação da reação de reticulação do dextran com epícloridrina. .41
- Figura 3.10. Conjunto de prótons com momento magnético líquido na presença de um campo magnético externo B_0 . Momento magnético precessionando em torno do B_0 , na frequência característica Larmor (ω_0). (A) e um segundo campo externo aplicado a 90° perpendicular ao B_0 , oscilando no eixo M_{xy} (ω_0) (B) [adaptado de 82].50
- Figura 4.1. Fluxograma resumido da síntese das nanopartículas pelo método de coprecipitação.56
- Figura 4.2. Imagem das principais etapas da síntese nanopartículas pelo método de coprecipitação. Reator (A), etapa de diálise (B), solução final de nanopartícula em tubo *Amicon* (C).57

- Figura 4.3. Representação de um evento de retroespalhamento entre dois átomos [adaptado de 96]. 63
- Figura 4.4. Diagrama representativo de uma partícula carregada em suspensão num meio de dispersão [99]. 67
- Figura 4.5. Imagem dos dois *phantoms* construídos para as medidas no equipamento de MRI. As posições das seringas com as nanopartículas da síntese S8 estão numeradas de 3-8 para o *phantom* A1 e as posições das seringas com as nanopartículas das sínteses S6, S9 e o Lumirem[®] estão numeradas de 1-15 para o *phantom* A2, ambos em sentido horário do mais concentrado para o menos concentrado. No orifício central, utilizou-se o *buffer* como referência (A). Imagem do equipamento de MRI com o *phantom* instalado (B e C). 72
- Figura 5.1. Imagem dos tubos *falcon* com as nanopartículas. Formação de duas fases na etapa final da síntese: uma fase líquida e uma fase sólida da síntese S9 (A); uma fase sólida para a síntese S10 (B). 74
- Figura 5.2. Micrografias de TEM de quatro regiões distintas da amostra da síntese S4 (A, B, C e D). Micrografia de nanopartículas aglomeradas (C e D). Micrografias mostrando regiões cristalinas presentes na amostra (D)... 77
- Figura 5.3. Micrografia de TEM da amostra da síntese S6. 77
- Figura 5.4. Micrografias de TEM de três regiões distintas de uma amostra da síntese S8. Figura Ampliação da região da micrografia A (B). 78
- Figura 5.5. Micrografias de TEM de uma amostra da síntese S9 em diferentes localidades do *grid*, indicando a presença de regiões cristalinas. 79
- Figura 5.6. Gráfico da distribuição de tamanhos das nanopartículas ponderadas por número, obtidas por DLS para todas as sínteses. 80
- Figura 5.7. Gráfico de distribuição de tamanhos ponderada em número das nanopartículas da síntese S7 em relação aos tempos de reação de uma, duas e três horas. 81
- Figura 5.8. Espectro de RBS de nanopartículas diluídas em isopropanol e água, depositadas por gotejamento em substrato de Si (A). Espectro com a ampliação dos picos característicos de cloro e ferro (B). 83
- Figura 5.9. Espectro de RBS das nanopartículas depositadas por gotejamento em isopropanol e água com e sem a adição de *buffer* salino em substrato de Si. 84

- Figura 5.10. Espectro de RBS das nanopartículas depositadas em substrato de SiO_2 (A) e Si (B) por gotejamento, *spin coating* e *rinsing*. 85
- Figura 5.11. Espectro de RBS com nanopartículas diluídas em isopropanol e água, depositadas gotejamento, *spin coating* e *rinsing* em substrato de Si. 86
- Figura 5.12. Espectro de FTIR das nanopartículas da síntese S4 e do dextran puro. 87
- Figura 5.13. Espectro de FTIR das nanopartículas das sínteses S6, S7 e S8. 88
- Figura 5.14. Espectro de FTIR das nanopartículas das sínteses S9 e S10. 89
- Figura 5.15. Gráfico do potencial zeta *versus* pH das sínteses S6, S7 e S8. 91
- Figura 5.16. Gráficos da distribuição de tamanho das nanopartículas em diferentes pH para as sínteses S6, S7 e S8. 91
- Figura 5.17. Curva magnetização em função do campo magnético em temperatura ambiente de todas as sínteses. 92
- Figura 5.18. Fotos da amostra liofilizada da síntese S4 mediante um magneto. 93
- Figura 5.19. Imagem do tubo *Falcon* com as nanopartículas da S10 na última etapa da síntese (A). As nanopartículas suspensas em água (B) e as nanopartícula na presença de um magneto (C). 94
- Figura 5.20. Espectro de UV-vis de amostras de nanopartículas com fluoróforo (S8-Cy5.5) e sem o fluoróforo (S8). 95
- Figura 5.21. Histograma obtido pela análise de citometria de células macrófagos controle, células com as nanopartículas sem o fluoróforo Cy5.5 e células com Cy5.5 incorporado nas nanopartículas. 96
- Figura 5.23. Imagem de MRI do segundo *phantom* com TR de 1000 ms e TE de 7.4 (A), 14 (B), 35 (C), 75 (D), 150 (E), 200 (F) ms. 97
- Figura 5.24. Curvas de intensidade do pixel em função de TE efetivo para diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S6. As linhas são ajustes exponenciais aos dados. 98
- Figura 5.25. Curvas de intensidade do pixel em função do TE efetivo para as diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S8. As linhas são ajustes exponenciais aos dados. 99

- Figura 5.26. Curvas de intensidade do pixel em função de TE efetivo para as diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S9. As linhas são ajustes exponenciais aos dados..... 99
- Figura 5.27. Curvas de intensidade do pixel em função de TE efetivo para as diferentes concentrações de nanopartículas do Lumirem. As linhas são ajustes exponenciais aos dados..... 100
- Figura 5.28. Gráfico da taxa de relaxação R2 em função da concentração de ferro para as sínteses S6, S8, S9 e Lumirem. 101
- Figura 5.30. Imagens de MRI do segundo *phantom* com TR de 3000 ms e TI de 50 (A), 90 (B), 130 (C), 200 (D), 600 (E), 1000 (F) ms. 102
- Figura 5.31. Curvas de intensidade do pixel em função de TI para as diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S6. As linhas são ajustes exponenciais aos dados. 103
- Figura 5.32. Curvas de intensidade do pixel em função de TI para as diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S8. As linhas são ajustes exponenciais aos dados. 103
- Figura 5.33. Curvas de intensidade do pixel em função de TI para as diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S9. As linhas são ajustes exponenciais aos dados. 104
- Figura 5.34. Curvas de intensidade do pixel em função de TI para as diferentes concentrações de nanopartículas do Lumirem. As linhas são ajustes exponenciais aos dados. 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Classificação quanto ao tamanho das partículas de óxido de ferro superparamagnético [adaptado de [22].	37
Tabela 3.2. Nomes genéricos e comerciais, características comuns e valores da razão de relaxividade (r_2/r_1) de diferentes nanopartículas compostas por óxido de ferro para uso em MRI [22, 39, 40].	38
Tabela 4.1. Reagentes utilizados nos procedimentos experimentais.	54
Tabela 4.2. Resumo dos parâmetros utilizados no processo de síntese.	58
Tabela 5.1. Valores de concentração de Fe na solução de nanopartículas.	75
Tabela 5.2. Diâmetros médios e desvios padrões obtidos das distribuições de tamanho das nanopartículas ponderadas em número de todas as sínteses, obtidas por DLS.	80
Tabela 5.3. Diâmetros médios e desvios padrões obtidos das distribuições de tamanho em número das nanopartículas apresentadas na Figura 5.7.	81
Tabela 5.4. Valores de potencial zeta das sínteses S4, S5, S6, S7, S8 e S9 em solução em pH 8.	90
Tabela 5.5. Valores de pH dos pontos isoelétrico das sínteses S6, S7 e S8.	92
Tabela 5.6. Valores da taxa de relaxação R2 e dos tempos de relaxação T2 em função da concentração de ferro para as sínteses S6, S8, S9 e o Lumirem.	100
Tabela 5.7. Valores da taxa de relaxação R1 e dos tempos T1 em função da concentração de ferro para as sínteses S6, S8, S9 e amostras de Lumirem.	105
Tabela 5.8. Valores da taxa de relaxividade das sínteses S6, S8, S9 e do Lumirem.	106

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Absorbância	
ξ	Absortividade Molar	$M^{-1}cm^{-1}$
DNA	Ácido Desoxirribonucleico	
PVA	Ácido Polivinílico	
RNA	Ácido Ribonucleico	
CLIO-NH ₂	<i>Aminated Cross-Linked Iron Oxide</i>	
H	Campo Magnético	T
H _C	Campo Magnético Coercitivo	T
B ₀	Campo Magnético Estacionário	T
D	Coeficiente de Difusão	cm^2s^{-1}
λ	Comprimento de Onda	nm
C	Concentração Molar	$molL^{-1}$
K _{eff}	Constante de Anisotropia Efetiva	
k_B	Constante de Boltzmann	
CLIO	<i>Cross-Linked Iron Oxide</i>	
Da	Daltons	$gmol^{-1}$
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>	$gmol^{-1}$
DLVO	Derjaguin-Landau-Verewy-Overbeek	
D _H	Diâmetro Hidrodinâmico	nm
DMF	Dimetilformamida	
DLS	<i>Dinamic Light Scattering</i>	
E _{DW}	Energia de Domínio de Parede	
E ₀	Energia Incidente	keV
E _{MS}	Energia Magnetostática	
E ₁	Energia Retroespalhada	keV
ELS	Espalhamento de Luz Eletroforético	
UV-vis	Espectrofotometria Ultravioleta-visível	
K	Fator Cinemático	
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>	
ω_0	Frequência de Larmor	

Gd-DTPA	<i>Gadolinium Diethylenetriamine-pentaacid</i>	
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>	
B	Indução Magnética	T
I_0	Intensidade de Luz Incidente	cd
I	Intensidade de Luz Transmitida	cd
LDV	Laser Doppler Vibrometer	
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>	
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>	
M	Magnetização	A/m
M_S	Magnetização de Saturação	A/m
M_z	Magnetização Longitudinal	A/m
M_R	Magnetização Remanescente	A/m
M_0	Magnetização Residual	A/m
M_{xy}	Magnetização Transversal	A/m
AGFM	Magnetômetro de Gradiente de Força Alternada	
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura	
M_w	<i>Molecular Weight</i>	gmol^{-1}
μ	Momento Magnético	Am^2
MION	<i>Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticles</i>	
NIR	<i>Near infrared</i>	
μ_0	Permeabilidade Magnética no Vácuo	TmA^{-1}
PEG	Polietilenoglicol	
PSPIO	<i>Polydisperse Superparamagnetic Iron Oxide</i>	
pH	Potencial Hidrogeniônico	
PZ	Potencial Zeta	
kD	Quilo Daltons	
keV	Quilo Elétron-volt	
RF	Radiofrequência	
γ	Razão giromagnética	$\text{rad s}^{-1} \text{T}^{-1}$
RES	<i>Reticuloendothelial System</i>	
RBS	<i>Rutherford Backscattering Spectrometry</i>	
SSPIO	<i>Small Superparamagnetic Iron Oxide</i>	
SPIO	<i>Superparamagnetic Iron Oxide</i>	
χ_m	Susceptibilidade Magnética	

R1	Taxa de Relaxação Longitudinal	$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$
R2	Taxa de Relaxação Transversal	$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$
T	Temperatura	$^{\circ}\text{C}$
T_c	Temperatura Curie	K
T_B	Temperatura de Bloqueio	K
T_f	Temperatura de Fusão	$^{\circ}\text{C}$
T_N	Temperatura de Néel	K
τ	Tempo de Relaxação da Partícula	s
T_1	Tempo de relaxação Longitudinal	s
T_2	Tempo de Relaxação Transversal	s
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>	
USPIO	<i>Ultra Small Superparamagnetic Iron Oxide</i>	
η	Viscosidade	$\text{gcm}^{-1}\text{s}^{-1}$
V	Volume	m^3

RESUMO

OLIVEIRA, M. N., ELISA. **Desenvolvimento de Sondas Nanoestruturadas de Óxido de Ferro para Imageamento Biomédico Não-Invasivo**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2014. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Neste trabalho, pesquisou-se a síntese, a caracterização e as propriedades de contraste por imagem de nanopartículas *core-shell* de óxido de ferro, revestidas com dextran e funcionalizadas com grupos amina. Grupos fluoróforos foram incorporados na superfície das nanopartículas, possibilitando seu uso como agente de contraste para imageamento por ressonância magnética e por microscopia óptica. As sínteses das nanopartículas foram realizadas pelo método de coprecipitação de sais de ferro, com o polímero de revestimento. Parâmetros da síntese foram modificados para averiguar sua influência na distribuição de tamanho das nanopartículas. Os resultados da morfologia e da distribuição de tamanhos por TEM e DLS mostraram um núcleo com diâmetros médios entre 10-15 nm e diâmetros hidrodinâmicos médios entre 16-50 nm, dependendo do procedimento de síntese. Os espectros de FTIR apresentaram bandas de absorção características das ligações presentes no dextran puro e nas nanopartículas sintetizadas. A análise do potencial zeta revelou valores positivos próximos de zero e estabilidade em pH neutro. As medidas de magnetização revelaram comportamento superparamagnético pela ausência de histerese na curva de magnetização. As análises por UV-vis e por citometria de fluxo revelaram a presença dos grupos fluorescentes nas nanopartículas e a viabilidade de seu uso em imagens ópticas. Os estudos nos tempos de relaxação magnética nuclear mostraram efeitos de contraste, perturbando a intensidade de sinal com o aumento da concentração, diminuindo os tempos de relaxação T1 e T2 das soluções aquosas de nanopartículas. A relação entre as relaxividades (r_2/r_1) foi entre 5.06 e 51.0, dentro dos valores dos agentes de contrastes de óxido de ferro comercialmente disponíveis.

Palavras-chaves: nanopartículas magnéticas, coprecipitação, agentes de contraste, ressonância magnética.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. N., ELISA. **Development of Nanostructured probes of Iron Oxide for Non-Invasive Biomedical Imaging.** Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2014. Master/PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

In this work we investigated the synthesis, characterization and contrast properties of core-shell nanoparticles of iron oxide coated with dextran and functionalized with amine groups. Fluorophores groups were incorporated on the nanoparticles surface, allowing their use as contrast agents for magnetic resonance imaging and optical microscopy. The nanoparticles synthesis was performed by the coprecipitation method of iron salts in basic medium, along with the polymer coating. The synthesis parameters were modified to investigate their influence on the size distribution of nanoparticles. Transmission electron microscopy observations and dynamic light scattering showed a magnetic iron oxide core with an average diameter around 10-15 nm and the total average hydrodynamic diameters between 16-50 nm, depending on the synthesis conditions. The FTIR spectra showed characteristics absorption bands pure dextran in the synthesized core-shell nanoparticles. The zeta potential analysis showed positive values close to zero and stability at neutral pH. The magnetization curves of the nanoparticles revealed superparamagnetic behavior, with the characteristic absence of hysteresis and no magnetization at zero field. The UV-vis and flow cytometry analysis revealed the presence of fluorescent groups in the nanoparticles and the feasibility of their use in optical imaging. Studies of relaxation times of the nuclear magnetization have shown the decrease of the magnetic resonance signal with increasing nanoparticles concentration, reducing the relaxation times T1 and T2 in the nanoparticle aqueous solutions. The relaxivities ratios (r_2/r_1) ranged between 5.06 and 51.0 and were within the value of iron oxide contrast agents commercially available.

Keywords: magnetic nanoparticles, coprecipitation, contrast agents, MRI.

1. INTRODUÇÃO

A ideia inicial de nanotecnologia foi introduzida pelo físico americano Feynman, em 1959, em sua palestra intitulada “*There’s plenty of room at the botton*” (“*Há muito espaço lá embaixo*”). Feynman sugeriu a possibilidade de manipulação e controle da matéria em escalas muito pequenas em um campo de pesquisa que conduziria para diversas aplicações técnicas [1].

A nanociência é definida como o estudo do comportamento e propriedades de materiais em dimensões de, aproximadamente, 1-100 nanômetros (nm), sendo a nanotecnologia a produção destes materiais. Ambas as definições envolvem a manipulação, caracterizações e aplicações destes nanomateriais, cuja menor organização funcional está, em pelo menos em uma das dimensões, na escala nanométrica [1].

Em particular, pesquisas em materiais nanoestruturados magnéticos têm recebido grande atenção. Estudos publicados demonstraram o uso de diferentes nanomateriais, como ímas permanentes, fluidos magnéticos [2], magnetolipossomas [3], nanocompósitos magnéticos, em diferentes setores, desde dispositivos eletrônicos e memórias para computadores, até aplicações biomédicas [4-8], incluindo o diagnóstico e tratamento de doenças [4]. Entre os diferentes tipos de materiais magnéticos, as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro têm sido um dos exemplos mais bem sucedidos para as aplicações biomédicas [4-9]. Elas podem ser usadas como agentes de contraste em imagens por ressonância magnética (MRI), bem como técnicas multimodais [10-12].

Agentes de contraste são substâncias químicas que podem localizar-se em regiões anatômicas, a fim de melhorar a visibilidade das estruturas internas do corpo

e aumentar a definição da imagem [5, 10]. Os agentes de contraste mais comuns na ressonância magnética são os complexos de gadolínio e de óxido de ferro. No Brasil, geralmente utilizam-se complexos de gadolínio, que muitas vezes podem ocasionar efeitos colaterais e limitações para certos pacientes. Por isso, agentes de contraste nanoparticulados podem ser uma alternativa para os atuais contrastes utilizados em exames de MRI.

Atualmente, os agentes de contraste em MRI compostos por óxido de ferro já são comercialmente disponíveis, tais como Magnevist®, Dotarem®, Feridex® e Resovist®. Para o MRI, o sinal gravado durante o exame está relacionado com os processos de relaxação magnética dos *spins* nucleares dos prótons presentes nas moléculas de água e/ou gorduras situadas na região do tecido de interesse. As nanopartículas podem interagir com um campo magnético externo, modulando a intensidade do sinal numa área específica, promovendo um melhor contraste entre diferentes tecidos e facilitando o diagnóstico [13]. As sondas de nanopartículas de óxido de ferro devem possuir, idealmente, solubilidade em água, biocompatibilidade, estabilidade coloidal em condições fisiológicas, eliminação do corpo de forma simples e superfície passível de ser funcionalizada, fatores extremamente importantes para seu uso em meios biológicos [11, 14].

O principal foco deste trabalho é o estudo e desenvolvimento de nanopartículas superparamagnéticas, sendo o núcleo composto de óxido de ferro (magnetita e maguemita) envolvido por um revestimento de dextran. A cobertura do dextran é reticulada, obtendo-se uma estrutura chamada *crosslinked iron oxide* (CLIO). Com a adição de terminações de grupos amina, a plataforma é denominada amino-CLIO. Juntamente ligado aos grupos amina, incorporou-se grupos fluoróforos na superfície da nanopartícula, obtendo-se nanopartículas que possam atuar como agentes de contraste para MRI e imagens ópticas. Otimizou-se o método de produção das nanopartículas, a fim de obter diferentes tamanhos médios. As caracterizações morfológicas, físico-químicas, magnéticas e também as medidas de relaxação e viabilidade celular também foram realizadas com o objetivo de comprovar as modificações das nanopartículas e aprimorar as propriedades de contraste para futuras aplicações biomédicas.

O presente trabalho está dividido em 7 capítulos. O capítulo 1 apresenta a introdução do trabalho, com aspectos e conceitos gerais sobre o assunto. O capítulo 2 apresenta os objetivos gerais e objetivos específicos propostos. O capítulo 3 apresenta a fundamentação teórica e a revisão bibliográfica sobre o assunto que será abordado. O capítulo 4 apresenta a descrição das metodologias e dos materiais utilizados durante a execução dos experimentos. O capítulo 5 apresenta a discussão dos resultados obtidos. O capítulo 6 apresenta as conclusões do trabalho desenvolvido e, como consequência, o capítulo 7 apresenta as propostas futuras para a continuidade deste projeto.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de nanopartículas superparamagnéticas multifuncionais constituídas de óxido de ferro revestidas com dextran com terminações aminas (NH_2) e fluoróforos emissores de radiação infravermelho-visível para atuar como agentes de contraste em imagens por ressonância magnética e por excitação óptica.

2.1 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Sintetizar as nanopartículas de óxido de ferro pelo método de coprecipitação;
- Otimizar o método de síntese em relação ao controle do tamanho das nanopartículas;
- Introduzir novas técnicas de caracterização de alta sensibilidade e resolução espacial, para estudar as propriedades morfológicas e estruturais do material;
- Determinar as relaxividades e os tempos de relaxação magnética nuclear das nanopartículas em soluções salinas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo será dedicado à revisão de aspectos gerais sobre as nanopartículas de óxido de ferro. Serão discutidas as propriedades magnéticas, a composição e a estrutura química, as funcionalidades e as aplicações gerais desses sistemas.

3.1 Aspectos Gerais do Magnetismo

As forças magnéticas surgem através do movimento de partículas carregadas eletricamente. A influência do campo magnético em materiais, quando um campo externo é aplicado, origina-se dos dipolos magnéticos presentes [15]. As propriedades magnéticas dos materiais estão relacionadas com seus momentos de dipolos magnéticos, ou momentos magnéticos ($\vec{\mu}$), sendo esta uma grandeza vetorial que relaciona a carga (i) em movimento num determinado circuito de área (\vec{A}).

$$\vec{\mu} = i \cdot \vec{A} \quad (3.1)$$

Os elétrons de um átomo possuem momentos magnéticos ao longo de seu eixo de rotação relacionados ao seu movimento do orbital ao redor do núcleo. Na maioria dos materiais, o momento magnético de um elétron no átomo é cancelado pelo momento magnético de outro elétron presente neste átomo, orbitando em uma direção oposta. Portanto, o efeito magnético produzido é nulo ou um valor pequeno para a maioria dos materiais [16]. Os elétrons do átomo também possuem um momento angular intrínseco, o *spin*, que contribui para o momento magnético total e é diferente do momento angular do orbital [17].

Os átomos que possuem níveis de energia incompletos possuem um momento magnético remanescente. Todos os átomos que possuem muitos elétrons e níveis de energia incompletos encontram-se de forma desemparelhada com seus *spins*, provocando um momento magnético líquido não nulo. Por exemplo, o elemento ferro possui no subnível eletrônico *d* seis elétrons presentes, dos dez elétrons que pode suportar. Conseqüentemente, a ausência de elétrons neste subnível eletrônico ocasiona um forte momento magnético [18]. Por outro lado, átomos com níveis de energia completo possuem elétrons com *spin* em direções opostas, sendo o momento magnético de *spin* total cancelado [16, 18].

Quando um material é exposto a um campo magnético externo (\vec{H}), os dipolos magnéticos elementares irão gerar um campo magnético próprio que irá alterar o valor original do campo [18]. A resposta desse material é descrita pela indução magnética \vec{B} (Equação 3.2). Os momentos magnéticos dipolares de dentro do material tendem a orientar-se de acordo com este campo externo. Os dipolos magnéticos irão reagir para produzir um campo magnético próprio: a magnetização (\vec{M}), que é o momento magnético líquido por volume (V) de material (Equação 3.3).

$$\vec{B} = \mu_0 \cdot (\vec{H} + \vec{M}) \quad (3.2)$$

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \sum_v \mu_i \quad (3.3)$$

Onde μ_0 é a permeabilidade magnética no vácuo. A relação entre \vec{H} e \vec{B} é uma propriedade intrínseca do material [18-20]. A resposta magnética é função da estrutura atômica e da temperatura. Os diversos tipos de resposta magnética podem ser classificados em termos da susceptibilidade magnética (χ), variável que relaciona à magnetização \vec{M} , com o campo magnético externo aplicado \vec{H} :

$$\vec{M} = \chi \cdot \vec{H} \quad (3.4)$$

Este parâmetro permite identificar a natureza magnética do material [16].

3.1.1 Propriedades Magnéticas dos Materiais

Os materiais magnéticos podem ser classificados em diferentes categorias.

O diamagnetismo é a forma mais fraca de magnetismo e persiste apenas enquanto um campo magnético externo está sendo aplicado no material. Um material será considerado diamagnético quando seus átomos tiverem momento angular líquido nulo. Todo material diamagnético sujeito a um campo magnético externo apresenta momento dipolar magnético orientado no sentido oposto ao do campo magnético externo. Caso o campo magnético externo não seja uniforme, o material pode ser repelido da região onde o campo magnético é mais intenso para regiões onde o campo magnético é menos intenso [16, 21].

O paramagnetismo ocorre em materiais com átomos que possuem momentos magnéticos não nulos e que interagem fracamente entre si [18]. Cada átomo ou molécula possui camadas atômicas incompletas e momentos magnéticos permanentes, devido ao cancelamento incompleto dos momentos magnéticos do *spin* do elétron ou do orbital. Quando não há presença do campo magnético externo, os momentos magnéticos estão aleatoriamente orientados e cancelam-se entre si, sem qualquer magnetização líquida [21]. Quando um campo magnético é aplicado, existe uma tendência de cada momento atômico alinhar-se paralelamente na direção do campo, e o material adquire, como um todo, um momento magnético na direção do campo [21]. Contudo, como há resistência ao alinhamento pela agitação térmica, que tende a romper a interação magnética devido às colisões atômicas, a fração de momentos magnéticos que se orientam com o campo depende da intensidade do campo e da temperatura envolvida. O resultado é um alinhamento parcial na direção do campo e uma pequena susceptibilidade positiva [18, 21].

O ferromagnetismo ocorre em materiais que possuem momentos magnéticos permanentes. O ferromagnetismo surge da forte interação entre os elétrons de uma camada incompleta do material, chamada de interação de troca, diminuindo a energia dos pares de elétrons presentes com rotações paralelas. Um pequeno campo magnético externo pode produzir um grau elevado de alinhamento dos momentos magnéticos atômicos, inclusive, em alguns casos, este alinhamento pode continuar por certo tempo, mesmo com a remoção do campo externo. As regiões de

alinhamento são chamadas de domínios magnéticos. A direção de alinhamento contudo pode ser diferente de um domínio para o outro. Com a aplicação de um campo externo, obtém-se o aumento do tamanho dos domínios magnéticos orientados no mesmo sentido do campo aplicado e a diminuição no tamanho dos domínios magnéticos orientados no sentido oposto a este campo [18, 19]. Se um material ferromagnético for aquecido a altas temperaturas, a agitação térmica é grande o suficiente para superar a coesão oriunda da interação de troca, desalinhando os momentos magnéticos e tornando o material paramagnético [15].

O ferrimagnetismo ocorre em materiais que possuem mais de dois tipos de átomos presentes no material. Os *spins* tendem a se alinhar na mesma direção, porém em sentidos opostos (em módulos diferentes) e a magnetização resultante não é nula. Na magnetita (Fe_3O_4), os íons de ferro podem ter o número de valência igual à +2 ou +3, ocorrendo um momento magnético de *spin* líquido para cada número de valência e os íons de oxigênio presentes são magneticamente neutros. Contudo, geram interações de pareamento de *spins* antiparalelo entre os íons de ferro e o momento magnético líquido resulta do cancelamento incompleto dos momentos de *spin* [18].

3.1.2. Curvas de Magnetização

A curva de magnetização é dada pelo gráfico de magnetização (\vec{M}), ou campo induzido \vec{B} , versus o campo magnético externo (\vec{H}). Na Figura 3.1A, estão representados os tipos de orientações dos momentos dos dipolos magnéticos para os diferentes tipos de respostas magnéticas, discutidos na seção anterior.

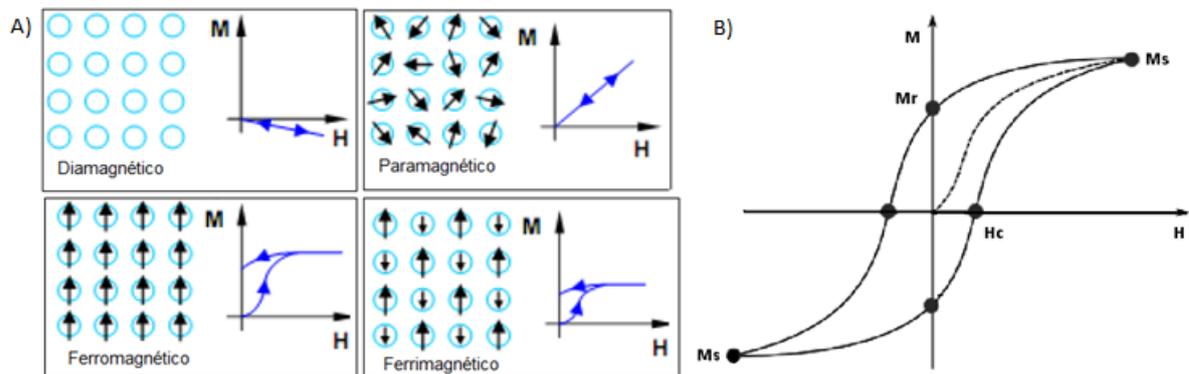


Figura 3.1. Esquema representativo das orientações dos dipolos magnéticos e as respectivas curvas de magnetização para materiais diamagnéticos, paramagnéticos e ferromagnéticos (A) [23]. Curva de magnetização M versus campo magnético H de um material ferromagnético. M_r : magnetização remanescente. M_s : magnetização de saturação. H_c : campo magnético coercitivo (B).

Para materiais ferromagnéticos, um campo magnético baixo provoca uma resposta de magnetização relativamente alta, a qual satura para valores altos do campo aplicado. Para estes materiais, o deslocamento dos domínios não é completamente reversível. Portanto, a curva de (\vec{M}) versus (\vec{H}) apresenta curva de histerese, de acordo com a Figura 3.1B.

Para campos magnéticos grandes, os domínios alinham-se chegando num valor máximo, chamado de magnetização de saturação (M_s). Ao diminuir a intensidade do campo magnético externo, abaixo do ponto de saturação, o valor da magnetização não evolui mais na mesma proporção do que anteriormente. Desta forma, a histerese ocorre devido aos domínios magnéticos que se alinham com o aumento do campo magnético e não voltam para sua orientação original, quando o campo é reduzido novamente. Quando o campo magnético volta ao valor zero, o material apresenta uma magnetização remanescente (M_r). Invertendo-se o sinal do campo magnético externo, através de um campo coercitivo (H_c) no sentido contrário ao campo inicial, os domínios reorientam-se até a sua desmagnetização. Depois de saturado no sentido inverso ao inicial, completa-se o ciclo da histerese [18, 21].

3.1.3. Domínios Magnéticos

Um material magnético nem sempre possui o seu volume magnetizado numa mesma direção. Entretanto, possui pequenas regiões com magnetização uniforme,

porém desorientadas umas em relação às outras. Estas microrregiões são denominadas domínios magnéticos (Figura 3.2) [21].

Para materiais magnéticos *bulk*, existem multidomínios magnéticos, onde as regiões de magnetização são separadas por paredes de domínios. A formação de paredes de domínios é um processo conduzido pelo equilíbrio entre a energia magnetostática (ΔE_{MS}), que aumenta proporcionalmente com o volume dos materiais, e a energia de domínio de parede (E_{DW}), a qual também aumenta proporcionalmente com a área interfacial entre os domínios magnéticos existentes no material [22-24].

Os domínios magnéticos possuem *spins* desemparelhados, formando pequenos ímãs permanentes. Quando um campo magnético é aplicado, os domínios magnéticos tendem a alinhar-se com o campo, e a magnetização será revertida pela rotação do *spin* (domínios magnéticos), de acordo com a Figura 3.2 [18].

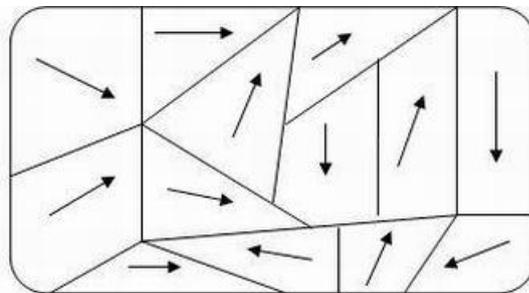


Figura 3.2. Representação de domínios magnéticos de um material magnético [adaptado de 18].

Quando o tamanho do material é reduzido, existe um volume crítico suficiente que necessita de uma maior energia para criar uma parede de domínio com capacidade de suportar a energia magnetostática do domínio [24]. O número de domínios magnéticos pode diminuir até existir um único domínio (monodomínio), desde que o tamanho do material seja inferior a certo tamanho crítico, chamado de diâmetro crítico (d_c) [20]. Este diâmetro crítico pode ter dezenas de nanômetros e depende do material, sendo influenciado pela contribuição de diferentes energias anisotrópicas [24].

As nanopartículas magnéticas podem ter um monodomínio magnético ou pequenos domínios magnéticos; dependendo do tamanho destes domínios, podem exibir histerese ou não. Em um material ferromagnético *bulk*, a magnetização aumenta em relação ao campo, através dos domínios de parede e sua rotação. Em um material com monodomínio magnético, o movimento de parede de domínio não é possível, e apenas a rotação da magnetização coerente pode ser usada para superar a anisotropia (K_a) da partícula [24, 25].

3.1.3. Superparamagnetismo

O superparamagnetismo pode ser entendido considerando o comportamento de uma partícula com um monodomínio magnético [24]. Ao sofrer a ação de um campo magnético, os momentos magnéticos no monodomínio magnético movimentam-se de forma coerente para uma mesma direção e seus momentos magnéticos apontam numa mesma direção. A diminuição do tamanho do monodomínio magnético faz com que o momento magnético torne-se instável no eixo magnético preferencial quando o campo magnético está sendo aplicado [26].

As interações atômicas nos materiais magnéticos possuem direções preferenciais em relação aos eixos cristalográficos, portanto são anisotrópicas [26]. A energia de anisotropia magnética, que determina a direção preferencial da magnetização por partícula, é responsável por manter os momentos magnéticos ao longo de uma determinada direção, de acordo com a Figura 3.3, e pode ser expressa por:

$$E(\theta) = K_{eff} V \sin^2 \theta \quad (3.5)$$

Onde V é o volume da partícula, K_{eff} é a constante de anisotropia e θ é o ângulo entre a magnetização e a direção preferencial [24, 25]. A energia de barreira $K_{eff}V$ separa, energeticamente, duas direções de magnetização (uniaxial), onde o momento magnético da partícula possui dois estados de energia mínima. Com partículas de tamanho cada vez menores, a energia térmica $k_B T$ pode ultrapassar a barreira de energia $K_{eff}V$ e a magnetização é facilmente invertida, sendo livre para girar entre as direções de fácil magnetização.

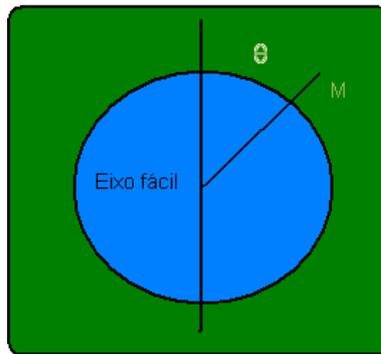


Figura 3.3. Magnetização de uma partícula com um ângulo θ em relação ao eixo fácil de magnetização.

O arranjo ordenado de momentos magnéticos diminui com o aumento da temperatura, devido a flutuações térmicas dos momentos magnéticos individuais. Acima da temperatura de Curie ou Néel, o material torna-se desordenado e perde sua magnetização. O momento magnético de uma partícula pode inverter os *spins* em tempos menores e a energia térmica pode ser grande o suficiente para superar a energia anisotrópica, logo a magnetização não se torna mais estável e o material é dito em estado superparamagnético [24].

Em nanopartículas superparamagnéticas, cada momento magnético próprio pode ser facilmente saturado na presença de um campo magnético externo. Porém, a magnetização retorna a zero, após a remoção do campo, como consequência de flutuações térmicas [25]. O momento magnético da partícula como um todo, está livre para flutuar em relação à energia térmica, enquanto que os momentos atômicos individuais mantêm o seu estado relativo ordenado uns com os outros [8]. Este comportamento é similar aos materiais paramagnéticos, porém ao invés de *spins* eletrônicos individuais, é o momento coletivo das partículas presentes [25]. Caso contrário a isto, este efeito é chamado de estado bloqueado. A temperatura que separa estes dois estados é a temperatura de bloqueio (T_B), onde em valores abaixo dela as partículas podem ter comportamento ferromagnético ou ferrimagnético, e acima da T_B as partículas podem ser desbloqueadas, tornando-se superparamagnéticas. A T_B eficaz depende da constante de anisotropia, do tamanho das partículas, do campo magnético aplicado e do tempo de medição experimental. A T_B define a transição de ferromagnetismo para superparamagnetismo [24].

A Figura 3.4 mostra o gráfico da magnetização versus o campo magnético de materiais com comportamento superparamagnético. As nanopartículas de óxido de ferro, com núcleos cerca de 20 a 30 nm, exibem comportamento superparamagnético à temperatura ambiente [20].

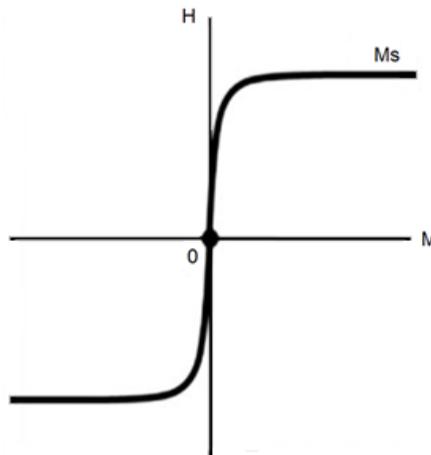


Figura 3.4. Curva de um material superparamagnético [adaptado de 25].

3.2. Estrutura do Óxido de Ferro

As nanopartículas magnéticas podem ser compostas por metais, como o Fe, Co, Ni e óxidos metálicos, como FeO, Fe₃O₄, MnO [27]. Os óxidos metálicos magnéticos mais conhecidos são as ferritas cúbicas, especialmente ferritas contendo ferro trivalente (Fe⁺³), podem ser representados como Fe⁺³O₃M⁺²O, onde M⁺² é um cátion divalente de um elemento metálico, óxidos mistos de outros metais (Co, Ni, Cu, etc) ou mesmo ferro puro [28, 29].

As ferritas são classificadas de acordo com suas estruturas cristalinas e são divididas em:

- Espinélios, com forma cúbica AB₂O₄;
- Magnetoplumbitas, com forma hexagonal RFe₁₂O₁₉ (R=Ba, Sr, Pb);
- Granadas, com forma cúbica A₃B₂(SiO₄)₃ (A= Mg, Fe⁺², Mn⁺² ou Ca e B= Fe⁺³, Al ou Cr);

- Perovskitas, com forma cúbica, monoclínica ou ortorrômbica ABO_3 .

Na estrutura em espinélio, existem duas vezes mais sítios catiônicos octaédricos do que sítios catiônicos tetraédricos. Se o cátion divalente ocupar apenas dois sítios tetraédricos, o espinélio é dito direto. Já a estrutura de espinélio inverso consiste de íons de óxido em um arranjo cúbico. Os íons de Fe^{+2} ocupam um quarto dos espaços octaédricos, e os íons Fe^{+3} são igualmente divididos entre um oitavo dos espaços tetraédricos e um quarto dos espaços octaédricos [2].

As ferritas de espinélio são as mais utilizadas devido à suas propriedades magnéticas, ópticas e elétricas bastante significativas. São divididas em magnetita e maguemita [23, 29].

A magnetita apresenta o maior comportamento magnético do que qualquer óxido composto por metal de transição. A maguemita é meta-estável em relação à hematita e forma soluções sólidas com a magnetita [20]. A magnetita pode ser convertida para maguemita em ambiente oxidativo, assim como em ambiente redutivo o efeito inverso é encontrado [22].

A estrutura cristalina da magnetita e da maguemita podem ser descritas em termos de planos compactados de ânions de oxigênio e cátions de ferro com sítios intersticiais octaédricos e tetraédricos, de acordo com a Figura 3.8. Em ambas as estruturas, os íons de oxigênio estão em um arranjo estrutural cúbico.

A magnetita difere da maioria dos óxidos de ferro por conter tanto cátions de Fe^{+2} como de Fe^{+3} . Os íons Fe^{+3} estão distribuídos aleatoriamente entre os sítios de coordenação octaédrica e tetraédrica, e os íons de Fe^{+2} em sítios octaédricos. A magnetita é frequentemente não estequiométrica, tendo cátions de Fe^{+3} deficiente na subestrutura. O Fe^{+2} também pode ser parcialmente ou totalmente substituído por outros íons divalentes. O arranjo de outros íons na estrutura se dá através da flexibilidade da estrutura de oxigênio, que pode expandir ou contrair para acomodar

cátions que diferem do tamanho do cátion Fe^{+2} . Esta substituição de cátion é acompanhada por alterações no comprimento da aresta da célula unitária [28].

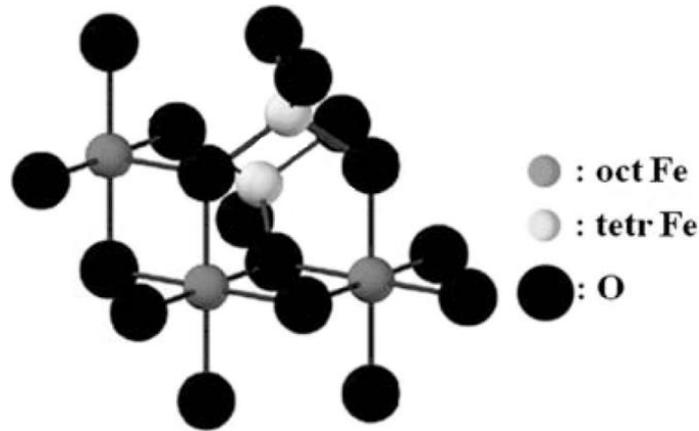


Figura 3.5. Estrutura de uma célula unitária de magnetita [adaptado de 20].

A maguemita possui uma estrutura semelhante à da magnetita. As principais diferenças entre ambas é que quase todos os cátions de ferro estão no estado trivalente e numa estrutura em espinélio com vacâncias em sua subestrutura catiônica. As vacâncias dos cátions compensam a oxidação do Fe^{+2} [28]. Dois terços dos sítios são preenchidos com íons de Fe^{+3} , dispostos regularmente, com dois sítios preenchidos seguidos por um local com vacância [20, 28]. O grau de ordenação da vacância diminui com a diminuição do tamanho das partículas, sem qualquer ordenação da vacância em maguemita menor do que 20 nm [20].

Em ambos os cristais, os *spins* dos elétrons dos íons de Fe^{+3} em sítios octaédricos são alinhados antiparalelamente com os sítios tetraédricos, portanto, nenhuma magnetização na estrutura é observada a partir destes íons. Os íons de Fe^{+2} tendem a alinhar seus *spins* paralelos com os sítios octaédricos adjacentes dos íons Fe^{+3} , conduzindo uma magnetização. Os arranjos de spins antiparalelos ao longo do sólido que não se cancelam completamente geram o comportamento ferrimagnético [2, 28].

3.3. Nanopartículas e Nanoestruturas

3.3.1. Características Gerais das Nanoestruturas

Os materiais nanoestruturados são definidos como materiais que apresentam tamanho característico de pelo menos uma das direções em escala nanométrica [30, 31]. Qualquer material composto por metais, cerâmicas, semicondutores, compósitos, polímeros, que contenha grãos ou agregados com tamanhos inferiores a, aproximadamente, 100 nm podem ser classificados como um material nanoestruturado [30, 32].

Para a produção de materiais nanoestruturados, existem duas abordagens de preparação: processos *bottom-up* (de baixo para cima), a partir do controle de arranjos de menor escala (átomos e moléculas); e processos *top-down* (de cima para baixo), a partir da escala microscópica ou da escala macroscópica [1].

A Figura 3.6 representa alguns exemplos da classificação das nanoestruturas. As nanoestruturas formadas com agrupamentos de poucos átomos podem ser consideradas como estruturas com zero dimensão (0-D), tais como fulerenos, nanopartículas, pontos quânticos, entre outros. As nanoestruturas de formato filiforme, na qual o comprimento é muito maior do que as suas dimensões laterais (poucos nanômetros) são classificadas como nanoestrutura de uma dimensão (1-D), tais como os nanotubos de carbono e nanofios. As nanoestruturas de duas dimensões (2-D) são aquelas que em apenas a espessura tem dimensão nanométrica, tais como os filmes ultrafinos ou lâminas de grafite. Os nanomateriais de três dimensões (3-D) incluem pós, multicamadas, policristais compactados, na qual as estruturas com 0-D, 1-D e 2-D podem estar em contato entre si [30-32].

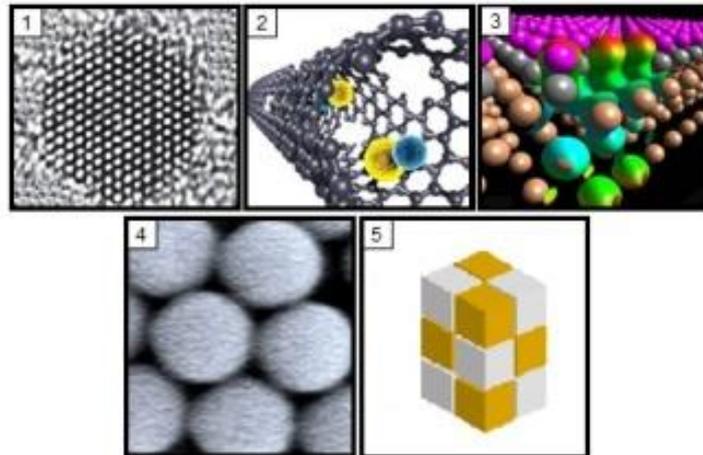


Figura 3.6. Representação de alguns materiais nanoestruturados. 1. 0-D - pontos quânticos; 2. 1-D nanotubos de carbono; 3. 2-D filme ultrafino; 4. 1-D partículas coloidais; 5. 3-D nanomateriais compactados.

Algumas nanopartículas tem uma estrutura *core-shell*. O revestimento (*shell*) protege o núcleo (*core*) e pode agir como um ligante para a adição de outras moléculas e de outras funções. Uma variedade de combinações de materiais *core-shell* pode ser encontrado na literatura, como *quantum dots* [33], fluoróforos [34] ou nanopartículas magnéticas [34-36].

O interesse na pesquisa em materiais nanoestruturados tem sido estimulado pelo fato de que as dimensões espaciais reduzidas e a elevada área de interface presente no material acarretam numa elevada relação de superfície-volume. Os átomos da superfície têm um papel diferenciado em relação àqueles presentes no interior do material, uma vez que podem participar de todas as interações físicas e químicas do material com o meio onde está inserido, causando modificações relevantes nas propriedades dos materiais, em relação ao mesmo material *bulk* [30, 31, 37]. As modificações nas propriedades físicas e químicas de um material (propriedades ópticas, elétricas, magnéticas, mecânicas, térmicas ou degradativas) manifestam-se diferentemente a partir de um determinado tamanho crítico [1].

3.3.2. Classificação das Nanopartículas de Óxido de Ferro

As nanopartículas de óxido de ferro, normalmente, consistem em dois componentes: um núcleo magnético cristalino e um revestimento de superfície

estabilizante, como apresentado na Figura 3.7. O núcleo magnético pode ser composto de misturas de magnetita e maguemita, ambas num mesmo arranjo cristalino cúbico [22, 37].



Figura 3.7. Representação de uma nanopartícula de óxido de ferro em sistema núcleo-casca (do inglês, *core-shell*), composto de um núcleo de óxido de ferro e um revestimento de dextran [adaptado de 38].

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas são geralmente classificadas de acordo com o diâmetro hidrodinâmico, em solução aquosa, em três categorias (Tabela 3.1): óxido de ferro superparamagnético oral (Oral SPIO), que abrangem diâmetros hidrodinâmicos de 3,4 μm a 300 nm; óxido de ferro superparamagnético padrão, ou também chamado de polidisperso (SSPIO ou PSPIO), que abrangem diâmetros hidrodinâmicos de 50 a 150 nm; e óxido de ferro superparamagnético ultra pequeno (USPIO), com diâmetros hidrodinâmicos de 10 a 40 nm [22, 37].

Tabela 3.1. Classificação quanto ao tamanho das partículas de óxido de ferro superparamagnético [adaptado de [22]].

Tipo	Varição de Tamanho
Oral SPIO	300 nm a 3,5 μm
PSPIO/SSPIO	50 nm a 150 nm
USPIO	<40 nm

Uma subcategoria de USPIO, conhecida como nanopartículas de óxido de ferro monocristalino (MION), é composto por um núcleo de óxido de ferro monocristalino, abrangendo tamanhos de diâmetros hidrodinâmicos de 10 a 30 nm. Uma derivação das nanopartículas MION ou USPIO consiste de uma nanoestrutura que apresenta um revestimento de polissacarídeo reticulado quimicamente, denominado CLIO (do inglês, *crosslinked iron oxide*) [22].

Algumas nanopartículas de óxido de ferro estão comercialmente disponíveis na área de contraste por MRI, ou em fase de investigação clínica, e são mostradas na Tabela 3.2:

Tabela 3.2. Nomes genéricos e comerciais, características comuns e valores da razão de relaxividade ($r2/r1$) de diferentes nanopartículas compostas por óxido de ferro para uso em MRI [22, 39, 40].

Classificação	Agente	Nome Comercial	Material de Revestimento	Diâmetro Hidrodinâmico	$r2/r1$
SPIO Oral	AMI-121	Lumirem Gastromark	Silicone	> 300 nm	22,5
SSPIO	AMI-25	Endorem Feridex IV	Dextran	80-180 nm	4,11
USPIO ou MION	CLIO	Investigação Clínica	Dextran Crosslinked	30-50 nm	-
	SH U 555 ^a	Resovist	Carboxidextran	40-60 nm	5,94
	AMI-227	Sinerem Combidex	Dextran	15-40 nm	4,49

3.3.3. Estabilização Coloidal das Nanopartículas de Óxido de Ferro

A preparação de fluido composto de nanopartículas de óxido de ferro pode ser semelhante à preparação em escala macroscópica, porém a formação dos cristais de óxido de ferro deve ser inibida para mantê-los em escala nanométrica e evitar possível aglomeração entre as mesmas [11]. Para evitar este problema, utilizam-se materiais que atuem como agentes estabilizantes. Esta estabilidade depende das forças atrativas e repulsivas presentes no material [9].

As combinações de soluções aquosas com surfactante ou contra-íons são utilizadas de modo que as superfícies externas das partículas sejam carregadas, positivamente ou negativamente, e compatíveis com o solvente circundante. O revestimento da superfície reduz a força magnética entre as partículas [41].

Os átomos de ferro da superfície do óxido de ferro atuam como ácidos de Lewis e coordenam-se com moléculas que doam pares de elétrons. Portanto, em soluções aquosas, os átomos de ferro coordenam-se com a água, que se dissocia, deixando a superfície de óxido de ferro funcionalizada com grupos hidroxilas (OH^-). Estes grupos hidroxilas são anfóteros, e podem reagir tanto com ácidos ou bases. Dessa forma, a superfície da nanopartícula pode ser positiva ou negativa,

dependendo do pH do meio. O ponto isoelétrico é o pH em que a superfície da nanopartícula apresenta número igual de cargas superficiais, sendo para a magnetita um valor de aproximadamente 6,8 [9].

A estabilização é um parâmetro importante para obter uma suspensão coloidal que seja estável contra a agregação e aglomeração, principalmente, em meio biológico e quando expostos a campos magnéticos [9, 22]. Esta estabilidade resulta do equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas. Se todas as partículas possuírem uma repulsão mútua, a dispersão tenderá a ficar estável. As nanopartículas em suspensão agregam-se devido a forças atrativas de van der Waals, minimizando a superfície total ou energia interfacial, induzindo atrações isotrópicas de curto alcance [42, 9]. Ambas estas forças são explicadas pela teoria de *Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek* (DLVO), na qual a energia potencial total entre dois corpos é resultante da ação combinada entre as forças atrativas de Van der Waals e as forças repulsivas da dupla camada elétrica, formada em solução aquosa [43].

A modificação da superfície para uma boa estabilização das nanopartículas magnéticas pode ser efetuada tanto durante a formação do núcleo de óxido de ferro no início da etapa de síntese ou depois do processo de formação do núcleo de óxido de ferro (pós-síntese). Ambas as formas de síntese podem gerar nanopartículas com suspensões monodispersas e com isso pode-se assumir maior controle sobre as propriedades físicas e químicas [22]. O revestimento, geralmente, deve ter características de biocompatibilidade e biodegradabilidade para serem usados na área biomédica. As moléculas mais usuais são tensoativos e/ou surfactantes, tais como o ácido oléico, ácido láurico, entre outros. As moléculas de surfactantes são na maioria das vezes anfífilas e fazem parte da relação entre a interface e o solvente.

Uma grande parte dos métodos de síntese de nanopartículas magnéticas que possuem surfactantes utiliza solventes orgânicos, tais como hexadecano, tolueno, entre outros (normalmente com grupos orgânicos com cauda hidrofóbica), formando uma proteção em torno das nanopartículas. Todavia, as nanopartículas em suspensão orgânica não podem ser utilizadas para fins biomédicos, devido à maioria dos solventes orgânicos não serem biocompatíveis [42].

Os diversos tipos de estabilizantes podem ser classificados em:

- Grupos orgânicos: com grupos funcionais, incluindo carboxilatos, fosfatos e sulfatos. São conhecidos por se ligarem facilmente à superfície da magnetita. A estabilização pode ser adaptada para uma melhor dispersão em diversos meios líquidos, tanto polares como apolares [9, 22].
- Materiais inorgânicos: ouro, sílica, gadolínio. Estes revestimentos são estáveis às nanopartículas em solução e também auxiliam no efeito de ligantes e/ou receptores biológicos para a superfície (formação de quelatos). Podem formar sistemas *core-shell* [9, 22].
- Materiais poliméricos: podem ser revestidos tanto *in situ*, como depois da síntese. Os revestimentos mais comuns são dextran, carboxidextrano, amido, polietileno glicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), entre outros. Estes têm sido bastante utilizados para dispersões de nanopartículas magnéticas em meio aquoso [42, 9].

3.3.4. Dextran

O dextran é um dos materiais mais comuns usados para revestimento em agentes de contraste por imagens por ressonância magnética (MRI). Atualmente, as nanopartículas de óxido de ferro revestidas com dextran são um dos poucos agentes de contraste a base de óxido de ferro clinicamente aprovados [4, 44]. Na medicina, o dextran é utilizado como antitrombótico e também para reduzir a viscosidade do sangue [4].

O dextran é um biopolímero produzido tanto por bactérias (*Leuconostoc mesenteroides*), como por síntese química [45]. É composto por polissacarídeos com moléculas de glicose $(C_6H_{10}O_5)_n$ e com ramificações de cadeias de diferentes comprimentos (10-50 kDa). O grau de ramificação depende da fonte de produção do dextran e pode variar de 0,5 a 60%. A maioria dos dextrans disponíveis comercialmente possui baixo grau de ramificação (0,5%), resultando num elevado

grau de solubilidade em água. Porém, dextrans com ramificações maiores que 43% (a partir α -1,2 e α -1,3), são considerados insolúveis em água [46].

A Figura 3.8 representa a estrutura do dextran. A cadeia linear consiste de ligações α -1,6-glicosídicas entre as moléculas de glicose e as ramificações iniciam a partir das ligações α -1, 4. [11, 46].

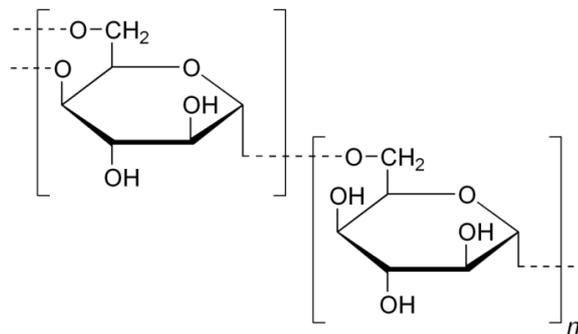


Figura 3.8. Estrutura química do dextran.

A estabilidade do dextran como revestimento para as nanopartículas de óxido de ferro pode variar em relação às possíveis modificações de superfícies para a fixação de biomoléculas. Para melhorar este aspecto, a cobertura das nanopartículas pode ser reticulada (Figura 3.9), obtendo-se uma estrutura mais rígida na superfície e, principalmente, mais resistente às variações de temperaturas.

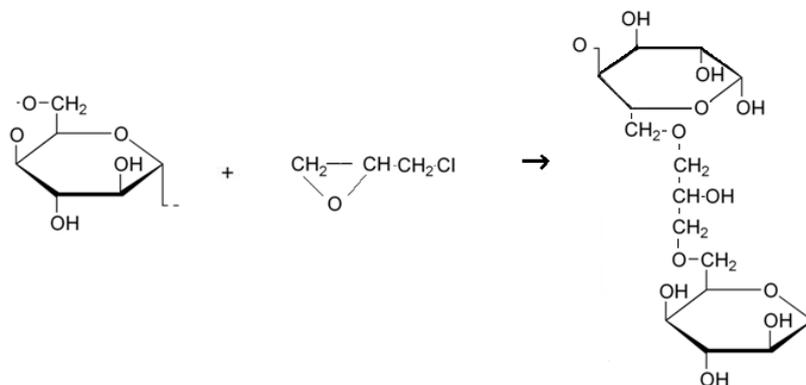


Figura 3.9. Representação da reação de reticulação do dextran com epícloridrina.

Em soluções aquosas, o dextran interage com a superfície da nanopartícula. Há interações polares (de quelação e de ligação de hidrogênio) com a superfície do

núcleo magnético. Embora as ligações de hidrogênio sejam relativamente fracas, a energia de ligação total das ligações de hidrogênio ao longo do comprimento da molécula de polissacarídeo pode ser elevada, devido ao grande número de grupos hidroxilas presente na molécula de dextran [9].

O comprimento das cadeias e o peso molecular (M_w) do dextran desempenham um papel fundamental para a absorção das nanopartículas no meio biológico. Os dextrans com baixo peso molecular, normalmente menor do que 10 kDa, são eliminados do organismo através de uma filtração glomerular que ocorre nos rins e, no caso de seu uso em partículas maiores que 80 nm, podem ser assimiladas pelo sistema reticuloendotelial (RES), com a captação hepática de até 80% da dose injetada [11, 47]. Para os dextrans com peso molecular maior, a eliminação passa por uma metabolização através de enzimas, chamada de dextranase, que se encontra presente em diversos órgãos humanos como fígado, rins ou cólon. Estudos realizados mostraram que a superfície do dextran é bastante estável em tecidos biológicos, devido à resistência a degradação mediada pela dextranase. Esta enzima transforma o dextran em glicose, sendo por fim hidrolisada em água e dióxido de carbono [13, 48].

3.4. Métodos de Síntese de Nanopartículas de Óxido de Ferro

Nas últimas décadas, diferentes métodos de preparação de nanopartículas magnéticas foram investigados. A síntese por coprecipitação normalmente é um processo complexo devido à formação de diferentes sistemas coloidais. O desafio consiste na definição de condições experimentais adequadas, conduzindo idealmente a uma população monodispersa de tamanho adequado [24].

O método via processos físicos, como deposições em fase gasosa e litografia por feixe de elétrons, podem ser métodos não apropriados por ter disparidade no controle de tamanho das partículas que se deseja obter [13, 24]. A síntese via rota química é mais indicada em comparação à síntese por métodos físicos, pela maior vantagem no controle de diferentes parâmetros e custo mais baixo. O tamanho e a distribuição das nanopartículas, o grau de cristalinidade, a pureza de fase são parâmetros importantes em termos de aplicações para biomédica [4].

Os métodos de síntese podem ser classificados também por rotas hidrolítica e não hidrolítica. As rotas hidrolíticas dependem da hidrólise dos íons de Fe^{+3} e Fe^{+2} , enquanto que o método não hidrolítico baseia-se na pirólise (quebra) de compostos orgânicos que possuem ferro em sua estrutura [4, 49].

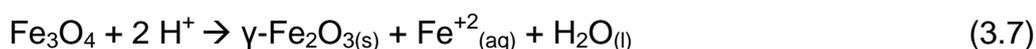
Uma variedade de métodos via processos químicos podem ser usados para sintetizar nanopartículas magnéticas [9], tais como síntese de microemulsão e sol-gel [11, 20, 49], “*eletrosprays*” [24, 50], deposição térmica [25], sonólise [51]. No entanto, para uma rota de síntese de nanopartículas monodispersas é necessário separar a nucleação e passos de crescimento durante a síntese. O método mais comum e barato para a produção de nanopartículas de magnetita é a técnica de coprecipitação de sais de ferro em meio alcalino, que foi a técnica utilizada neste trabalho. O processo de coprecipitação apresenta vantagens como homogeneidade química, reações em baixas temperaturas, obtenção de partículas finas, tempo de reação relativamente pequeno e possibilidade de processamento em grande escala [9, 52].

3.4.1. Síntese pelo Método de Coprecipitação

Convencionalmente, as nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) podem ser sintetizadas pela adição de uma solução básica (NaOH, NH_4OH) junto com misturas de sais de Fe^{+3} e Fe^{+2} , em atmosfera ambiente. A reação sintética pode ser escrita como:



Para ocorrer e completar a precipitação da Fe_3O_4 , o pH do meio deve ser básico, com uma proporção estequiométrica do $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ de 2:1, em temperatura ambiente e em meio não oxidante [9, 13]. Contudo, a magnetita não é estável em temperatura ambiente e pode sofrer oxidação, gerando a maguemita, de acordo com a equação abaixo:



A magnetita tem magnetização de saturação um pouco mais alta do que a maguemita, e é mais preferível para a aplicação em MRI, porém a maguemita é mais estável quimicamente sob condições de temperatura ambiente [4].

A solução de base é adicionada à solução dos sais de ferro já dissolvidos em meio aquoso, sob agitação constante e numa temperatura próxima a temperatura de ebulição das respectivas soluções. Alguns parâmetros podem ser controlados no início da preparação das nanopartículas, como o controle do tamanho através da velocidade de agitação mecânica, concentração e tipo de base utilizada, controle de temperatura da reação, força iônica, pH e natureza dos sais de Fe^{+3} e Fe^{+2} [9].

A pureza dos reagentes é importante para a formação de magnetita. Normalmente, no método de coprecipitação são utilizados sais hidratados de ferro trivalentes ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e sais hidratados de ferro divalentes ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) [27]. A oxidação da magnetita para maguemita pode afetar as propriedades físicas e químicas das nanopartículas magnéticas durante a síntese. Para evitar isto, pode-se adicionar um material de revestimento, bem como adicionar um gás inerte (N_2 ou Ar). Ao borbulhar um gás inerte na solução de síntese, auxilia na proteção contra a oxidação da magnetita, como também a redução do tamanho da nanopartícula [9, 11, 13].

A formação da magnetita ocorre através de adsorção superficial de cátions, o que leva a um equilíbrio entre reações de complexação de superfície e precipitação. O processo de nucleação cristais ocorre quando a concentração satura (saturação crítica) e, logo, um crescimento lento dos núcleos por difusão do soluto para a superfície do cristal. O processo de crescimento é controlado pelo transporte de massa e pelo equilíbrio da superfície através da adição e da remoção dos monômeros individuais (átomos, íons ou moléculas) [13]. Para obter nanopartículas monodispersas, é necessário que as etapas de nucleação e crescimento sejam separadas de modo que a nucleação ocorra primeiramente e, só depois, o crescimento, pois o número de partículas é determinado pelo fim da nucleação. As taxas relativas de nucleação e crescimento das partículas controlam o tamanho e a polidispersão. Quando o processo de nucleação predomina são obtidas partículas pequenas em grande quantidade, porém, se o processo de crescimento for

predominante, será obtido um pequeno número de partículas com tamanho maior [9, 11, 25].

3.2. Marcação de Nanopartículas de Óxido de Ferro com Fluoróforos

Imagem por fluorescência é uma técnica de imagem molecular em que são adicionados fluoróforos em sondas específicas que são excitadas por radiação incidente, geralmente na luz visível ou infravermelho próximo (do inglês, *near infrared* – NIR - 650-950 nm), e emitem em uma energia mais baixa do que aquela que foram excitadas [53]. É um método não invasivo e não ionizante para diagnóstico de tecidos por imagem, principalmente de animais pequenos [54].

A fluorescência na região do visível é aceitável para cortes de tecidos finos (menores que 1 cm). A profundidade de penetração de luz depende do tipo de tecido que se deseja analisar, como a pele e o músculo que são mais transparentes do que órgãos mais vascularizados por causa da absorção pela hemoglobina [55].

Corantes que emitem no NIR podem ser incorporados nas nanopartículas, tais como polimetinas (Cy5.5, Cy7), verde de indocianina (ICG), Alexa Fluor 750, e IRDye78, entre outros. A vantagem seria de que em uma única nanopartícula pode encapsular milhares de moléculas de corante em sua superfície, proporcionando mais clareza e estabilidade na análise [53].

Em destaque, a cianina é o nome da família de corantes sintéticos que apresentam grupos de polimetina. As cianinas são corantes pertencentes à classe do grupo de polimetinas, utilizadas como sondas fluorescentes, principalmente na área biomédica. Sua estrutura, em geral, é composta por um número ímpar de grupos metina (CH) ligados de forma alternada por ligações simples e duplas. Dependendo da estrutura, as cianinas apresentam um espectro eletromagnético com bandas de absorção combinado nas regiões do ultravioleta e infravermelho [56].

Uma das cianinas que pode ser utilizada em estudos como marcador biológico é o corante Cy5.5, com absorções num comprimento de onda em torno de 675 nm [57-59]. O corante possui um grupo reativo em cada molécula de Cy5.5 para

a rotulagem exata de grupos amina. Normalmente, o Cy5.5 é usado para alvo e rotulagem específica de resíduos de amina em anticorpos, peptídeos, entre outros [60].

3.5. Nanopartículas Magnéticas em Aplicações Biomédicas

Nos últimos anos, o uso de sistemas compostos por nanopartículas de óxido de ferro foram descritos em diversas aplicações. Alguns exemplos, que abrangem diferentes áreas de pesquisa em nanomateriais magnéticos [61-65]. Essas aplicações tecnológicas incluem catálise [66, 67], vedantes magnéticos [68] e tintas [69], armazenamento de dados e mitigação de impacto ambiental [24]. As aplicações mais comuns nas áreas de biotecnologia e medicina envolvem marcação celular, hipertermia, carregamento de fármacos [13] e agentes de contraste para imagens biomédicas [70-74].

Os diagnósticos clínicos e de investigação biomédica empregam uma série de técnicas de imagem *in vivo* e *in vitro*, incluindo microscopia confocal [75], imagem por ressonância magnética (MRI) [76], raio-X (XR) [75], tomografia computadorizada (CT) [77], tomografia por emissão de pósitrons (PET) [77], tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) [77] e ultra-som. Cada uma dessas técnicas possui pontos fortes e fracos de resolução espacial, temporal e limites de sensibilidade, proporcionando informações complementares entre si [78].

O uso de nanopartículas de óxido de ferro nas áreas biomédicas pode ser classificado em duas categorias amplas. Para aplicações *in vitro*, o uso principal é a separação e rotulagem de biomoléculas, tais como proteínas, células, DNA/RNA, microrganismos. Para usos *in vivo*, destaca-se seu uso como agente de contraste em diagnósticos por imagem, como em MRI, e para terapias como entrega de drogas e hipertermia no tratamento de câncer [4, 7, 8, 9, 36].

O método por separação magnética pode ser utilizado de modo rápido e simples para a captura de proteínas específicas ou outras biomoléculas. A maioria das partículas utilizadas atualmente são superparamagnéticas, o que significa que podem ser magnetizadas por um campo magnético externo e imediatamente re-

dispersas quando o imã é removido. A separação magnética tem várias vantagens em comparação com os processos de separação tradicional. Este processo é muito simples e todos os passos de purificação podem ser realizados em um arranjo simples, sem nenhum sistema mais sofisticado de purificação [9, 30].

Outra aplicação interessante das nanopartículas magnéticas é seu uso para tratamento de câncer por hipertermia, que é considerado como um tratamento suplementar a quimioterapia, a radioterapia ou cirurgia. A ideia de utilizar a magnetohipertermia está no fato de que quando as nanopartículas magnéticas são expostas a um campo magnético variável, normalmente gerado por bobinas de radiofrequência, o calor é gerado pela agitação magnética das nanopartículas. Num campo magnético alternado, as correntes induzidas por materiais metálicos geram calor destruindo as células tumorais. As células patológicas são mais sensíveis a temperaturas do que as células saudáveis [24].

Uma das maiores aplicações das nanopartículas magnéticas é como transportadores de fármacos (*drug delivery*). O conceito geral é ligar as nanopartículas a moléculas de fármaco e orientá-las a um local biológico escolhido através de gradientes de campos magnéticos localizados, mantendo-as neste local até que a terapia esteja completa. Em seguida, é preciso remover o campo magnético aplicado para que as nanopartículas sejam eliminada do corpo [24]. Os transportadores magnéticos de fármacos têm o potencial para produzir uma elevada concentração local, diminuindo a toxicidade e outros efeitos colaterais adversos resultantes da administração de doses elevadas de drogas em outras partes do organismo.

Após a administração, as nanopartículas com diâmetros superiores a 200 nm, são facilmente isoladas pelo baço e removidas por fagócitos, resultando numa redução do tempo de circulação no sangue. Por outro lado, as partículas com diâmetros inferiores a 10 nm são rapidamente removidas pelos rins. As partículas com um diâmetro que variam de 10 a 100 nm, são eficazes para a injeção intravenosa e possuem um maior tempo de circulação na corrente sanguínea. Essas partículas são suficientemente pequenas para evitar a eliminação pelo sistema reticuloendotelial (RES) do corpo [9, 24].

3.6. Princípio Básico de Imagens por Ressonância Magnética

Na medicina, a ressonância magnética nuclear é usada para produzir imagens anatômicas de órgãos e também fornecer informações sobre o estado físico dos tecidos, sua vascularização e, em alguns casos, sua função. Os principais átomos que compõem o tecido humano são o hidrogênio, oxigênio, carbono, nitrogênio, fósforo, cálcio. Não obstante, nem todos estes núcleos apresentam propriedades que permitam seu uso em MRI. Utiliza-se o hidrogênio por ter o maior momento magnético nuclear e ser um elemento químico abundante no corpo humano [79, 80].

O imageamento por ressonância magnética nuclear baseia-se na interação entre o momento magnético de prótons de água e/ou gordura com campos de radiofrequência em presença de um campo magnético externo (1-3 T) [81, 79]. Os momentos magnéticos nucleares não possuem uma orientação espacial bem definida, distribuindo-se de forma aleatória nos tecidos do corpo humano, sendo a magnetização resultante, num certo volume de tecido, praticamente igual a zero.

Ao aplicar um campo magnético externo num tecido humano, os prótons de hidrogênio irão orientar-se de acordo com direção do campo externo. Os *spins* podem orientar-se tanto paralelamente (baixa energia) como antiparalelamente (maior energia). Estas duas orientações representam os níveis de energias que estes prótons podem ocupar. A diferença entre as disposições dos estados antiparalelos em relação aos estados paralelos são baixas, e apenas uma pequena parcela de *spins* remanescentes irão reproduzir uma magnetização nuclear líquida M_z não nula na direção do campo B_0 [80, 81].

Devido ao campo B_0 , os prótons de hidrogênio também precessionam numa frequência característica (ω_0), determinada pela equação de Larmor.

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \tag{3.8}$$

Onde γ é a razão giromagnética. A razão giromagnética para os prótons de hidrogênio é igual $\gamma = 2,67 \times 10^8 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$, de modo que em um campo estacionário

(B_0) de 1,0 T, a frequência de precessão de Larmor será de 42,54 MHz [7]. O movimento de precessão dos prótons de hidrogênio ocorre em torno do eixo z, chamado de eixo longitudinal que é dado pela direção do campo magnético aplicado (B_0). O plano xy é chamado de plano transversal. Os *spins* remanescentes dos cancelamentos formam uma componente de magnetização residual (M_0), descrita na Figura 3.10A, que surge alinhada ao eixo z.

Os momentos magnéticos individuais precessionam no plano transversal sem ter coerência de fase entre eles, portanto a M_x e M_y são iguais a zero, não havendo magnetização no plano xy (Figura 3.10A). Um segundo campo magnético (B_1) de curta duração pode ser aplicado para reorientar o vetor de magnetização. Este campo B_1 é um pulso de radiofrequência e tipicamente é perpendicular ao B_0 (Figura 3.10 B). Um dos pulsos mais utilizado é o que resulta num desvio de 90° , do vetor M_0 para o plano xy [81]

Ao aplicar um pulso de radiofrequência ressonante com a transição de *spin*, os prótons de hidrogênio mudam seu nível de *spin*. A partir do instante em que o pulso de RF é desligado, o sistema excitado dos *spins* relaxa e volta ao seu estado de equilíbrio reemitindo a radiofrequência que é captada através de correntes induzidas em bobinas receptoras no equipamento. O processo através do qual os *spins* dos prótons voltam para o seu estado original, é referido como relaxação [25, 80].

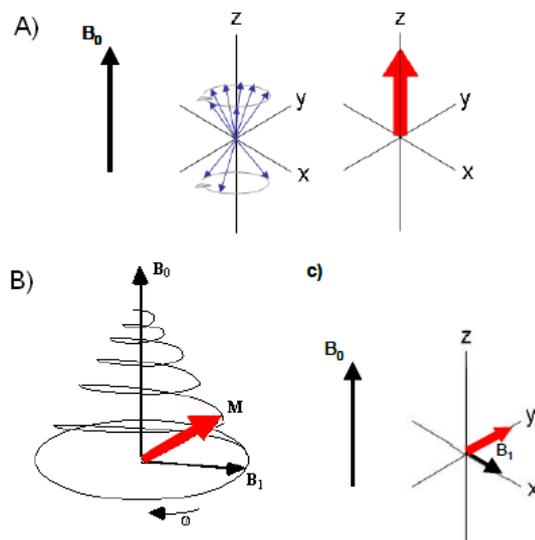


Figura 3.10. Conjunto de prótons com momento magnético líquido na presença de um campo magnético externo B_0 . Momento magnético precessionando em torno do B_0 , na frequência característica Larmor (ω_0). (A) e um segundo campo externo aplicado a 90° perpendicular ao B_0 , oscilando no eixo M_{xy} (ω_0) (B) [adaptado de 82].

O efeito de relaxação dos *spins* é devido a trocas de energia entre *spins* e entre os *spins* e suas vizinhanças (rede), fazendo com que o vetor de magnetização volte a orientar-se paralelamente ao B_0 (equilíbrio). Estes processos de relaxação são caracterizados por duas componentes, o tempo de relaxação T1 e tempo de relaxação T2.

Se um pulso de 90° na frequência de Larmor (ω_0) é aplicado em uma amostra, o M_0 irá rotar no plano xy e M_z será zero (Figura 3.10 B). Com o passar do tempo, a M_z irá se recuperar pelo retorno dos *spins* ao seu estado fundamental. Esta recuperação segue em processo exponencial com uma constante de tempo (T1), sendo uma medida da rapidez do acoplamento dipolar dos momentos de prótons para o meio envolvente descrito na Equação 3.9 [80, 81].

$$M_z = M_0(1 - e^{-t/T1}) \quad (3.9)$$

O tempo T2 é o tempo de relaxação transversal ou o tempo de redução (decaimento) da magnetização no plano perpendicular (spin-spin). Se um pulso de 90° é aplicado à amostra, M_0 irá rotar para o plano xy. Os momentos magnéticos individuais dos *spins* terão coerência de fase no plano transversal no final do pulso aplicado. Com o tempo, esta coerência de fase desaparece devido as suas interações magnéticas com outros prótons nos tecidos e o valor de magnetização no plano xy diminui à zero. A relaxação no plano xy é relativamente rápida, e é descrita de acordo com a Equação 3.10 [81, 80].

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{-t/T2} \quad (3.10)$$

Como o sinal de MRI é proporcional a M_{xy} , a relaxação T2 modula o decaimento do sinal.

Existem duas possíveis causas para a perda de coerência no plano xy . A primeira seria a interação spin-spin devido seus campos magnéticos intrínsecos e a segunda seria devido a não homogeneidade do campo local, aumentando mais a relaxação no plano transversal e acelerando o decaimento do sinal [80]. Devido a esse segundo processo, foi definida outra constante de tempo, denominada $T2^*$, a qual descreve um tempo de relaxação menor, seguindo a Equação 3.11:

$$\frac{1}{T2^*} = \frac{1}{T2} + \gamma\Delta B_0 \quad (3.11)$$

Onde $\gamma\Delta B_0$ representa a taxa de decaimento do sinal devido a não uniformidades do campo. De modo a compensar o decaimento do sinal devido as não-uniformidades de campo, foi introduzida a sequência de pulsos *spin eco* [8, 80].

A sequência *spin eco* consiste na aplicação de um pulso de 90° de excitação, seguido de um pulso de 180° em um tempo igual a $TE/2$. Este pulso faz rotar a magnetização de 180° em torno do eixo x' , compensando a perda de coerência devido as não-uniformidades. Uma das vantagens da utilização de uma sequência de *spin eco* é que introduz a dependência $T2$ para a intensidade de sinal, e não em $T2^*$ [79-81].

Para formar a imagem real de um paciente, é necessário aplicar um pulso de gradientes magnéticos, gerando pequenas perturbações sobrepostas ao campo magnético principal. Na presença deste gradiente de campo, cada próton ressona numa frequência única e depende da sua posição no interior do campo de gradiente [80, 81].

O contraste de imagem surge das variações locais de relaxação, influenciadas por $T1$ e $T2$, e também pelos parâmetros de aquisição TE e TR ajustados na máquina durante a aquisição. O tempo de relaxação intrínseca da água no tecido depende do ambiente fisiológico. O contraste por MRI em diferentes tecidos pode ser modificado por agentes de contraste que encurtam o tempo de relaxação longitudinal e transversal. Esta capacidade de alterar os tempos $T1$ e $T2$ é

frequentemente usada para aumentar a sensibilidade e especificidade de detecção de certas patologias [38].

A medida usada para definir a eficácia do agente de contraste é dada pela mudança na taxa de relaxação dos prótons na água, denominado de relaxividade [81]. Quantitativamente é representada pelas Equações 3.12 e 3.13.

$$r1 = \frac{1}{\Delta T1 [M]} \quad (3.12)$$

$$r2 = \frac{1}{\Delta T2 [M]} \quad (3.13)$$

Onde a M é a concentração molar do agente de contraste, em molL⁻¹. A relaxividade transversal (r2) é significativamente maior do que r1 para as nanopartículas magnéticas. Este fato é importante, pois quanto maior o valor da relaxividade, menor o número de nanopartículas necessárias para produzir um sinal detectável e, conseqüentemente, uma menor dose do fármaco seria administrada ao paciente [82].

3.6.1. Nanopartículas como Agentes de Contraste em MRI

Os agentes de contraste para MRI são substâncias químicas (fármacos) administradas em pacientes que podem localizar-se em regiões anatômicas, a fim de melhorar a visibilidade das estruturas internas do corpo, diferenciando os tecidos saudáveis dos não saudáveis. Os agentes de contraste alteram os tempos de relaxação local dos átomos dentro dos tecidos após a administração oral ou intravenosa. O mecanismo de contraste pode ser afetado por vários fatores, como a densidade de prótons e sequências de pulsos de ressonância magnética. Com base no processo de relaxação, os agentes de contraste podem ser classificados como agentes de contraste T1 e T2 [83-85].

A presença das nanopartículas magnéticas em órgãos ou tecidos cria um campo magnético adicional, que induz a não homogeneidade dos campos locais que

aumentam significativamente a velocidade de relaxação transversal de prótons (diminuição de T2) [7, 12]. As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, portanto, tendem a reduzir a intensidade de sinal, ou seja, escurecer a região aonde se encontram. Como resultado, estas nanopartículas são referidas como agentes de contraste negativos [22].

Dentre os diversos agentes de contraste nanoparticulados, dois agentes de contraste já foram clinicamente aprovados, o Feridex[®] e Resovist[®], mencionados na Tabela 3.2. Ambos estão especificamente aprovados para exames de MRI do fígado. De acordo com os estudos realizados por Wang [86], a diferença entre ambos os contrastes, seria que o fármaco Resovist[®] pode ser administrado de forma mais rápida por vias intravenosas e pode ser usado com imagem dinâmica, enquanto que o Feridex[®] deve ser administrado por infusão lenta e é usado exclusivamente em imagiologia de fase tardia. No fígado, estas partículas são sequestradas (fagocitadas) por células *Kupffer* no sistema reticuloendotelial (RES), mas não são retidas nas lesões deficientes de células de *Kupffer*. Consequentemente existem diferenças significativas nos tempos de relaxação T2/T2* entre o tecido normal e o tecido doente, resultando num aumento na visualização ou detecção da lesão [86].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo é destinado à descrição dos materiais, equipamentos, procedimentos e análises realizadas no desenvolvimento deste trabalho.

4.1. Reagentes Utilizados

Os reagentes utilizados nos procedimentos laboratoriais estão listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Reagentes utilizados nos procedimentos experimentais.

Reagentes	Fórmula Molecular	Procedência
Ácido Clorídrico	HCl	Merck
Água de Purificada	H ₂ O	Sistema Milli-Q
Álcool Etílico 70%	CH ₃ CH ₂ OH	Merck
Álcool Isopropílico	CH ₃ CHOCH ₃	F. MAIA
Brometo de Potássio	KBr	Merck
Citrato de Sódio	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	Merck
Cloreto de Ferro II Tetraidratado	FeCl ₂ ·4H ₂ O	Merck
Cloreto de Ferro III Hexaidratado	FeCl ₃ ·6H ₂ O	Merck
Cloreto de Sódio	NaCl	Nuclear
Cy5.5 NHS Ester	C ₄₄ H ₄₆ ClN ₃ O ₄	G&E
Dextran T10	H(C ₆ H ₁₀ O ₅) _x OH	Pharmacosmos
Epícloridrina	C ₃ H ₅ ClO	Sigma-Aldrich
Hidróxido de Amônio 25%	NH ₄ OH	Merck
Hidróxido de Sódio	NaOH	Merck
Peróxido de Hidrogênio	H ₂ O ₂	Merck

4.2. Síntese das Nanopartículas pelo Método de Coprecipitação

As sínteses das nanopartículas de óxido de ferro tipo CLIO foram realizadas pelo método de coprecipitação de sais de ferro em meio básico, baseado nas referências [87, 88]. Este método de síntese é denominado de processo de gelificação a frio. O processo é realizado por uma solução ácida do polímero e sais de ferro hidratado resfriados a temperaturas entre 0-5 °C. A mistura é neutralizada pela adição de base gelada, na mesma faixa de temperatura, produzindo um gel fracamente magnético. Essa mistura, ao ser aquecida entre 60-80°C, produz um colóide homogêneo magnético. Quando se utiliza o dextran neste processo, a superfície do óxido de ferro torna-se revestida numa maneira que estende o tempo de vida no plasma sanguíneo, um critério importante para o seu uso em agentes de contraste para MRI. Variações nos parâmetros de síntese, tais como a quantidade estequiométrica de polissacarídeo em relação à quantidade de sais de óxido de ferro, a temperatura e ao tempo de reação podem influenciar na distribuição de tamanho das nanopartículas [88].

O processo da síntese foi realizado seguindo o esquema representado nas figuras 4.1 e 4.2. Iniciou-se pela dissolução do dextran em meio aquoso. Após, adicionou-se a solução no reator (balão de 3 bocas), em banho de gelo e agitação magnética por alguns minutos. Adicionou-se os sais de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2:1 de $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$), descritos na Tabela 4.2, ao reator, deixando em agitação magnética cerca de 30 minutos, em atmosfera de N_2 , ainda em banho de gelo. Adicionou-se à mistura o NH_4OH gelado e logo, em seguida, a mistura foi aquecida em temperaturas que variaram entre, aproximadamente, 60-82°C, por 1-1h15min.

Após este período, colocou-se a solução de nanopartículas na centrífuga por 30 minutos, a 3400 rpm em tubos *Amicon* (Millipore, 50k MWCO), para a remoção de dextran ainda remanescente. A cada centrifugação, lavou-se a solução com água deionizada obtida em sistema Milli-Q. Colocou-se a solução de nanopartícula em outro reator, e adicionou-se uma solução concentrada de NaOH, sob agitação magnética por 15 minutos e, logo depois, adicionou-se epicloridrina, sob agitação magnética por mais 12h. Após esta etapa, adicionou-se NH_4OH , novamente sob agitação magnética por mais 24h, para efetuar o processo de aminação. No dia

seguinte, a solução foi colocada em membranas de diálise (Spectra/Por[®]) submersas em água deionizada e sob agitação magnética, como mostrado na Figura 4.2B. A cada 30 minutos de agitação, trocou-se a água do recipiente. Este procedimento foi repetido até a minimização do cheiro de amônia. Na última etapa, centrifugou-se a solução de nanopartículas em tubos *Amicon* (50k MWCO) durante 15 minutos, a 2400 rpm, até eliminar o máximo do centrifugado remanescente para concentrar a solução.

Após este procedimento, adicionou-se a solução tampão de citrato de sódio/cloreto de sódio, pH entre 8-8,3. A solução das nanopartículas CLIO-NH₂ finalizada foi acondicionada em geladeira, a 4°C em tubos *Falcon*.

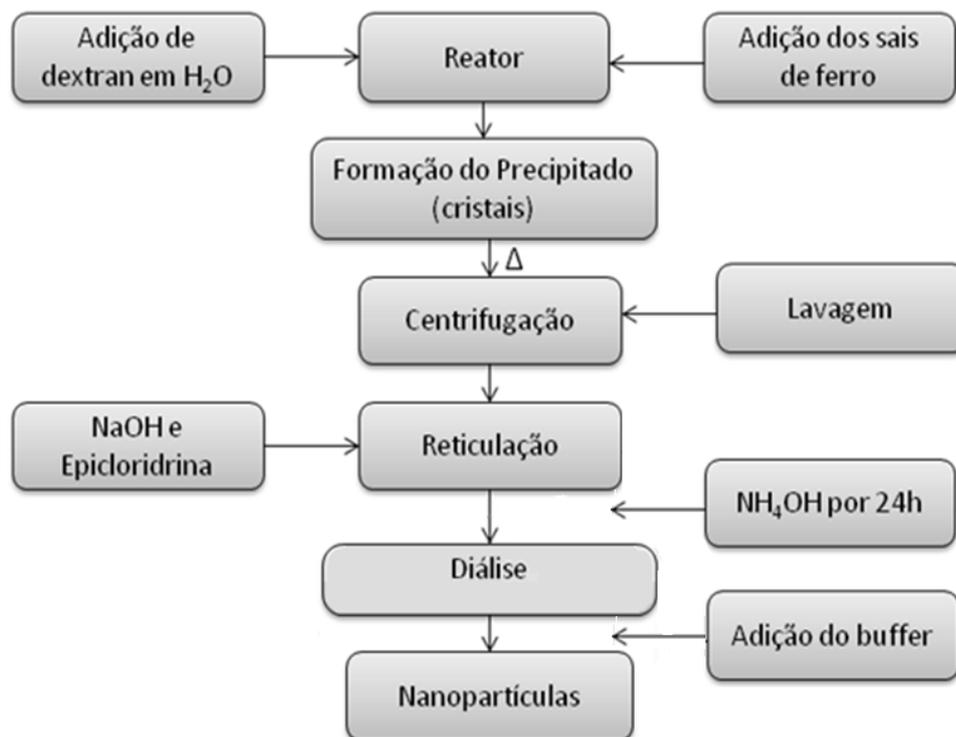


Figura 4.1. Fluxograma resumido da síntese das nanopartículas pelo método de coprecipitação.

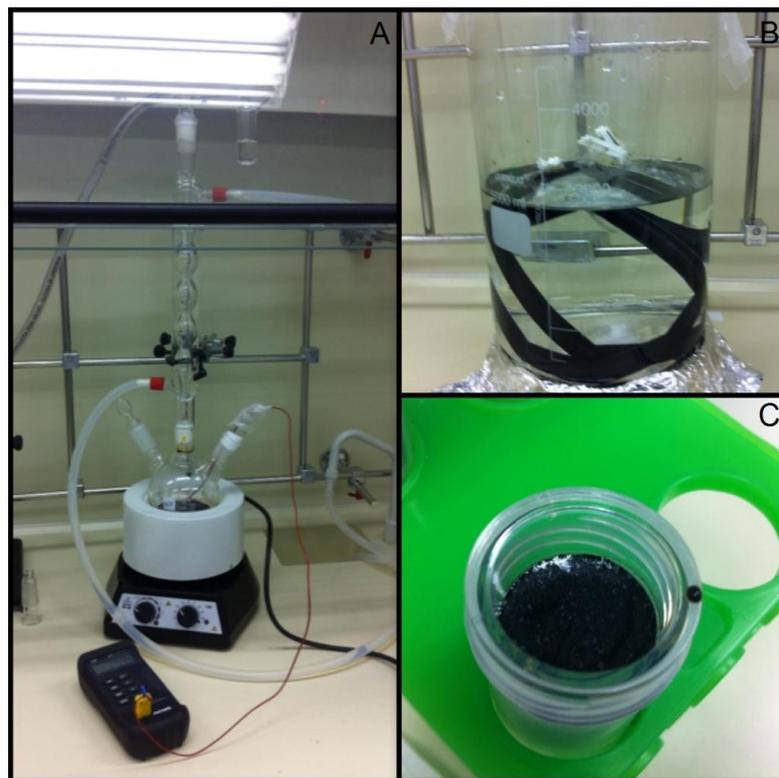


Figura 4.2. Imagem das principais etapas da síntese nanopartículas pelo método de coprecipitação. Reator (A), etapa de diálise (B), solução final de nanopartícula em tubo *Amicon* (C).

Diversas sínteses foram realizadas com pequenas variações nos parâmetros de reação. As sínteses foram rotuladas com os códigos S4, S5, S6, S7, S8, S9 e S10. A Tabela 4.2 ilustra as variações realizadas.

- Para as sínteses S4, S5 e S6, a massa de dextran e de sais de ferro adicionadas foram iguais, porém na S5 a temperatura usada foi menor. A síntese S6 foi sintetizada nas mesmas condições da S4 para averiguar a reprodutibilidade do processo.
- Para a síntese S7 foi avaliado a influência do tempo de reação na formação das nanopartículas, variando os tempos em 1, 2 e 3 horas.
- Para a síntese S8, a massa de dextran adicionada foi a metade da massa usada nas sínteses S4, S5 e S6, porém com a mesma massa de sais de ferro.

- Para a síntese S9, a massa de dextran adicionada foi a metade da massa usada na síntese S8 e também com a mesma massa de sais de ferro.
- Para a síntese S10 a massa de dextran adicionada foi a mesma utilizada na síntese S9, porém com o dobro da massa de sais de ferro.

Tabela 4.2. Resumo dos parâmetros utilizados no processo de síntese.

Sínteses	Dextran (mmol)	Fe ⁺³ (mmol)	Fe ⁺² (mmol)	Temperatura de reação (°C)
S4	0,9	2,4	2	82-80
S5	0,9	2,4	2	65-60
S6	0,9	2,4	2	80
S7	0,9	2,4	2	82
S8	0,45	2,4	2	75
S9	0,2	2,4	2	78
S10	0,2	4,8	4	80

4.2.1. Incorporação do Corante Cy5.5 nas nanopartículas

A amostra foi preparada a partir de 1 mL de solução estoque da nanopartícula com a adição de bicarbonato de sódio, em pH 9. Esta mistura foi adicionada no próprio recipiente do corante. Após 7h de constante agitação, a solução foi filtrada numa coluna de separação em gel (Sephadex™ G-25M). As nanopartículas conjugadas com Cy5.5 foram mantidas a 4°C, com vedação do frasco com papel alumínio até a sua utilização.

4.3. Técnicas de Caracterização

Foram utilizadas diferentes técnicas de caracterização para investigar a morfologia, a distribuição do tamanho de partícula, as propriedades de magnetização, a concentração elementar, a viabilidade celular e os tempos de relaxação magnética nuclear. A teoria destas técnicas e os respectivos equipamentos serão descritos de uma maneira geral nos itens a seguir.

4.3.1. Espectrofotometria Ultravioleta-visível (UV-vis)

A faixa do espectro eletromagnético chamada de região ultravioleta e visível (UV-vis) abrange comprimentos de onda de aproximadamente 100 a 800 nm [89, 90]. Quando a radiação contínua passa através de um material, uma parte desta radiação pode ser absorvida, formando um espectro com picos ou bandas características, chamado de espectro de absorção [89].

Na espectroscopia UV-vis, as transições que resultam na absorção de radiação eletromagnética são transições eletrovibrorotacionais. Quando moléculas absorvem energia, os elétrons são removidos de um orbital ocupado para um orbital desocupado. Normalmente, a transição é do orbital molecular ocupado de energia mais alta (do inglês, *HOMO*) para o orbital desocupado de menor energia (do inglês, *LUMO*). A absorbância da amostra no regime linear é dada lei de Lambert-Beer:

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (4.1)$$

Onde A é a absorbância, I_0 é a intensidade da luz incidente, I é a intensidade da luz transmitida, c a concentração molar, l é o caminho óptico (espessura da cubeta, amostrador) e ϵ é a absorvidade molar [89, 90].

Um espectrofotômetro UV-vis consiste de uma fonte de luz, um monocromador e um detector. A fonte de luz normalmente é uma lâmpada de deutério, que emite luz na região ultravioleta, e uma segunda lâmpada de tungstênio, que emite na região do visível. O monocromador é uma grade de difração, dispersando o feixe de luz nos comprimentos de onda de seus componentes. O sistema de fendas direciona na cubeta o comprimento de onda desejável para a amostra. A luz que passa pela cubeta atinge o detector, que grava a intensidade de luz transmitida (I) em relação ao valor de referência (I_0) [86].

Para obter as medidas de concentração de ferro total no UV-vis, utilizou-se cubetas de plástico descartáveis, com caminho óptico (l) de 10 mm. Foi preparado uma solução estoque do padrão de ferro e, a partir deste padrão, nove

concentrações diferentes foram preparadas para a curva de calibração, variando de 0,1 a 10 mg/mL. Para cada cubeta, adicionou-se 10 μL de cada solução padrão, mais 10 μL de H_2O_2 e 980 μL de HCl 6 molL^{-1} . Para a leitura no espectrofotômetro, utilizou-se um comprimento de onda $\lambda=410$ nm. Realizou-se a curva de calibração com os valores de absorbâncias adquiridos, relacionando com as respectivas concentrações. Para a leitura de cada amostra, fez-se o mesmo preparo realizado nos padrões.

Para as medidas de visualização do fluoróforo presente nas nanopartículas utilizou-se cubetas de vidro, com caminho óptico de 10 mm. Foi realizada uma diluição de 50 vezes em água milli-Q da mesma amostra de nanopartícula com e sem a adição do fluoróforo e feito a leitura no espectrofotômetro em varredura de 190-1100 nm. As medidas de absorção foram obtidas no espectrofotômetro UV-Vis modelo Lambda 35, fabricado pela Perkin Elmer.

4.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão TEM, (do inglês *transmission electron microscopy*) é uma técnica de alta resolução espacial e capacidade de fornecer tanto informações de imagem morfológica, como de difração de uma amostra [91, 92].

A amostra é irradiada por um feixe de elétrons com uma densidade de corrente uniforme [91]. A energia do feixe é suficiente para que os elétrons incidentes passem através da amostra. Os elétrons interagem fortemente com átomos por espalhamento elástico e inelástico [91, 92]. Outros elétrons podem ser difratados por um conjunto de planos cristalográficos (seguindo a lei de Bragg), onde lentes eletromagnéticas ampliam o sinal transmitido dos elétrons [91, 93]. A imagem é formada pela detecção de elétrons transmitidos pela amostra, fornecendo informações detalhadas da estrutura interna. Espalhamento elástico é causado pela interação com núcleos atômicos e resulta de desvios angulares na direção de incidência. Quando os elétrons penetram na amostra, difundem-se diferentemente da direção original do feixe e isso depende da tensão de aceleração e do número atômico da amostra. Para amostras de baixo número atômico, o espalhamento é

menor. Quando a amostra é cristalina, o espalhamento ocorre regularmente, produzindo em ângulos definidos em relação ao feixe incidente. O espalhamento inelástico ocorre pela interação com os elétrons orbitais da amostra absorvendo os elétrons incidentes e transformando a energia cinética em calor e uma pequena parte escapa sob a forma de raios-X e elétrons secundários e Auger [92].

O feixe de elétrons é suficientemente energético para ionizar camadas profundas dos átomos e produzir também a emissão de raios-X, por isso a espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS, *energy-dispersive X-ray spectroscopy*) pode ser acoplada junto ao TEM. A técnica de EDS é em geral semi-quantitativa e é usada para obter uma informação global relativa da composição elementar dos materiais [94].

O TEM consiste em uma fonte emissora de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas que controlam o feixe emitido, bobinas eletromagnéticas de deflexão e aberturas ao longo do caminho do feixe incidente, encerrados em uma coluna a vácuo. A imagem é projetada em uma tela fluorescente e redirecionada a uma placa fotográfica de registro ou um sistema computadorizado [92].

A preparação das amostras de TEM foi realizada a partir da solução estoque das nanopartículas. As amostras foram ultrassonificadas (40 kHz) por 10 minutos e agitadas em vortex. Para as amostras das sínteses S6, S7, S8 e S9, foram realizadas diluições de 3000 vezes em água deionizada, e, posteriormente, colocada por mais 10 minutos no ultrassom. Para a síntese S4 um pequeno pedaço da amostra liofilizada foi diluída 1,5 mL de acetona e ultrassonificada por 10 minutos.

As nanopartículas possuem comportamento magnético e o equipamento de TEM possui lentes magnéticas, podendo ocasionar contaminações ao equipamento. Uma metodologia foi estudada juntamente ao Centro de Microscopia da UFRGS, onde uma gota de cada amostra foi depositada em um suporte, *grid* (*Carbon Film, 200 mesh*) e, posteriormente, realizado uma deposição de um filme de carbono na camada em que as nanopartículas estão dispostas no *grid*, formando um “sanduíche”, evitando assim a possibilidade das nanopartículas serem atraídas pelas lentes magnéticas. Antes das amostras serem analisadas no TEM, todas foram

analisadas previamente analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), para averiguar a distribuição da gota adicionada em cada *grid*, bem como a deposição da camada de carbono.

As microscopias foram obtidas num JEM-2010 de 200 kV, da JEOL, localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS e as micrografias de MEV no EVO LS150, da ZEISS, localizado no Instituto Tecnológico em Ensaios e Segurança Funcional, na Unisinos.

4.3.3. Espectrometria de Retroespalhamento de Rutherford (RBS)

O método de análise por espectrometria de retroespalhamento de Rutherford (RBS, do inglês *Rutherford backscattering spectrometry*) é um dos métodos de análise de materiais por feixes iônicos [92, 95]. O princípio básico do RBS consiste no fenômeno que ocorre quando se incide um feixe monoenergético de partículas alfa, geralmente hélio com energias na ordem de MeV, na superfície de um material (amostra). A maior parte destas partículas pode atravessar a amostra, se tiver uma espessura mais fina, ou acomodar-se no interior da amostra, se tiver uma espessura maior. Uma pequena parte das partículas incidentes choca-se com os núcleos dos átomos que compõe o material da amostra, sendo retroespalhadas em diferentes ângulos. Um detector capaz de contar o número de eventos associados a estas partículas é utilizado para obter um sinal elétrico proporcional à energia do íon retroespalhado, gerando um espectro de contagens de íons em diferentes faixas de energias, que correspondem ao número de canal do analisador [92, 95].

A energia do íon incidente possui um valor fixo de energia, em geral próximo a 1-2 MeV, para que não haja reações adversas e a colisão seja de forma elástica. O íon incidente durante o choque com a amostra transfere parte de sua energia inicial (E_0) para os átomos presente na amostra. A energia (E_1) restante corresponderá a uma fração de E_0 dada pelo fator cinemático (K) [97].

$$E_1 = K \cdot E_0 \quad (4.2)$$

O fator cinemático é dependente da massa dos átomos presentes na amostra (M_2), da massa do íon incidente (M_1) e do ângulo (θ) do detector em relação ao feixe incidente. Como o ângulo de espalhamento e a massa do íon incidente são fixos, a energia de uma partícula retroespalhada é diretamente vinculada à massa do átomo presente na amostra, enquanto que o número de partículas retroespalhadas é proporcional à concentração por unidade de área daquele átomo no material [97].

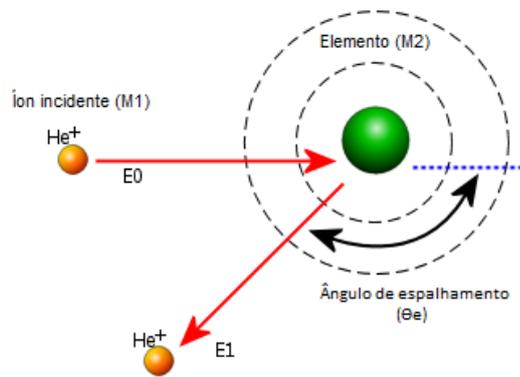


Figura 4.3. Representação de um evento de retroespalhamento entre dois átomos [adaptado de 96].

A probabilidade de retroespalhamento é proporcional ao número atômico (Z^2) e elementos pesados têm limites de detecção muito melhores que 10-100 ppm. Por outro lado, como a energia da partícula incidente diminui à medida que a mesma se propaga no material é possível associar também a posição em profundidade do átomo espalhador. Os átomos do feixe retroespalhado presentes na superfície da amostra adquirem uma energia kE_0 . Os átomos do feixe retroespalhado ao percorrer o caminho numa dada espessura X de profundidade na amostra, perdem energia no percurso dentro da amostra e ao sair chega à superfície com uma energia igual a E_1 , de acordo com a Equação 4.3. Para amostras suficientemente finas, a diferença de energia de entrada (ΔE_{in}) e saída (ΔE_{out}) em relação ao percurso percorrido dentro da amostra pode ser calculada por um fator de proporcionalidade que mostra a perda de energia dos íons incidente dentro da amostra.

$$\Delta E = (E_0 - \Delta E_{in})K - \Delta E_{out} \quad (4.3)$$

Para distâncias maiores, o dE/dX pode variar com a espessura, tornando o cálculo mais complexo, mas ainda factível. Esta relação permite, em princípio, gerar um perfil da concentração do elemento em função da profundidade [92, 95, 97].

Para as medidas por RBS, as amostras foram preparadas a partir da solução concentrada das nanopartículas e depositadas em um substrato. Para todas as preparações, as amostras de nanopartículas concentradas foram sempre ultrassonificadas (40 kHz) por 10 minutos e agitadas em vortex. Uma curva de calibração do detector foi realizada com uma amostra de ouro e quatro diferentes energias (1600, 1800, 2000, 2200 keV).

Diferentes maneiras de preparação das amostras foram realizadas para a formação de uma camada de nanopartículas no substrato. O preparo de amostras foi realizado variando alguns parâmetros:

- Quanto ao modo de deposição da amostra no substrato foram aplicados três métodos: *spin coating*, *rinsing* (gotejamento seguido de lavagem), gotejamento com secagem natural;
- Tipo de solvente: água, dimetilformamida (DMF) e isopropanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$);
- Diferentes tipos de substratos: Si e SiO_2 .

As amostras foram analisadas com feixe de He^{+2} com 2,2 MeV, com ângulo de detecção de 165° em relação a direção do feixe incidente, em um acelerador eletrostático Tandetron de 3 MV do Laboratório de Implantação Iônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.3.4. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering* ou DLS) é utilizada para a determinação do diâmetro hidrodinâmico (D_H) de partículas com tamanhos que podem variar de 0,6-6 μm , partindo da ideia de que partículas em suspensão movem-se aleatoriamente no meio [98]. As partículas menores movem-se mais rapidamente do que partículas grandes se a temperatura é a mesma, tendo um coeficiente de difusão (D) maior [82]. Quando o laser, que possui uma frequência característica, incide numa amostra, a luz é espalhada numa frequência diferente. As partículas são dispersas em um meio líquido e movem-se aleatoriamente pelo movimento Browniano, devido a isto a intensidade da luz espalhada pelas partículas flutua ao longo do tempo e a intensidade da luz que atinge o detector irá flutuar com o movimento das partículas. Como partículas menores possuem velocidades médias maiores do que as partículas maiores é possível com esta diferença obter um histograma de distribuição de tamanhos [99, 100].

Os dados que são medidos no DLS geram uma curva de correlação que contém a informação sobre a difusão de partículas no interior da amostra. Ao ajustar a curva de correlação para uma função exponencial, o coeficiente de difusão pode ser calculado. Com o coeficiente de difusão já conhecido, o diâmetro hidrodinâmico pode ser calculado utilizando uma variação da equação de Stokes-Einstein:

$$D_H = \frac{k.T}{f} = \frac{k.T}{3\pi.\eta.D} \quad (4.4)$$

Onde D_H é o diâmetro hidrodinâmico, k é a constante de Boltzmann, f é o coeficiente de fricção da partícula, η é a viscosidade do solvente, T é a temperatura absoluta e D é o coeficiente de difusão. Contudo, nota-se que uma partícula maior terá coeficiente de difusão menor do que uma partícula pequena e as flutuações irão ocorrer mais lentamente [99, 100].

A distribuição de tamanho das nanopartículas pode ser representada em função da distribuição de intensidade de espalhamento, do número de partículas ou do volume fracional das partículas em função do seu diâmetro [98, 100]. A

distribuição do número indica o número de partículas presentes na solução em diferentes faixas de tamanhos. A distribuição em termos de volume mostra o volume total de partículas presentes na solução e, assumindo que as partículas são esféricas, o volume é proporcional ao tamanho da partícula ao cubo. A intensidade descreve a quantidade de luz dispersa pelas partículas em diferentes faixas de tamanhos e, para partículas pequenas e esféricas, a intensidade é proporcional ao tamanho na sexta potência. Portanto, a aquisição dos dados nestas diferentes representações demonstra que a distribuição de intensidade enfatiza as partículas maiores na distribuição, ocasionando valores maiores de tamanho, enquanto que as distribuições em número enfatizam as partículas de menores dimensões. Quanto mais esférico for o formato da partícula, mais perto será o valor do diâmetro equivalente ao diâmetro hidrodinâmico medido.

Para análise de DLS, as amostras da solução estoque foram ultrassonificadas (40 kHz) por 10 minutos e agitadas em vortex. As nanopartículas foram diluídas 100 vezes em água milli-Q e acondicionadas em cubetas descartável de plástico. A análise foi realizada em um Zetasizer, modelo ZEN3600 da Malvern.

4.3.5. Potencial Zeta (PZ)

A maioria das soluções líquidas contém íons, devido a átomos carregados positivamente ou negativamente. Quando uma partícula suspensa em um meio líquido é carregada, as cargas presentes podem ser atraídas por cargas opostas para a superfície das partículas. A existência de uma carga líquida na superfície da partícula perturba a distribuição de íons ao redor da região interfacial, resultando num aumento da concentração de contra-íons perto da superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica ao redor de cada partícula, de acordo com a figura 4.4.

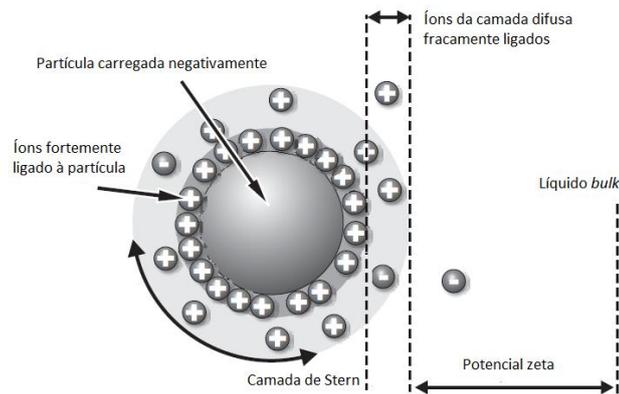


Figura 4.4. Diagrama representativo de uma partícula carregada em suspensão num meio de dispersão [99].

A camada líquida presente em volta das partículas possui duas regiões distintas: uma região interna (camada de Stern), na qual os íons são fortemente ligados, e uma camada exterior (camada difusa), região onde estão menos ligados. Dentro da camada difusa, há um limite teórico no interior do qual os íons e as partículas tornam-se estáveis. Quando uma partícula se move, partes dos íons dentro do limite se movem, mas existem íons além deste limite que não se movimentam com a partícula. Esta fronteira é chamada de superfície de cisalhamento hidrodinâmico e o potencial que existe neste limite é conhecido como potencial zeta (PZ).

A magnitude do potencial zeta dá uma indicação da estabilidade do sistema coloidal. Se todas as partículas em suspensão possuírem valor relativamente alto de potencial zeta, tanto negativo quanto positivo, terão a tendência de se repelir mutuamente, não gerando floculação/agregação. No entanto, se as partículas possuírem valores menores de potencial zeta, não haverá força para evitar que as partículas se unam, aglomerando-se. Geralmente, as suspensões são estáveis para valores mais positivos que +30 mV e mais negativos que -30 mV [99].

O potencial zeta é medido utilizando a técnica conhecida como espalhamento de luz eletroforético (ELS), na qual se mede a velocidade de uma partícula movimentando-se em um determinado líquido, quando um campo elétrico é aplicado. O valor da velocidade é convertido para o valor do potencial zeta da partícula. Estes valores são indicativos da estabilidade de sistemas e é determinado pela mobilidade eletroforética. A mobilidade eletroforética é obtida por ensaio de eletroforese sobre a

amostra e medição da velocidade das partículas usando a velocimetria de laser doppler (LDV) [99].

Para análise de PZ, as amostras da solução estoque foram ultrassonificadas (40 kHz) por 10 minutos e agitadas em vortex. As nanopartículas foram diluídas 100 vezes em água mili-Q e acondicionadas em uma célula capilar descartável. As análises foram realizadas em um Zetasizer, modelo ZEN3600 da Malvern.

4.3.6. Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A radiação infravermelha (IV) corresponde à região do espectro eletromagnético entre o visível e microonda, sendo a região entre $4000-400\text{ cm}^{-1}$ a mais utilizada para a identificação de compostos orgânicos [101]. A espectroscopia no infravermelho permite a identificação de grupos funcionais através da interação das moléculas/átomos com a radiação eletromagnética num processo de vibração molecular, envolvendo as transições vibrorotacionais das moléculas. A radiação no IV atravessa a amostra, e a radiação transmitida é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra, gerando um espectro de absorção. O processo de obtenção é quantizado, porém o espectro vibracional surge na forma de bandas, porque a cada mudança de nível de energia vibracional também envolvem mudanças de níveis de energia rotacional [101].

Um espectrômetro de grande sensibilidade é o espectrômetro com transformada de Fourier (FTIR), que emprega um interferômetro de *Michelson*, que divide o feixe da radiação da fonte de infravermelho de tal forma que se reflita simultaneamente a partir de um espelho em movimento e de um espelho fixo. Os feixes refletidos voltam a se combinar e passam através da amostra para o detector e são reproduzidos na forma de um gráfico de tempo contra a intensidade do sinal [89, 101].

A intensidade da banda é medida pela transmitância ou pela absorbância. A transmitância é definida pela razão entre a energia transmitida e a energia incidente na amostra analisada e a absorbância é o logaritmo recíproco da transmitância.

$$T = \frac{E_t}{E_i} \quad (3.17)$$

$$A = \log \frac{1}{T} \quad (3.18)$$

Onde T é a transmitância, E_t é a energia transmitida e E_i é a energia incidente [104].

Para a análise de FTIR, as amostras das nanopartículas foram inicialmente liofilizadas (*Thermo Fisher Scientific*, modelo micromodulic-115) para obtê-las na forma de pó. Foram confeccionadas pastilhas numa proporção de 10% de amostra para 90% de KBr, previamente seco em estufa por 2 horas.

As análises foram realizadas num FTIR Spectrum One da Perkim Elmer, em intervalo de 4000-400 cm^{-1} .

4.3.7. Magnetômetro de Gradiente de Força Alternada (AGFM)

O magnetômetro de gradiente de força alternada (do inglês, *Alternating Gradient Force Magnetometer*), é capaz de medir variações no momento magnético, através da medição da força executada por um momento magnético em meio de um gradiente de campo magnético. A técnica baseia-se na variação de fluxo de campo de uma bobina quando uma amostra magnetizada é vibrada na bobina. A amostra é posicionada verticalmente em uma das extremidades do amostrador (haste) ao longo do eixo z e o gradiente de campo é perpendicular ao eixo z (eixo x). Na outra extremidade do amostrador é fixada um piezoelétrico mantido dentro de uma caixa protetora [21, 102, 103].

O campo magnético alternado aplicado à amostra gera uma força eletromotriz alternada, cuja força magnética é proporcional ao momento magnético da amostra. As bobinas de gradiente produzem campos em sentidos opostos, formando um gradiente de campo magnético. O campo magnético é gerado por eletroímãs para a magnetização da amostra. A força magnética gerada na amostra pela aplicação do gradiente desvia o amostrador, produzindo uma diferença de potencial ($d\phi$) no piezoelétrico. Este sinal gerado é proporcional à magnitude do gradiente de campo e

a componente da amostra na direção dos eletroímãs presentes. A amplitude de oscilação do amostrador é dependente da força produzida sobre a amostra, que é transformada em um sinal elétrico por um cristal piezoelétrico. Sabendo-se o valor do gradiente alternado é possível obter informações sobre a resposta magnética da amostra. Aplica-se o campo na frequência de ressonância do amostrador como um todo, aumentando a oscilação do amostrador e a sensibilidade do sistema, potencializando o sinal de saída. A força alternada é amplificada, normalmente com um amplificador *lock-in*, que é sensível apenas a sinais na frequência de excitação das bobinas [21, 102, 103].

Para as medidas de magnetização, uma pequena quantidade de amostras das nanopartículas liofilizadas foi colocada em um substrato de mica, formando um “sanduíche”, fixadas por uma pequena gota de cola *bonder*, deixando secar em temperatura ambiente. Não foi possível pesar a massa de nanopartícula adicionada, devido à quantidade ser muito pequena e imprecisa para uma balança analítica. As medidas foram realizadas num campo máximo de 8000 Oe. As medidas magnéticas foram feitas em um AGFM construído no Laboratório de Magnetismo (LAM) do Instituto de Física/UFRGS.

4.3.8. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo, permitindo a análise de vários parâmetros simultaneamente. Através de um aparelho de detecção óptico-eletrônico são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de diferentes células [104].

O princípio básico da citometria de fluxo é dado pela incidência de um feixe de luz de um comprimento de onda fixo direcionado para o meio líquido que a amostra está inserida. Os detectores são apontados ao local onde a amostra com as células em solução passa através do feixe de luz, sendo um na própria linha do feixe de luz (*Forward Scatter* ou FSC) e outro perpendicularmente a este (*Side Scatter* ou SSC). Cada partícula suspensa, que passa através do feixe, dispersa a luz de uma forma diferente e os grupos fluorescentes presentes junto à amostra podem ser excitados,

emitindo luz de menor frequência do que o emitido pela fonte de luz. A combinação da luz dispersa e luz fluorescente são registradas pelos detectores de intensidade de fluorescência, que analisa as flutuações de brilho de cada detector, possibilitando examinar as informações sobre a estrutura física e química de cada partícula individual. O FSC correlaciona-se com o volume celular e o SSC depende da complexidade da partícula, como a forma do núcleo, a quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e rugosidade da membrana [104, 105].

Para o teste celular foi utilizado células macrófagos peritoneais de camundongos de linhagem C57BL6. As células foram removidas com meio RPMI (meio celular comercial de múltiplas aplicações desenvolvido pelo *Instituto Memorial Park Roswell* (RPMI)), sem soro. A análise foi realizada em cultivos de aproximadamente 10^5 células por poço. As células ficaram uma hora em estufa, a 37°C , para adesão dos macrófagos, posteriormente lavadas três vezes com uma solução salina tamponada (PBS 1X) para a remoção de células não aderidas. A incubação foi a partir de células controle (sem adição de nenhuma nanopartícula), de células com as nanopartículas sem o corante e de células com o corante incorporado na nanopartícula, todas em triplicatas por uma hora. As amostras foram diluídas em $100\mu\text{g}$ de ferro/mL em água milli-Q, a partir da solução estoque das sínteses S8 e S8-Cy5.5. A análise foi realizada em um citômetro BD FACS Canto™ II.

4.4. Medidas de Relaxação Magnética

As amostras para as medidas de relaxometria de cada síntese foram preparadas, variando a diluição a partir da solução estoque das nanopartículas (C_0). Foram feitas cinco diluições: $C_0/100$; $C_0/200$; $C_0/500$; $C_0/1000$ e $C_0/2000$. Um mililitro de cada diluição foi colocada em seringas de 3 mL e dispostas em dois *phantoms* cilíndricos, construídos de espuma com oito e quinze furos, respectivamente, ao longo de sua borda e mais um furo central, no qual uma solução do *buffer* salino foi adicionada como referência, de acordo com a Figura 4.5A1 e A2.

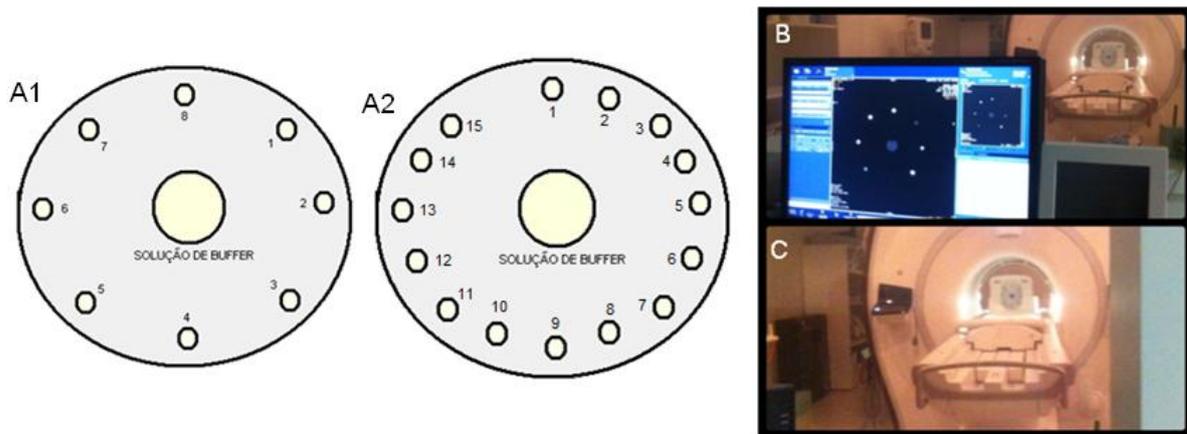


Figura 4.5. Imagem dos dois *phantoms* construídos para as medidas no equipamento de MRI. As posições das seringas com as nanopartículas da síntese S8 estão numeradas de 3-8 para o *phantom* A1 e as posições das seringas com as nanopartículas das sínteses S6, S9 e o Lumirem[®] estão numeradas de 1-15 para o *phantom* A2, ambos em sentido horário do mais concentrado para o menos concentrado. No orifício central, utilizou-se o *buffer* como referência (A). Imagem do equipamento de MRI com o *phantom* instalado (B e C).

As medidas dos tempos de relaxação magnéticas T1 e T2 foram realizadas no equipamento de Ressonância Magnética, modelo 450 W gen, da G&E, com campo de 1.5 T, localizado no Hospital são Lucas, na PUCRS. A análise foi realizada com o *phantom* em uma bobina de crânio (*head 24*), utilizado sequências de Fast Spin Eco (FSE). Para os mapas T1, foi empregado o modo de recuperação de inversão com tempo TR de 3000 ms e TI de 50, 70, 90, 110, 130, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 ms, com quatro fatias em cada seringa e uma matriz de 512x512 pixels. Para os mapas T2, foi usado um TR de 1000 ms e TE de 7.4, 10, 14, 18, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ms, também numa matriz de 512x512 pixels.

A partir destes dados, foram determinados os tempos de relaxação T1 e T2, para as diferentes concentrações de nanopartículas, o que permite o cálculo da relaxividade da dispersão de nanopartículas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados da síntese de coprecipitação, da caracterização das nanopartículas e de suas características de contraste em MRI.

5.1. Síntese pelo método de coprecipitação

O presente trabalho deu continuação de um trabalho [106], na qual o processo de síntese foi rotulado como síntese S1, S2 e S3. No decorrer desse projeto, foram realizadas sete sínteses, rotuladas como S4, S5, S6, S7, S8, S9 e S10.

Como já descrito na metodologia, as sínteses S4 e S6 foram realizadas com o propósito de verificar a reprodução do procedimento básico [ref. 88]. A síntese S5 teve o propósito de avaliar o efeito da temperatura na distribuição de tamanho das nanopartículas. Nas sínteses S4 e S5 foram utilizadas, nas etapas de filtração, tubos *Amicon* de 10.000 MWCO, sendo observadas diferenças na solução final, que serão descritas na seção a seguir. Para as demais sínteses utilizaram-se tubos *Amicon* de 50.000 MWCO. A síntese S7 foi realizada com o intuito de verificar a possibilidade de variação de tamanho das nanopartículas na etapa de formação das mesmas, variando o tempo em que a solução (dextran e os sais de ferro em meio básico) mantinha-se na temperatura de reação. Para este fim, alíquotas foram retiradas após uma, duas e três horas de reação. Vale ressaltar aqui, que pequenas oscilações na temperatura foram observadas ao decorrer das primeiras sínteses (Tabela 4.2), devido ao uso de um termômetro de mercúrio. Nas demais sínteses foram adaptadas um termopar para um melhor controle. A síntese S8 foi realizada para averiguar o efeito da proporção da massa de dextran na formação das nanopartículas. De acordo com a literatura, quanto maior a proporção de massa de

dextran em relação à massa de sais de ferro, menor tende a ser o tamanho das nanopartículas. Ao adicionar a metade do valor de massa de dextran usado nas sínteses S4 e S6, observou-se que a distribuição de tamanho aumentou, descrita na seção 5.3. Então, para a síntese S9, a massa de dextran adicionada foi reduzida ainda mais, sendo a metade da massa de dextran da usada na síntese S8 e verificada uma pequena mudança na distribuição de tamanhos. Além disso, houve a formação de uma fase dispersa aquosa e uma fase sólida magnética (Figura 5.1). Tentou-se também mudar a proporção de massa de sais de ferro, dobrando estes valores na síntese S10. Contudo, tal procedimento resultou apenas na formação de um precipitado altamente magnético (Figura 5.1).



Figura 5.1. Imagem dos tubos *falcon* com as nanopartículas. Formação de duas fases na etapa final da síntese: uma fase líquida e uma fase sólida da síntese S9 (A); uma fase sólida para a síntese S10 (B).

5.2. Análise da Concentração de Ferro

A determinação da concentração de ferro na solução de nanopartículas é importante, principalmente para determinarmos as dosagens, em estudos biológicos e de contraste no MRI.

Foi utilizada a técnica por espectroscopia UV-Vis para determinar a concentração de ferro. Realizamos também análise de concentração de ferro por espectroscopia por absorção atômica e os resultados foram similares. A partir da

curva de calibração da absorbância *versus* concentração, a concentração estimada para as sínteses ficaram, aproximadamente, entre 11,18 – 1,88 g/L. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Valores de concentração de Fe na solução de nanopartículas.

Amostras	Concentração (g/L)
S4	2,68
S5	2,57
S6	6,75
S7	6,72
S8	11,2
S9	1,88
S10	-

As sínteses realizadas revelaram valores de concentração de ferro diferenciados. Essa diferença pode ser atribuída às etapas de centrifugação com os tubos *Amicon*, na qual se prevê a eliminação de dextran remanescente que não reagiu com o óxido de ferro, bem como íons (cloreto, hidroxila, ferroso, férrico) que não participaram da reação. Nas sínteses S4 e S5 foram utilizadas tubos com um *cut off* de peso molecular de 10.000, ou seja, apenas materiais com pesos moleculares abaixo de 10.000 Da passam através das membranas presentes nos tubos (lembrando que o peso molecular do dextran é de 10 kDa). Como consequência, nas sínteses que resultaram em valores de concentração menor de ferro, foi obtido um maior volume líquido final. Além disso, posteriormente a etapa primeira de centrifugação, e depois da diálise, tem-se a etapa de centrifugação (também com tubos *Amicon* de 50k Da) com propósito de concentrar a solução final das nanopartículas. A primeira etapa de centrifugação realizada nas sínteses S4 e S5 pode ter sido inadequada, acarretando num maior número de elementos indesejáveis em suspensão na solução das nanopartículas. É importante que na primeira etapa de centrifugação sejam eliminados os elementos que não interagiram com o meio reacional. Nas demais sínteses, foram utilizadas para esta etapa de eliminação de dextran, tubos *Amicon* de 50.000 MWCO, e com isso verificou-se um aumento no valor da concentração de ferro na solução de nanopartículas.

5.3. Análise Morfológica e Distribuição de Tamanhos

A síntese pelo método de coprecipitação pode produzir nanopartículas com uma variedade de tamanhos. O tamanho do núcleo magnético e do diâmetro hidrodinâmico dependem do número de cristais de óxido de ferro por partícula e do volume ocupado pelo revestimento de dextran.

Micrografias por TEM foram obtidas para as amostras das sínteses S4, S6, S8 e S9. Foi feito EDS em regiões específicas do *grid* para a confirmação dos elementos presentes nas nanopartículas, principalmente o ferro. Os espectros de EDS confirmaram a presença do elemento ferro nas amostras. A Figura 5.2 mostra micrografias de TEM em três regiões diferentes do mesmo *grid* para uma amostra da síntese S4. Observa-se que as nanopartículas aparecem como estruturas circulares mais escuras. A Figura 5.2C mostra uma região de aglomeração das nanopartículas, mas ainda assim com um diâmetro de aproximadamente 50 nm. A caracterização realizada não foi suficiente para obter uma distribuição de tamanho estatisticamente significativa, porém a partir das microscopias e usando o *software image J*, foi possível estimar os diâmetros médios de aproximadamente $9,3 \pm 1,6$ nm.

As micrografias 5.2D, 5.3, 5.4B, 5.4C, 5.4D, 5.5A, 5.5B, 5.5C, 5.5D, fornecem evidências de que as nanopartículas são cristalinas. Estas imagens apresentam regiões, seguindo um ordenamento atômico de planos cristalinos nas partículas e também alguns contornos facetados correspondentes ao óxido de ferro formado.

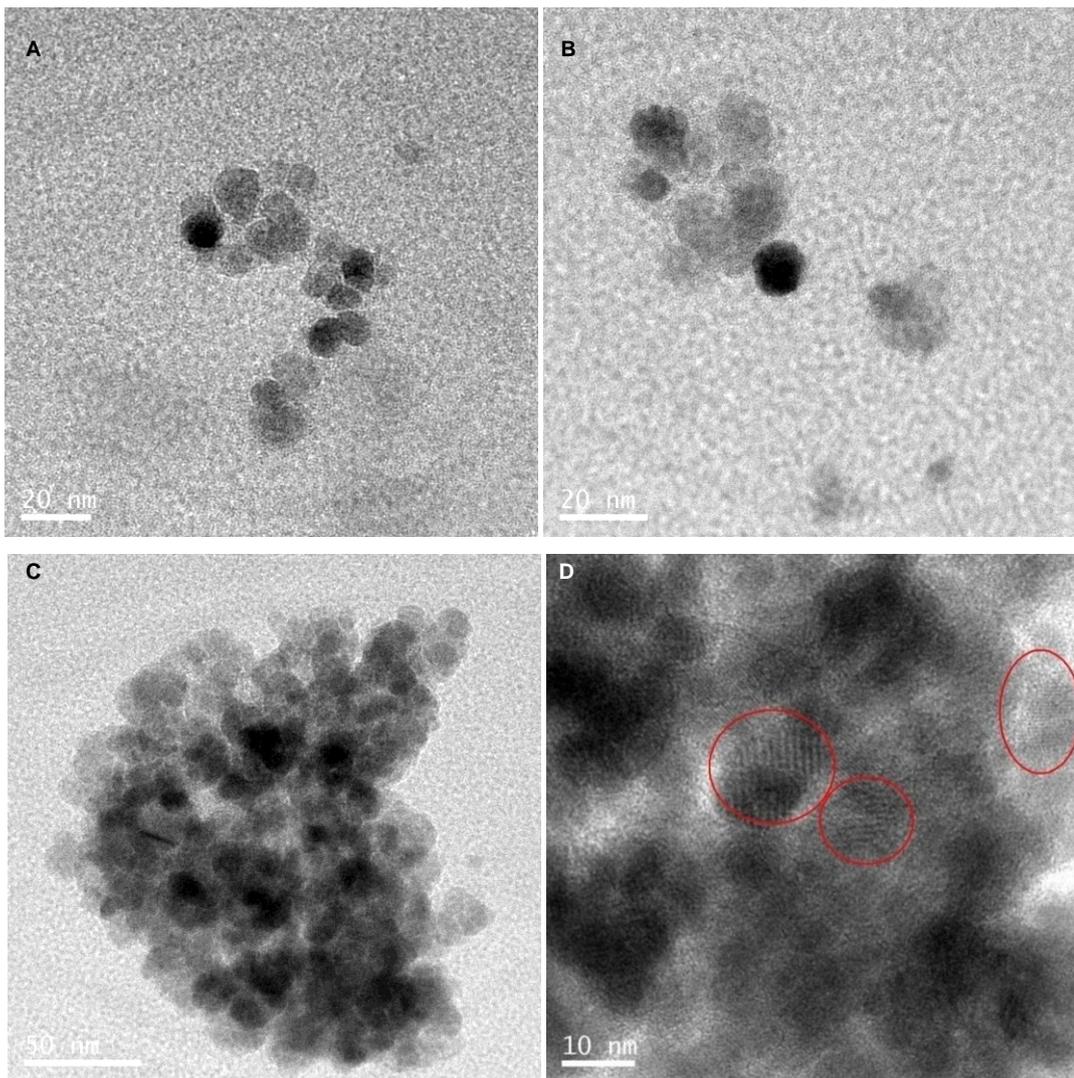


Figura 5.2. Micrografias de TEM de quatro regiões distintas da amostra da síntese S4 (A, B, C e D). Micrografia de nanopartículas aglomeradas (C e D). Micrografias mostrando regiões cristalinas presentes na amostra (D).

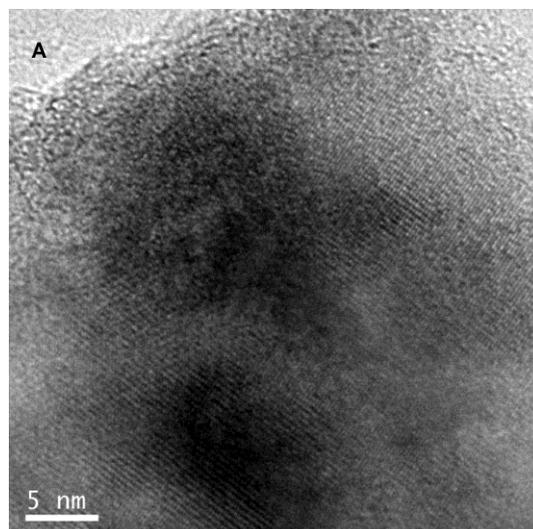


Figura 5.3. Micrografia de TEM da amostra da síntese S6.

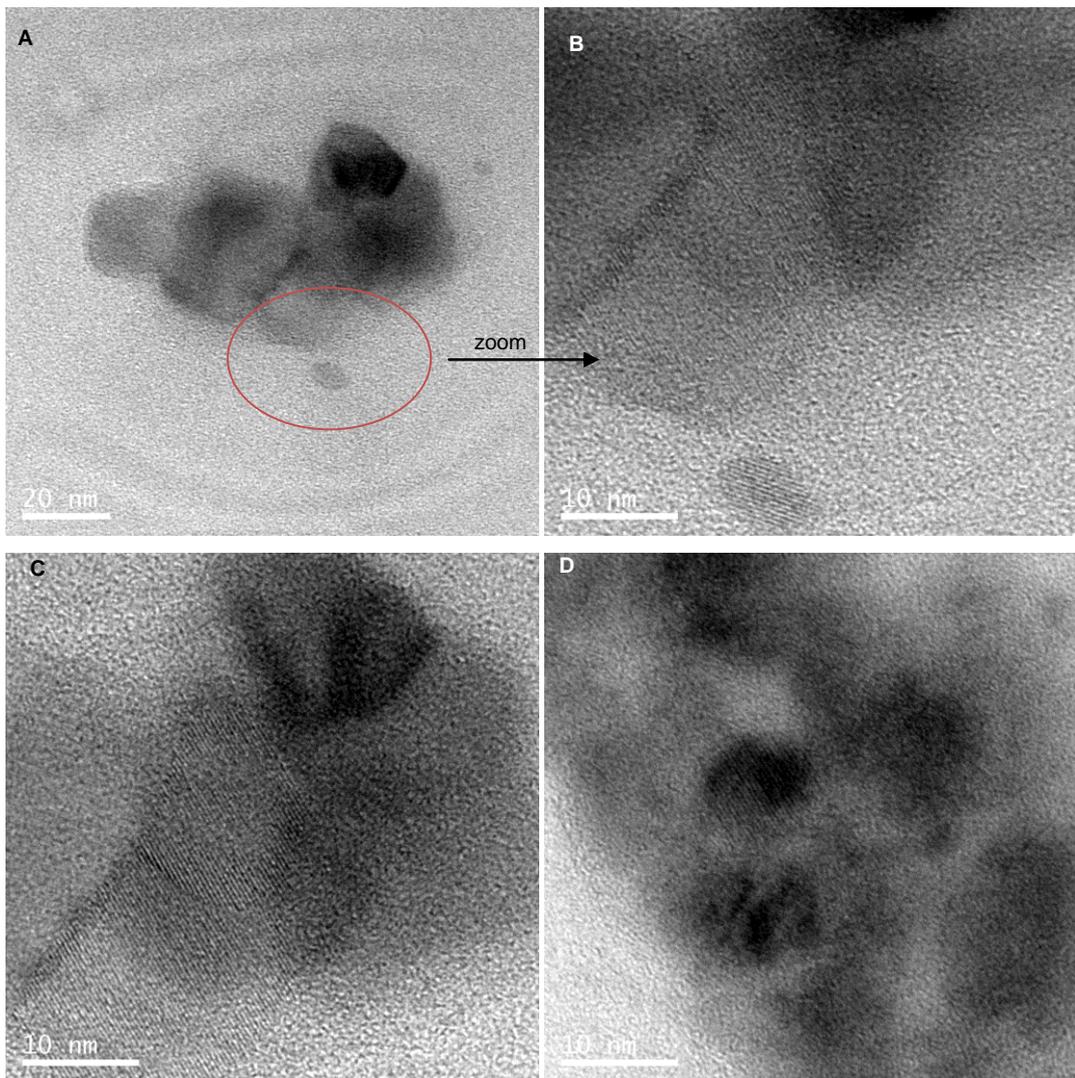


Figura 5.4. Micrografias de TEM de três regiões distintas de uma amostra da síntese S8. Figura Ampliação da região da micrografia A (B).

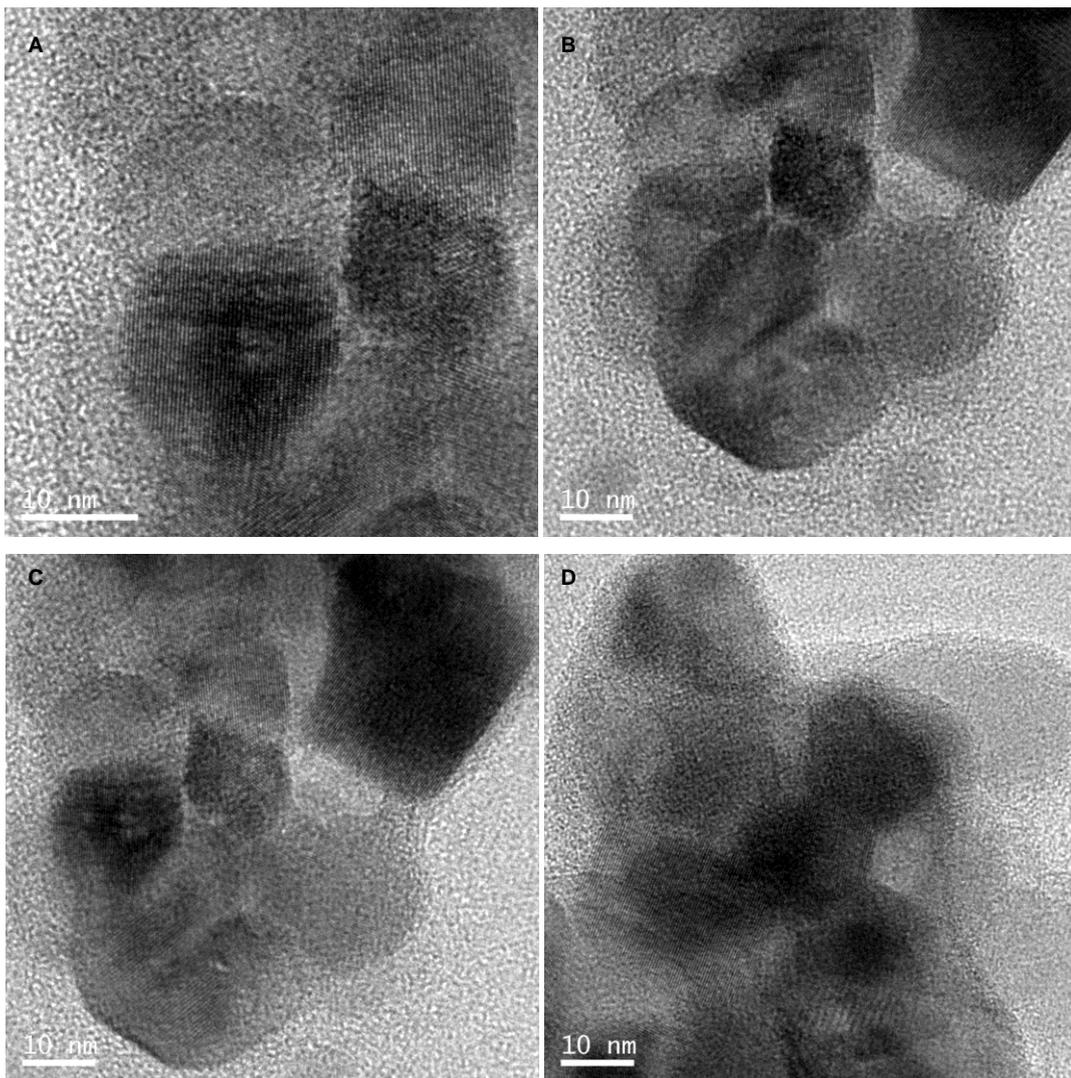


Figura 5.5. Micrografias de TEM de uma amostra da síntese S9 em diferentes localidades do *grid*, indicando a presença de regiões cristalinas.

Observa-se que para a síntese S9 (Figura 5.5), o tamanho das nanopartículas foi maior do que para as demais sínteses, com tamanhos médios de $15,1 \pm 3,1$ nm (figura 5.6A), $20,7 \pm 4,5$ nm (figura 5.6B), $17,5 \pm 2,5$ nm (5.6C) e $16,5 \pm 2,8$ nm (figura 5.6D). Observou-se que as partículas sintetizadas possuem contornos relativamente esféricos.

O gráfico da Figura 5.6 apresenta a distribuição de tamanho das nanopartículas (com ponderação em número) em solução aquosa obtidas por DLS para as diferentes sínteses.

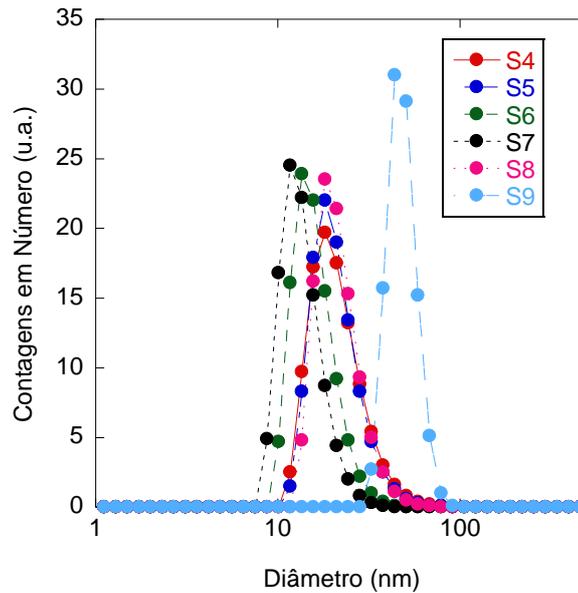


Figura 5.6. Gráfico da distribuição de tamanhos das nanopartículas ponderadas por número, obtidas por DLS para todas as sínteses.

Tabela 5.2. Diâmetros médios e desvios padrões obtidos das distribuições de tamanho das nanopartículas ponderadas em número de todas as sínteses, obtidas por DLS.

Amostras	Diâmetro médio (nm)
S4	21,7 ± 8,07
S5	21,4 ± 6,84
S6	16,2 ± 7,40
S7	13,8 ± 3,91
S8	21,8 ± 6,73
S9	48,5 ± 8,90
S10	195,8 ± 41,2

Observou-se que para a síntese S5, que teve uma variação da temperatura de reação de, aproximadamente 80°C para 60°C, há apenas uma pequena variação de tamanho nas nanopartículas. Como esperado, o diâmetro médio foi maior para a síntese S9, devido a modificações nos parâmetros de síntese.

Apesar das sínteses S4 e S6 terem sido realizadas nas mesmas condições, ambas apresentaram uma distribuição de tamanhos um pouco diferentes. Isto pode ter ocorrido devido a flutuações de temperatura durante a síntese, que ficaram menores na síntese S6, quando foi utilizado um termopar.

A Figura 5.7 apresenta a distribuição de tamanho das nanopartículas na etapa de formação das mesmas, sem passar pelos processos de reticulação e aaminação, variando o tempo de reação no reator em uma, duas e três horas. O processo de síntese foi o mesmo realizado para as sínteses S4 e S6, e durante a reação alíquotas foram retiradas e analisadas por DLS para avaliar a influência do tempo de reação na distribuição de tamanhos. Observou-se que houve um pequeno aumento do diâmetro médio com a variação do tempo de reação (~16 nm para 13 nm), apresentados na Tabela 5.3. Os diâmetros das nanopartículas obtidas na síntese S7 são menores em relação às demais sínteses e isso pode ser justificado pelo fato de que nesta síntese as etapas de reticulação e aaminação não foram suprimidas. Porém, estas etapas não executadas não influenciaram demasiadamente na distribuição de tamanhos.

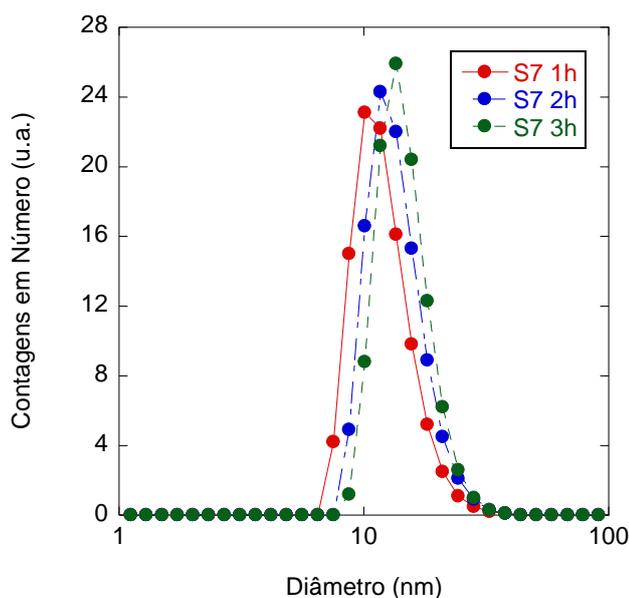


Figura 5.7. Gráfico de distribuição de tamanhos ponderada em número das nanopartículas da síntese S7 em relação aos tempos de reação de uma, duas e três horas.

Tabela 5.3. Diâmetros médios e desvios padrões obtidos das distribuições de tamanho em número das nanopartículas apresentadas na Figura 5.7.

Tempo de reação (h)	Diâmetro médio (nm)
1	10,2 ± 3,7
2	11,7 ± 4,0
3	13,5 ± 3,8

A distribuição de tamanhos observada nas amostras da síntese S8 mostrou que, mesmo diminuindo pela metade a proporção de massa de dextran em relação à síntese S4, houve um aumento muito pequeno nos diâmetros médios. De acordo com o estudo realizado na ref. [42], o tamanho das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com dextran diminui marcadamente com o aumento do teor de dextran adicionado, porém isto não foi observado na síntese S8. Entretanto, ao diminuirmos ainda mais a proporção de massa de dextran, na síntese S9 observou-se uma variação significativa da distribuição de tamanho. Acredita-se que isso pode ter sido devido à grande quantidade de dextran adicionadas em relação as quantidade de massa de sais ferro, tornando a solução das nanopartículas supersaturada de dextran e apenas uma pequena parcela de dextran aderiu quimicamente na superfície do óxido de ferro.

De acordo com a ref. [42], quando pequenas quantidades de dextran são adicionadas, todo o dextran pode ser consumido, não desempenhando o papel na estabilização de impedimento estérico entre as nanopartículas. As nanopartículas adjacentes que podem não ter sido revestidas, sedimentam-se entre si pelas forças magnéticas, aglomerando-se. Esta situação pode ser relacionada com a síntese S9, onde duas fases foram encontradas, uma fase dispersa e a outra fase precipitada. A fase dispersa foi a que gerou o diâmetro médio mostrado na Tabela 5.2. Não executamos nenhuma análise na água de lavagem na etapa de eliminação do dextran remanescente para justificar concretamente esta hipótese.

Devido à amostra da síntese S10 mostrar-se em estado sólido precipitado, pesou-se uma pequena quantidade da amostra (~ 0,001 g) e solubilizou-se em 1 mL de água purificada, seguido do mesmo procedimento de preparação das amostras realizadas para as demais sínteses. O diâmetro médio foi de $195,8 \pm 41,2$ nm, valor esperado devido ao aumento da quantidade de sais de ferro adicionado na síntese.

5.4. Caracterização Elementar por RBS

Para as análises de RBS, estudamos diferentes métodos de deposição em substratos de Si e SiO₂, e diluições em água, isopropanol e DMF. O teste de

diferentes solventes foi devido ao fato de ser preferível um solvente que fosse mais volátil para uma adesão mais rápida das nanopartículas no substrato.

A Figura 5.8 apresenta um espectro de RBS de amostras diluídas 100 vezes em água e isopropanol, depositadas por gotejamento. Observa-se a amostra diluída em isopropanol gerou um pico maior em relação à amostra diluída em água. A altura do pico no espectro demonstra uma maior quantidade de ferro presente na amostra. O pico entre 1250-1300 keV é devido à presença do elemento cloro no *buffer* salino presente na solução das nanopartículas. Como a amostra de nanopartículas é composta por um sistema *core-shell*, feixe de hélio incide primeiramente na camada polimérica da amostra, perdendo energia. Por isso, há um deslocamento da energia do pico do ferro. Através deste deslocamento de energia é possível estimar a espessura da camada de dextran presente nas nanopartículas.

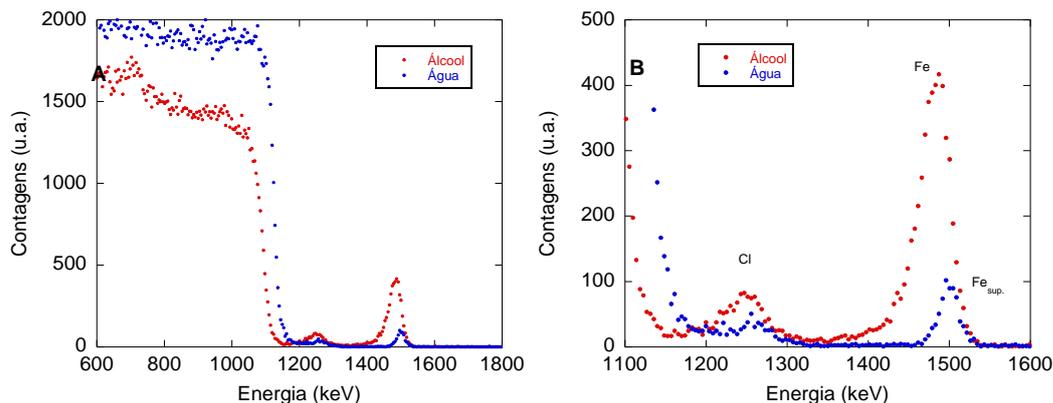


Figura 5.8. Espectro de RBS de nanopartículas diluídas em isopropanol e água, depositadas por gotejamento em substrato de Si (A). Espectro com a ampliação dos picos característicos de cloro e ferro (B).

A Figura 5.9 mostra um espectro de RBS de nanopartículas com e sem a adição do buffer salino, diluída 100 vezes em água e isopropanol, depositada por gotejamento em um substrato de Si. Neste espectro, observa-se um aumento do pico de ferro quando a solução de nanopartículas não possui o buffer. Em relação ao tipo de solvente, não houve diferenças no pico característico do ferro. Não houve também diferença entre os espectros para as diluições entre água e DMF.

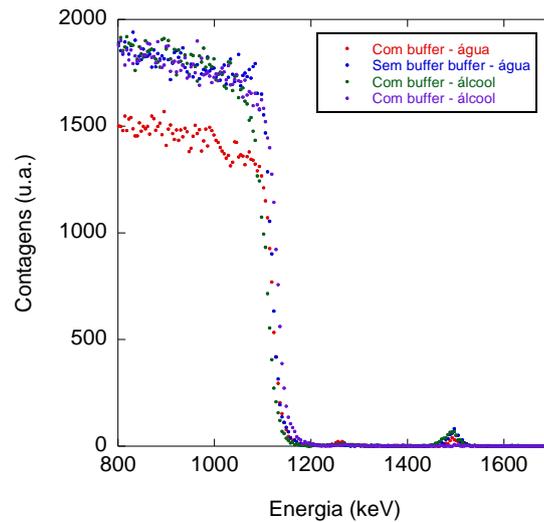


Figura 5.9. Espectro de RBS das nanopartículas depositadas por gotejamento em isopropanol e água com e sem a adição de buffer salino em substrato de Si.

Em relação à diluição entre água e isopropanol, de acordo com os dados do fabricante, o dextran tem pouca solubilidade em isopropanol, acarretando possíveis aglomerações, já visualizadas por DLS, porém nas análises de RBS isto não mostrou muita diferença.

A Figura 5.10 mostra um espectro de RBS de uma amostra diluída 50 vezes em água e depositada em substrato de SiO_2 e de Si pelos três métodos. Dentre os três métodos de deposição, o método por gotejamento foi o que melhor demonstrou pico bem definido na faixa de energia característica do elemento ferro (~1520 keV) e separado do sinal de silício para os dois substratos. Observa-se que para o substrato de SiO_2 também na faixa de 900-1200 keV uma camada mais espessa de silício, representando o próprio substrato. Os picos entre 800-600 keV são do óxido de silício presente na superfície do substrato.

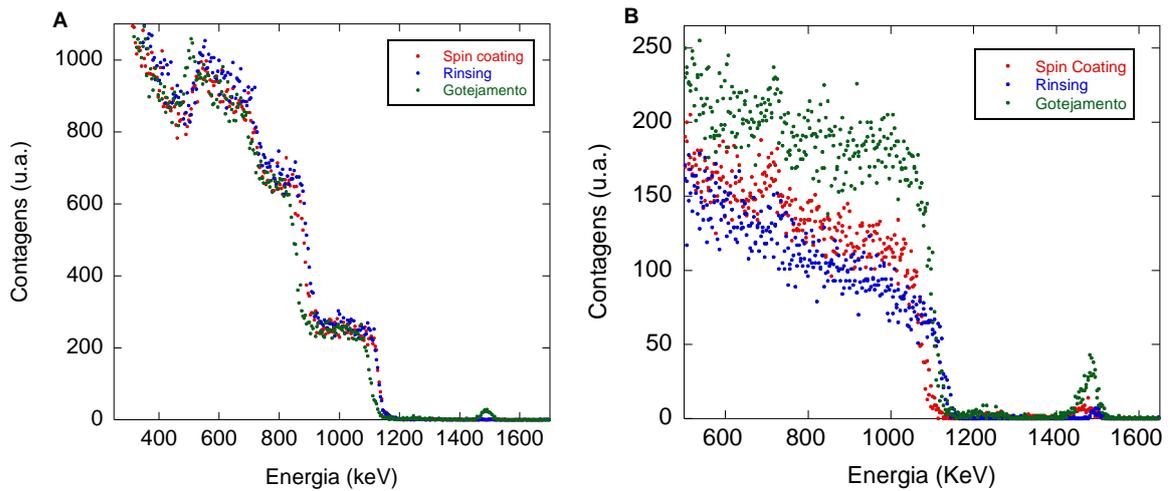


Figura 5.10. Espectro de RBS das nanopartículas depositadas em substrato de SiO_2 (A) e Si (B) por gotejamento, *spin coating* e *rinsing*.

A Figura 5.11 mostra um espectro de RBS de amostras de nanopartículas diluídas em água e isopropanol pelos três métodos de deposição. Neste espectro, observa-se a formação de uma camada grossa de nanopartículas dispostas sobre o substrato. Existem três possibilidades de formação de camada de nanopartículas em cima do substrato. Primeiro, um sistema ideal seria onde todas as nanopartículas se distribuíssem de forma uniforme sobre o substrato, formando uma monocamada, na qual o resultado da análise seria um espectro com um pico mais definido (Figura 5.8). Uma segunda hipótese seria que a camada de nanopartículas se distribuísse de forma heterogênea, onde aglomerados de nanopartículas não preenchessem totalmente o substrato, gerando regiões com falhas de nanopartículas em cima do substrato (Figura 5.11B). Dependendo de onde o feixe é incidido na amostra, pode ser que seja irradiado em regiões onde não tenha nanopartículas. Isso implicaria numa contagem maior de sinal do Si na superfície (um pequeno deslocamento do canal de subida do sinal de Si), bem como no alargamento do pico de Fe. A terceira hipótese seria a formação de multicamadas de nanopartículas, onde apresenta um sinal constante desde a região da superfície até chegar ao valor de energia do silício (Figura 5.11B).

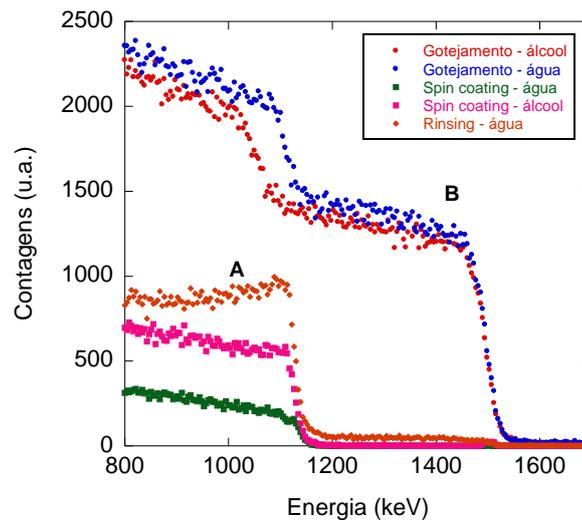


Figura 5.11. Espectro de RBS com nanopartículas diluídas em isopropanol e água, depositadas gotejamento, *spin coating* e *rinsing* em substrato de Si.

A dificuldade central encontrada na análise por RBS foi a não reprodutibilidade nos processos de preparação das amostras. Portanto, conseguimos observar a presença de ferro nas nanopartículas e uma possível noção de como elas se distribuem quando em solução. Isso dificultou uma análise mais conclusiva da melhor forma de preparar o efeito do solvente na dispersão das nanopartículas.

Uma análise preliminar de amostra que produziu uma camada mais fina de nanopartículas (pico estreito de ferro) foi analisada por MEIS (do inglês, *medium energy ion scattering*) e observou-se um valor de espessura da camada polimérica de, aproximadamente, 6,5 nm, através da análise de deslocamento do pico de ferro.

5.5. Análise por Espectroscopia IV

A Figura 5.12 mostra os espectros de FTIR das amostras de nanopartículas e de dextran puro. O espectro de dextran exibe bandas de absorção características de polissacarídeos. O pico largo em 3410 cm^{-1} está relacionado ao estiramento de grupos OH^- , devido a hidroxilas presentes na estrutura de dextran, como também à presença eventual de água entre a superfície do óxido e do dextran formando uma rede de pontes de hidrogênio [107, 108]. A banda de absorção em 2922 cm^{-1} é atribuída às vibrações CH/CH_2 e a banda de absorção em 1638 cm^{-1} é característica

de ligações C=O. A banda de absorção perto de 1110 cm^{-1} representa a vibrações de ligações do tipo C-O presente no dextran, comum em moléculas de glicose. A banda de absorção em 952 e 768 cm^{-1} são associados ao modo de deformação do anel α -glicopirranose.

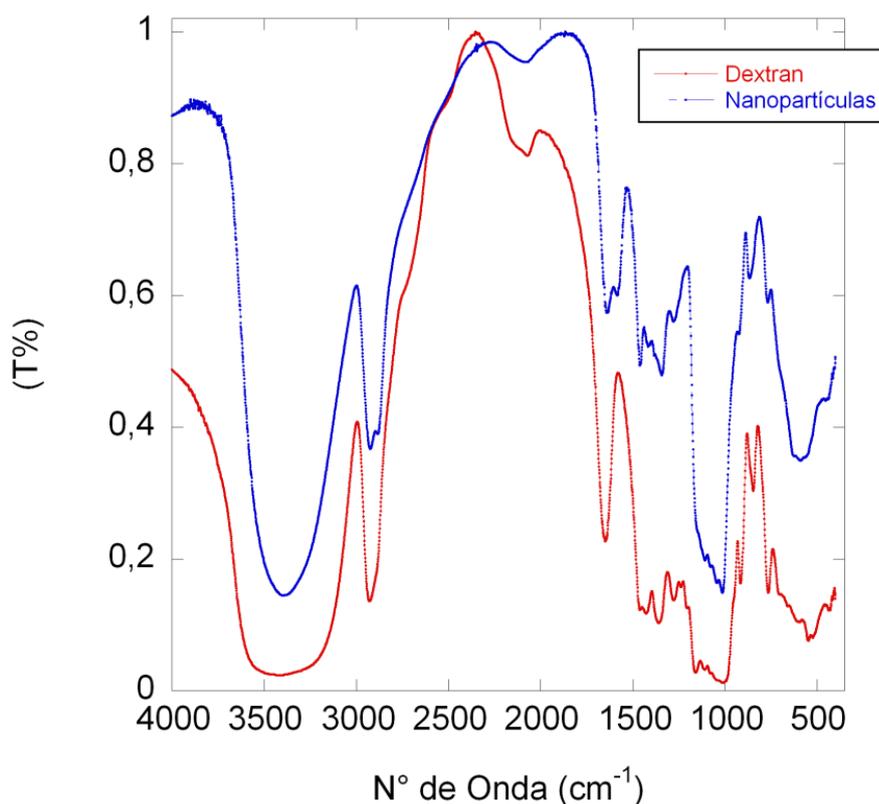


Figura 5.12. Espectro de FTIR das nanopartículas da síntese S4 e do dextran puro.

No espectro das nanopartículas, aparece um pico em 593 cm^{-1} de vibrações características do modo de estiramento Fe-O da magnetita. As bandas de absorção em 1583 e 1638 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento da ligação N-H, possivelmente pertencentes aos grupos amina funcionalizados. As sínteses S5 e S6 apresentaram picos semelhantes (Figura 5.13 da S6).

A Figura 5.13 mostra os espectros de FTIR das sínteses S6, S7 e S8. Para as sínteses S6 e S8, observa-se bandas de absorção similares as da Figura 5.12. Porém para a S7, há uma diminuição da intensidade da banda de estiramento OH⁻, o que pode ser devido à redução do número de hidroxilas e, conseqüentemente, diminuição no número de ligações de hidrogênio na estrutura. Na síntese S7, não foi

realizada a etapa de reticulação do dextran, obtendo-se um número menor de moléculas de glicose revestindo as nanopartículas.

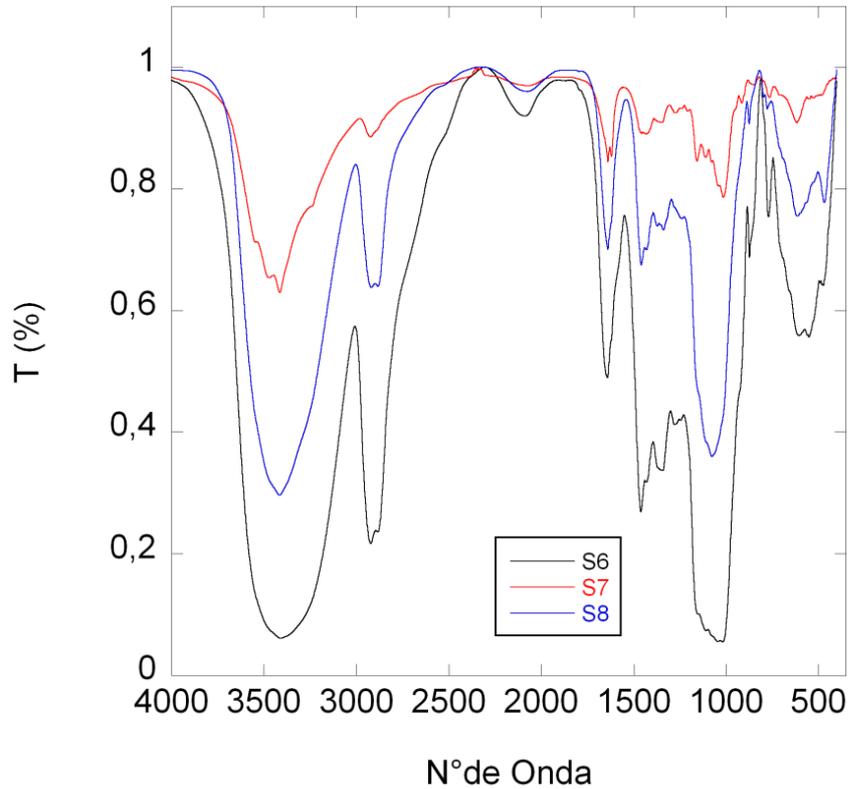


Figura 5.13. Espectro de FTIR das nanopartículas das sínteses S6, S7 e S8.

A Figura 5.14 mostra o espectro de FTIR das sínteses S9 e S10. Observa-se para a síntese S9 e S10, está presente a banda de absorção características de óxido de ferro em, aproximadamente, 598 cm^{-1} [109], porém para a síntese S10 os picos característicos do dextran não estão totalmente presentes, indicando a possibilidade da amostra de nanopartículas não ter sido revestida completamente com o dextran. O espectro da síntese S9 apresentou picos semelhantes à Figura 5.12.

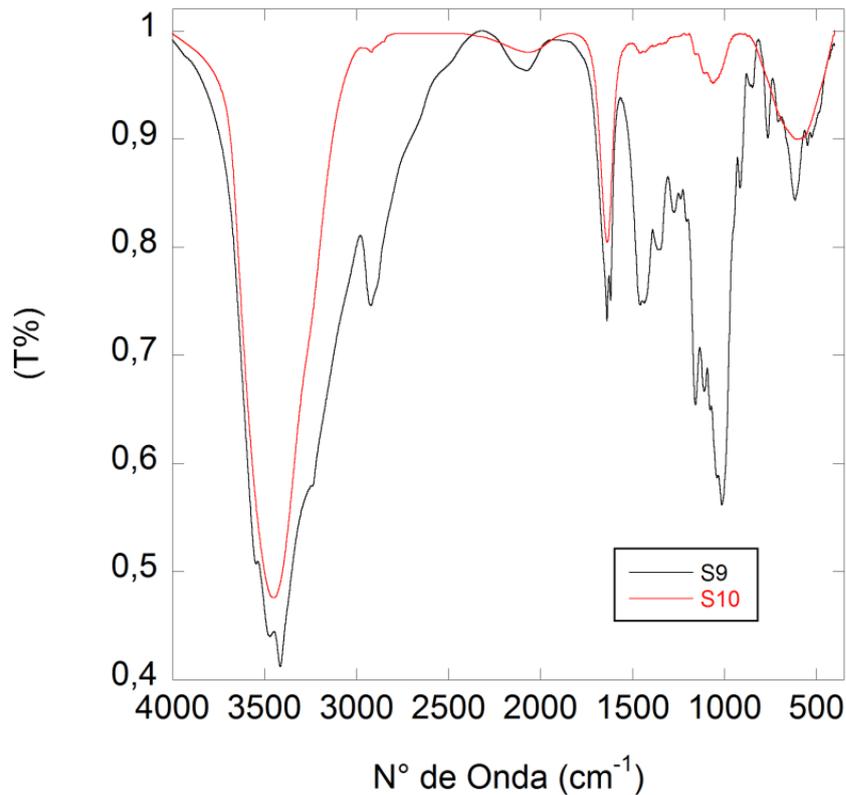


Figura 5.14. Espectro de FTIR das nanopartículas das sínteses S9 e S10.

5.6. Estabilidade Coloidal

As características da superfície das partículas revestidas foram estudadas através da medição do potencial zeta e também as curvas de potencial zeta em função do pH da solução.

A Tabela 5.4 apresenta os valores de potencial zeta das nanopartículas em solução aquosa. Os valores variaram de acordo com o procedimento de síntese. Para as sínteses S4 e S6, os valores de potencial zeta foram próximos, com valores de 6,99 e 5,82 mV, respectivamente. Para a síntese S5, o potencial zeta obtido foi um pouco maior em relação às sínteses S4 e S6, com um valor de 9,99 mV. Para a síntese S8 o valor obtido foi de 11,8 mV, um valor mais alto do que as demais sínteses. Para a síntese S9 o valor obtido foi de 0,27 mV. Em todas as sínteses, com exceção da síntese S7, as nanopartículas apresentaram valores positivos de potencial zeta, possivelmente pela presença dos grupos amina em sua superfície (NH_3^+). Este é um indício de que o processo de aminação foi efetivo. Os valores potenciais zeta foram relativamente baixos, o que indica que as partículas na

dispersão podem ter sido estabilizadas por repulsão estérica pelas moléculas de dextran, com uma pequena carga líquida positiva.

Para a síntese S7, observa-se um valor de potencial zeta diferenciado, em relação aos valores obtidos para as demais sínteses. Este fato pode ser devido à síntese S7 não ter participado da etapa de funcionalização de grupos amina. Os grupos hidroxilas na molécula de dextran estão ligados à superfície do óxido de ferro, o que resulta de nanopartículas com uma superfície carregada negativamente pela presença de íons hidroxilas (OH^-), ocasionando um valor de potencial zeta negativo, com uma pequena carga líquida negativa.

Tabela 5.4. Valores de potencial zeta das sínteses S4, S5, S6, S7, S8 e S9 em solução em pH 8.

Amostra	Potencial zeta (mV)
S4	6,99
S5	9,99
S6	5,82
S7	-6,38
S8	11,8
S9	0,27

A dependência do potencial zeta em função do pH e o diâmetro hidrodinâmico estão descritos nas Figuras 5.15 e 5.16, respectivamente. A variação no diâmetro hidrodinâmico com os valores de pH depende da superfície da nanopartícula e da carga líquida. A repulsão eletrostática entre as nanopartículas em meio aquoso dificulta a formação de ligações de hidrogênio e leva a uma suspensão mais estável em valores de pH acima de 7, com valores de potencial zeta próximo de zero, visualizadas para as sínteses S6 e S8. Com a diminuição do pH, o sistema é suscetível a aglomerações com valores de potencial zeta na faixa de instabilidade, devido a tendência de formação de ligação de hidrogênio na superfície da nanopartícula. Para síntese S7, a variação do pH indica estabilidade em valores de pH entre 5-12, com valores de potencial zeta perto de zero. A nanopartículas da síntese S8 mostraram estabilidade em valores de pH entre 7-12, sendo os valores de potencial zeta perto de zero. A distribuição de tamanho variou muito pouco na variação do pH do meio (Figura 5.16).

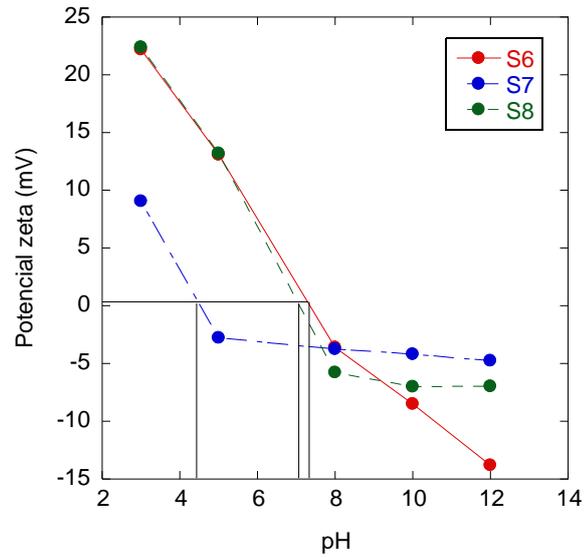


Figura 5.15. Gráfico do potencial zeta *versus* pH das sínteses S6, S7 e S8.

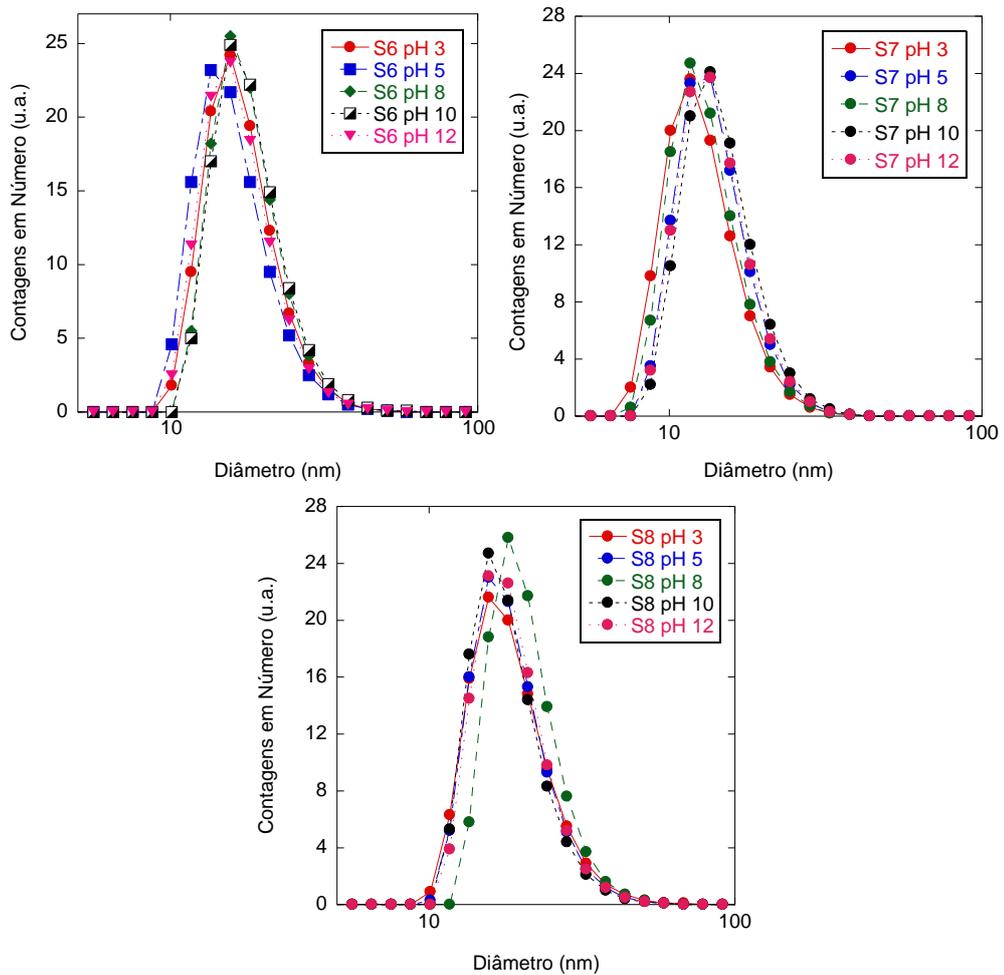


Figura 5.16. Gráficos da distribuição de tamanho das nanopartículas em diferentes pH para as sínteses S6, S7 e S8.

O ponto isoelétrico da síntese S7 está numa faixa de pH mais baixo, não sendo ideal para o meio biológico. Para as sínteses S6 e S8, o potencial zeta obtido em pH 7 foi igual a zero, sendo, então, as nanopartículas estáveis em pH neutro [110]. Este fato é muito importante, levando em consideração que será estável no pH fisiológico, um dos pré-requisitos mínimos para a utilização em meio biológicos.

Tabela 5.5. Valores de pH dos pontos isoelétrico das sínteses S6, S7 e S8.

Amostras	Ponto isoelétrico
S6	7,36
S7	4,53
S8	7,13

Para as demais sínteses, estima-se comportamentos semelhantes na variação de pH por apresentarem valores de potencial zeta positivos.

5.7. Medidas Magnéticas

A Figura 5.17 mostra a curva de magnetização em função do campo magnético externo, em temperatura ambiente, para amostras de todas as sínteses.

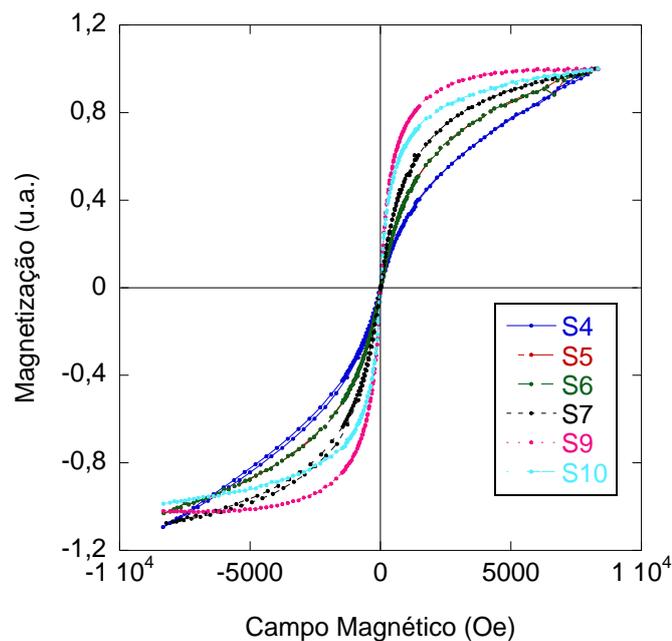


Figura 5.17. Curva magnetização em função do campo magnético em temperatura ambiente de todas as sínteses.

As amostras de todas as nanopartículas não apresentaram magnetização residual quando o campo magnético externo foi removido. As curvas de magnetização não apresentaram histerese, mostrando um possível comportamento superparamagnético. Todas as amostras, tanto em soluções (Figura 5.18) quanto liofilizadas (Figura 5.19), apresentaram comportamento magnético mediante a um imã (neodímio).



Figura 5.18. Fotos da amostra liofilizada da síntese S4 mediante um magneto.

Observa-se que para a síntese S10, o resultado final da síntese foi de um material no estado sólido (Figura 5.19A). As Figuras 5.19B e 5.19C mostram as nanopartículas da síntese S10 antes da última etapa de centrifugação da síntese, retiradas da etapa de diálise, mostrando semelhanças a materiais magnéticos *bulk*.

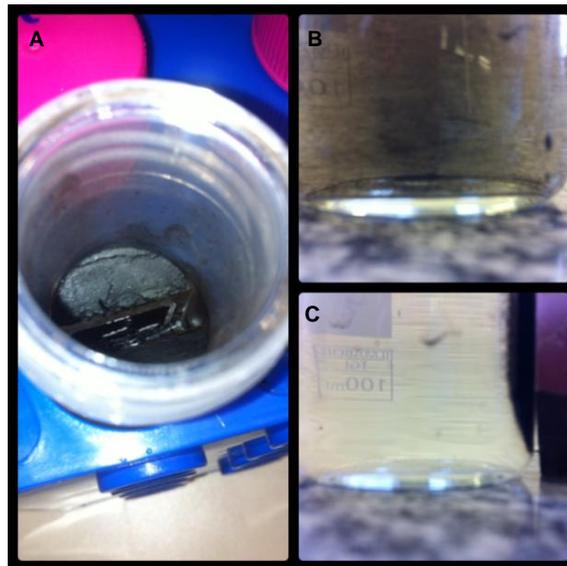


Figura 5.19. Imagem do tubo *Falcon* com as nanopartículas da S10 na última etapa da síntese (A). As nanopartículas suspensas em água (B) e as nanopartícula na presença de um magneto (C).

Pequenas variações foram observadas nas curvas de magnetização (Figura 5.17), na qual para amostras, como as sínteses S9 e S10, magnetizaram-se mais rapidamente, em relação à curva de magnetização das demais sínteses. Este fato pode ser devido ao tamanho dos domínios magnéticos (ou pequenos multidomínios), onde domínios com uma distribuição de tamanhos um pouco maior magnetizam-se mais facilmente. Como todas as sínteses tiveram valores de tamanhos numa faixa entre 16-22 nm, obtiveram magnetizações similares, enquanto que para a síntese S9 obteve-se tamanho perto de 50 nm (Tabela 5.2).

O comportamento magnético das nanopartículas magnéticas pode ser sensível às variações do tamanho, devido aos efeitos de superfície gerados da quebra de simetria da rede cristalina. As partículas com tamanhos nanométricos nem sempre possuem monodomínios magnéticos e, sim, multidomínios pequenos. Um número grande de momentos magnéticos encontra-se mais na superfície da partícula e possuem um menor número de coordenação do que os momentos magnéticos mais internos (camada menos magnética) [111]. No caso da Figura 5.17, o que é desconhecido é a disposição espacial das nanopartículas no substrato utilizado nas medidas de magnetização, levando em consideração a densidade de partículas distribuídas nas amostras e a distância entre as mesmas. Estas diferenças

de distribuição da massa magnética dificultam a interpretação das diferentes curvas de magnetização obtidas.

5.8. Incorporação do Fluoróforo

Para a confirmação da incorporação de fluoróforo, foram realizadas medidas por espectroscopia de UV-vis. A Figura 5.20 mostra o espectro de UV-vis das amostras da síntese S8 e da S8 com o fluoróforo presente nas nanopartículas (S8-Cy5.5).

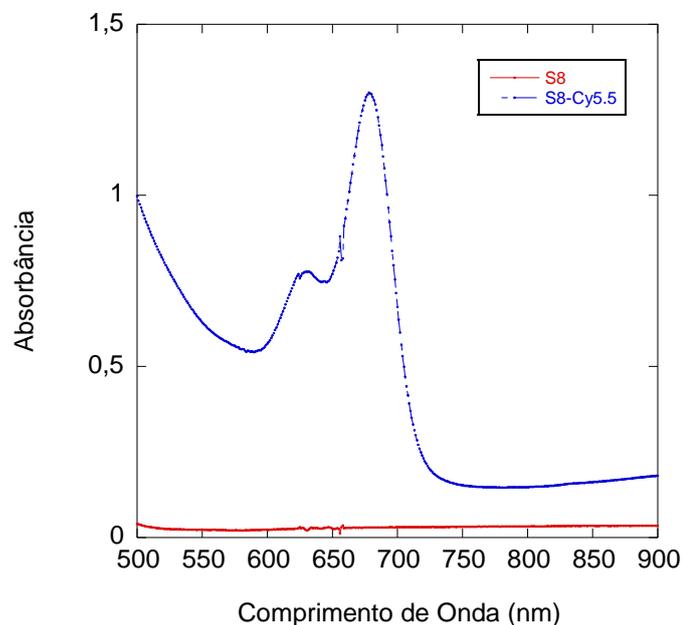


Figura 5.20. Espectro de UV-vis de amostras de nanopartículas com fluoróforo (S8-Cy5.5) e sem o fluoróforo (S8).

Observou-se o pico de absorção máxima em 677 nm para a amostra das nanopartículas S8-Cy5.5, confirmando a conjugação do fluoróforo na estrutura da nanopartícula no comprimento de onda característico do corante [112]. A distribuição de tamanho para S8-Cy5.5 foi de $28,17 \pm 6,34$ nm, valor um pouco maior do que a S8 e concentração de ferro de 93,0 g/L, um valor um pouco menor do que a S8.

5.9. Teste Celular

A Figura 5.21 mostra um histograma da intensidade de fluorescência em relação ao número de contagens celular. Um deslocamento na intensidade de

fluorescência demonstra que algumas das nanopartículas S8-Cy5.5 foram fagocitadas pelas células peritoniais. As células controle e células com a S8 obtiveram resultados semelhantes, o que era esperado, devidas ambas não possuírem fluorescência.

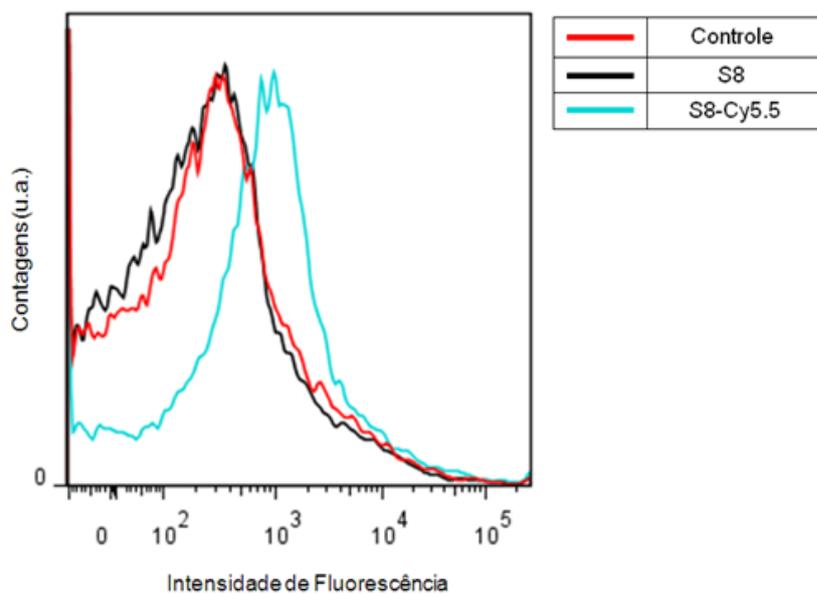


Figura 5.21. Histograma obtido pela análise de citometria de células macrófagos controle, células com as nanopartículas sem o fluoróforo Cy5.5 e células com Cy5.5 incorporado nas nanopartículas.

Apesar do deslocamento do pico da amostra S8-Cy5.5 ser pequeno, em relação ao controle e a síntese S8, pode ter ocorrido pelo baixo número de moléculas do corante incorporado na superfície das nanopartículas, obtendo-se um número menor de células fagocitadas. O corante liga-se através de grupos amina presente na superfície das nanopartículas. Talvez o processo de aminação para as nanopartículas da síntese S8 não tenha sido totalmente eficiente. Contudo, preliminarmente, foi possível averiguar a possibilidade de células macrófagos fagocitarem as nanopartículas.

5.10. Medida da Relaxividade – MRI

As medidas de relaxividade foram obtidas com o uso de dois *phantoms*, seguindo a metodologia descrita na seção 4.4. As medidas de relaxação foram realizadas para as sínteses S6, S8, S9, e como modelo de comparação, os mesmos

procedimentos foram realizados com o agente contraste comercial Lumirem[®], da Guerbet.

As imagens de MRI da Figura 5.22 e Figura 5.23 mostram imagens de fatias do primeiro *phantom*, contendo cinco seringas com soluções de nanopartículas da síntese S8 em cinco diferentes concentrações, e do segundo *phantom*, contendo quinze seringas com soluções de nanopartículas das sínteses S6, S9 e Lumirem nas mesmas cinco diferentes concentrações (Tabela 5.6). Os círculos menores correspondem às seções transversais de cada seringa.

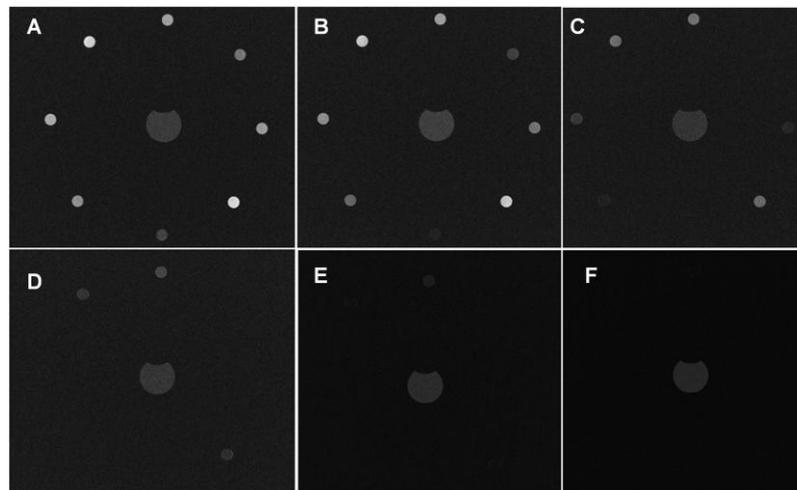


Figura 5.22. Imagem de MRI do primeiro *phantom* com TR de 1000 ms e TE de 7.4 (A), 18 (B), 35 (C), 75 (D), 150 (E), 250 (F) ms.

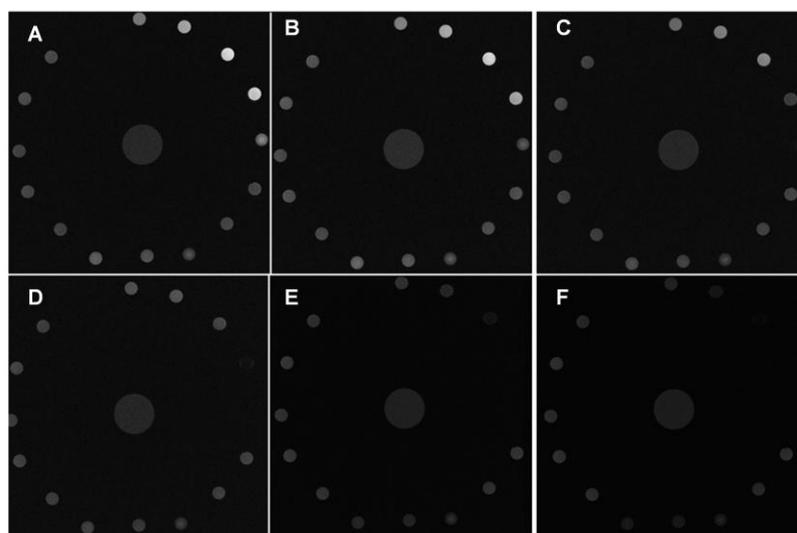


Figura 5.23. Imagem de MRI do segundo *phantom* com TR de 1000 ms e TE de 7.4 (A), 14 (B), 35 (C), 75 (D), 150 (E), 200 (F) ms.

Para as diferentes diluições da concentração de ferro das nanopartículas presentes em cada seringa, verificam-se diferenças no nível de intensidade do sinal. A intensidade de sinal decai mais rapidamente nas seringas com a concentração de ferro maior. Este fato é muito bem observado para as sínteses S6 e S8, já para a síntese S9 e o Lumirem, o efeito é pouco observado visualmente, devido ao fato de que as concentrações da síntese S9 e do Lumirem serem muito menores do que a concentração da síntese S6 e S8.

A intensidade do sinal em cada uma das seringas com as nanopartículas das sínteses S6, S8, S9 e Lumirem foram medidas em função do tempo de eco (TE), como mostrado nas Figuras 5.24, 5.25, 5.26 e 5.27.

A partir da curva de ajuste de uma exponencial (Equações 3.10 e 3.12), já mencionada no Capítulo 3.6, foi possível obter os valores do tempo T2 e da taxa de relaxação R2 ($1/T2$) das nanopartículas em solução.

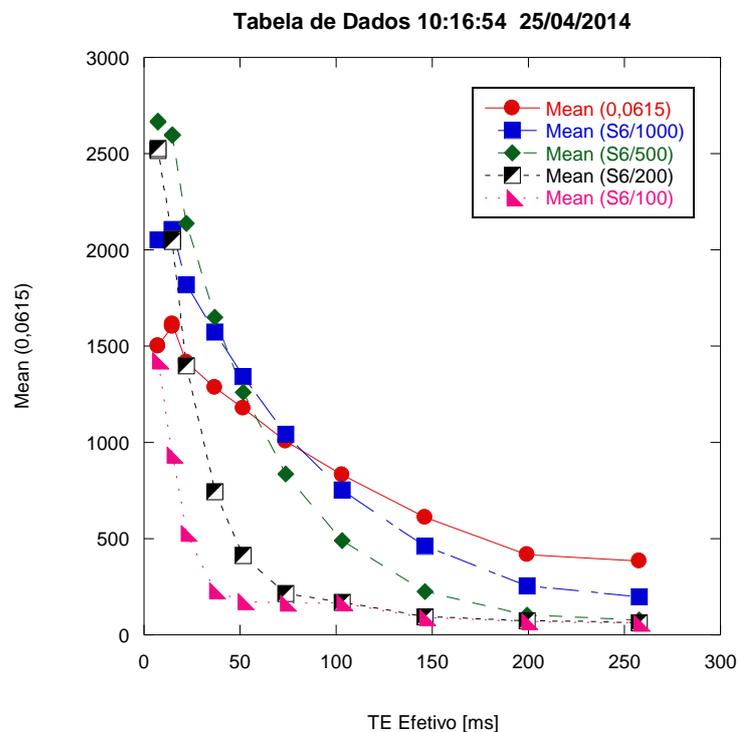


Figura 5.24. Curvas de intensidade do pixel em função de TE efetivo para diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S6. As linhas são ajustes exponenciais aos dados.

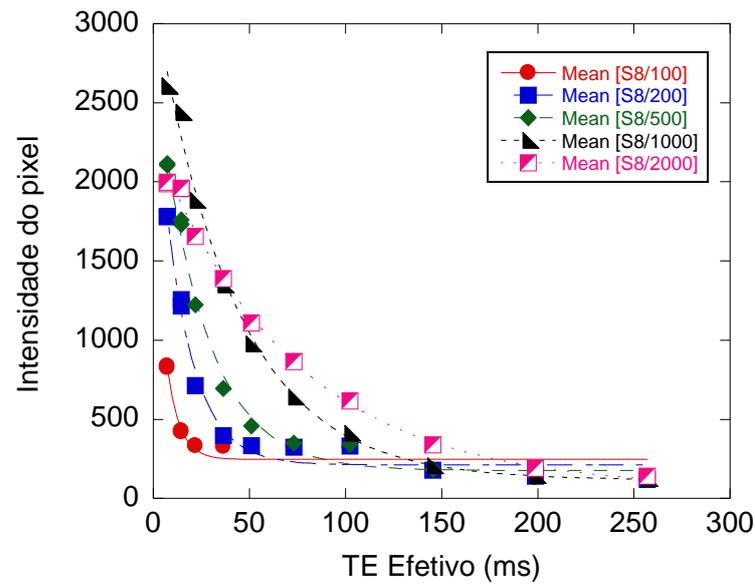


Figura 5.25. Curvas de intensidade do pixel em função do TE efetivo para as diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S8. As linhas são ajustes exponenciais aos dados.

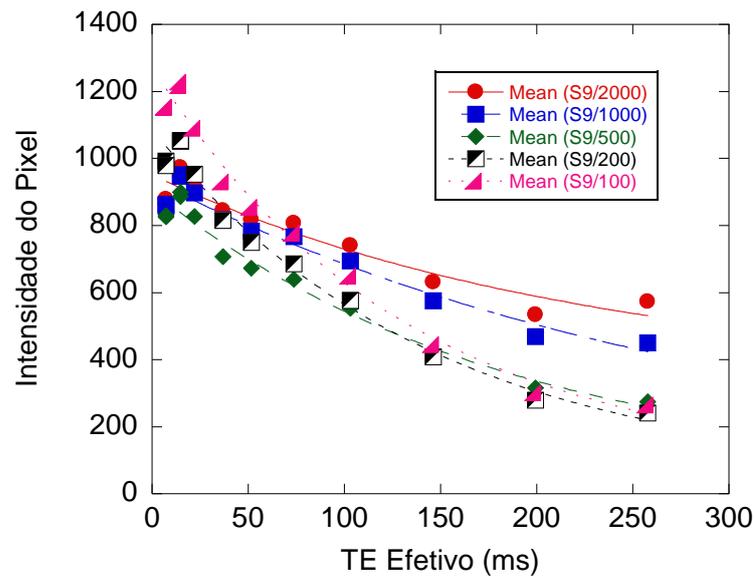


Figura 5.26. Curvas de intensidade do pixel em função de TE efetivo para as diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S9. As linhas são ajustes exponenciais aos dados.

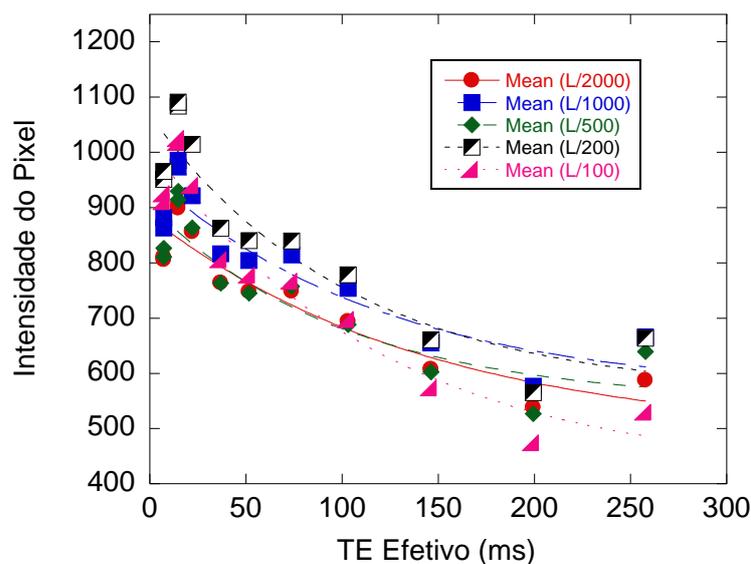


Figura 5.27. Curvas de intensidade do pixel em função de TE efetivo para as diferentes concentrações de nanopartículas do Lumirem. As linhas são ajustes exponenciais aos dados.

Os valores do tempo T2 e da taxa de relaxação de R2 obtidos dos dois *phantoms* a partir da regressão dos pontos da curva para cada concentração das sínteses S6, S8, S9 e Lumirem estão representados na Tabela 5.6. A Figura 5.28 mostra os gráficos da taxa de relaxação R2 em função da concentração de ferro para as sínteses S6, S8, S9 e Lumirem.

Tabela 5.6. Valores da taxa de relaxação R2 e dos tempos de relaxação T2 em função da concentração de ferro para as sínteses S6, S8, S9 e o Lumirem.

Amostra	Fator de Diluição	Concentração de Fe (mg/mL)	T2 (ms)	R2 (Hz)
S6	100	0,0615	14,17	70,57
	200	0,0307	24,25	41,24
	500	0,0123	56,97	17,55
	1000	0,0061	95,52	10,47
	2000	0,00300	131,9	7,58
S8	100	0,112	6,47	154,9
	200	0,0560	15,15	66,00
	500	0,0224	24,42	40,95
	1000	0,0112	41,34	24,19
	2000	0,00560	68,97	14,50
S9	100	0,0188	119,2	8,39

	200	0,00940	143,7	6,96
	500	0,00380	182,4	5,48
	1000	0,00190	202,3	4,94
	2000	0,000900	223,6	4,47
Lumirem	100	0,00175	71,39	14,01
	200	0,000875	98,30	10,17
	500	0,000350	133,0	7,52
	1000	0,000175	165,5	6,04
	2000	0,0000875	204,1	4,90

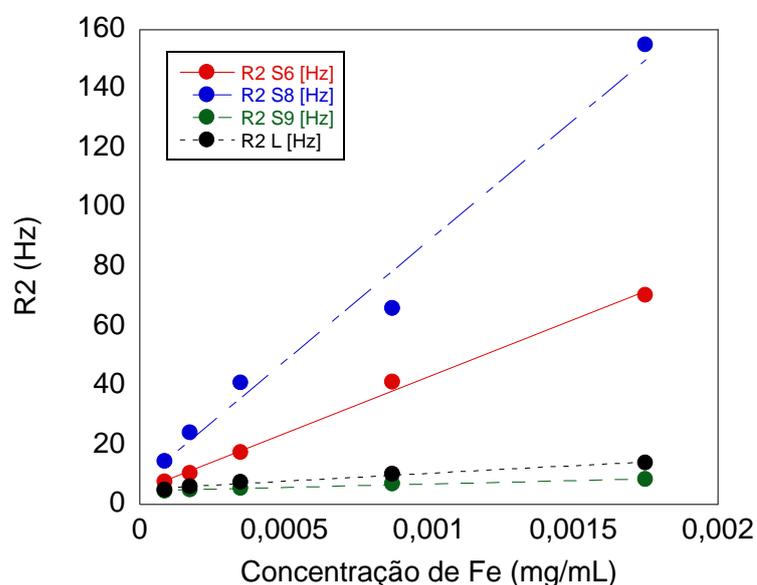


Figura 5.28. Gráfico da taxa de relaxação R2 em função da concentração de ferro para as sínteses S6, S8, S9 e Lumirem.

Na Tabela 5.6, observa-se que o tempo de relaxação T2 diminui com o aumento da concentração. Este efeito demonstra que as nanopartículas de óxido de ferro podem agir como um contraste no MRI.

Para as medidas do tempo T1, o mesmo procedimento foi realizado, porém modificando a sequência de aquisição de dados para a recuperação de inversão. As imagens de MRI da Figura 5.29 e Figura 5.30 mostram as fatias dos dois *phantoms* contendo também as mesmas seringas com soluções de nanopartículas com diferentes concentrações de ferro das sínteses S6, S8, S9 e Lumirem.

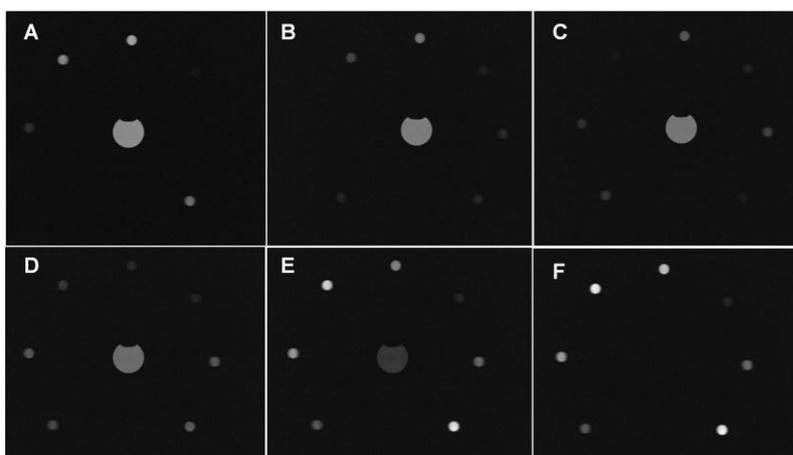


Figura 5.29. Imagens de MRI do primeiro *phantom* com TR de 3000 ms e TI de 50 (A), 90 (B), 130 (C), 200 (D), 600 (E), 1000 (F) ms.

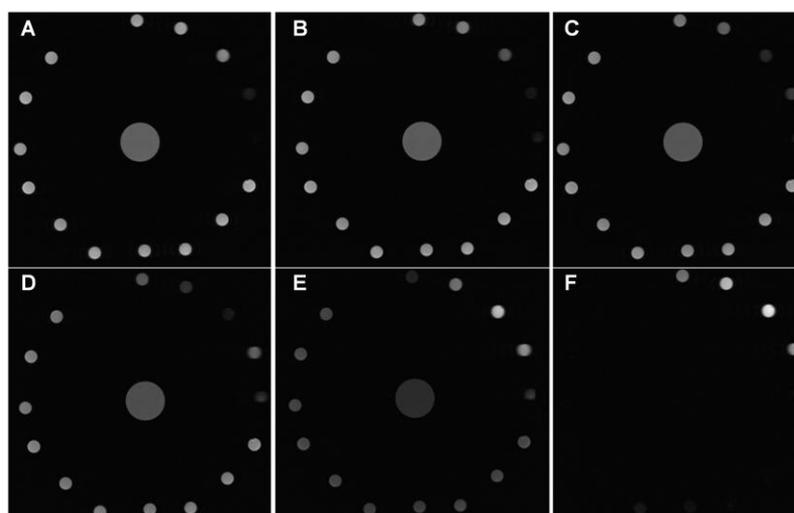


Figura 5.30. Imagens de MRI do segundo *phantom* com TR de 3000 ms e TI de 50 (A), 90 (B), 130 (C), 200 (D), 600 (E), 1000 (F) ms.

A intensidade do sinal em cada uma das seringas com as nanopartículas das sínteses S6, S8, S9 e Lumirem foram medidas em função do tempo de inversão (TI), e são mostradas nas Figuras 5.31, 5.32, 5.33 e 5.34. A partir da curva de ajuste das equações 3.10 e 3.12 obtiveram-se os tempos de relaxação T1.

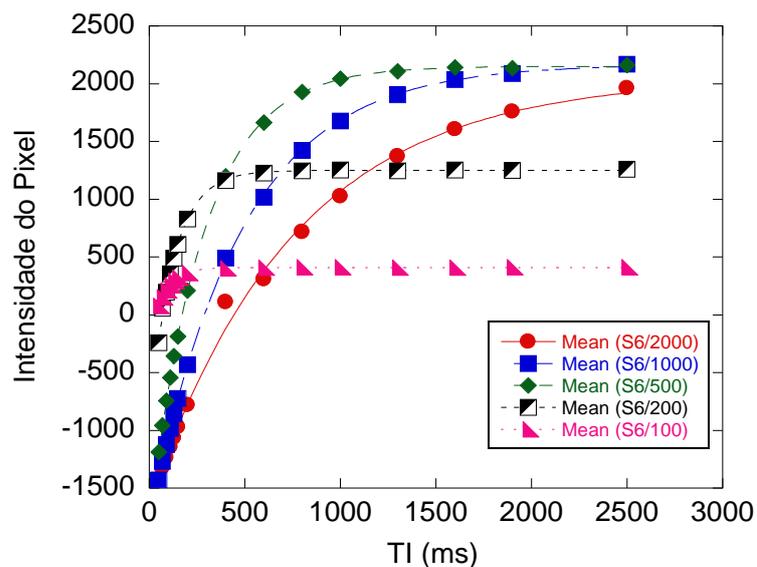


Figura 5.31. Curvas de intensidade do pixel em função de TI para as diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S6. As linhas são ajustes exponenciais aos dados.

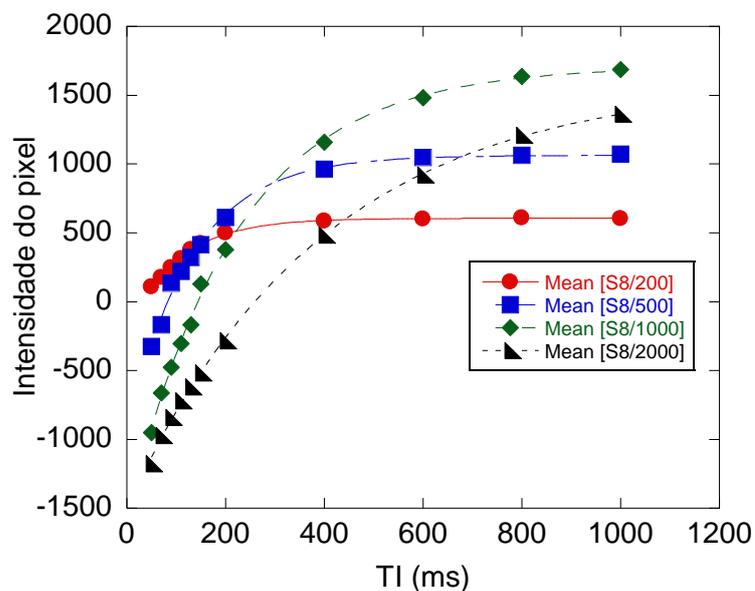


Figura 5.32. Curvas de intensidade do pixel em função de TI para as diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S8. As linhas são ajustes exponenciais aos dados.

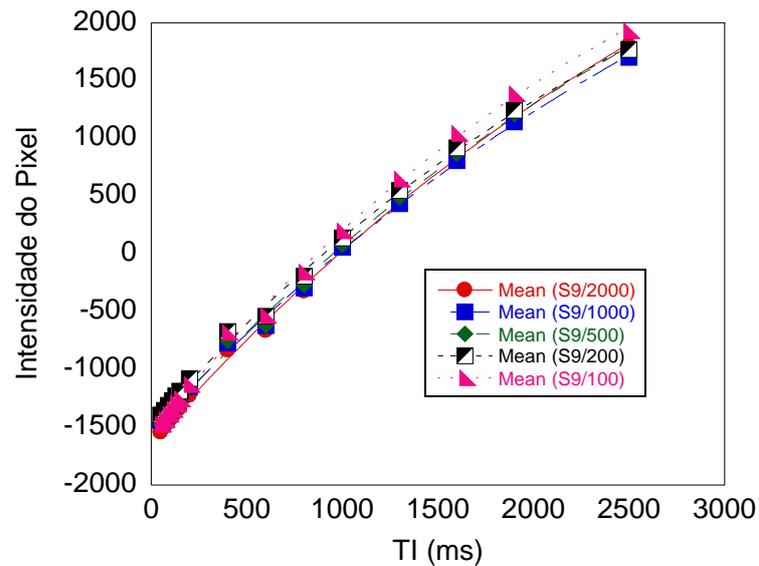


Figura 5.33. Curvas de intensidade do pixel em função de TI para as diferentes concentrações de nanopartículas da síntese S9. As linhas são ajustes exponenciais aos dados.

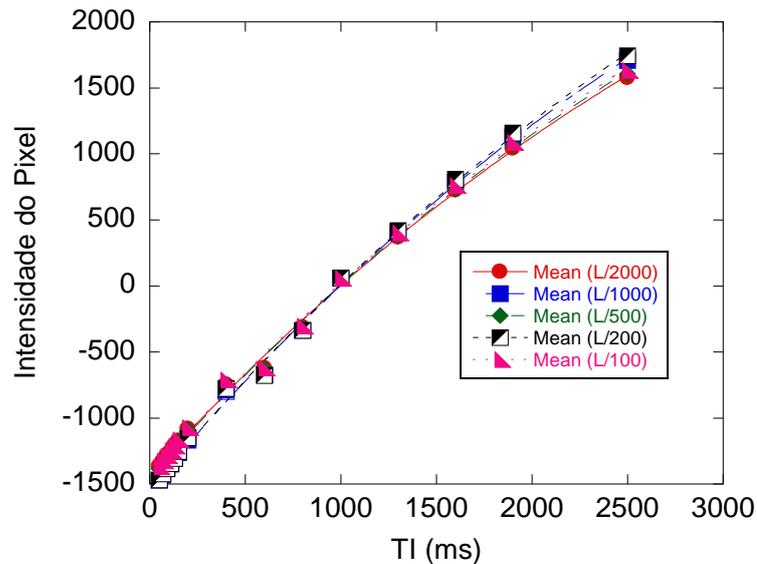


Figura 5.34. Curvas de intensidade do pixel em função de TI para as diferentes concentrações de nanopartículas do Lumirem. As linhas são ajustes exponenciais aos dados.

Para o ajuste destas curvas, utilizaram-se as Equações 3.09 e 3.12, já mencionadas no Capítulo 3.6, para obter os valores de tempo T1 e da taxa de relaxação R1 das nanopartículas em solução. Os valores de R1 obtidos da regressão dos pontos da curva para cada concentração estão representados na Tabela 5.7, juntamente com os valores tempo de relaxação longitudinal T1. A Figura

5.40 mostra o gráfico de R1 em função da concentração de ferro para as sínteses S6, S8, S9 e Lumirem.

Tabela 5.7. Valores da taxa de relaxação R1 e dos tempos T1 em função da concentração de ferro para as sínteses S6, S8, S9 e amostras de Lumirem.

Amostra	Fator de Diluição	Concentração de Fe (mg/mL)	T1 (ms)	R1 (Hz)
S6	100	0,0615	75,7	13,21
	200	0,0307	120,6	8,29
	500	0,0123	279,9	3,57
	1000	0,00610	474,4	2,11
	2000	0,00300	758,8	1,32
S8	100	0,112	-	-
	200	0,0560	70,21	14,24
	500	0,0224	128,2	7,80
	1000	0,0112	218,1	4,58
	2000	0,00560	393,2	2,54
S9	100	0,0188	2976,8	0,336
	200	0,00940	3271,7	0,310
	500	0,00380	3625,9	0,276
	1000	0,00190	3860,6	0,259
	2000	0,000900	3875,9	0,258
Lumirem	100	0,00175	2976,8	0,336
	200	0,000875	3271,7	0,316
	500	0,000350	3625,9	0,276
	1000	0,000175	3860,6	0,259
	2000	0,0000875	3875,9	0,258

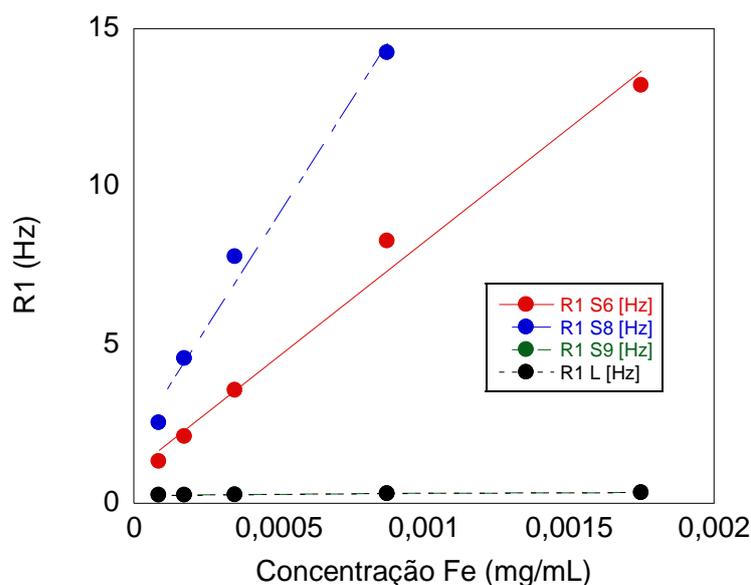


Figura 5.35. Gráfico da taxa de relaxação R1 em função da concentração de ferro para as sínteses S6, S8, S9 e Lumirem.

As retas dos gráficos da Figura 5.35 possuem uma declividade que representa a relaxividade, parâmetro físico importante para a classificação de um agente de contraste. A razão entre a relaxividade transversal e longitudinal (r_2/r_1) é um parâmetro de definição que indica se o agente de contraste pode ser utilizado como um agente de contraste positivo ou negativo. Os valores encontrados para as sínteses S6, S8, S9 e Lumirem estão representados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Valores da taxa de relaxividade das sínteses S6, S8, S9 e do Lumirem.

Amostra	r_2 (mMs) ⁻¹	r_1 (mMs) ⁻¹	r_2/r_1
S6	60,15	11,36	5,29
S8	73,76	12,98	5,68
S9	12,24	0,24	51,0
Lumirem	305,7	2,62	116,7

A eficiência de uma agente de contraste para MRI é avaliado de acordo com as relações da taxa de relaxividade r_1 e r_2 , ou seja, com as taxas em que os núcleos dos prótons de moléculas de água presente relaxam-se para a recuperação de seu estado de equilíbrio inicial. Os agentes de contraste denominados positivos possuem relaxividade r_2/r_1 com valores baixos, obtendo uma imagem clara onde o contraste está localizado. Os agentes de contraste denominados negativos, com relação de

r_2/r_1 maiores, diminuem a intensidade de sinal do campo onde estão localizadas as nanopartículas, revelando imagens de MRI negativas.

A relação entre as relaxividades r_2/r_1 encontradas para as nanopartículas das sínteses S6, S8, S9 e Lumirem foram de 5,06; 5,68; 51,0 e 116,7, respectivamente. O valor obtido para a síntese S9 foi maior em relação às sínteses S6 e S8. Isto pode ser atribuído ao tamanho das nanopartículas serem maior para a S9, bem como a concentração de ferro obtido para a síntese S9 um valor mais baixo do que para as demais sínteses, acarretando diferença no nível de intensidade do sinal e um decaimento de sinal mais longo.

Os valores de relaxividades obtidos estão dentro dos valores esperados para agentes de contraste de óxido de ferro comercialmente já disponíveis, o que pode ser consultado na Tabela 3.2, do Capítulo 3.3.2. O valor de relaxividade encontrado para o Lumirem foi acima do valor de relaxividade descritos na literatura.

6. CONCLUSÃO

Foram sintetizadas nanopartículas magnético CLIO-NH₂ (*Cross-Linked Iron Oxide*) com e sem fluoróforo com características adequadas para imageamento biomédico. A distribuição de tamanho das nanopartícula foi controlada ao variar a proporção de massa do polímero e de sais de ferro, a temperatura de reação e o tempo de reação durante a síntese. Os resultados da morfologia e distribuição de tamanhos das nanopartículas por TEM e DLS mostraram um núcleo de óxido de ferro cristalino com diâmetros médios em torno de 10-15 nm e diâmetros hidrodinâmicos médios entre 16-50 nm, dependendo do tipo de síntese. A mudança de temperatura de reação em até, aproximadamente, 20 °C e o tempo de reação tiveram pouca influencia na distribuição de tamanho. A variação na proporção de dextran revelou-se como o parâmetro mais eficaz para alterar o tamanho das nanopartículas (aproximadamente de 20 para 50 nm).

A análise por RBS e EDS indicou uma distribuição elementar compatível com a do óxido de ferro pela presença do elemento ferro e os espectros de FTIR das diferentes sínteses apresentaram pico característico de ligação Fe-O e bandas de absorção das moléculas de dextran, comprovando a formação do sistema *core-shell*.

Os valores obtidos de potencial zeta de todas as sínteses, exceto a síntese S7, revelaram uma carga superficial líquida positiva, provavelmente pela presença de grupos amina. Esta carga superficial positiva foi baixa, indicando que as nanopartículas foram estabilizadas por repulsão estérica. Para a síntese S7 (sem o processo de aminação), o valor do potencial zeta revelou uma carga superficial negativa, provavelmente pela presença de grupos hidroxilas. A dependência do pH em função do potencial zeta revelou também a estabilidade das nanopartículas no ponto isoelétrico, com valor de potencial zeta igual a zero em pH neutro (pH

fisiológico). A distribuição de tamanho das nanopartículas praticamente não variou em diferentes pH.

A curva de magnetização das nanopartículas não apresentou magnetização residual quando o campo magnético foi removido e nem histerese, indicando comportamento superparamagnético. A medida de magnetização mostrou que as nanopartículas maiores magnetizaram-se mais facilmente do que as nanopartículas menores. As amostras das nanopartículas liofilizadas e em solução aquosa apresentaram, visualmente, comportamento magnético mediante a um ímã de neodímio.

A incorporação do fluoróforo nas nanopartículas e sua análise por UV-vis revelou o pico de absorção característico no comprimento de onda do corante, em comparação com a mesma amostra de nanopartículas sem o corante. O teste celular no citômetro de fluxo revelou diferenças nos histogramas das células controle e das células com as nanopartículas fluorescentes. O deslocamento do pico de contagens de células em função da intensidade de fluorescência mostrou que uma pequena quantidade de células que continham os grupos fluoróforos presentes na solução.

As medidas de tempos de relaxação T1 e T2 mostraram efeitos de contraste das nanopartículas pelo decréscimo da intensidade de sinal de ressonância magnética, com o aumento da concentração nas soluções aquosas das nanopartículas, reduzindo os tempos de relaxação T1 e T2, bem como um aumento de contraste negativo (escurecimento do sinal nas imagens dos *phantoms*). Os valores da taxa de relaxação r_1 variaram de 11,36 a 2,62 (mMs)⁻¹ e para r_2 de 60,15 a 305,7(mMs)⁻¹. A razão entre as relaxividades r_2/r_1 encontradas para as sínteses S6, S8, S9 e Lumirem foram de 5,68; 5,29; 51,0 e 116,7, respectivamente. Os valores de relaxividade das nanopartículas de óxido de ferro obtidas estão dentro dos valores esperados para agentes de contraste compostos por óxido de ferro, podendo ser utilizadas como agente de contraste T2.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

No decorrer deste trabalho, visou-se o desenvolvimento de nanopartículas, suas modificações, caracterizações e simulações de testes para seu uso como agente de contraste para MRI.

As nanopartículas desenvolvidas formam uma plataforma genérica que pode ser usada para customizar diversas classes de nanopartículas, através da variação da funcionalização das suas superfícies.

Uma aplicação promissora é na área de imageamento molecular para detecção de biomoléculas. Diferentes tipos de receptores têm sido estudados para acoplar as nanopartículas em testes tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. Para uma marcação específica, biosondas podem ser conjugadas na superfície das nanopartículas, como no caso de identificação um determinado tipo de proteína os anticorpos contra a proteína podem ser conjugados na superfície das nanopartículas funcionalizadas ou para o imageamento de células do sistema linfático, medula óssea hepática, entre outros.

Portanto, em trabalhos futuros alguns tópicos poderiam ser explorados. A influência das possíveis variações estruturais nas nanopartículas ao longo do tempo (envelhecimento), seu comportamento em diferentes culturas celulares pela determinação cinética de absorção e localização das mesmas em testes *in vitro* e o estudo da afinidade das nanopartículas com diferentes ligantes peptídicos inseridos em sua superfície.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] HORNYAK, G.L. et al. **Introduction to Nanoscience**. 1ª ed. Boca Raton: CRC, 2008, 815 p.

[2] BERGER, P.; ADELMAN, N. B.; BECHMAN, K. J.; CAMPBELL, D. J.; ELLIS, A. B. **Preparation and properties of an aqueous ferrofluid**. Journal of Chemical Education, v. 76, nº 7, 943-948 p, 1999.

[3] COELHO, J. P. **Avaliação da biocompatibilidade de magnetolipossomas à base de nanopartículas de maghemita**. Brasília. 2008. 85p. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular. Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília, Brasil.

[4] QIAO, R.; YANG, C.; GAO, M. **Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications**. Journal of Materials Chemistry: v. 19, p. 6274-6293, 2009.

[5] McCARTHY, J; WEISSLEDER, R. **Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy**. Advanced Drugs Delivery Reviews: v. 60, p. 1241-1251, 2008.

[6] MÜLLER, K.; SKEPPER, J. N.; POSFAI, M.; TRIVEDI, R. et al. **Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro**. Biomaterials: v. 28, p. 1629-1642, 2007.

[7] SINGH, R.; LILLARD JR, J. W.; **Nanoparticle-based targeted drug delivery**. Experimental and Molecular Pathology: v. 86, nº 3, p. 215-223, 2009.

- [8] PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. **Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine.** Journal of Physics D: Applied Physics, v. 36, p. R167-R181, 2003.
- [9] LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. **Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications.** American Chemical Society: v. 108, p. 2064-2110, 2008.
- [10] SCHLADT, T.; SCHNEIDER, K.; SCHILD, H; TREMEL, W. **Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment.** Dalton Transactions: v. 40, p. 6315-6343, 2011.
- [11] QIAO, R.; YANG, C.; GAO, M. **Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications.** Journal of Materials Chemistry: v. 19, p. 6274-6293, 2009.
- [12] FIGUEROLA, A.; CORATO, R. D.; MANNA, L.; PELLEGRINO, T. **From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications.** Pharmacological Research: v. 62, p. 126-143, 2010.
- [13] GUPTA, A. K.; GUPTA, M. **Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.** Biomaterials, v. 26, p. 3995-4021, 2005.
- [14] MUTHIAH, M.; PARK, I. K.; CHO, C. S. **Surface modification of iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting.** Biotechnology Advanced: v. 13, p. 1-13, 2013.
- [15] EISBERG, R. RESNICK, R. **Física Quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas.** 2ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 1979. 928p.

- [16] CALLISTER, W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC. 2000. 589p.
- [17] TIPLER, P. A. MOSCA, G. **Física**. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC. 2006. 550p.
- [18] POOLE, C. P. OWENS, F. J. **Introducción a la nanotecnología**. Barcelona: Reverté. 2007. 407p.
- [19] PASSOS, A. G. **Magnetismo e ressonância magnética em sólidos**. 1ª ed. São Paulo: Edusp. 2009. 360p.
- [20] TEJA A. S.; KOH, P. Y. **Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles**. Progress in crystal growth and characterization of materials, v. 55, p. 22-45, 2009.
- [21] CULLITY, B. D. GRAHAM, C. D. **Introduction to magnetic materials**. 2ª ed. Hoboken: Wiley. 2009. 544p.
- [22] WEISSLEDER, R. ROSS, B. D. REHEMULLA, A. GAMBHIR, S. S. **Molecular imaging: principles and practice**. Connecticut: PMHM-USA. 2010. 1357.
- [23] SOUZA, N. S. **Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro e de grafite magnética fluida (GMF)**. São Carlos. 2008. 100p. Dissertação de Mestrado em Física. Faculdade de Física. Universidade de São Carlos, Brasil.
- [24] LU, A.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. **Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application**. Angewandte Chemie, v. 46, p. 1222-1244, 2007.
- [25] FREY, N. A.; PENG, S.; CHENG, K.; SUN, S. **Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage**. Royal Chemistry Society, v. 38, p. 2532-2542, 2009.

- [26] BOHN, F. **Magnetostricção e ruído Barkhausen em aços elétricos de grão não-orientado**. Santa Maria. 2005. 104p. Dissertação de Mestrado em Física. Universidade Federal de Santa Maria, Brasil.
- [27] BURSTEIN, E. COHEN, M. L. MILLS, D. L. STILES, P. J. **Nanomagnetism - ultrathin films, multilayer and nanostructures**. 1ª ed. Amsterdam: Elsevier. 2006. 337p.
- [28] CORNELL, M. R. SCHWERTMANN, U. **The oxides-structure, properties, reaction, occurrences and uses**. 2ª ed. Freising: Wiley-VHC. 2003. 664p.
- [29] COSTA, A. F.; PIMENTEL, P. M.; MELO, D. M. A.; MELO, M. A. F.; AQUINO, F. M. **Síntese e caracterização de espinélios à base de ferritas com gelatina como agente direcionador**. Cerâmica, v. 57, p. 353-355, 2011.
- [30] GLEITER, H. **Nanostructured materials: basic concepts and microstructure**. Acta Materialia. v. 48, p. 1-29, 2000.
- [31] KOCH, C. C. **Nanostructured materials: processing, properties and potencial applications**. 1ª ed. New York: Noyes. 2002. 612 p.
- [32] LU, K. **Nanocrystalline metals crystallized from amorphous solids: nanocrystallization, structure, and properties**. Materials Science & Engineering, v. R16, p. 161-221, 1996.
- [33] ZHANG, L. W.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. **Mechanisms of Quantum Dot Nanoparticle Cellular Uptake**. Toxicological Science, v. 110, p. 138-155, 2009.
- [34] YU, F.; ZHANG, L.; HUANG, Y.; SUN, K.; DAVID, A. E.; YANG, V. C. **The magnetophoretic mobility and superparamagnetism of core-shell iron oxide nanoparticles with dual targeting and imaging functionality**. Biomaterials, v. 31, p. 5842-5848, 2010.

- [35] X.Q. XU, X. Q.; SHEN, H.; XU, J. R.; XU, J.; LI, J. X.; XIONG, X. M. **Core-shell structure and magnetic properties of magnetite magnetic fluids stabilized with dextran.** Applied Surface Science, v. 252, p. 494-500, 2005.
- [36] KOO, O. M.; RUBINSTEIN, R.; ONYUKSEL, H. **Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review.** Nanomedicine: Nanotechnology and Medicine, v. 1, p. 193-212, 2005.
- [38] AGRAWAL, P.; STRIJKERS, G. NICOLAY, K.; **Chitosan-based systems for molecular imaging.** Advanced Drug Delivery Reviews: v. 62, p. 42-58, 2010.
- [37] THOREK, D. L. J.; CHEN, A. K.; CZUPRYNA, J.; TSOURKAS, A. **Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Probes for Molecular Imaging.** Annals of Biomedical Engineering: v. 34, n° 1, p. 23-28, 2006.
- [39] WANG, Y. X. J.; HUSSAIN, S. M.; KRESTIN, G. P. **Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging.** European Radiology: v. 11, p. 2319-2331, 2001.
- [40] GOSSUIN, Y.; GILLIS, P.; HOCQ, A.; VUONG, Q. ROCH, A. **Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles.** Advanced Reviews: v. 1, p. 299-310, 2009.
- [41] KOCH, C. C. **Nanostructured materials: processing, properties and applications.** 2^a ed. New York: William Andrew Publishing. 2007. 719 p.
- [42] MAHMOUDI, M.; SANT, S.; WANG, B.; LAURENT, S.; SEN, T. **Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy.** Advanced drug delivery reviews: v. 63, p. 24-46, 2011.
- [43] OSS, C. J. V.; NORDE, W. VISSER, H. **DLVO Theory.** Colloids and Surfaces B, v. 14, 1-2p, 1999.

- [44] HONG, R. Y.; FENG, B.; CHEN, L. L.; LIU, G. H.; LI, H. Z.; ZEHNG, Y.; WEI, D. G. **Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles**. *Biochemical Engineering Journal*: v. 42, p. 290-300, 2008.
- [45] LARSEN, C. **Dextran prodrugs - structure and stability in relation to therapeutic activity**. *Advanced Drug Delivery Reviews*: v. 3, p. 103-154, 1989.
- [46] MEHVAR, R. **Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents**. *Journal of controlled release*: v. 69, p. 1-25. 2000.
- [47] WEISSLEDER, R.; STARK, D. D.; ENGELSTAD, B. L.; BACON, B. R.; et al. **Superparamagnetic iron oxide: Pharmacokinetics and toxicity**. *American Journal of Roentgenology*: v. 152, p. 167-173, 1989.
- [48] JOZEFONVICZ, J.; CREPON, B.; CHYTRY, V.; et al. **Enzymatic degradation and immunogenic properties of derivatized dextrans**. *Biomaterials*: v. 12, p. 550-554, 1991.
- [49] SCHNEPP, Z.; WIMBUSH, S. C.; ANTONIETTI, M.; GIORDANO, C. **Synthesis of Highly Magnetic Iron Carbide Nanoparticles via a Biopolymer Route**. *Chemistry Material*: v. 22, 5340-5344, 2010.
- [50] AN, H.; AHN, H. J. **A change in morphology from anatase-TiO₂ nanoparticles to anatase-TiO₂ nanoflakes via electrospray**. *Materials Letters*: v. 81, 41-44, 2012.
- [51] QASEM, R. A. M.; GEDANKEN, A. **Sonochemical synthesis of stable hydrosol of Fe₃O₄ nanoparticles**. *Journal of Colloids and Interface Science*: v. 284, 489-494, 2005.
- [52] ROSEN, J. E.; CHAN, L.; SHIEH, D. B.; GU, F. X. **Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics**. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*: v. 8, p. 275-290, 2012.

- [53] HAHN, M. A.; SINGH, A. K.; SHARMA, P.; BROWN, S. C.; MOUDGIL, B. M. **Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives.** Anal Bioanal Chemistry, v. 399, p. 3-27, 2011.
- [54] ALTINOGLU, E. I.; ADAIR, J. H. **Near infrared imaging with nanoparticles.** Advanced Review, v. 2, p. 461-477, 2010.
- [55] JOSEPHSON, L.; KIRCHER, M. F.; MAHMOOD, U.; TANG, Y.; WEISSLEDER, R. **Near-Infrared Fluorescent Nanoparticles as Combined MR/Optical Imaging Probes.** Bioconjugate Chemistry, v. 13, p. 554-560, 2002.
- [56] MISHRA, A.; BEHERA, R. K.; BEHERA, P. K.; MISHRA, B. K.; BEHERA, G. B. **Cyanines during the 1990s: A Review.** Chemical Review, v. 100, p. 1973-2011, 2000.
- [57] FENT, K.; WEISBROD, C. J.; WIRTH-HELLER, A.; PIELES, U. **Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages.** Aquatic Toxicology, v. 100, p. 218-228, 2010.
- [58] CHO, W. S.; CHO, M.; KIM, S. R.; CHOI, M.; LEE, J. Y.; HAN, B. S.; PARK, S. N.; YU, M. K.; JON, S.; JEONG, J. **Pulmonary toxicity and kinetic study of Cy5.5-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles by optical imaging.** Toxicology and Applied Pharmacology, v. 239, p. 106-115, 2009.
- [59] CHA, E. J.; JANG, E. S.; SUN, I. C.; LEE, I. J.; KO, J. H.; KIM, Y. I.; KWON, I. C.; KIM, K.; AHN, C. H. **Development of MRI/NIRF 'activatable' multimodal imaging probe based on iron oxide nanoparticles.** Journal of Controlled Release, v. 155, p. 152-158, 2011.
- [60] **Fluorescence Screening Reagentes Guide.** Amersham Bioscience, 2003.
- [61] LIU, T. Y.; HU, S. H.; LIU, D. M.; CHEN, S. Y.; CHEN, I. W. **Biomedical nanoparticle carriers with combined thermal and magnetic responses.** Nano Today: v. 4, p. 52-65, 2009.

- [62] MOORE, A.; MARECOS, E.; BOGDANOV JR, A.; WEISSLEDER, W. **Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model.** *Radiology*: v. 214, 568-574, 2000.
- [63] MIKHAYLOVA, M.; KIM, D. K.; BERRY, C. C.; ZAGORODNI, A.; TOPRAK, M.; CURTIS, A. S. G.; MUHAMMED, M. **BSA Immobilization on Amine-Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles.** *Chemistry of Materials*: v. 16, 2344-2354, 2004.
- [64] ATANASIJEVIC, T.; SHUSTEFF, M.; FAM, P.; JASANOFF, A. **Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences: V. 103*, 14707-14712, 2006.
- [65] WEI, C.; WEI, W.; MORRIS, M.; et al. **Nanomedicine and Drug Delivery.** *Clinics of North America*: v. 91, p. 863-870, 2007.
- [66] CARRILLO, A.; SERRANO, E.; LUQUE, R.; MARTÍNEZ, J. G. **Microwave-assisted catalysis by iron oxide nanoparticles on MCM-41: Effect of the support morphology.** *Applied Catalysis A: General*: v. 453, p. 383-390, 2013.
- [67] MOODLEY, P.; SCHEIJEN, F. J. E.; NIEMANTSVERDIET, J. W.; THÜNE, P. C. **Iron oxide nanoparticles on flat oxidic surfaces-Introducing a new model catalyst for Fischer–Tropsch catalysis.** *Catalysis Today*: v. 154, 142-148, 2010.
- [68] SREEDHAR, B. K.; KUMAR, R. N.; SHARMA, P.; RUHELA, S.; et. al. **Development of active magnetic bearings and ferrofluid seals toward oil free sodium pumps.** *Nuclear Engineering and Design*: v. X, p. 1-9, 2013.
- [69] CIGLANSKÁ, M.; JANCOVICOVÁ, V.; HAVLÍNOVÁ, B.; MACHATOVÁ, Z.; BREZOVÁ, V. **The influence of pollutants on accelerated ageing of parchment with iron gall inks.** *Journal of Cultural Heritage*: v. X, p. 1-9, 2013.

[70] CHOI, H.; CHOI, S. R.; ZHOU, R.; KUNG, H. F.; CHEN, W. **Iron Oxide Nanoparticles as Magnetic Resonance Contrast Agent for Tumor Imaging via Folate Receptor-targeted Delivery.** *Academic Radiology*, v. 11, n° 9, 996-1004 p, 2004.

[71] NA, H. B.; SONG, I. C.; HYEON, T. **Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents.** *Advanced Materials*: v. 21, 2133-2148, 2009.

[72] LIU, G.; HONG, R. Y.; GUO, L.; LI, Y. G.; LI, H. Z. **Preparation, characterization and MRI application of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles.** *Applied Surface Science*: v. 257, 6711-6717, 2011.

[73] NEUWELT, E. A.; VÁRALLYAY, P.; BAGÓ, A. G.; MULDOON, L. L.; NESBIT, G.; NIXON, R. **Imaging of iron oxide nanoparticles by MR and light microscopy in patients with malignant brain tumours.** *Neuropathology and Applied Neurobiology*: v. 30, 456-471, 2004.

[74] BULTE, J. W.; KRAITCHMAN, D. L. **Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging.** *Nmr in Biomedicine*: v. 17, 484-499, 2004.

[75] MOMOSE, A.; TAKEDA, T.; ITAI, Y.; HIRANO, K. **Phase-contrast X-ray computed tomography for observing biological soft tissue.** *Nature Medicine*, v. 2, n° 4, p. 473-475, 1996.

[76] HENGERER, A.; GRIMM, J. **Molecular magnetic resonance imaging.** *Biomedical Imaging and Intervention Journal*, v. 2, p. 1-7, 2006.

[77] WADAS, T. J.; WONG, E. H.; WEISMAN, G. R. **Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease.** *Chemical Review*, v. 110, n° 5, p. 2858-2902, 2010.

[78] DEBBAGE, P.; JASCHKE, W. **Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors.** *Histochemistry and Cell Biology*, v. 130, p. 845-875, 2008.

- [79] MAZZOLA, A. A. **Ressonância magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional**. Revista Brasileira de Física Médica. V. 3 (1), p. 117-129, 2009.
- [80] HUETTEL, S. A. SONG, A. W. MCCARTHY. **Funcional Magnetic Resonance Imaging**. 2ª ed. Sunderland: Sinauer, 2009, 542p.
- [81] ROBERTS, P. A. WILLIAMS, J. **Farr's Physics for Medical Imaging**. 2ª ed. Edinburgh: Saunders, 2008, 199p.
- [82] Alves, T. M. M. T. **Síntese e caracterização de nanopartículas de óxidos de ferro para aplicações biomédicas**. Campinas, 2007. 99 p. Dissertação de Mestrado em Física. Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- [83] JIANBIN TANG, J.; SHENG, Y.; HU, H.; SHEN, Y. **Macromolecular MRI contrast agents: Structures, properties and applications**. Progress in Polymer Science, v. 38, p. 462-502, 2013.
- [84] YAN, Y.; JIE, W. Y.; JUN, Z. W.; JING, L. X.; KUI, P. F. **Research Progress of Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents**. Chinese Journal of Analytical Chemistry, v. 39, nº 5, p. 757-764, 2011.
- [85] HAYAT, M. A. Cancer Imaging. Chapter 4: **Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: An Overview**. 1ª ed. Elsevier Academic Press: Burlington, 2008, 656p.
- [86] XIANG, Y.; WANG, J. **Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application**. Quantitative Imaging Medicine and Surgery: v. 1, p. 35-40, 2011.
- [87] WUNDERBALDINGER, P.; JOSEPHSON, L.; WEISSLEDER, R. **Crosslinked iron oxides (CLIO): a new platform for the development of target MR contrast agents**. Academic Radiology: v. 9, p. S304-S306, 2002.

[88] STEPHEN PALMACCI, Walpole. LEE JOSEPHSON, Arlington. AdvancedMagnetics, Cambridge. **Synthesis of polysaccharide covered superparamagnetic oxide colloids**. Int.Cl.5 G01N24/08; B01J 13/02; A61M 37/00; A61K 33/26. EUA 5,262,176. May 2nd, 1991. Nov 16th, 1993. United States Patent, Massachusetts, p. 1-16.

[89] PAVIA, D. L. LAMPMAN, G. M. KRIZ, G. S. VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**. 4^a ed. Belmont: Cengage learning. 2009. 657p.

[90] STOPPLER, M. **Techniques and instrumentation in analytical chemistry: hazardous metals in the environment**. Amsterdam: Elsevier. 1992. 535p.

[91] REIMER, L. KOHL, H. **Transmission electron microscopy**. 5^a ed. Münster: Springer. 2008. 589p.

[92] BRUNDLE, C. R. EVANS, C. A. WILSON, S. **Encyclopedia of materials characterization**. Stoneham: Manning Publications Co. 1992. 745p.

[93] YASUDA, E. INAGAKI, M. KANEKO, M. OYA, A. TANABE, Y. **Carbon alloys: novel concept to develop carbon science and technology**. Oxford: Elsevier. 2003. 563p.

[94] MALISKA, A. M. **Microscopia eletrônica de varredura – UFSC**. Florianópolis. 97p.

[95] MAYER, M. Rutherford Backscattering Spectrometry (RBS). In: **Workshop on Nuclear Data of Science and Technology: Materials Analysis**: 2003, Trieste. 59-78p.

[96] www.kobelcoco.jp/english/machinery/products/function/hrbs/analysis/genri.html - (acessado em 04/09/2013)

[97] CHU, W. K.; MAYER, J. W.; NICOLET, M. A. **Backscattering Spectroscopy**. Academic Press, 1978. 384p.

- [98] PECORA, R. **Dynamic Light scattering: applications of photon correlation spectroscopy**. John Wiley & Sons: New York, 1976.
- [99] **Malvern Instruments Zetasizer Nano Series User Manual**. Malvern Instrumetns Ltd. Worcestershire, 2004.
- [100] Tscharnuter, W. **Photo correlation spectroscopy in particle sizing**. Encyclopedia of Analytical Chemistry. New York: Brookhaven Instruments Corporation. 2000. 16p.
- [101] SILVERTEIN, R. M. BASSLER, G. C. MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de composto orgânico**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabarra Koogan. 1994. 87p.
- [102] ZIJLSTRA, H. **A vibrating reed magnetometer for microscopic particles**. API Reviews Scientific Instruments. V. 41, p. 1241, 1970.
- [103] ASHCROFT, G.; TERRY, I. **Resonant properties of a Flanders alternating gradient field magnetometer: influence of temperature and magnetic moment**. Meas. Sci. Technol. V. 17, p. 2263-2268, 2006.
- [104] GIVAN, A. L. **Flow Cytometry, First Principles**. 2^a ed. Canada, Wiley-Liss. 2001. 296p.
- [105] ORMEROD, M. G. **Flow Cytometry**. 3^a ed. Oxford, Oxford University Press. 2000. 296p.
- [106] LIMA, F. A. P.. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas como agente de contraste em imagens biomédicas**. Porto Alegre. 2012. 91p. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.
- [107] BAUTISTA, M. C.; MIGUEL, O. B.; MORALES, M. O.; SERNA, C. J.; VERDAGUER, S. V. **Surface characterization of dextran-coated iron oxide**

nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 293, p. 20-27, 2005.

[108] HONG, R. Y.; LI, J. H.; QU, J. M.; CHEN, L. L.; LI, H. Z. **Preparation and characterization of magnetite/dextran nanocomposite used as a precursor of magnetic fluid.** Chemical Engineering Journal, v. 150, p. 572-580, 2009.

[109] HONG, R. Y.; FENG, B.; CHEN, L. L.; LIU, G. H.; LI, H. Z.; ZHENG, Y.; WEI, D. G. **Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles.** Biochemical Engineering Journal, v. 42, p. 290-300, 2008.

[110] RAVIKUMAR, C.; KUMAR, S.; BANDYOPADHYAYA, R. **Aggregation of dextran coated magnetic nanoparticles in aqueous medium: Experiments and Monte Carlo simulation.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect, v. 403, p. 1-6, 2012.

[111] RUSSIER, V.; MONTFERRAND, C.; LALATONNE, Y.; MOTTE, L. **Size and polydispersity effect on the magnetization of densely packed magnetic nanoparticles.** Journal of Applied Physics, v. 112, p.073926-1-073926-11, 2012.

[112] JOSEPHSON, L.; KIRCHER, M. F.; MAHMOOD, U.; TANG, Y.; WEISSLEDER, R. **Near-Infrared Fluorescent Nanoparticles as Combined MR/Optical Imaging Probes.** Bioconjugate Chemistry, v. 13, 554-560, 2002.