

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Pedro Manuel Abreu Martins

**Produção e caracterização de
nanopartículas magnéticas para
aplicação biotecnológica**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Pedro Manuel Abreu Martins

**Produção e caracterização de
nanopartículas magnéticas para
aplicação biotecnológica**

Dissertação de Mestrado em Micro
e Nano Tecnologias

Trabalho realizado sob a orientação do
Professor Doutor Gerardo Rocha
e co-orientação do
**Professor Doutor Senentxu
Lanceros Méndez**

Outubro de 2011

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A
REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Várias pessoas contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Quero agradecer a algumas delas de forma especial.

Agradeço ao professor Senentxu a oportunidade de realizar um trabalho, do meu agrado, num grupo dinâmico, onde desenvolvi competências científicas e sociais valiosas. Referir ainda o seu útil pragmatismo científico e a sua sensibilidade para questões pessoais, extra-trabalho, tão invulgar no meio científico.

À Cristina, um sentido obrigado pela sua atitude proativa, pela eficiente coordenação dos trabalhos e por partilhar com a equipa o seu otimismo e energia positiva, essenciais nos momentos mais atribulados.

Ao professor Gerardo, uma palavra de grande apreço pelo seu tempo de qualidade e disponibilidade na elaboração da tese.

Endereço ainda uma palavra de agradecimento ao professor Carlos Silva pelo seu tempo e contributo nos ensaios de remoção de metais em água.

Dos colegas de laboratório, agora amigos, devo realçar em primeiro lugar o Renato, por ter desempenhado um papel crucial na minha integração no grupo e por ser uma pessoa generosa a todos os níveis. Apadrinhou o meu retorno ao trabalho laboratorial e foi um verdadeiro catalisador nesse mesmo processo.

Um agradecimento ainda para a Daniela e Juliana, que muito contribuíram para um bom ambiente de trabalho, facilitando um harmonioso desenvolvimento do mesmo.

À Susana, não um agradecimento mas uma saudação especial, pelo seu bom humor que, não poucas vezes, emprestou aos presentes na salinha.

Ao Gabriel, por ser um exemplo enquanto investigador e pela sua capacidade de, com as suas opiniões e conhecimentos, nos fazer refletir sobre o nosso trabalho e atitudes, deixo aqui um agradecimento muito merecido. Mantém esse genuíno entusiasmo pela Ciência!

Aos amigos Gabriel, Liliana e Sara “devo” momentos de trabalho e de lazer inesquecíveis, durante todo mestrado, e por isso também os saúdo.

À família, sem a qual nada seria possível, obrigado!



Resumo

Nas últimas décadas têm-se assistido a importantes desenvolvimentos na área dos nanomateriais. Exemplo disso é a crescente aplicação biotecnológica de nanopartículas magnéticas. Para isso, muito contribuiu a aplicação de novos métodos de síntese, que permitiram um controlo profícuo do tamanho, propriedades magnéticas e propriedades da superfície das nanopartículas. Assim sendo, o objectivo deste trabalho foi otimizar um método de síntese de nanopartículas magnéticas, caracterizá-las e aplicar as mesmas – avaliando o seu desempenho.

Para sintetizar nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foi empregue o método de coprecipitação. A utilização de ácido cítrico como agente estabilizador/surfatante das nanopartículas mostrou-se eficaz, obtendo-se partículas menores e mais estáveis.

A caracterização permitiu obter valores para o tamanho das nanopartículas por dispersão dinâmica de luz (21,9 nm), difração de raios-X (17,91 nm) e microscopia eletrónica de transmissão (10 nm). Por difração de raios-X foi ainda possível identificar a estrutura cristalina da amostra e indexá-la à maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). A morfologia prismática foi observada por análise das imagens de microscopia eletrónica de transmissão. O estudo da carga superficial das partículas (potencial ζ) revelou que as nanopartículas são pouco estáveis (tendência a aglomerar), sendo que o revestimento da superfície é fundamental para a sua estabilização e aplicação.

Na última fase do trabalho, foram produzidas esferas (≈ 400 nm) com nanopartículas aprisionadas em matriz porosa de sílica. Para o efeito foi aplicado o método de Stober combinado com tratamento hidrotermal. Foi usado brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) como agente surfatante e a aplicação do processo hidrotermal (120 °C durante 48 h) assegurou uma boa distribuição de tamanhos das esferas magnéticas porosas de sílica. A morfologia esférica e porosa foi confirmada por microscopia eletrónica de transmissão e por microscopia eletrónica de varrimento.

As esferas obtidas foram testadas como adsorventes de catiões de níquel em solução aquosa. Os estudos realizados por espectroscopia de absorção atómica mostraram que 100% do conteúdo de Ni^{2+} foi removido com sucesso da solução aquosa, sem necessidade de funcionalizar (e.g. quelantes) a superfície da sílica.

Abstract

In the last few decades huge developments were achieved in nanomaterials science. These breakthroughs were in part a consequence of the application of new magnetic nanoparticles production methods, allowing an efficient control of their size, magnetic and surface properties. Therefore, the goal of this work lied on the optimization of synthesis, characterization, and application of magnetic nanoparticles – studying their efficiency.

To synthesize iron oxide magnetic nanoparticles it was used the coprecipitation method. Additionally, the application of citric acid proved to be an efficient surfactant, producing smaller and more stable nanoparticles.

The size of nanoparticles was accessed by dynamic light scattering (21.09 nm), X-ray diffraction (1791 nm) and transmission electron microscopy (10 nm). X-ray diffraction also allowed the identification of the crystalline structure of the samples and indexing it to maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). The prismatic morphology of magnetic nanoparticles was observed through transmission electron microscopy image analysis. The nanoparticles surface charge (zeta potential) study revealed that nanoparticles are unstable (tend to agglomerate), showing the importance of a coating process to stabilize and allow their efficient application.

In the last phase of the work, porous magnetic silica spheres of about 400 nm diameter were synthesized using the classical Stober method combined with hydrothermal treatment. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was used as surfactant agent. The application of the hydrothermal process (120 °C during 48h), before the calcination, led to formation of homogeneous and narrow size distribution porous magnetic silica spheres.

The obtained silica spheres were evaluated as adsorbents for nickel cations in aqueous solution. The results, obtained by atomic absorption spectrometric method, showed that 100% of the Ni^{2+} content was successfully removed from the aqueous solution without need of functionalizing the silica surface.

Índice

| | |
|--|------|
| Agradecimentos | iii |
| Resumo..... | v |
| Abstract | vi |
| Índice | vii |
| Índice de figuras | ix |
| Índice de tabelas | xiii |
| Abreviaturas | xv |
| Capítulo 1 :Introdução: | 1 |
| Capítulo 2 :Estado da Arte: | 5 |
| 2.1 – Nanopartículas de óxidos de ferro | 7 |
| 2.2 – Propriedades magnéticas..... | 8 |
| 2.3 – Síntese de nanopartículas magnéticas..... | 12 |
| 2.3.1- Métodos de síntese | 12 |
| 2.3.1.1- Coprecipitação | 12 |
| 2.3.1.2- Decomposição térmica | 15 |
| 2.3.1.3- Reação sol-gel | 16 |
| 2.3.1.4- Síntese hidrotermal | 17 |
| 2.3.1.5- Síntese em microemulsão..... | 17 |
| 2.4- Revestimento/Funcionalização de nanopartículas..... | 18 |
| 2.5- Aplicações das nanopartículas magnéticas | 21 |
| 2.5.1- Ressonância magnética por imagem | 21 |
| 2.5.2- Endereçamento de fármacos | 21 |
| 2.5.3 – Hipertermia | 22 |
| 2.5.4 – Separação ambiental | 23 |
| 2.5.5 – Magnetofecção | 23 |
| Capítulo 3 :Material e métodos: | 25 |
| 3.1- Material..... | 27 |
| 3.2- Síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro..... | 27 |
| 3.2.1 – Estabilização da superfície das nanopartículas com ácido cítrico | 27 |
| 3.2.2 – Efeito da concentração de sais de ferro no meio | 28 |

| | |
|---|----|
| 3.2.3 – Efeito da concentração de AC nas nanopartículas..... | 28 |
| 3.3 – Produção de esferas magnéticas de sílica para remoção de níquel em solução aquosa | 29 |
| 3.3.1 – Revestimento das nanopartículas magnéticas com sílica | 29 |
| 3.3.2 – Remoção de íons de níquel em solução aquosa | 30 |
| 3.4 – Técnicas de caracterização das nanopartículas..... | 31 |
| 3.4.1 – Microscopia eletrônica de transmissão | 32 |
| 3.4.2 - Microscopia eletrônica de varrimento | 33 |
| 3.4.3 – Difração de raios-X..... | 34 |
| 3.4.4 - Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier | 36 |
| 3.4.5 – Dispersão dinâmica de luz..... | 37 |
| 3.4.6 – Potencial Zeta..... | 38 |
| 3.4.7 – Magnetoforese..... | 40 |
| 3.5 – Espectroscopia de absorção atômica | 42 |
| Capítulo 4 :Resultados e discussão: | 45 |
| 4.1 – Efeito da concentração de sais de ferro no meio | 47 |
| 4.2 – Efeito da concentração de ácido cítrico nas nanopartículas | 49 |
| 4.3 – Caracterização das nanopartículas magnéticas..... | 50 |
| 4.4 – Esferas magnéticas de sílica para remoção de níquel em solução aquosa..... | 56 |
| Capítulo 5 :Conclusões e perspectivas futuras: | 65 |
| Bibliografia | 69 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 2.1 - Estrutura cristalina da hematite (a) e da magnetite (b) – Maghemite é semelhante à magnetite. Adaptado de (Teja and Koh 2009). | 7 |
| Figura 2.2 - Alinhamento de momentos magnéticos atômicos individuais em diferentes tipos de materiais. a) ferromagnéticos; b) antiferromagnéticos; c) ferrimagnéticos e d) paramagnéticos. Adaptado de (Cornell and Schwertmann 2003)..... | 8 |
| Figura 2.3 - Curva de campo magnético vs. magnetização teórica para nanopartículas superparamagnéticas (SPM) e ferromagnéticas (FM), onde os parâmetros do campo coercivo (H_c), saturação de magnetização (M_s) e magnetização remanescente (M_R) estão indicados. Adaptado de (Figuerola, Di Corato <i>et al.</i> 2010). | 9 |
| Figura 2.4 - Variação da coercividade (H_c) das nanopartículas com o tamanho (Figuerola, Di Corato <i>et al.</i> 2010)..... | 11 |
| Figura 2.5 - Esquema do mecanismo de crescimento de nanopartículas: (a) crescimento de Ostwald; (b) agregação. Adaptado de (Zhang, Huang <i>et al.</i> 2010). | 14 |
| Figura 2.6 – Representação esquemática de um sistema microfluídico gota a gota para produção de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 por coprecipitação de soluções de $Fe(II)$ e $Fe(III)$ em óleo: a) módulo bipartido com Q_0 para o óleo e Q_y para as duas fases aquosas; b) módulos de fusão, onde as gotas emparelhadas coalescem mediante aplicação de uma diferença de potencial elétrica U entre os dois eléctrodos (Frenz, El Harrak <i>et al.</i> 2008)..... | 15 |
| Figura 2.7 – Imagem de TEM mostra nanopartículas (16 nm) de óxido de ferro obtidas por decomposição térmica (Cheng and Sun 2010)..... | 16 |
| Figura 2.8 - Esquema proposto por I. Capek para obtenção de nanopartículas pelo método de microemulsão (I 2004). | 18 |
| Figura 2.9 – Diferentes métodos de revestimento: (A) troca de ligandos (B) adição de ligandos (C) revestimento inorgânico. F representa um grupo químico funcional que permite posterior conjugação. | 19 |
| Figura 2.10 - Esquema de uma NPM com superfície funcionalizada com polietileno glicol (PEG). Adaptado de (Pilloni, Nicolas <i>et al.</i> 2010). | 20 |
| Figura 2.11 – Ilustração de endereçamento activo com NPMs, através de vasos sanguíneos permissivos, para tecidos específicos. (A) Internalização das nanopartículas ocorre por endocitose mediada por receptor formando-se o endossoma (vesícula que digere material). (B) A acidificação e inchamento do endossoma desembocam no rebentamento do mesmo (C), | |

| | |
|--|----|
| permitindo a libertação das nanopartículas e do fármaco. Adaptado de (Sun, Lee <i>et al.</i> 2008). | 22 |
| Figura 3.1 - Representação esquemática para a síntese de NPMs revestidas com sílica..... | 30 |
| Figura 3.2 - Curva de calibração obtida antes dos ensaios com as partículas magnéticas de sílica P1..... | 31 |
| Figura 3.3 - Curva de calibração obtida antes dos ensaios com as partículas magnéticas de sílica P2..... | 31 |
| Figura 3.4 - Representação esquemática do percurso dos eletrões (amarelo) através dos principais componentes de um TEM. Adaptado de (Kenkel 2003)..... | 33 |
| Figura 3.5 - Representação esquemática dos componentes principais de um SEM (Smith 1998). | 34 |
| Figura 3.6 - Difração de raios-X, com ângulo de Bragg, numa rede cristalina. Adaptado de (Kumar, Hormes <i>et al.</i> 2005). | 35 |
| Figura 3.7 - Esquema de funcionamento da DLS. A luz dispersa é desviada para um detetor sendo obtidas intensidades médias que serão convertidas em tamanhos. | 37 |
| Figura 3.8 - Esquema representativo das diferentes camadas associadas a uma partícula em suspensão..... | 39 |
| Figura 3.9 – a) Esquema do comportamento de partículas magnéticas durante a separação de campo magnético de baixo gradiente de um SEPMAG. Assume-se que as partículas formam agregados alongados, com os campos magnéticos direcionados para o campo magnético. A força magnética (F_m) direciona-se para o gradiente magnético e é contrabalançada pelo atrito viscoso (F_d). Adaptado de (De Las Cuevas, Faraudo <i>et al.</i> 2008). b) Foto obtida durante utilização do separador magnético. | 41 |
| Figura 3.10 - Ilustração do método utilizado na medição da opacidade da dispersão, durante o processo de magnetoforese. A luz incide em cima da dispersão e atinge o fotodetetor (situado no fundo) após dispersão pela amostra. a) Inicialmente, as partículas estão distribuídas uniformemente e a opacidade da amostra é elevada. b) Depois de algum tempo, as partículas movem-se em direção às paredes do cilindro, originando um círculo transparente (“limpo”), reduzindo a opacidade da amostra. Adaptado de (De Las Cuevas, Faraudo <i>et al.</i> 2008)..... | 41 |
| Figura 3.11 - Ilustração do processo que ocorre quando uma solução de iões metálicos é introduzida na chama de um espectrómetro de absorção atómica. Adaptado de (Kenkel 2003). | 42 |
| Figura 4.1 - Distribuição do tamanho das amostras de Fe10, Fe11, Fe12 e Fe13 (dados indexados à Tabela 4.1); A- toda a distribuição, B – Valores máximos de cada amostra..... | 48 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.2 - Distribuição do tamanho das amostras de Fe10, Fe11, Fe12 e Fe13 (valores indexados à Tabela 4.2); A- toda a distribuição, B – Valores máximos de cada amostra. | 49 |
| Figura 4.3 - Distribuição do tamanho por intensidade. Valores médios obtidos com seis medições consecutivas obtidos após 4 minutos de tempo de estabilização à temperatura de 25 °C. | 50 |
| Figura 4.4 - Distribuição do tamanho por volume. Valores médios obtidos com seis medições consecutivas obtidos após 4 minutos de tempo de estabilização à temperatura de 25 °C. | 50 |
| Figura 4.5 - Distribuição do tamanho por número. Valores médios obtidos com seis medições consecutivas obtidos após 4 minutos de tempo de estabilização à temperatura de 25 °C. | 51 |
| Figura 4.6 - Histograma de distribuição de tamanho por número das NPMs e respectivas barras de erro. Resultados obtidos, após quatro minutos de estabilização, em seis medições consecutivas à temperatura de 25 °C. | 52 |
| Figura 4.7 - Difratoograma de raios-X de NPMs (preto) e padrão de maghemite (vermelho)..... | 52 |
| Figura 4.8 - Difratoograma de raios-X de NPMs (preto) e padrão de magnetite (vermelho)..... | 53 |
| Figura 4.9 - Imagens TEM onde se vislumbram aglomerados de NPMs em forma de anel | 54 |
| Figura 4.10 - Curvas do potencial ζ e respectivas barras de erro das NPMs em diferentes condições de pH. Para cada pH foram realizadas dez medições. | 55 |
| Figura 4.11 - a) Espectro de DRX das NPs sintetizadas (preto) e das amostras P1 e P2; b) espectro de ATR-FTIR das NPs sintetizadas, das amostras P1 e P2 e do surfatante CTAB. | 56 |
| Figura 4.12 - Imagens TEM das amostras P2 exibindo formas quase esféricas com incorporação de nanopartículas/nanoagregados de γ -Fe ₂ O ₃ . Também se pode observar um número assinalável de esferas de sílica com baixa incorporação de nanopartículas magnéticas. | 57 |
| Figura 4.13 - Imagens TEM (A e B) e SEM (C) de amostras P1 que ilustram a morfologia oca das esferas magnéticas de sílica. D e E representam imagens de campo claro e campo escuro, respetivamente. | 57 |
| Figura 4.14 - Magnetoforese das amostras P1 e P2 em gradiente de campo magnético 60 T/m. | 58 |
| Figura 4.15 - Mecanismo de formação das esferas magnéticas porosas de sílica..... | 59 |
| Figura 4.16 - Potencial- ζ e respetivas barras de erro das amostras P1, P2 e nanopartículas de OF sem revestimento a diferentes pH's em diferentes suspensões. Para cada valor de pH foram realizadas dez medições..... | 61 |
| Figura 4.17 - Evolução da concentração de Ni ²⁺ em solução aquosas em contato com as amostras P1 (vermelho) e P2 (preto). | 61 |

Figura 4.18 - Aspeto das amostras de água com níquel antes (T0) e depois do contato com as partículas magnéticas de sílica (P2) – aumento do tempo de contato da esquerda para a direita. 63

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 2.1 - Propriedades físicas e magnéticas dos óxidos de ferro. Adaptado de (Cornell and Schwertmann 2003). | 7 |
| Tabela 3.1 - Peso dos sais de ferro e das NPMs obtidas em cada síntese. | 28 |
| Tabela 3.2 - Amostras com pesos de NPMs e de AC e respectiva proporção. | 28 |
| Tabela 4.1 – Massa de NPMs obtidas, tamanho (r) e respectivas percentagens, z-average (r) e índice de polidispersão (PDI) das NPMs. O desvio padrão (σ) refere-se a seis medições consecutivas. | 47 |
| Tabela 4.2 - Tamanho (r) e respectivas percentagens, z-average (r) e índice de polidispersão (PDI) das NPMs. O desvio padrão (σ) refere-se a oito medições consecutivas..... | 49 |

Abreviaturas

A - absorvância

ADN – ácido dexocirbonúcleico

α -Fe₂O₃ - hematite

B_0 - campo magnético criado

CTAB - brometo de cetiltrimetilamónio

c - velocidade da luz

DLS – dispersão dinâmica de luz (*dynamic light scattering*)

DRX – Difração de raios - X

EAA – espectroscopia de absorção atómica

ϵ - constante dielétrica

η - viscosidade do solvente

$f(ka)$ - função de Henry

FTIR - espectroscopia de Infravermelhos por transformada de Fourier

Fe₃O₄ – magnetite

γ -Fe₂O₃ - maghemite

h – constante de Plank

H_c – coercividade

K_B - constante de Boltzman

l – comprimento de onda da luz

M - magnetização da partícula por unidade de volume

M_R – magnetização remanescente

M_s – saturação de magnetização

NPMs – nanopartículas magnéticas

NPs – nanopartículas

OF – óxido de ferro

PdI - índice de polidispersão

PEG – polietileno glicol

PVA - álcool polivinílico

R - raio da partícula

SEM - microscopia electrónica de varrimento (*scanning electron microscopy*)

T - temperatura absoluta

TEM – microscopia eletrónica de transmissão (*transmission electron microscopy*)

U_E - mobilidade electroforética

UP – ultra pura

ζ - zeta

CAPÍTULO 1

:INTRODUÇÃO:

A tecnologia do século XXI requer a miniaturização de dispositivos para tamanhos nanométricos enquanto o seu desempenho é significativamente melhorado. Esta necessidade levantou diversas questões inerentes a novos materiais para alcançar funcionalidades específicas e elevada seletividade. Os materiais nanofásicos e nanoestruturados, pertencentes a um novo ramo de investigação de materiais, têm recebido muita atenção devido a potenciais aplicações em áreas como eletrónica, óptica, catálise, cerâmica, armazenamento magnético de dados, biotecnologia e nanocompósitos. As propriedades únicas e desempenhos otimizados destes materiais são determinados pelos seus tamanhos reduzidos, estrutura da superfície e interação interpartículas (Gonsalves 2008). Assim, a possibilidade de controlar a composição, estrutura, propriedades e função dos materiais à escala nanométrica, permite desenvolver novos materiais com propriedades de interesse (Knauth and Schoonman 2002). Como paradigma do grande desenvolvimento dos nanomateriais, refira-se o crescente interesse nas aplicações médicas da nanotecnologia/nanociência que esteve na génese de um novo campo, a nanomedicina, que por sua vez contribuiu para melhores diagnósticos, tratamentos e eficiente prevenção de patologias (Freitas 2005).

Entre os nanomateriais destacam-se as nanopartículas (NPs), que por conta do seu tamanho (partículas entre 1 e 100 nm) são tidas como “*building blocks*” da nanotecnologia. Estas partículas exibem propriedades eletrónicas, ópticas, fotónicas e catalíticas únicas. As nanopartículas podem ser compostas de qualquer substância, incluindo metais, semicondutores, compósitos núcleo-cápsula e polímeros orgânicos. Além disso, exibem propriedades intermédias entre materiais quânticos e macroscópicos devido ao seu tamanho intermédio e à sua elevada relação área superficial/volume. Nanopartículas com tamanho e formas diferentes exibem propriedades também diferentes (Henglein 1989; Liz-Marzán and Kamat 2004).

De entre as várias NPs, as de óxido de ferro (NPMs – nanopartículas magnéticas) constituem um dos primeiros e mais estudados nanomateriais. Tal deveu-se sobretudo às suas propriedades magnéticas, baixo custo, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Enquanto vários tipos de óxidos de ferro foram aprovados pela *Federal Drug Administration (FDA)* e são já aplicados em imagiologia (ressonância magnética) e terapias (hipertermia), muitos nanomateriais não podem ser aplicados *in vivo*, devido a questões relativas à sua toxicidade. Estes avanços promovem um interesse ainda maior no melhoramento dos óxidos de ferro (OF). O desenvolvimento de métodos de síntese mais eficazes permite o controlo do tamanho, distribuição do tamanho, forma, cristalinidade e propriedades magnéticas. Os avanços na modificação da superfície e técnicas de bioconjugação permitem que as NPMs desempenhem diferentes funções e exibam bioatividade. Actualmente têm vindo a ser desenvolvidas NPMs

combinadas com outros nanomateriais, no sentido de que estas desempenhem diferentes funções.

Este trabalho incidiu sobre a produção de NPMs, de modo a otimizar as suas características, visando uma aplicação biotecnológica. Deste modo, a síntese, caracterização e aplicação das NPMs, são os aspetos focados neste trabalho.

Este documento está dividido em cinco capítulos. Depois desta introdução, no capítulo 2 é abordado o estado da arte das nanopartículas e suas aplicações. O capítulo 3 é dedicado aos materiais e métodos usados durante a fase experimental do trabalho. O capítulo 4 relata os testes efetuados e os resultados experimentais alcançados e finalmente no capítulo 5 são apresentadas algumas conclusões e sugestões para trabalhos futuros.




CAPÍTULO 2

:ESTADO DA ARTE:

2.1 – Nanopartículas de óxidos de ferro

Os óxidos de ferro (OF) são compostos comuns, ubíquos na natureza e podem ser facilmente sintetizados em laboratório. São conhecidos dezasseis OF, contudo, a maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), a magnetite (Fe_3O_4) e a hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são, provavelmente, os mais comuns (Schwertmann 1991). Estes óxidos são igualmente tecnologicamente muito importantes. A **Tabela 2.1** resume algumas das suas principais propriedades (Cornell and Schwertmann 2003).

Tabela 2.1 - Propriedades físicas e magnéticas dos óxidos de ferro. Adaptado de (Cornell and Schwertmann 2003).

| Propriedade | Óxido | | |
|--|---|--|---|
| | Hematite | Magnetite | Maghemite |
| Fórmula molecular | $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ | Fe_3O_4 | $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ |
| Densidade (g/cm^3) | 5.26 | 5.18 | 4.87 |
| Ponto de fusão ($^\circ\text{C}$) | 1350 | 1583-1597 | - |
| Dureza | 6.5 | 5.5 | 5 |
| Tipo de magnetismo | Ferromagnético fraco ou antiferromagnético | Ferrimagnético | Ferrimagnético |
| M_s a 300K ($\text{A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$) | 0,3 | 92-100 | 60-68 |
| Sistema cristalográfico | Romboédrico, hexagonal | Cúbico | Cúbico ou tetraédrico |
| Cor |  |  |  |

Dos OF referidos, apenas a magnetite e a maghemite são estáveis à temperatura ambiente. A magnetite exposta ao ambiente será gradualmente oxidada a maghemite. No entanto, para aplicações biomédicas estes dois OF não são, geralmente, distinguidos sendo ambos designados por óxido de ferro.

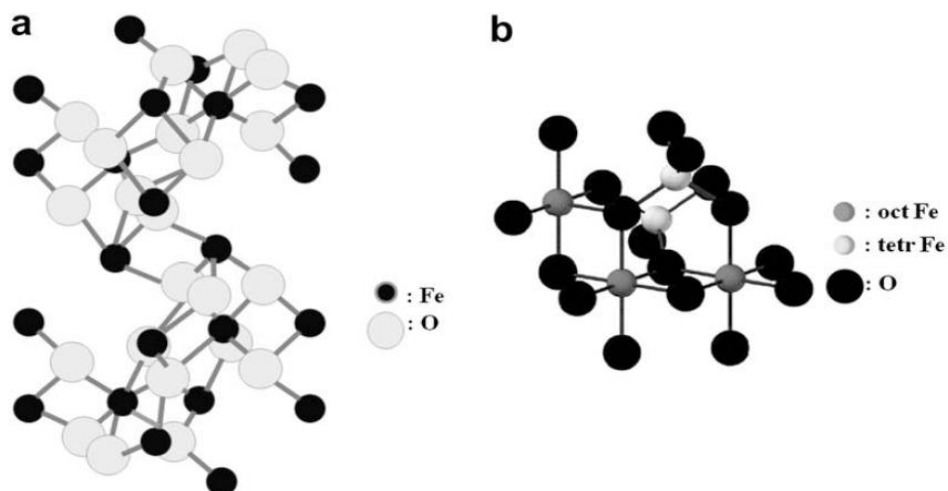


Figura 2.1 - Estrutura cristalina da hematite (a) e da magnetite (b) – Maghemite é semelhante à magnetite. Adaptado de (Teja and Koh 2009).

A estrutura cristalina (**Figura 2.1**) destes três OF pode ser descrita como planos de aniões de oxigénio, bem empacotados, com catiões de ferro octaédricos ou tetraédricos nas zonas intersticiais. Na hematite, os iões de oxigénio estão empacotados numa disposição hexagonal, com os iões Fe (III) ocupando zonas octaédricas. Na magnetite e na maghemite, os iões de oxigénio estão dispostos com um arranjo cúbico. A magnetite apresenta uma estrutura de espinela invertida com o Fe (III) distribuído aleatoriamente entre locais octaédricos e tetraédricos, e os iões Fe (II) em zonas octaédricas. A maghemite apresenta uma estrutura semelhante à da magnetite, onde os catiões ferro estão todos (ou quase todos) no estado de oxidação Fe (III). Oito catiões Fe (III) encontram-se em posições intersticiais tetraédricas, os restantes estão distribuídos em posições intersticiais octaédricas. Para manter o balanço de cargas, um terço dos catiões trivalentes são removidos da coordenação, deixando lacunas (Evans and Heller 2003).

2.2 – Propriedades magnéticas

Os materiais magnéticos caracterizam-se pela presença de dipolos magnéticos gerados pela orientação do spin de alguns dos seus eletrões. Cada um dos spins destes eletrões pode ser alinhado de forma paralela ou antiparalela relativamente aos eletrões vizinhos na rede cristalina, este tipo de interação está na origem do efeito magnético macroscópico, o qual podemos medir. Consoante a resposta magnética observada os materiais podem ser classificados em paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos ou antiferromagnético (**Figura 2.2**) (Teja and Koh 2009).

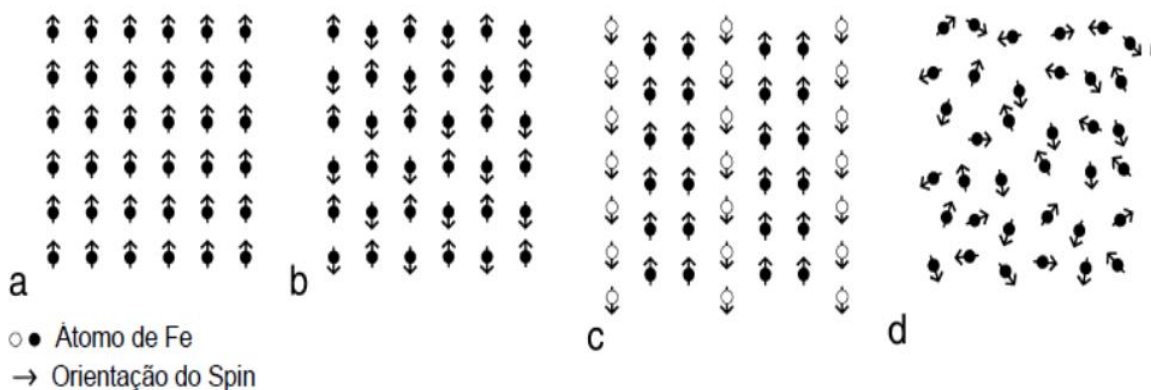


Figura 2.2 - Alinhamento de momentos magnéticos atômicos individuais em diferentes tipos de materiais. a) ferromagnéticos; b) antiferromagnéticos; c) ferrimagnéticos e d) paramagnéticos. Adaptado de (Cornell and Schwertmann 2003)

No estado paramagnético, os momentos magnéticos individuais dos átomos apresentam orientações aleatórias fazendo com que o momento magnético total do cristal seja nulo, situação que pode ser alterada pela ação de um campo magnético externo. Se os momentos magnéticos dos átomos forem todos antiparalelos e da mesma magnitude, o cristal está no estado antiferromagnético - também possui momento magnético total nulo. Em contraste, no estado ferromagnético todos os momentos magnéticos estão alinhados, mesmo sem o efeito de um campo magnético externo, possuindo por isso momento magnético intrínseco. Um estado ferrimagnético também possui momento magnético intrínseco, devido à contribuição dos momentos magnéticos de átomos diferentes, que mesmo sendo antiparalelos possuem diferentes amplitudes.

Os comportamentos magnéticos observados são no entanto fortemente dependentes do tamanho e, como tal, a uma dada temperatura, o comportamento magnético de um material pode ser alterado por ajuste do seu tamanho (O'Handley 1999).

Considerando um material ferromagnético, à macroescala, a magnetização (M) consiste no somatório vetorial dos momentos magnéticos dos átomos por unidade de volume do material. Contudo, devido à existência de domínios, a magnitude de M é geralmente menor do que a que resultaria se os momentos magnéticos de todos os átomos estivessem alinhados da mesma forma, uma vez que este alinhamento só ocorre dentro dos domínios. Os vectores de magnetização dos domínios podem ter direções diferentes levando a uma diminuição da magnetização total (Teja and Koh 2009). Neste tipo de materiais, três parâmetros principais descrevem a força e magnetização de um material, nomeadamente a coercividade, H_c , que representa o campo externo (sinal contrário) necessário para reduzir a magnetização a zero.

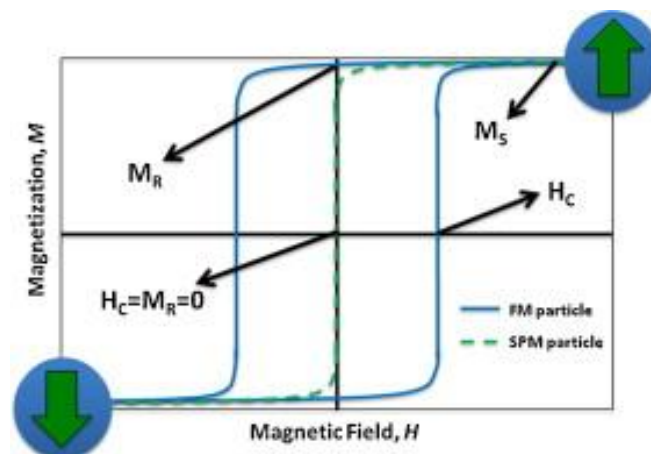


Figura 2.3 - Curva de campo magnético vs. magnetização teórica para nanopartículas superparamagnéticas (SPM) e ferromagnéticas (FM), onde os parâmetros do campo coercivo (H_c), saturação de magnetização (M_s) e magnetização remanescente (M_R) estão indicados. Adaptado de (Figuerola, Di Corato *et al.* 2010).

O parâmetro (H_c) representa também a energia mínima necessária para reverter a magnetização de um material. A coercividade está intimamente relacionada com a constante de anisotropia magnética (K_u), que determina a energia que deve ser fornecida para inverter a direção dos dipolos magnéticos do material. O segundo parâmetro é a saturação de magnetização, M_s , que é o valor máximo de magnetização que um material pode atingir durante o efeito de campos magnéticos suficientemente elevados. O terceiro parâmetro é a magnetização remanescente, M_r , que indica a magnetização residual quando nenhum campo magnético é aplicado. Estes três parâmetros podem ser facilmente identificados nas curvas de histerese geradas por medição da magnetização provocada por campos magnéticos (**Figura 2.3**)(Figuerola, Di Corato *et al.* 2010).

Enquanto o tamanho do material diminui, o número de domínios magnéticos também diminui até se atingir um tamanho crítico em que o material é composto por um único domínio. A formação das paredes do domínio é um processo determinado por um equilíbrio entre a energia magnetoestática (ΔE_{MS}) - que aumenta com o volume do material - e a energia da parede do domínio (E_{pd}) - que aumenta com a área de interface entre domínios. Ao se atingir um volume crítico é energeticamente mais despendioso criar domínios do que suportar a energia magnetoestática exterior do domínio individual. Este limite crítico é geralmente da ordem das dezenas de nanômetros, dependendo do tipo de material, e é influenciado por vários termos da energia de anisotropia.

Um material perto do tamanho crítico pode estar magnetizado uniformemente com todos os spins alinhados na mesma direção, podendo funcionar como um ferromagnete que possui elevada resistência à desmagnetização (coercividade magnética) e alta remanescência (capacidade para reter magnetização) que são propriedades importantes para, por exemplo, o armazenamento de dados magnéticos em discos duros ou em outros dispositivos de gravação (Iwaki 2003). Por outro lado, uma redução ainda maior dos materiais magnéticos traz vantagens assinaláveis para aplicação destes em técnicas terapêuticas e de diagnóstico. Assim, uma redução do tamanho nas NPMs abaixo de um determinado valor de raio, o chamado *raio superparamagnético* (r_{sp}), induz uma transição de partículas ferro- e ferrimagnéticas (FM) para superparamagnéticas. As últimas apresentam elevados momentos magnéticos, porém, não apresentam magnetização remanescente quando o campo magnético externo é retirado. Estas propriedades traduzem-se em vantagens aquando da aplicação *in vivo* das NP's. A ausência de coercividade – momento magnético igual a zero – depois de concluída a medição ou terapia previne que ocorra agregação de NPMs, o que por sua vez poderia levar à morte do paciente (por embolia vascular). O estado da partícula (ferromagnético ou superparamagnético) depende igualmente do tempo de medida relativamente ao tempo de relaxamento. Se o

momento magnético reverte num tempo inferior ao da precisão experimental, o sistema está num estado superparamagnético, caso contrário está num estado bloqueado ou estável (estado ferromagnético), (**Figura 2.4**).

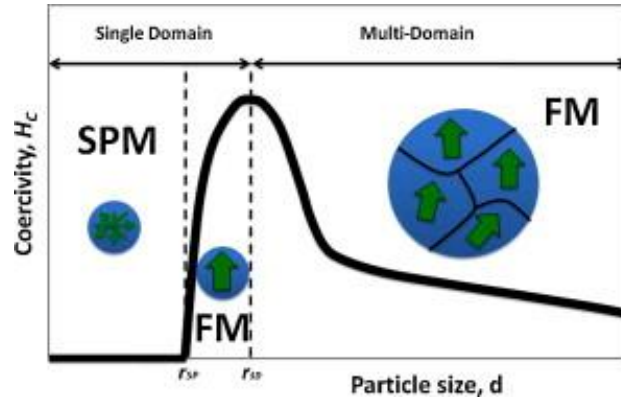


Figura 2.4 - Variação da coercividade (H_c) das nanopartículas com o tamanho (Figuerola, Di Corato *et al.* 2010).

Por norma, os materiais tornam-se paramagnéticos acima de uma dada temperatura. Esta temperatura de transição é denominada de temperatura Currie para substâncias ferromagnéticas ou ferrimagnéticas e temperatura de Néel para substâncias antiferromagnéticas. O superparamagnetismo é uma forma diferente desta transição uma vez que ocorre abaixo da temperatura de Currie, a denominada temperatura de bloqueio. Este fenómeno é possível para partículas cujo diâmetro é da ordem de 3-50 nm. Numa escala temporal muito superior ao tempo de relaxação, o material aparenta em média ter magnetização zero, e tal como um paramagnete, pode ser magnetizado por um campo externo. Contudo, a sua susceptibilidade magnética é superior à de um paramagnete comum (**Figura 2.3**)(Figuerola, Di Corato *et al.* 2010). O superparamagnetismo é uma propriedade estritamente associada a materiais magnéticos nanoestruturados e ocorre quando a energia térmica é suficientemente elevada para superar a energia magnética de estabilização da partícula. A **Figura 2.4** explica ainda como a coercividade das nanopartículas varia quando os seus tamanhos são reduzidos, até que o estado superparamagnético é atingido.

O OF constitui um bom material magnético, apresentando uma saturação magnética (M_s) de 92 meu/g e 78 meu/g para a magnetite e maghemite (bulk), respetivamente. Estes valores são menores para NPMs, o que se atribui a efeitos na superfície (defeitos e *spin canting*). No entanto, com os recentes avanços no controlo da cristalinidade, algumas NPMs têm exibido valores de M_s próximos dos apresentados pelo respectivo material “bulk”.

2.3 – Síntese de nanopartículas magnéticas

Na última década a síntese de nanopartículas magnéticas tem vindo a desenvolver-se intensivamente, não apenas pelo interesse científico fundamental mas também pelas suas diversas aplicações tecnológicas: armazenamento magnético de dados, tintas magnéticas para impressão a jato de tinta, biossensores, endereçamento dirigido de fármacos, terapia genética, agentes de contraste para ressonância magnética (RM), entre outras (Laurent, Forge *et al.* 2008). Controlar eficientemente os processos de síntese é fundamental de modo a obter melhores materiais e melhores desempenhos.

2.3.1- Métodos de síntese

Várias vias sintéticas têm vindo a ser desenvolvidas para sintetizar nanopartículas de óxido de ferro (Lu, Salabas *et al.* 2007).

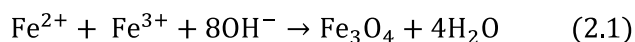
Os métodos físicos, como decomposição de fase gasosa e litografia por feixe de eletrões, são procedimentos complexos que não permitem o controlo do tamanho de partículas à escala nanométrica.

As vias químicas para produção de nanopartículas, são mais simples, mais flexíveis e possibilitam um controlo mais efetivo do tamanho, composição química e, por vezes, até a forma das mesmas (Gupta and Gupta 2005). O princípio central subjacente às sínteses químicas consiste no controlo da nucleação e crescimento dos produtos de reação. Tal pode ser alcançado realizando as reações em ambientes controlados ou controlando o processo de reação mediante ligação de ligandos à superfície das NPMs (Figuerola, Di Corato *et al.* 2010).

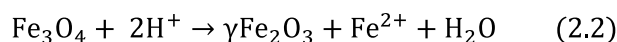
2.3.1.1- Coprecipitação

A técnica de coprecipitação constitui, muito provavelmente, a via química mais simples e eficaz para obter nanopartículas magnéticas (Laurent, Forge *et al.* 2008). Os OF podem ser sintetizados por coprecipitação de sais Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução aquosa, mediante adição de uma base. O tamanho, forma e composição das NPMs dependem dos sais usados (e.g. cloretos, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), da proporção Fe^{2+} e Fe^{3+} , do pH e da força iónica do meio (Hadjipanayis and Siegel 1994).

Convencionalmente, a magnetite (Fe_3O_4) é preparada por adição de uma base (e.g. amónia ou hidróxido de sódio) a uma mistura aquosa de sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} na razão molar de 1:2 (Bee, Massart *et al.* 1995; Goya 2003; Cheng, Su *et al.* 2005). A magnetite surge como um precipitado de cor preta. A reação química que ocorre pode ser descrita pela equação 2.1 (Kim, Zhang *et al.* 2001; Gupta and Gupta 2005):



De acordo com a termodinâmica desta reação, a precipitação completa da magnetite deverá ocorrer num intervalo de pH's entre 9 e 14, em ambiente anóxico (Jolivet, Chaneac *et al.* 2004). Contudo, a magnetite não é muito estável e é sensível à oxidação. Assim, na presença de oxigénio, a magnetite é oxidada a maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), de acordo com a equação 2.2.



A oxidação por contato com o ar não constitui a única via para transformar magnetite em maghemite. A transferência de vários eletrões ou iões, dependendo do pH da suspensão, também estão envolvidos (Morales, Veintemillas-Verdaguer *et al.* 1999). Isto é, a oxidação de iões ferrosos está sempre associada ao fluxo de catiões ao longo da estrutura cristalina, criando lacunas catiónicas que distinguem a maghemite da magnetite.

A principal desvantagem deste método tem que ver com a necessidade de controlar cuidadosamente os valores de pH, tanto durante a síntese como durante a purificação. Adicionalmente, devido à elevada relação área superficial/volume, as nanopartículas em meio líquido tendem a agregar para reduzir a sua energia superficial (Teja and Koh 2009). Advém daí, que a produção de nanopartículas magnéticas por coprecipitação, com picos de dispersão estreitos continua a ser um desafio científico. O controlo da distribuição do tamanho é limitado, uma vez que apenas fatores cinéticos estão envolvidos no controlo do crescimento do cristal. Por forma a controlar a cinética da reação, que está fortemente associada à velocidade de oxidação das espécies de ferro, a síntese deve ser realizada em ambiente livre de oxigénio, devendo usar-se um gás inerte (e.g. azoto, árgon, etc.). Isto permite, não só mitigar a oxidação como também reduzir o tamanho das nanopartículas, comparativamente a métodos na presença de oxigénio (Gupta and Curtis 2004).

De modo evitar a oxidação e a agregação da magnetite, as nanopartículas em suspensão são estabilizadas pela adição de surfatantes aniónicos, detergentes não-iónicos (Song 2005),

polieletrólitos (Mikhaylova, Kim *et al.* 2004), proteínas (Xu, Zeng *et al.* 2006), ou polímeros (Wei, Li *et al.* 2010).

No processo de coprecipitação estão envolvidas duas fases. A primeira, curta nucleação, ocorre quando a concentração dos sais atinge uma supersaturação crítica. Posteriormente ocorre o crescimento do núcleo, por difusão dos solutos para a superfície dos cristais. Este último processo é controlado pelo transporte de massa e pelo equilíbrio superficial de adição e remoção de monómeros individuais (átomos, iões ou moléculas) (Schwertmann 1991). Desta forma, a remoção de monómeros (dissolução) aumenta com a diminuição do tamanho da partícula. Como tal, dentro de um conjunto de partículas com tamanhos ligeiramente diferentes, as maiores partículas crescem à custa das menores. Este mecanismo é apelidado de amadurecimento de *Ostwald* e é tido como a principal via para o crescimento de cristais (Gupta and Gupta 2005).

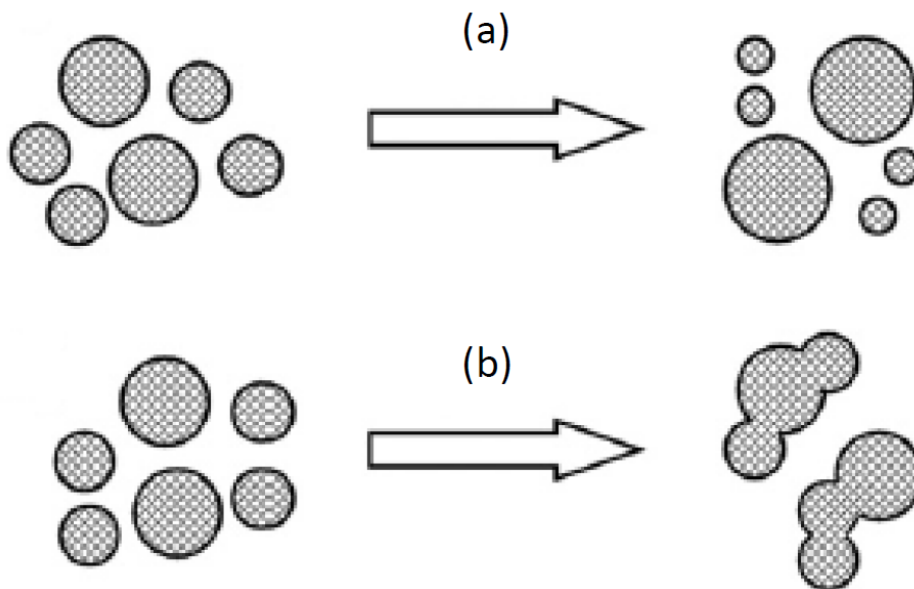


Figura 2.5 - Esquema do mecanismo de crescimento de nanopartículas: (a) crescimento de Ostwald; (b) agregação. Adaptado de (Zhang, Huang *et al.* 2010).

As duas fases, já referidas, devem decorrer separadamente. Assim, a nucleação deve ser evitada durante o período de crescimento. Só assim se podem obter monodispersões de nanopartículas de óxidos de ferro (Tartaj, Morales *et al.* 2006). Além disso, para produzir uma monodispersões é necessário um controlo rigoroso na etapa de nucleação e proporcionar condições para um crescimento lento. Assim, o controlo do tamanho de NP monodispersas tem de ser realizado durante a curtíssima fase de nucleação, pois o número de NP é determinado no final desta fase e não se altera durante o crescimento da partícula. Mais uma

vez, para esse efeito, a utilização de aditivos orgânicos como agentes estabilizadores e/ou redutores como o álcool polivinílico na presença de surfatante com grupo carboxílico (e.g. ácido cítrico e o ácido oleico), surge como solução (Lee, Isobe *et al.* 1996). Embora o método de coprecipitação seja bem conhecido, novos sistemas continuam a ser desenvolvidos **Figura 2.6** (Frenz, El Harrak *et al.* 2008).

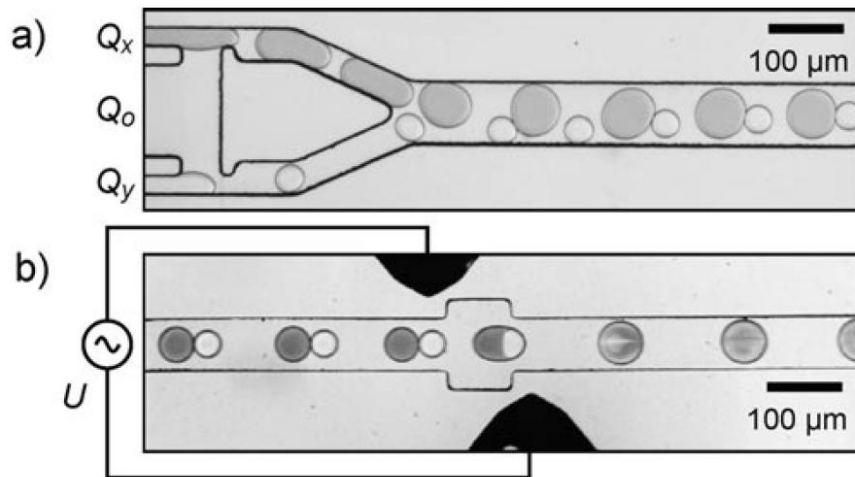


Figura 2.6 – Representação esquemática de um sistema microfluídico gota a gota para produção de nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ por coprecipitação de soluções de Fe(II) e Fe(III) em óleo: a) módulo bipartido com Q₀ para o óleo e Q_y para as duas fases aquosas; b) módulos de fusão, onde as gotas emparelhadas coalescem mediante aplicação de uma diferença de potencial eléctrica U entre os dois eléctrodos (Frenz, El Harrak *et al.* 2008).

2.3.1.2-Decomposição térmica

Nanopartículas de OF monocristalinas, com elevada monodispersão, podem também ser sintetizadas por decomposição térmica de precursores em solventes orgânicos a temperaturas de ebulição elevadas (entre 250 e 500 °C), contendo surfatantes estabilizadores. Os precursores organometálicos podem ser acetilacetonatos metálicos (Fe acac)₃, cupferronatos metálicos (Fe Cup)₃ (Geng, Liu *et al.* 2007), ou carbonilos (FeCO)₅ (Park, Lee *et al.* 2005). Os surfatantes mais comuns são ácidos gordos e a hexadecilamina. Este método pode também produzir NPMs com tamanhos entre 3 - 60nm (**Figura 2.7**). Diversos trabalhos que aplicam esta técnica têm sido reportados (Dumestre, Chaudret *et al.* 2004; Li, Sun *et al.* 2005; Cheng and Sun 2010).

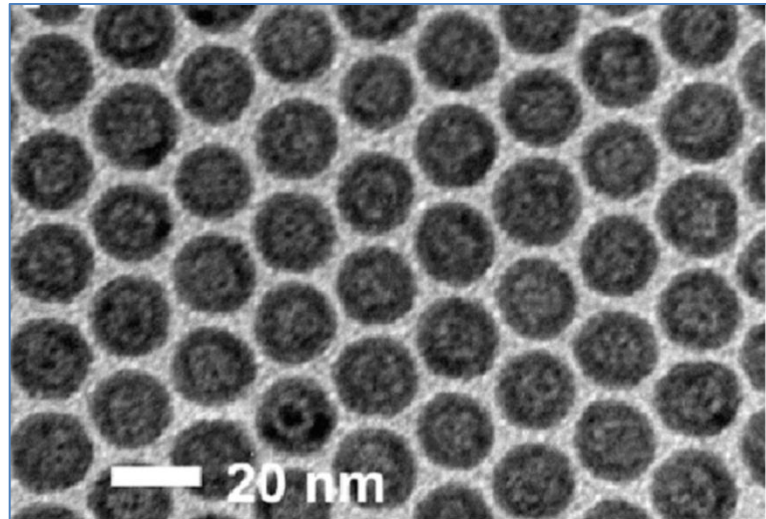


Figura 2.7 – Imagem de TEM mostra nanopartículas (16 nm) de óxido de ferro obtidas por decomposição térmica (Cheng and Sun 2010).

2.3.1.3- Reação sol-gel

A síntese de NPMs é possível pelo método sol-gel. Este método é geralmente descrito como envolvendo a hidrólise e condensação de precursores moleculares em solução, originando uma “sol” partículas nanométricas. O solvente usado é geralmente água, contudo, os precursores podem ser também hidrolisados por um ácido ou base. A continuação do processo de hidrólise e a polimerização inorgânica originam uma rede tridimensional de óxidos metálicos, denominada gel coloidal (Tavakoli, Sohrabi *et al.* 2007; Lam, Mammucari *et al.* 2008).

Partículas mais pequenas são obtidas com reações de hidrólise mais lentas e mais controladas (temperatura, concentração dos sais precursores, pH e agitação) (da Costa, De Grave *et al.* 1994), (Cannas, Gatteschi *et al.* 1998), (Dai, Meiser *et al.* 2005), (Solinas, Piccaluga *et al.* 2001) .

O método descrito comporta algumas vantagens, nomeadamente, a possibilidade de produzir materiais amorfos com diversas formas/estruturas e monodispersões. Além disso, permite um controlo eficiente do tamanho e a possibilidade de adicionar moléculas que mantêm a estabilidade e as propriedades dentro da matriz sol-gel (Chanéac, Tronc *et al.* 1995; Pinna 2009).

2.3.1.4- Síntese hidrotermal

A síntese hidrotermal baseia-se na capacidade da água, a elevadas pressões e temperaturas, hidrolisar e desidratar sais metálicos e no facto de nestas condições os óxidos metálicos resultantes serem muito pouco solúveis em água, gerando-se assim supersaturação. Estas reações desenvolvem-se num meio aquoso, em reactores ou autoclaves, onde a pressão pode ser superior a 2000 psi e a temperatura superior a 200 °C (Nobuto, Sugita *et al.* 2004; Tavakoli, Sohrabi *et al.* 2007).

Têm sido relatadas várias aplicações deste método na produção de nanopartículas ultrafinas de óxido de ferro (Chen and Xu 1998), (Hyeon, Lee *et al.* 2001), (Zhu, Yang *et al.* 2007), (Lian, Wang *et al.* 2004), (Wang, Zhuang *et al.* 2005).

Este método é ambientalmente inofensivo, uma vez que não requer nenhum solvente orgânico ou pós-tratamentos. Contudo, a funcionalização da superfície não pode ser realizada *in situ* e requer um pós-processamento adicional para o efeito.

2.3.1.5- Síntese em microemulsão

Uma microemulsão consiste numa dispersão isotrópica termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis, estabilizados por um surfatante (Pillai, Kumar *et al.* 1995). As estruturas mais usadas na síntese de nanopartículas são as micelas, tanto na forma inversa (água- em-óleo) como as normais (óleo-em-água) (Israelachvili 1991) . Em ambos os casos a fase dispersa consiste em gotas monodispersas num intervalo de 1 a 100 nm. Nas microemulsões água em óleo, quando um metal solúvel é adicionado à fase aquosa da microemulsão, ele irá permanecer nas microgotas aquosas rodeadas por óleo. Estas microgotas irão colidir, coalescer, e quebrar-se novamente (**Figura 2.8**) (Tavakoli, Sohrabi *et al.* 2007).

Por ajuste dos tamanhos dos núcleos micelares é possível obter NPMs com diferentes tamanhos: 10 a 100 nm (Munshi, De *et al.* 1997), 10 nm (Salazar-Alvarez and Tekniska högskolan i Stockholm. Institutionen för 2004), 10 a 80 nm (Zhi, Wang *et al.* 2006), 3,5 nm (Vidal-Vidal, Rivas *et al.* 2006).

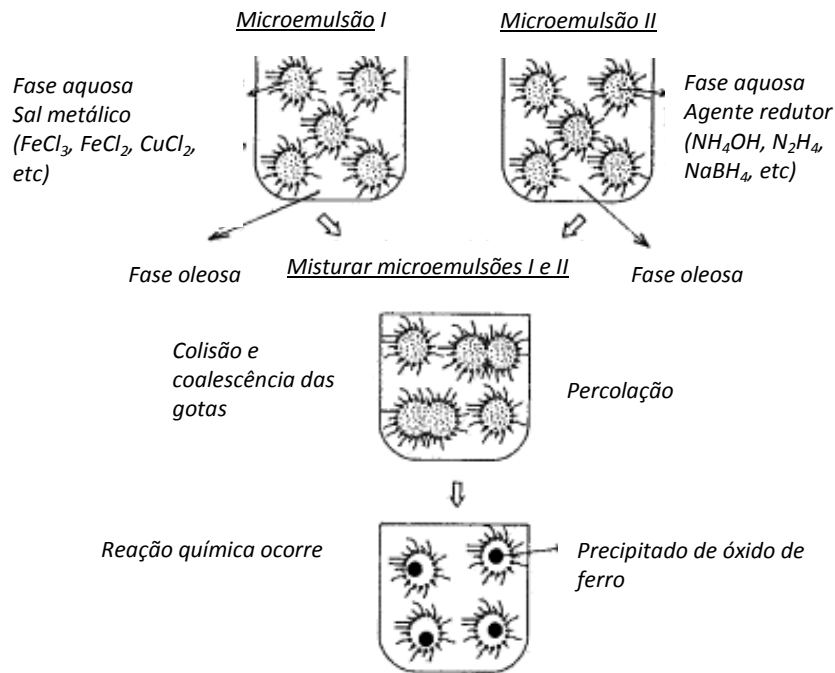


Figura 2.8 - Esquema proposto por I. Capek para obtenção de nanopartículas pelo método de microemulsão (I 2004).

Em suma, vários progressos têm sido feitos no sentido de melhorar as sínteses de monodispersões de NP. Os métodos desenvolvidos permitem, de forma diferenciada, controlar tamanho, distribuição do tamanho, forma, estrutura cristalina, estrutura superficial e propriedades magnéticas das mesmas. Dos métodos referidos, a síntese hidrotérmica é o que permite um maior controle do processo. Actualmente, o maior desafio de todas as abordagens químicas assenta num eficiente controlo do processo de síntese das nanoestruturas. Adicionalmente, os métodos empregues devem produzir grandes quantidades de NPMs e estas devem ser estáveis em ambientes biológicos - *in vitro* e *in vivo*.

A escolha do método por coprecipitação para síntese de NPM fez-se, sobretudo, pela simplicidade dos protocolos, por não requerer equipamentos e o baixo custo inerente ao método, que ainda assim permite obter bons resultados e elevadas quantidades de NPMs.

2.4- Revestimento/Funcionalização de nanopartículas

O controlo das características químicas da superfície das NPMs é fundamental, pois permite uma aplicação consentânea das mesmas. As NPMs “nuas” (sem modificações na

superfície) têm tendência a agregar, resultado da elevada razão área superficial/volume e das interações dipolo-dipolo (Oh and Park 2011).

É devido às interações entre as superfícies hidrofóbicas, das NPMs “nuas”, que ocorre a agregação e se formam grandes aglomerados. Estes exibem maior atração dipolo-dipolo entre si e comportam-se como ferromagnetes. Numa cascata de eventos, cada agregado fica mais próximo dos agregados vizinhos, aumentando as magnetizações de ambos, que se tornam ainda mais propensos a aglomerar e conseqüentemente precipitar (Gupta and Gupta 2005).

A superfície das NPMs deve ser modificada, não apenas com o intuito de prevenir a agregação entre elas, mas também para as dotar de solubilidade em água, biocompatibilidade, adsorção não específica a células e bioconjugação (Oh and Park 2011).

Vários métodos de revestimento têm sido desenvolvidos e podem ser divididos, essencialmente, em três categorias: troca de ligandos, adição de ligandos e revestimento inorgânico (Figura 2.9).

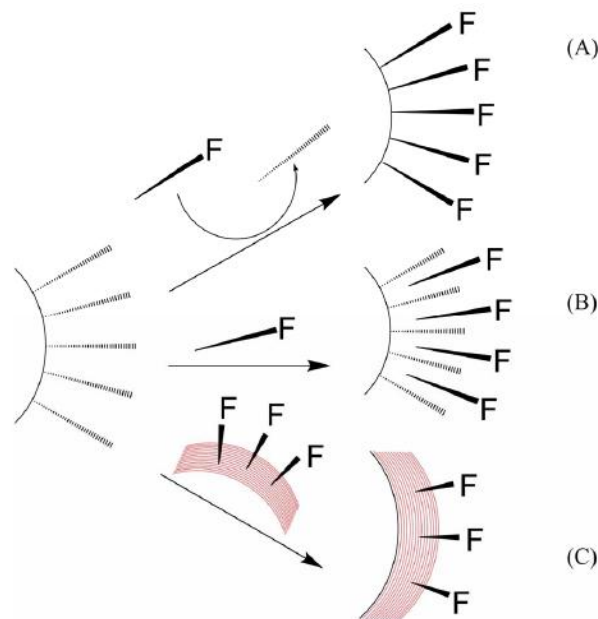


Figura 2.9 – Diferentes métodos de revestimento: (A) troca de ligandos (B) adição de ligandos (C) revestimento inorgânico. F representa um grupo químico funcional que permite posterior conjugação.

É fundamental saber a aplicação que se pretende dar às NP para poder escolher o revestimento de forma cuidadosa, permitindo obter os melhores desempenhos possíveis. Os revestimentos de NPMs incluem uma grande diversidade de materiais, incluindo materiais poliméricos e materiais inorgânicos (Liz-Marzán and Kamat 2004). Os revestimentos poliméricos podem ser de origem sintética ou natural.

Grupos funcionais, incluindo carboxilatos como o ácido cítrico (Čampelj, Makovec *et al.* 2009), e fosfatos como a fosfonato (Tautzenberger, Kreja *et al.* 2011) ligam-se à superfície das NPMs, funcionando como estabilizadores destas no meio. O ácido cítrico (AC) é adsorvido à superfície das NPMs através de um ou dois dos seus grupos carboxilato, dependendo da necessidade estereoquímica e da curvatura da superfície da NP. Deste modo, pelo menos um grupo carboxílico fica exposto ao solvente, sendo responsável pelo carácter hidrofílico e carga negativa da superfície das NPMs.

Materiais inorgânicos como sílica (Boissiere, Allouche *et al.* 2007; Shimura and Ogawa 2007), ouro e gadolínio (III) (Chen, Wolahan *et al.* 2011) são também muito aplicados como revestimento de NPMs. Este tipo de revestimento não só aumenta a estabilidade das NPMs como também coadjuva na ligação de agentes ligando à superfície das NPMs.

Uma das vantagens da sílica na superfície das NPMs é a presença do silanol, que reage facilmente com vários agentes de ligação para ligar, covalentemente, ligandos específicos (e.g. grupos amina) às NPMs (Chen 2003).

Relativamente aos polímeros, aqueles que possuem mais do que um grupo capaz de se ligar à superfície das partículas, podem aumentar a estabilidade coloidal das NPMs, o que melhora as suas propriedades óticas, magnéticas e eletrónicas (Nikodem, Dominik *et al.* 2009).

O polietileno glicol (PEG) é um polímero hidrofílico, solúvel em água e biocompatível que tem vindo a ser extensamente usado em aplicações biomédicas (Zhang, Kohler *et al.* 2002; Wei, Li *et al.* 2010; Chen, Wolahan *et al.* 2011). Aquilo que notabiliza o PEG é a sua capacidade de prolongar o tempo em circulação sanguínea de partículas de óxido de ferro (**Figura 2.10**) (Moghimi, Hunter *et al.* 2001; Pilloni, Nicolas *et al.* 2010).

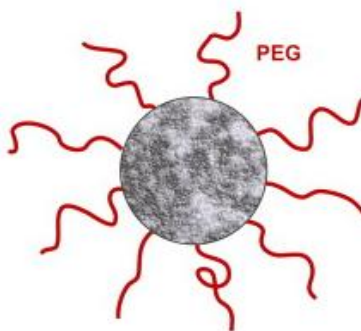


Figura 2.10 - Esquema de uma NPM com superfície funcionalizada com polietileno glicol (PEG). Adaptado de (Pilloni, Nicolas *et al.* 2010).

Um dos polímeros sintéticos mais usados no revestimento de NPMs é o dextrano (Mornet, Portier *et al.* 2005; Hong, Feng *et al.* 2008). Tal deve-se, sobretudo, à sua biocompatibilidade e tamanho favorável das suas cadeias.

O álcool polivinílico (PVA) é um polímero hidrofílico e biocompatível. O revestimento feito com este material previne a aglomeração, originando monodispersões de NPMs (Osada and Gong 1998; Ng V and Adeyeye 2002).

Em relação a polímeros naturais, o quitosano é, provavelmente, aquele que actualmente atrai mais interesse (Li, Zhou *et al.* 2010; Qu, Liu *et al.* 2010; Zhang, Zhu *et al.* 2010). Tal deve-se, essencialmente, ao facto de ser um polímero alcalino, não tóxico, hidrofílico, biocompatível e biodegradável, propriedades bastante atrativas para aplicações biomédicas (Hee Kim, Sook Lee *et al.* 2005). Outros polímeros naturais como o alginato (Boissiere, Allouche *et al.* 2007), a albumina (Shamim, Hong *et al.* 2006), a goma-arábica (Chockalingam, Babu *et al.* 2010) e gelatina (Gaihre, Hee Lee *et al.* 2011), entre outros, são também usados no revestimento de NPMs.

2.5- Aplicações das nanopartículas magnéticas

2.5.1- Ressonância magnética por imagem

A ressonância magnética por imagem (RMI), é um método não invasivo de imagiologia, muito utilizado na medicina clínica e é possível devido ao relaxamento dos prótons nos tecidos. Depois da acumulação nos tecidos, as NPMs de óxido de ferro aumentam o relaxamento dos prótons de tecidos específicos relativamente a tecidos periféricos, servindo assim como agentes de contraste. Este tipo de aplicação requer que as NPMs possuam algumas características, nomeadamente o elevado tempo de meia vida na circulação sanguínea, superfície hidrofílica e tamanhos reduzidos (passarem despercebidas ao sistema imunológico). Vários trabalhos têm vindo a ser desenvolvidos no sentido de que a interação com proteínas do plasma sanguíneo (opsoninas) e consequente eliminação de circulação ocorra mais tarde (Horak, Babic *et al.* 2007; Shultz, Calvin *et al.* 2007; Babic, Horak *et al.* 2009; Taboada, Solanas *et al.* 2009; Chen, Wolahan *et al.* 2011).

2.5.2- Endereçamento de fármacos

Uma outra possível e prometedora aplicação das NPM é o endereçamento de fármacos (**Figura 2.11**), onde estes são seletivamente direccionados (sem “atingir” tecidos saudáveis) até a um local específico do corpo – tecido alvo – e posteriormente libertados. Tal como em imagiologia, também para esta aplicação alguns fatores devem ser tidos em conta: tamanho,

capacidade de carga (para incorporar o fármaco), estabilidade para prolongado tempo em circulação na corrente sanguínea, liberação controlada do agente terapêutico, biodegradabilidade, não-toxicidade e possibilidade de bioconjugação com marcador alvo (Pratsinis and Vemury 1996; Oh 2010).

Diversos tamanhos, estruturas, revestimentos biocompatíveis (e.g. PEG, PEI, quitosano) e fármacos (e.g. doxorrubicina) têm vindo a ser testados nesta área de aplicação (Storm, Belliot *et al.* 1995; Alexiou, Arnold *et al.* 2000; Zhang, Kohler *et al.* 2002; Panyam and Labhasetwar 2003; Gupta and Kompella 2006; Gaihre, Khil *et al.* 2009; Rahimi, Wadajkar *et al.* 2010).

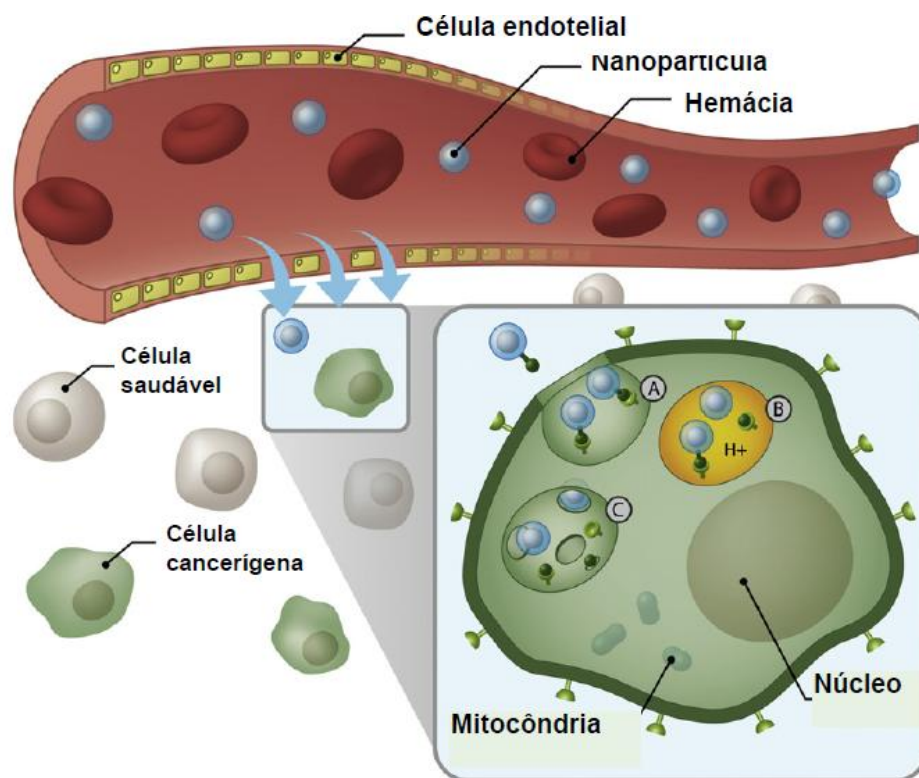


Figura 2.11 – Ilustração de endereçamento activo com NPMs, através de vasos sanguíneos permissivos, para tecidos específicos. (A) Internalização das nanopartículas ocorre por endocitose mediada por receptor formando-se o endossoma (vesícula que digere material). (B) A acidificação e inchamento do endossoma desembocam no rebentamento do mesmo (C), permitindo a libertação das nanopartículas e do fármaco. Adaptado de (Sun, Lee *et al.* 2008).

2.5.3 – Hipertermia

As NPMs podem ser “guiadas” por um campo magnético externo até tecidos específicos e, dependendo da formulação utilizada, produzir calor quando submetidas a um campo magnético alternado. Este princípio pode ser aplicado no tratamento de tumores por

hipertermia, onde o aquecimento até ≈ 43 °C, durante cerca de 30 min, pode conduzir à morte localizada, por apoptose (“rebetamento”), de células cancerígenas (menos resistentes ao aquecimento) e/ou impedir o desenvolvimento do tumor. A selectividade pode também ser obtida pela utilização de anticorpos específicos para antígenos específicos das células tumorais. A hipertermia já tem sido utilizada em conjunto com outras terapias (Ito, Matsuoka *et al.* 2003). Entretanto, diversos estudos, *in vitro* e *in vivo*, continuam a ser realizados neste âmbito (Takamatsu, Matsui *et al.* 2008; Chen, Chiang *et al.* 2010; Qu, Liu *et al.* 2010).

2.5.4 – Separação ambiental

Diversas técnicas, envolvendo nanopartículas magnéticas têm vindo a ser propostas e testadas experimentalmente para separação ambiental. Neste processo são geralmente utilizadas NPMs de OF (ou compósitos de OF e outros materiais) que são usados como agentes marcadores através do revestimento com um adsorvente para solutos alvo, tais como radionuclídeos (Buchholz, Nunez *et al.* 1996), iões de metais pesados (Huang and Chen 2009; Shen, Tang *et al.* 2009; Girginova, Daniel-da-Silva *et al.* 2010), ou corantes orgânicos solúveis em água (Kaminski and Nuñez 1999). Outras técnicas utilizam esferas magnéticas porosas (Carja, Nakamura *et al.* 2005), também estas capazes de remover iões metálicos da água; alternativamente, usando partículas magnéticas carregadas que agregam com bactérias e sólidos suspensos, é possível depurar águas residuais (Afkhami and Norooz-Asl 2009).

2.5.5 – Magnetofecção

A Magnetofecção (MF) é um método através do qual nanopartículas associadas a ADN são transfetadas para o interior de células por ação de um campo magnético externo. Para o efeito, as NPMs magnéticas devem ser revestidas com o polímero polietilenoimina (PEI). Este complexo liga-se facilmente ao ADN carregado negativamente, uma vez que as NPMs magnéticas apresentam carga positiva conferida pela PEI.

Esta técnica atinge elevados níveis de transfecção, uma vez que as NPMs não dependem de recetores ou outras estruturas membranares para efetivarem a transfecção. Deste modo, é possível transfetar células que normalmente são não-permissivas – que não estão naturalmente aptas a receber material genético (Plank, Scherer *et al.* 2003). Investigadores têm aplicado, cada vez mais, a MF para aumentar a transferência de genes para células sem

que as nanopartículas tenham um efeito citotóxico. (Scherrer 2002; Krotz, Sohn *et al.* 2003; Schillinger, Brill *et al.* 2005).

CAPÍTULO 3

:MATERIAL E MÉTODOS:

3.1- Material

O $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (CAS 7782-63-0), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (CAS 10025-77-1), a solução concentrada de amónia 28% (NH_4OH , CAS 1336-21-6), o ácido cítrico (CA, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, CAS 5949-29-1), tetraetilortosilicato (TEOS, $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$, CAS 78-10-4), o brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$, CAS 57-09-0) e o $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (CAS 7791-20-0) foram comercialmente adquiridos à Sigma-Aldrich®.

3.2- Síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

A síntese das nanopartículas magnéticas foi realizada de acordo com o método aplicado por Benelmekki *et al.* (Benelmekki, Caparros *et al.* 2011). As NPMs foram preparadas pelo método de coprecipitação, a partir de uma mistura de FeSO_4 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e FeCl_3 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). A amónia (NH_4OH) foi usada como agente de precipitação. Assim, FeSO_4 (0.67 M, 9.3 g em 50 mL) e FeCl_3 (1.27M, 10.8 g em 50 mL) foram misturados e aquecidos até 80°C. Para promover a precipitação dos óxidos de ferro, o valor de pH foi elevado e mantido em pH=10 durante 30 min. A solução foi sujeita a agitação e mantida a temperatura constante durante todo o processo de síntese. Após 30 min, as nanopartículas foram separadas magneticamente e lavadas, várias vezes, com água ultra pura (UP). Posteriormente, o valor de pH foi elevado para 10.5-11. O material sólido obtido foi depois seco em estufa a vácuo a 60 °C por 24 h. A filtração, controlo e separação das nanopartículas foi realizada através do Horizontal Low Gradient Magnetic Field (HLGMF) da Sepmag Technologies™.

3.2.1 – Estabilização da superfície das nanopartículas com ácido cítrico

Numa segunda fase do processo - e na sequência da síntese das NPMs de OF - o AC é utilizado para estabilizar as NPMs, de acordo com o método proposto por Campelj *et al.* (Campelj, Makovec *et al.* 2008). Deste modo, aproximadamente 2 g de NPMs foram adicionadas a uma solução aquosa de AC 2% (0,2 mg/mL). O valor de pH da mistura foi ajustado para pH=5 e foi depois elevado até pH=10, usando amónia concentrada (28 %). Para

que ocorra a adsorção do AC, a mistura foi mantida a 80 °C, sob agitação, por um período de 60 minutos. Posteriormente, a suspensão obtida foi lavada com água UP e magneticamente separada, várias vezes, com intuito de remover o excesso de CA.

3.2.2 – Efeito da concentração de sais de ferro no meio

Neste estudo foram realizados quatro sínteses para obter quatro tipos de nanopartículas (Fe10, Fe11, Fe12 e Fe13). A diferença entre cada uma delas foi a quantidade de sais de ferro usados (**Tabela 3.1**). Todos os restantes procedimentos, inclusive a adição AC para estabilizar as NPs, foram igualmente aplicados.

Tabela 3.1 - Peso dos sais de ferro e das NPMs obtidas em cada síntese.

| Amostra | Peso (g) | |
|------------|-------------------|--------------------------------------|
| | FeCl ₃ | FeSO ₄ .7H ₂ O |
| Fe 10 | 10,8 | 9,3 |
| Fe 11 (C) | 2,7 | 1,4 |
| Fe 12 (2C) | 5,4 | 2,8 |
| Fe 13 (3C) | 8,1 | 4,2 |

3.2.3 – Efeito da concentração de AC nas nanopartículas

Este estudo consistiu na aplicação de três concentrações diferentes de AC num dos métodos anteriormente descritos. O objectivo foi estudar que efeitos teriam estas variações no tamanho das NPs. Assim, foram sintetizadas NPs usando as massas de sal utilizadas em Fe13 e três proporções diferentes de NPs:AC foram testadas (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2 - Amostras com pesos de NPMs e de AC e respectiva proporção.

| Amostra | Peso NPs/ Peso AC (g) | NPs:AC |
|---------|-----------------------|---------|
| CA-1 | 3,7 2,0 | 4 : 2,2 |
| CA-2 | 4,2/ 1,4 | 4 : 1,3 |
| CA-3 | 4,1/ 4,0 | 1 : 1 |

3.3 – Produção de esferas magnéticas de sílica para remoção de níquel em solução aquosa

Depois de efectuadas diversas sínteses (acima referidas) e obtidas várias nanopartículas, estas foram caracterizadas. As NPs que mais se adequavam à aplicação desejada (Fe10 e Fe11), voltaram a ser produzidas, revestidas com sílica e aplicadas na remoção de níquel (Ni^{2+}) em solução aquosa.

3.3.1 – Revestimento das nanopartículas magnéticas com sílica

As partículas de sílica com NPMs foram produzidas pelo método de Stöber *et al.* (Stöber, Fink *et al.* 1968) . Por este método (**Figura 3.1**), 14 mL de solução aquosa de brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) 0.8% wt% e 4.5 mL de amónia foram adicionados a 60 mL de etanol contendo 15 mg de NPMs a 25 °C. Esta concentração de CTAB corresponde a 3,875 vezes a concentração micelar crítica (CMC) para este composto (Modaressi, Sifaoui *et al.* 2007). Subsequentemente, a suspensão foi sonicada (35 KHz) durante 5 min e o tetraetilortosilicato (TEOS) foi lentamente adicionado à solução, que foi mantida por mais 3 horas em vibração ultra-sónica. A finalizar esta etapa, a solução foi agitada durante 21 h.

A partir daqui, dois procedimentos diferentes foram adotados: i) A amostra P1 foi obtida por secagem e ressuspensão da mistura em 10 mL de água destilada, que foram transferidos para autoclave de aço inoxidável revestido com Teflon a 120 °C durante 48 h, obtendo-se a amostra P1. Em seguida, depois do autoclave arrefecer até temperatura ambiente, o precipitado foi separado, com auxílio do separador da SEPMAG, e lavado com etanol. ii) A amostra P2 foi obtida por calcinação das amostras a 400 °C por 8h, seguido de tratamento hidrotermal.

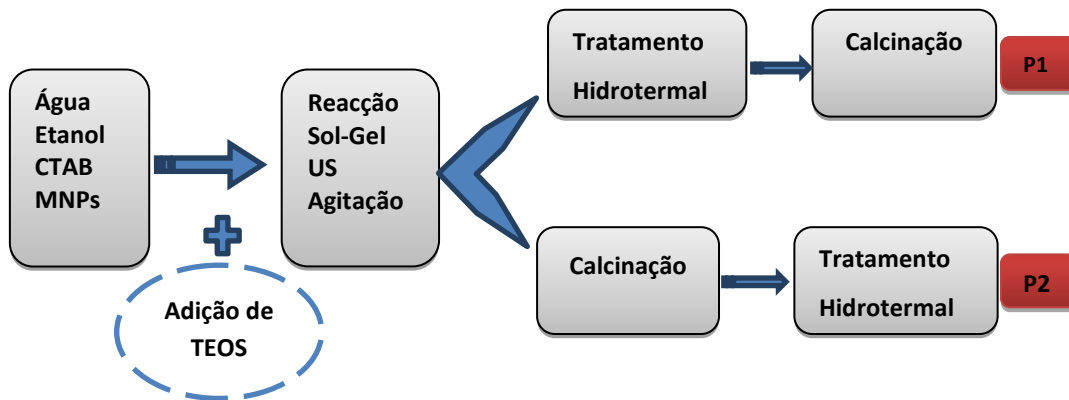


Figura 3.1 - Representação esquemática para a síntese de NPMs revestidas com sílica.

3.3.2 – Remoção de iões de níquel em solução aquosa

Por forma a assegurar as condições experimentais que potenciem a remoção de Ni^{2+} da água, o potencial ζ das nanopartículas de sílica (porosas e não porosas) foi estudado. Neste estudo o pH foi ajustado a diferentes valores, entre 3 e 11, com ácido clorídrico ou amónia, mantendo a mesma concentração iónica em todas as suspensões. Foi medido o potencial ζ a diferentes pH e traçado o respectivo gráfico, obtendo-se aí o valor de pH ao qual as NPMs são mais estáveis em solução.

Para remoção de iões Ni^{2+} em solução aquosa, 20 mg de NPMs foram colocadas em contato com 15 ml de solução aquosa de cloreto de níquel com uma concentração de 100 mg/L. O pH inicial foi ajustado a 9 com NH_3 0,1 M. O ensaio de absorção foi realizado com agitação constante de 150 rpm à temperatura ambiente. Foram preparadas cinco suspensões, sujeitas às mesmas condições, e cada uma delas esteve em agitação durante períodos de tempo diferentes. Terminado o processo de agitação, as NPMs foram separadas magneticamente da solução e esta foi filtrada com um filtro de poro 0,200 μm – evitar colmatação do espectrómetro de absorção atómica. A concentração final de iões Ni^{2+} , em cada intervalo de tempo, foi determinada pelo método de espectroscopia de absorção atómica de chama.

A concentração de iões Ni^{2+} foi determinada pelo método de calibração, usando soluções padrão entre 0,3 e 10 ppm. Estas soluções foram preparadas a partir de uma solução *stock* preparada dissolvendo 100 mg de Ni (99,9%; Merck) em ácido nítrico concentrado a quente, sendo o volume final, de 1 L, perfeito com água UP. As rectas de calibração mostram boa correlação (Figura 3.2 e Figura 3.3).

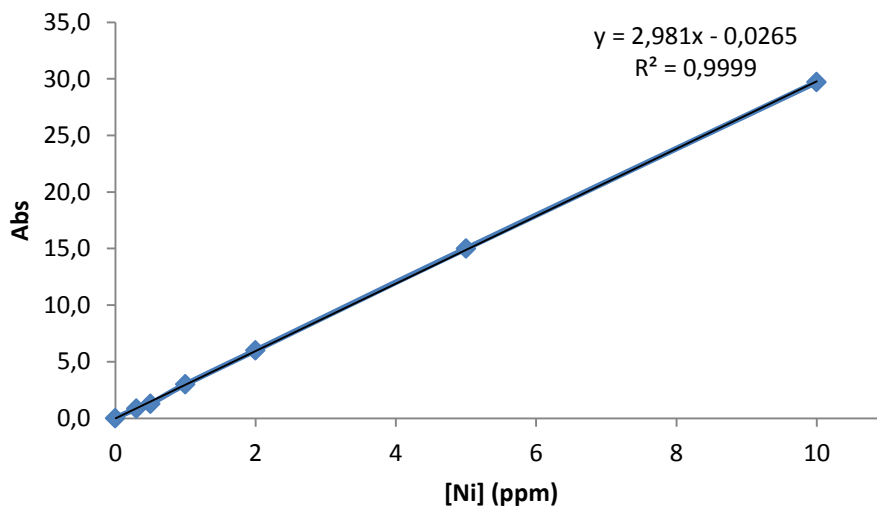


Figura 3.2 - Curva de calibração obtida antes dos ensaios com as partículas magnéticas de sílica P1.

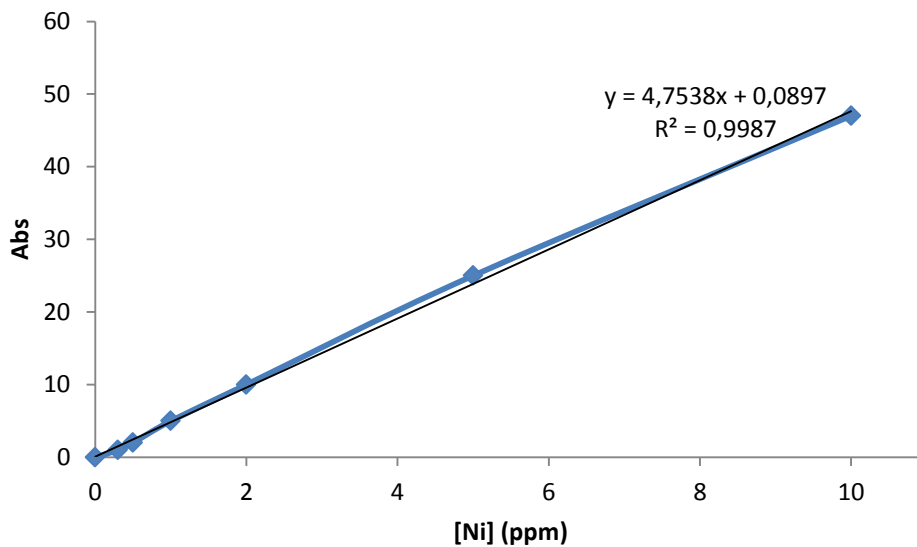


Figura 3.3 - Curva de calibração obtida antes dos ensaios com as partículas magnéticas de sílica P2.

3.4 – Técnicas de caracterização das nanopartículas

As propriedades únicas e os melhores desempenhos dos nanomateriais são determinados pelos seus tamanhos, estruturas superficiais e interações interpartículas. O papel do tamanho das nanopartículas é comparável, em alguns casos, à composição química

das partículas, acrescentando um novo parâmetro flexível para a concepção e controlo do seu comportamento. Para compreender completamente o impacto dos nanomateriais na nanotecnologia e responder à questão de porque serão os nanomateriais tão particulares é fundamental conhecer as técnicas que os permitem caracterizar – conhecendo também o princípio inerente a cada uma das técnicas implementadas (Niederberger and Pinna 2009). Assim, a caracterização das nanopartículas é indispensável para compreender o comportamento e as propriedades destes materiais, promovendo a aplicação das nanopartículas e a concepção de novos sistemas nanofásicos com melhores desempenhos.

Neste trabalho foram aplicadas algumas técnicas, com objetivo de caracterizar o tamanho, a forma, a superfície e a polidispersão das NPMSs:

- Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM)
- Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)
- Difração de Raios-X (DRX)
- Espectroscopia de Infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR)
- Dispersão Dinâmica de Luz (DLS)
- Potencial Zeta (ζ)

Com o objectivo de aferir a eficiência de remoção de iões de níquel (Ni^{2+}) em solução aquosa, foi realizada espectroscopia de absorção atómica de chama (EAA).

3.4.1 – Microscopia eletrónica de transmissão

O princípio do microscópio eletrónico de transmissão (TEM) é análogo ao de um microscópio de transmissão óptica, só que ao invés de luz visível é usado um feixe de eletrões (Niederberger and Pinna 2009). Este feixe é direcionado para a amostra através das lentes do condensador. Os eletrões defletidos e não defletidos pela amostra são focados pela lente objetiva, dando origem a uma imagem intermédia. Esta é ampliada pela lente magnética do projector. A imagem é observada devido a uma placa de metal revestida com uma fina camada de pó fosforescente - constituindo o detetor. Quando a essa camada é bombardeada por eletrões, emite na região do visível (**Figura 3.4**).

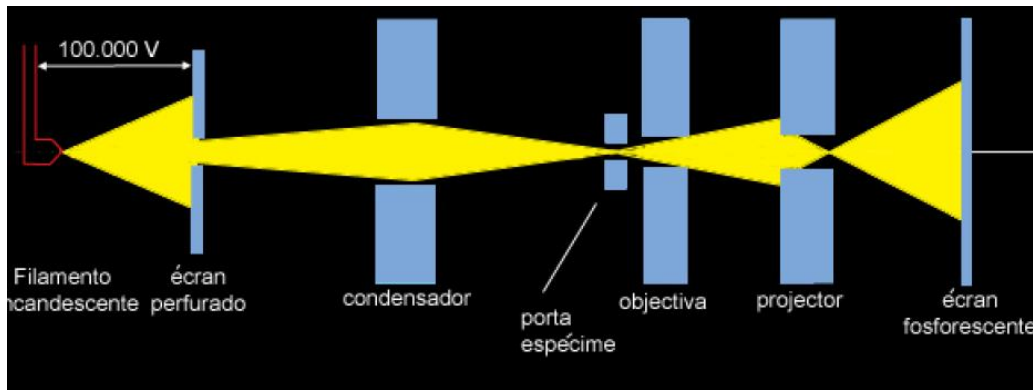


Figura 3.4 - Representação esquemática do percurso dos elétrons (amarelo) através dos principais componentes de um TEM. Adaptado de (Kenkel 2003).

O tamanho do núcleo das NPMs pode ser determinado por imagens de TEM. Esta técnica permite obter o tamanho total do núcleo, ou seja, a parte cristalina e a parte amorfa (Ascencio, Gutiérrez-Wing *et al.* 1998). São ainda fornecidos detalhes relativos à distribuição dos tamanhos e forma. Contudo, esta técnica requer análise por tratamento de imagens e tal tem de ser efectuado em um número de partículas estatisticamente válido (Wang 2000). Além disso, a preparação da amostra pode induzir agregação das partículas, o que vai adulterar os tamanhos e distribuição na solução.

O microscópio eletrónico utilizado foi um LEO 906E, a uma voltagem de 100 KeV. As amostras foram preparadas por deposição de uma gota de solução de partículas numa grelha de cobre e revestidas com carbono, deixando secar.

3.4.2 - Microscopia eletrónica de varrimento

Com intuito de analisar a morfologia das amostras foi utilizada a técnica de microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Nesta técnica, a amostra é irradiada por um feixe fino de elétrons e desta interação irá resultar a emissão de uma série de radiações, tais como: elétrons secundários, elétrons retrodifundidos, raios-X característicos, elétrons de Auger, etc. Quando estas radiações são devidamente captadas, permitem obter informações inerentes à amostra, nomeadamente topografia da superfície, a composição e a estrutura cristalina.

Os elétrons secundários são resultado da transferência de energia entre elétrons bombardeados e elétrons das camadas externas. O elétron do átomo vai sair deste com uma energia relativamente mais baixa, aproximadamente 50 eV. Estes elétrons são provenientes de uma interação inelástica. Esta interação ocorre à superfície e a sua intensidade é bastante

influenciada pela topografia da amostra, o que faz com que estes eletrões sejam muito importantes para a caracterização da topografia/morfologia desta (Bandyopadhyay 2007).

A estrutura de um SEM caracteriza-se pela coluna óptico-eletrónica (canhão de eletrões e sistema de redução do feixe de eletrões), por uma unidade de varrimento, por uma câmara de vácuo (onde se localiza o suporte para amostras), por um sistema de detetores e por um sistema de visualização de imagem (**Figura 3.5**).

O feixe é produzido no canhão de eletrões e o seu diâmetro é reduzido ao longo da passagem por diversas lentes eletromagnéticas, cuja finalidade é produzir um feixe de eletrões focado com um pequeno diâmetro numa determinada região da amostra.

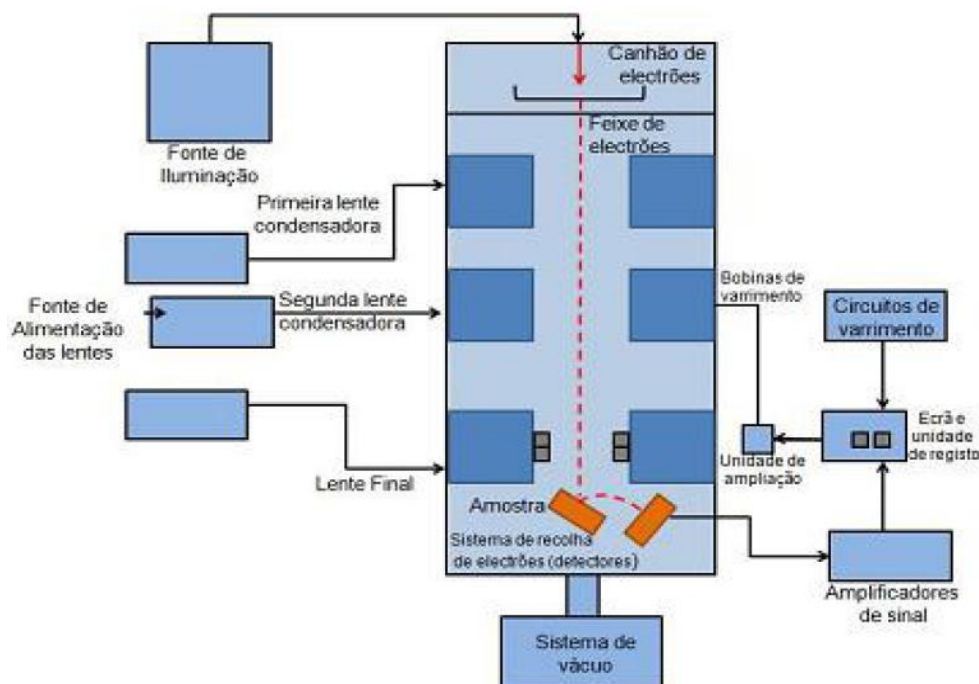


Figura 3.5 - Representação esquemática dos componentes principais de um SEM (Smith 1998).

As amostras foram analisadas por SEM num microscópio eletrónico JSM-6300 (JEOL) com uma voltagem de 5 KeV. Uma gota de amostra foi colocada na grelha de cobre e depois depositado um fino revestimento de ouro.

3.4.3 – Difração de raios-X

Por difração de raios-X (DRX) pode-se obter a estrutura cristalina das nanopartículas. A interação entre os raios-X e a amostra poderá originar processos de dispersão elástica, ou seja, os valores de comprimento de onda dos fotões e a energia dos mesmos mantém-se constante,

tal como o sistema de dispersão. Simultaneamente, os raios-X dispersos permanecem coerentes. Apenas a direção de propagação é alterada (Kumar, Hormes *et al.* 2005). A **Figura 3.6** representa a *difração* dos raios-X numa rede cristalina.

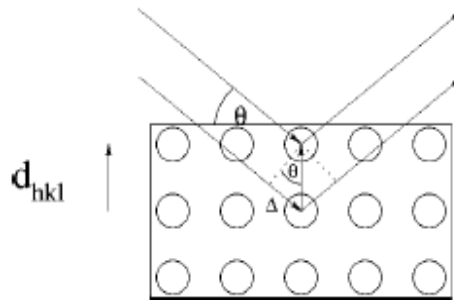


Figura 3.6 - Difração de raios-X, com ângulo de Bragg, numa rede cristalina. Adaptado de (Kumar, Hormes *et al.* 2005).

A *difração* dos raios-X no cristal é descrita através da lei de Bragg (Kenkel 2003), equação 3.1.

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta_B \quad (3.1)$$

Onde λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d_{hkl} representa a distância interplanar e θ_B o ângulo de Bragg (C.C 2004). De modo a obter um sinal forte (pico) com um ângulo de Bragg θ_B , medido relativamente a um dado plano, as difrações que ocorrem nos planos vizinhos (na rede cristalina) devem ser em fase – interferência construtiva.

Todos os materiais cristalinos apresentam um padrão de *difração* (raios-X *difratados* pelos planos hkl - índices de Miller), deste modo é possível identificar a fase do material. Os materiais identificados passam a fazer parte de bases de dados e a identificação do material faz-se por comparação dos espectros experimentais com os espectros padrão (da base de dados), tendo em conta características dos espectros como: posições dos picos, suas intensidades relativas e os respetivos planos hkl .

Num espectro de *difração*, a intensidade pode ser usada para quantificar a proporção de um dado material numa mistura, por comparação das intensidades dos picos experimentais com as intensidades dos picos padrão (Laurent, Forge *et al.* 2008). O tamanho do cristal pode também ser calculado pelo espectro de DRX usando a equação de *Scherrer* (Liveri 2006)(eq. 3.2):

$$d = \frac{\kappa\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (3.2)$$

Onde d representa o tamanho médio do cristal, λ o valor do comprimento de onda dos raios-X incidentes, β a largura máxima a meia altura do pico do espectro, θ o ângulo de difração e K uma constante, dependente da morfologia da partícula, que varia entre 0,9 e 1 (Pinna 2009).

As partículas secas obtidas foram caracterizadas por difração de raios-X com um difratômetro PW 1710 da *Philips* e radiação Cu K α (40 kV e 30 mA) com comprimento de onda de 1.5405600 Å, sendo os respectivos espectros obtidos no *software* PC-APD, *Diffraction*.

3.4.4 - Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier

É sabido que as ligações moleculares vibram a diversas frequências, dependendo dos elementos e dos tipos de ligações que os unem. Para uma dada ligação, existem diversas frequências específicas de vibração. De acordo com a mecânica quântica, estas frequências correspondem ao estado fundamental (menores frequências) e diversos estados excitados (frequências elevadas). Uma forma de causar um aumento da frequência de vibração molecular é por excitação da ligação, fazendo com que esta absorva energia da luz. Para qualquer transição entre dois estados, a energia da luz (determinada pelo comprimento de onda) tem que igualar a diferença de energia entre os dois estados (eq. 3.3) – comumente estado fundamental (E_0) e primeiro estado excitado (E_1) (Allinger and Cava 1980).

$$E_1 - E_0 = \frac{h.c}{l} \quad (3.3)$$

h – constante de plank
 c - velocidade da luz
 l – comprimento de onda da luz

A energia correspondente a estas transições, entre estados moleculares vibracionais, é geralmente de 1 a 10 Kcal/mol, correspondendo à zona dos infravermelhos (IV) do espectro eletromagnético molécula (Kealey and Haines 2002). Assim, por comparação entre os valores de energia da radiação infravermelha absorvida e os valores característicos de cada molécula, podemos identificar as moléculas presentes nas amostras, ou seja, a interpretação de um

espectro de absorção baseia-se na associação da absorção de energia à presença de determinados grupos estruturais na amostra.

Para preparar as pastilhas para análise por FTIR, as NPMs (0,1% a 2,0%) foram adicionadas a KBr, bem seco, sendo a mistura prensada – Prensa Manfredi OL57 – para se obterem as pastilhas. As medições de FTIR foram realizadas à temperatura ambiente num dispositivo FTLA 2000- série 100 da ABB no modo ATR (*attenuated total reflectance*) com uma largura de banda entre 4000 e 650/500 cm^{-1} . A resolução foi de 4 cm^{-1} e 32 varrimentos. O espectro foi obtido com o *software* Bomem - GRAMS/LT (v 7.0) - Thermo Galatic.

3.4.5 – Dispersão dinâmica de luz

A dispersão dinâmica de luz (também conhecida por PCS – *Photon Correlation Spectroscopy*) mede a flutuação da intensidade da luz dispersa causada pelo movimento das partículas (movimento Browniano) para obter a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das mesmas (**Figura 3.7**) (Mehnert and Mäder 2001).

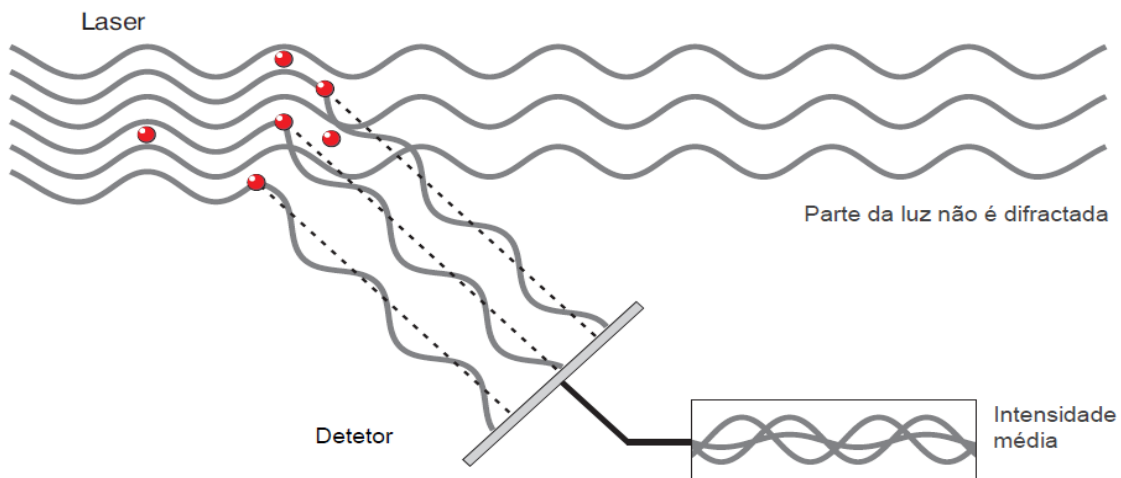


Figura 3.7 - Esquema de funcionamento da DLS. A luz dispersa é desviada para um detector sendo obtidas intensidades médias que serão convertidas em tamanhos.

Uma característica importante do movimento Browniano, para a DLS, é o fato de partículas pequenas se moverem rapidamente enquanto as maiores se movimentam lentamente (Xu 2008). A relação entre o tamanho da partícula e a velocidade a que esta se move é definida na equação de *Stokes-Einstein* (Liveri 2006) (eq. 3.4).

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R} \quad (3.4)$$

K_B : constante de *Boltzman*

T : temperatura absoluta

η : viscosidade do solvente

R : raio da partícula

A análise por DLS fornece o valor médio do raio hidrodinâmico (*Z-average*) da partícula, e foi realizada com o Zetasizer NANO ZS-ZEN3600 da Malvern (*Malvern Instruments Limited*, UK), usando um laser He-Ne (comprimento de onda de 633 nm) e um ângulo de detecção de 173° (backscatter detection). A dispersão de NPMs foi diluída - de modo a evitar concentrações elevadas que resultariam em dispersão múltipla da luz – e filtrada (poro 22 µm). Em seguida foi analisada numa *cuvette* de poliestireno com um tempo de estabilização de 4 minutos (mínimo) a 25 °C. Para cada amostra foram realizadas, pelo menos, 6 medições (recomendado pelo fabricante). O *software* usado para obtenção dos dados foi o Zetazizer 6.20, da Malvern Instruments Ltd.

3.4.6 – Potencial Zeta

No caso de NPMs em meio líquido, não existe ainda nenhuma técnica totalmente eficaz para determinar a carga superficial das NPMs. O que se faz geralmente é determinar o potencial eléctrico de uma zona periférica à superfície da partícula (*Diffuse layer*). Esta zona, relacionada com o movimento de partículas em líquido, é apelidada de zona de deslizamento (*Slipping plane*). A **Figura 3.8.** ilustra a disposição das camadas referidas.

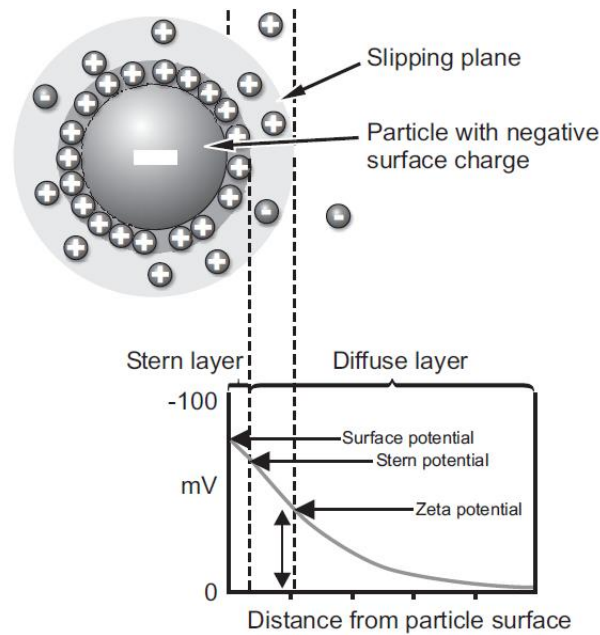


Figura 3.8 - Esquema representativo das diferentes camadas associadas a uma partícula em suspensão.

O potencial medido no *slipping plane* corresponde ao potencial ζ , um parâmetro fundamental para nanopartículas em suspensão (Xu 2008). Como tal, é uma técnica muito usada em estudos de estabilidade e adsorção (Delgado, González-Caballero *et al.* 2007). Na prática, é o potencial ζ que determina a estabilidade dos sistemas coloidais. Geralmente, partículas com potencial ζ superior a $|30|$ mV são consideradas cineticamente estáveis – não agregam devido a maiores interações repulsivas entre si (Gonsalves 2008).

A determinação do potencial ζ foi realizada por *Electrophoretic Light Scattering* (ELS). A mobilidade eletroforética (U_E) é obtida através de uma eletroforese - onde um campo elétrico é aplicado a um eletrólito - e medição da velocidade das partículas por *Laser Doppler Velocimetry* (LDV). O potencial zeta é depois obtido através da equação de Henry (Delgado, González-Caballero *et al.* 2007) (eq.3.5).

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (3.5)$$

ζ : potencial zeta

U_E : mobilidade eletroforética

ε : constante dielétrica

η : viscosidade

$f(ka)$: função de Henry (1.5 para a aproximação de Smoluchowski)

O potencial ζ foi determinado com o Zetasizer, NANO ZS -ZEN3600 da Malvern (Malvern Instruments Limited, UK) usando um laser He-Ne (comprimento de onda de 633 nm) e um

ângulo de detecção de 173 ° (*backscatter detection*). A dispersão de NPMs foi analisada numa cuvette produzida pela Malvern – *folded capillary cell* - e para cada amostra foram realizadas 10 medições. O *software* usado para obtenção dos dados foi o Zetazizer 6.20, da Malvern Instruments Ltd.

3.4.7 – Magnetoforese

Para determinar os tempos óptimos de separação magnética, foi utilizado um sistema de magnetoforese acoplado a retroiluminação e sensor óptico (De Las Cuevas, Faraudo *et al.* 2008; Andreu, Camacho *et al.* 2011; Benelmekki, Caparros *et al.* 2011). A estimativa do tempo de separação das nanopartículas pôde ser obtida após aplicação de um campo magnético, pois a força magnética exercida sobre as nanoesferas (eq. 3.6) é equilibrada pela força de atrito viscoso (*d-drag*) (eq. 3.7), obtendo-se assim a velocidade magnetoforética (eq. 3.8)(De Las Cuevas, Faraudo *et al.* 2008; Suwa and Watarai 2011).

$$F_m = \frac{4}{3} \pi R^3 M \cdot V B_0 \quad (3.6)$$

M – magnetização da partícula por unidade de volume
 B_0 – campo magnético criado

$$F_d = -6\pi\eta v \quad (3.7)$$

η – Coeficiente de viscosidade (10⁻³ Pa para a água)

$$v = \frac{2R^2}{9\eta} M \cdot V B_0 \quad (3.8)$$

O dispositivo empregue nos ensaios de magnetoforese foi o sistema SEPMAG LAB 1x25 mL 2042. Este dispositivo consiste numa cavidade cilíndrica que possui um elevado campo magnético permanente com um gradiente horizontal permanente direcionado às paredes da estrutura cilíndrica (**Figura 3.9**). Este ensaio foi realizado com campo magnético de baixo gradiente (*Low Gradient Magnetic Field* – LGMF) (<100 T/m), dispondo um recipiente de 1,5 cm de raio, contendo 25 mL de solução na cavidade cilíndrica descrita.

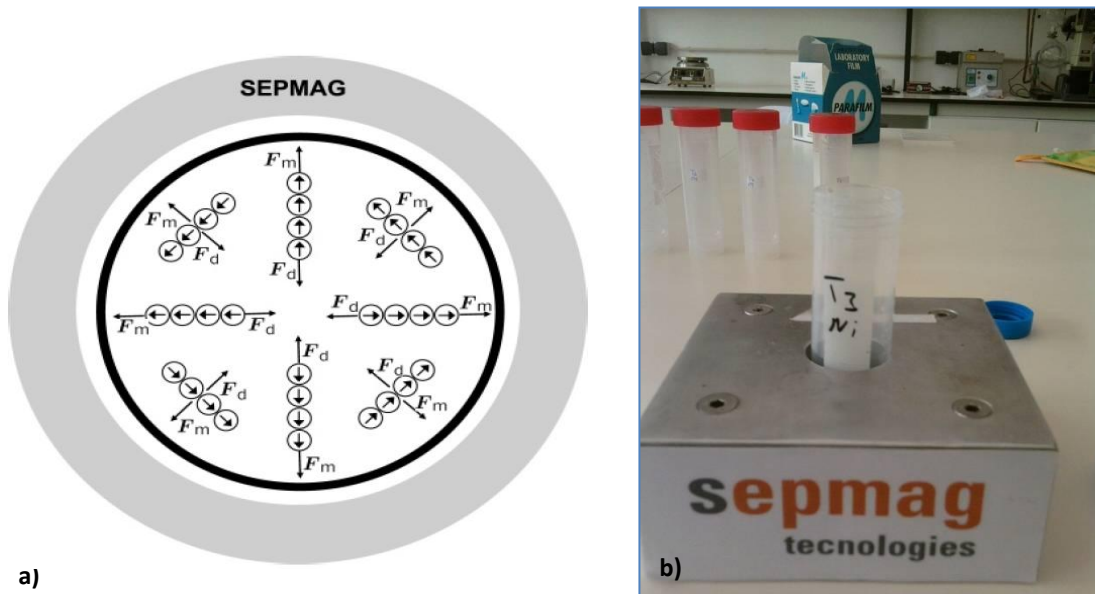


Figura 3.9 – a) Esquema do comportamento de partículas magnéticas durante a separação de campo magnético de baixo gradiente de um SEPMAG. Assume-se que as partículas formam agregados alongados, com os campos magnéticos direcionados para o campo magnético. A força magnética (F_m) direciona-se para o gradiente magnético e é contrabalançada pelo atrito viscoso (F_d). Adaptado de (De Las Cuevas, Faraudo *et al.* 2008). b) Foto obtida durante utilização do separador magnético.

A solução, inicialmente turva, torna-se progressivamente transparente à medida que as partículas se vão acumulando nas paredes do recipiente. As medições da opacidade foram realizadas com uma fonte de luz externa SEPMAG CBL Q 250 mL.

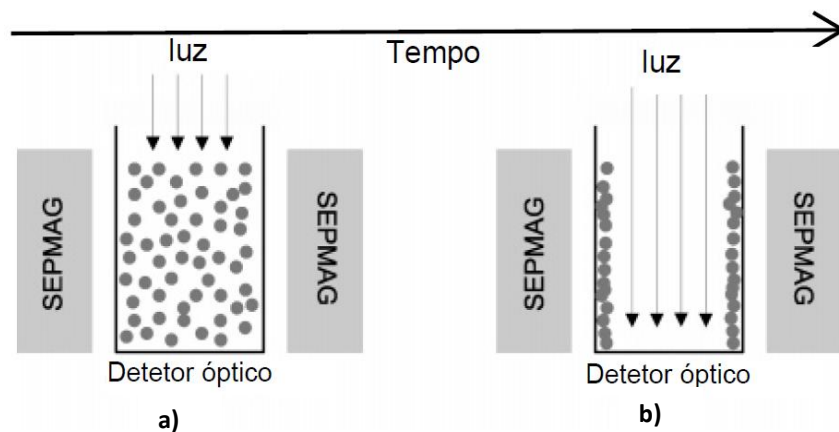


Figura 3.10 - Ilustração do método utilizado na medição da opacidade da dispersão, durante o processo de magnetoforese. A luz incide em cima da dispersão e atinge o fotodetector (situado no fundo) após dispersão pela amostra. a) Inicialmente, as partículas estão distribuídas uniformemente e a opacidade da amostra é elevada. b) Depois de algum tempo, as partículas movem-se em direção às paredes do cilindro, originando um círculo transparente (“limpo”), reduzindo a opacidade da amostra. Adaptado de (De Las Cuevas, Faraudo *et al.* 2008)

3.5 – Espectroscopia de absorção atômica

A concentração de íons Ni^{2+} , em solução aquosa, foi determinada por espectroscopia de absorção atômica (EAA) de chama.

Quando soluções de íons metálicos são expostas à chama, vários processos em cascata ocorrem rapidamente. Primeiro, o solvente evapora deixando para trás os elementos que compõem a sua estrutura inicial. Em seguida, o composto (sal) dissocia-se em átomos – íons metálicos são transformados em átomos. Posteriormente, se os átomos são facilmente excitados (apenas 0,1 %) pela energia térmica da chama, irá ocorrer um processo de ressonância, no qual os átomos alternam entre o estado excitado e o estado fundamental. Quando os átomos “caem” para o estado fundamental (processo natural), um espectro de emissão é obtido. Os comprimentos de onda emitidos estão na região do visível do espectro e a chama apresenta a cor característica do elemento a analisar. Trata-se de uma cor característica pois cada elemento possui uma energia de transição específica que corresponde a uma zona, também específica, do espectro (Kenkel 2003).

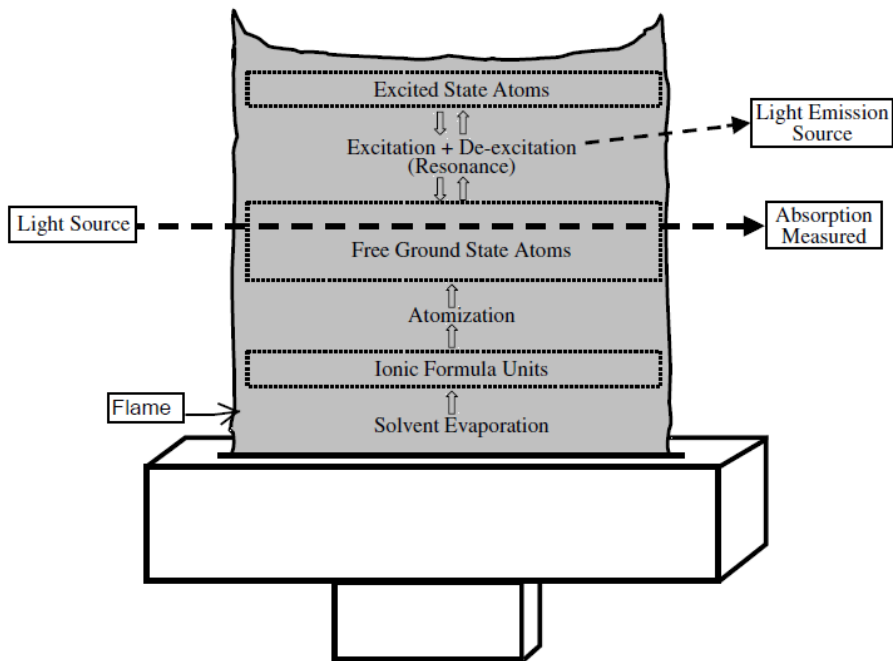


Figura 3.11 - Ilustração do processo que ocorre quando uma solução de íons metálicos é introduzida na chama de um espectrómetro de absorção atômica. Adaptado de (Kenkel 2003).

Os átomos não excitados pela chama (99.9%) ficam disponíveis para serem excitados por um feixe de luz (**Figura 3.11**). Para isso, uma fonte de luz é usada e o feixe é direcionado

para a chama. Este ensaio está de acordo com a lei de Beer (eq. 3.9) (Kenkel 2003), sendo a largura da chama correspondente ao l .

$$A = \epsilon lc \quad (3.9)$$

A: absorvância

ϵ : absorbtividade molar da substância

l : distância que a luz atravessa

c : concentração de substância absorvente no meio

A lei de Beer mostra a relação entre a transmissão de luz, através de uma substância, e a concentração da mesma, assim como entre a transmissão e a distância que a luz atravessa. Se forem conhecidos l e α , a concentração da substância pode ser deduzida a partir da quantidade de luz transmitida (Kealey and Haines 2002).

O EAA de chama utilizado - AAS PYE Unicam SP9 da Philips - usa acetileno como combustível e ar como oxidante. As amostras foram diluídas (1:4) utilizando HNO₃ 0,2 %. Para cada amostra foram realizadas sete medições.

CAPÍTULO 4

:RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A primeira fase deste trabalho consistiu, como referido nos materiais e métodos, no estudo de diferentes variáveis durante a síntese das nanopartículas magnéticas. Assim, inicialmente, estudou-se a influência do ratio de sais de ferro (FeCl_3 e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e de AC na quantidade, no tamanho e dispersão das NPMs. Posteriormente, as NPMs foram caracterizadas por DRX, DLS, potencial ζ e TEM. O passo final consistiu na aplicação das NPMs na remoção de Ni^{2+} em água. As nanopartículas magnéticas foram revestidas com sílica e caracterizadas pelos métodos já referidos, aos que se juntaram ainda FTIR e SEM. Para apurar a eficiência dessa aplicação foi realizada espectroscopia de absorção atômica.

4.1 – Efeito da concentração de sais de ferro no meio

Na síntese Fe10 foram despendidas grandes quantidades de sais de ferro. Sabendo da propalada influência que as concentrações de sais têm nos tamanhos e dispersão das NPs (Babes, Denizot *et al.* 1999; Itoh and Sugimoto 2003; Maity and Agrawal 2007), outras sínteses (Fe11, Fe12 e Fe13) foram realizadas usando menores quantidades de sais. Aferiu-se assim se com emprego de menores quantidades de sais seria possível obter tamanhos similares aos obtidos em Fe10. Nas sínteses Fe12 e Fe13, o dobro (2C) e o triplo (3C) das quantidades de sais em Fe11 (C) foram, respetivamente, usadas. Maiores massas de NPMs são obtidas com maiores massas de sais.

Tabela 4.1 – Massa de NPMs obtidas, tamanho (r) e respetivas percentagens, z-average (r) e índice de polidispersão (Pdl) das NPMs. O desvio padrão (σ) refere-se a seis medições consecutivas.

| Amostra | NPMs obtidas (g) | Tamanho | | Z-average (r.nm) $\pm \sigma$ Pdl $\pm \sigma$ |
|------------|------------------|---------|-----|---|
| | | r (nm) | % | |
| Fe 10 | 30,2 | 38,6 | 61 | 21,13 \pm 1,896 |
| | | 12,88 | 39 | 0,210 \pm 0,052 |
| Fe 11 (C) | 9,1 | 49,39 | 100 | 42,24 \pm 0,478 0,178 \pm 0,013 |
| Fe 12 (2C) | 15,9 | 86,58 | 72 | 55,97 \pm 1,537 |
| | | 31,16 | 28 | 0,201 \pm 0,019 |
| Fe 13 (3C) | 21,7 | 50,72 | 68 | 60,02 \pm 2,862 |
| | | 154,1 | 30 | 0,230 \pm 0,034 |
| | | 304,1 | 1,4 | |

De acordo com os valores de Pdl ($0,178 \pm 0,013$) e percentagem dos tamanhos (100%), apresentados na **Tabela 4.1**, a síntese Fe11 apresenta as melhores dispersões (monodispersão). Além disso, foi também em Fe11 que se obtiveram o menor tamanho ($42,24 \pm 0,478$). As restantes amostras apresentam polidispersões e tamanhos superiores aos de Fe11. Embora a amostra de Fe10 apresente NPMs com tamanhos menores, as quantidades de sais gastas nesta síntese são demasiado elevadas.

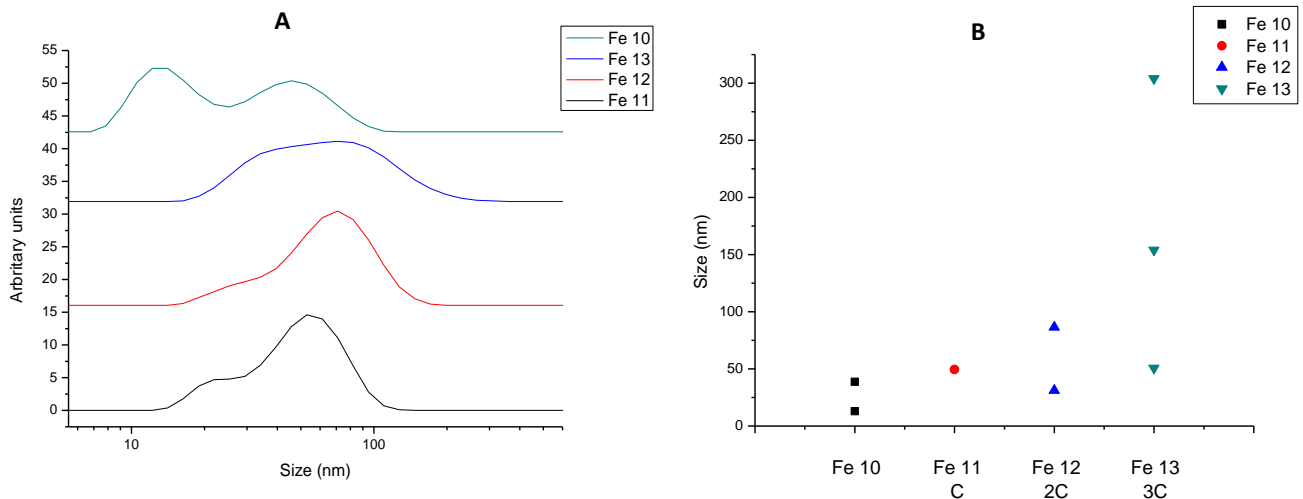


Figura 4.1 - Distribuição do tamanho das amostras de Fe10, Fe11, Fe12 e Fe13 (dados indexados à Tabela 4.1); A-toda a distribuição, B – Valores máximos de cada amostra.

Os resultados da **Figura 4.1**, indicam que menores NPMs são obtidas quando se usam menores massas de sais, o que é consentâneo com resultados de outros autores (Jolivet and Tronc 1988; Babes, Denizot *et al.* 1999; Laurent, Forge *et al.* 2008). Embora a síntese Fe 10 apresente as menores nanopartículas, apesar de utilizar as maiores massas de sais, as situações não são comparáveis, uma vez que a proporção de sais, Fe^{2+}/Fe^{3+} , nesta síntese foi diferente das restantes (Fe11, Fe11 e Fe13). Nos gráficos, pode-se ainda verificar que a polidispersão aumenta proporcionalmente com o aumento da massa. A síntese Fe11 apresenta o melhor compromisso entre massas de sais, tamanho e dispersão das NPMs.

4.2 – Efeito da concentração de ácido cítrico nas nanopartículas

Como se pode ver na **Tabela 4.2**, as amostras CA-1 e CA-2 apresentam uma polidispersão enquanto a amostra CA-3 possui uma monodispersão. Esta amostra possui o valor mais baixo de Pdl e menor Z-average ($52,39 \pm 0,9648$).

Tabela 4.2 - Tamanho (r) e respectivas percentagens, z-average (r) e índice de polidispersão (Pdl) das NPMs. O desvio padrão (σ) refere-se a oito medições consecutivas.

| Amostra | Tamanho | | Z-average (r.nm) $\pm \sigma$ |
|---------|---------|-----|---|
| | r (nm) | % | Pdl $\pm \sigma$ |
| CA-1 | 50,72 | 68 | $55,02 \pm 2,862$ $0,230 \pm 0,034$ |
| | 154,1 | 30 | |
| | 304,1 | 1,4 | |
| CA-2 | 79,28 | 87 | $63,81 \pm 0,5244$ $0,162 \pm 0,019$ |
| | 30,48 | 13 | |
| CA-3 | 59,24 | 100 | $52,38 \pm 0,9648$ $0,144 \pm 0,017$ |

De acordo com os resultados ilustrados na **Figura 4.2**, as diferentes proporções de NPMs e AC influenciam o tamanho das primeiras. Tal seria de esperar, uma vez que os iões do AC adsorvem à superfície da NPM e inibem o seu crescimento (Bee, Massart *et al.* 1995). Devido à monodispersão e tamanhos reduzidos, a amostra CA-3 é a mais adequada para uma putativa aplicação, especialmente se forem pretendidas NPMs pequenas.

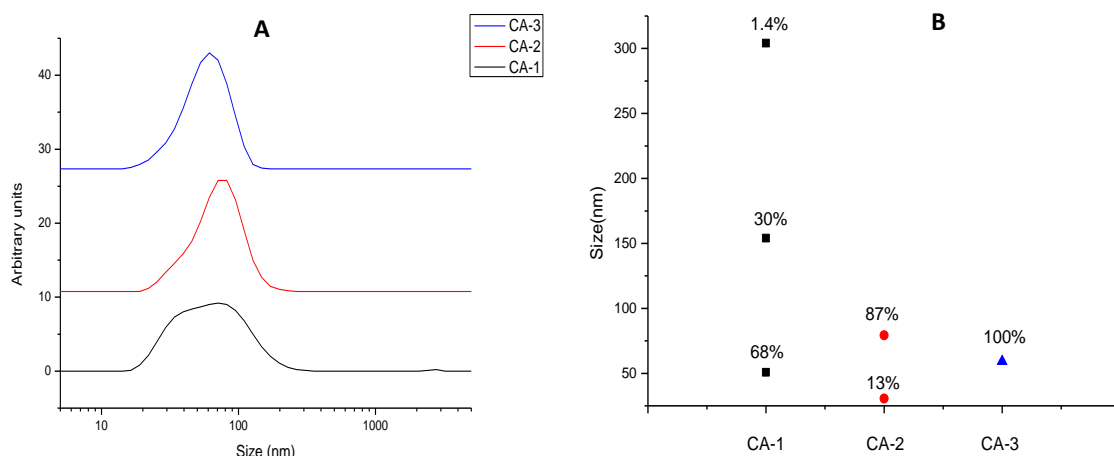


Figura 4.2 - Distribuição do tamanho das amostras de Fe10, Fe11, Fe12 e Fe13 (valores indexados à Tabela 4.2); A- toda a distribuição, B – Valores máximos de cada amostra.

4.3 – Caracterização das nanopartículas magnéticas

Antes do revestimento com sílica e ulteriores ensaios para remoção de Ni^{2+} em solução aquosa, as NPMs a testar foram caracterizadas por DLS, potencial ζ , DRX e TEM.

Por DLS foi possível obter o diâmetro hidrodinâmico das NPMs, obtidas na síntese Fe11. Podem ser obtidos valores de distribuição de tamanhos por intensidade, por volume ou por número. A distribuição de tamanhos por intensidade (**Figura 4.3**), mostra uma polidispersão com dois picos destacados, um em 30,11 nm e outro em 95,31 nm de diâmetro.

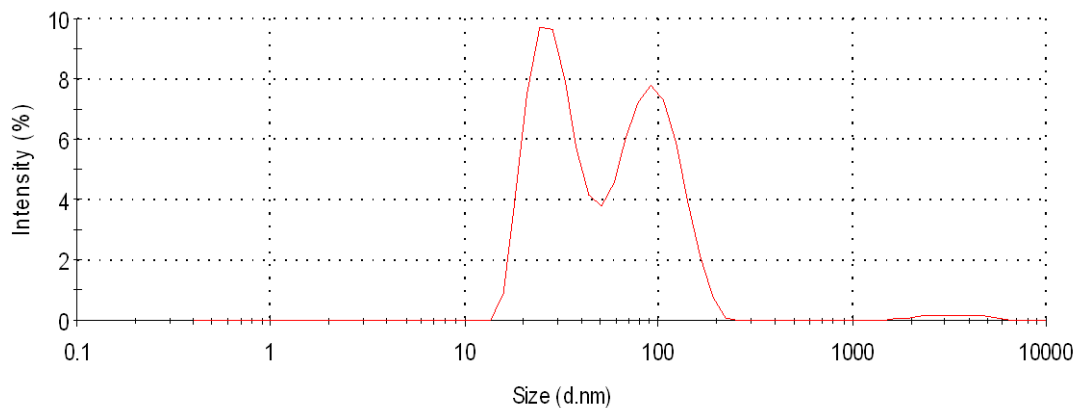


Figura 4.3 - Distribuição do tamanho por intensidade. Valores médios obtidos com seis medições consecutivas obtidos após 4 minutos de tempo de estabilização à temperatura de 25 °C.

A partir da distribuição por intensidade é obtida a distribuição por volume. Nesta distribuição (**Figura 4.4**), obteve-se um pico estreito com um tamanho médio de 25,9 nm de diâmetro.

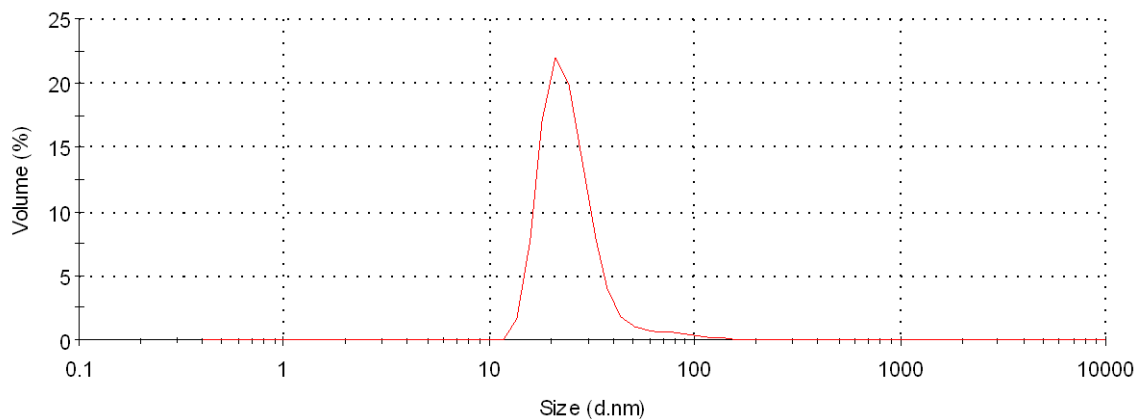


Figura 4.4 - Distribuição do tamanho por volume. Valores médios obtidos com seis medições consecutivas obtidos após 4 minutos de tempo de estabilização à temperatura de 25 °C.

A distribuição de tamanhos por número (**Figura 4.5**), mostra uma monodispersão de 21,09 nm de diâmetro. Este tipo de distribuição de tamanhos deve ser cuidadosamente interpretada e apenas aceite se houver uma boa curva de correlação (fornecida pelo software), o que se verificou neste caso.

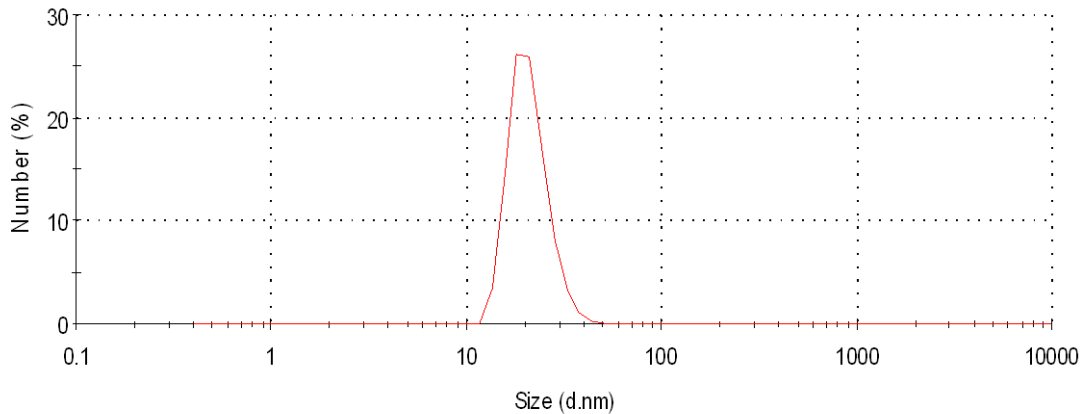


Figura 4.5 - Distribuição do tamanho por número. Valores médios obtidos com seis medições consecutivas obtidos após 4 minutos de tempo de estabilização à temperatura de 25 °C.

O valor de tamanhos mais preciso fornecido pela técnica de DLS é o Z-average (em condições ideais). Para esta amostra o Z-average obtido foi de $42,26 \pm 3,796$ nm e Pdl de $0,310 \pm 0,052$. No entanto, o valor de Z-average é obtido por intensidade da luz dispersa, e neste tipo de distribuições (por intensidade), as NPMs com diâmetros maiores “inflacionam” significativamente tanto as distribuições por volume como por intensidade. Há ainda que ter em conta a possibilidade de as interações interpartículas (dipolo magnético - dipolo) ou a existência de artefatos (possível dado o elevado Pdl) como putativas causas para a obtenção de tamanhos superiores aos reais (Pecora 1985; Gupta and Kompella 2006). Adicionalmente, quando estão envolvidos tamanhos reduzidos de NPs ou se aumenta a concentração destas em suspensão, as medições correspondem aos valores de difusão de um conjunto de várias partículas (agregados) e não de apenas uma partícula (Xu 2008). Assim sendo, a distribuição por número **Figura 4.6** deverá fornecer um valor médio de tamanho (21,09 nm) mais próximo do tamanho das nanopartículas.

Na realidade, as situações referidas, constituem as limitações inerentes à técnica por DLS, que não deixando de ser útil pela sua rapidez e relativa precisão, requer a complementação com outras como DRX e TEM.

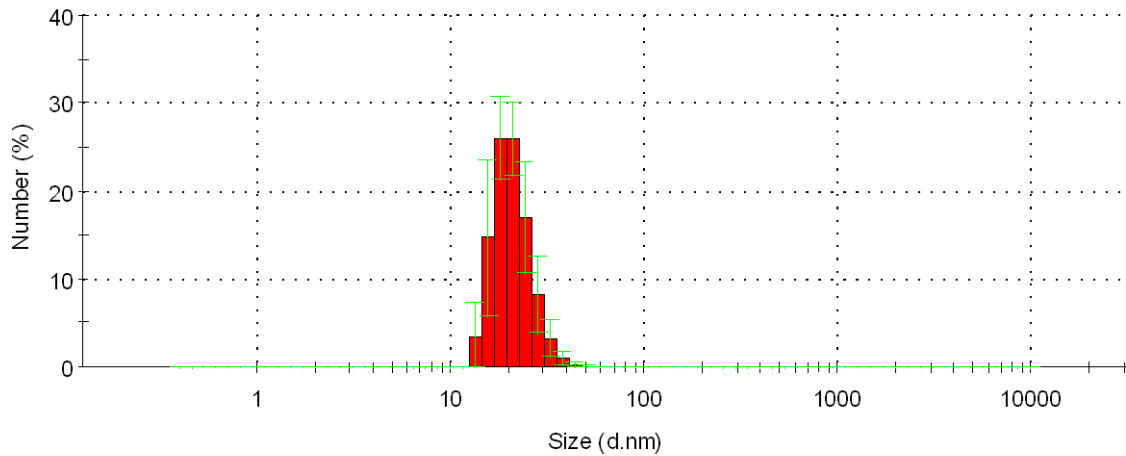


Figura 4.6 - Histograma de distribuição de tamanho por número das NPMs e respectivas barras de erro. Resultados obtidos, após quatro minutos de estabilização, em seis medições consecutivas à temperatura de 25 °C.

Em relação aos difratogramas de DRX (**Figura 4.7** e **Figura 4.8**), observam-se picos largos resultado do efeito de confinamento quântico associado às nanopartículas (Fe11) (Bajaj, Malhotra *et al.* 2010). São identificados cinco picos (*HKL*) característicos de uma estrutura cristalina em espinela (comum à magnetite e maghemite): 220; 311; 400; 422 e 511 (Ma, Qi *et al.* 2007; Campelj, Makovec *et al.* 2008). No entanto, dado que a síntese não foi realizada em atmosfera livre de oxigênio toda a magnetite (instável) deverá ter sido oxidada a maghemite.

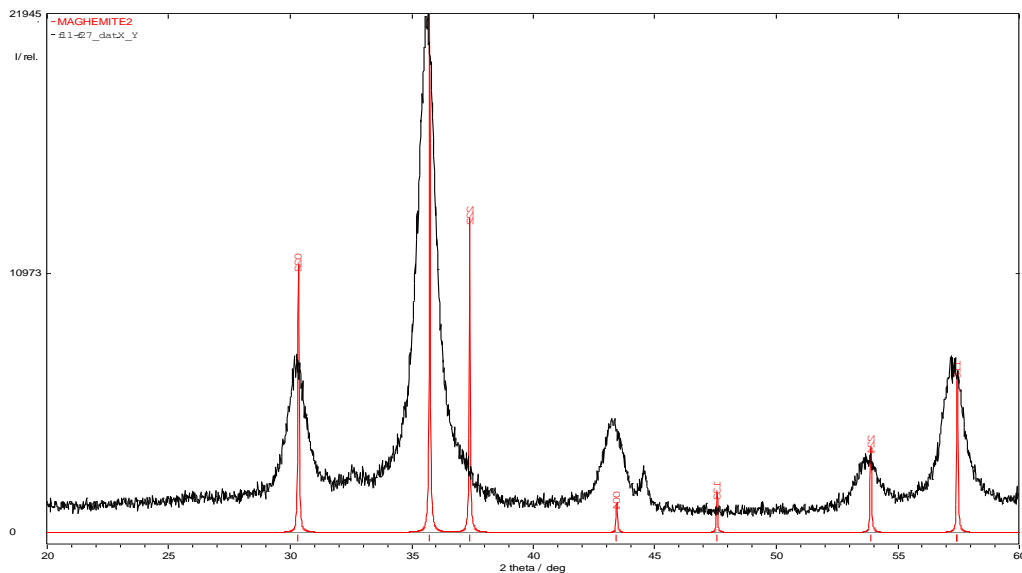


Figura 4.7 - Difratograma de raios-X de NPMs (preto) e padrão de maghemite (vermelho).

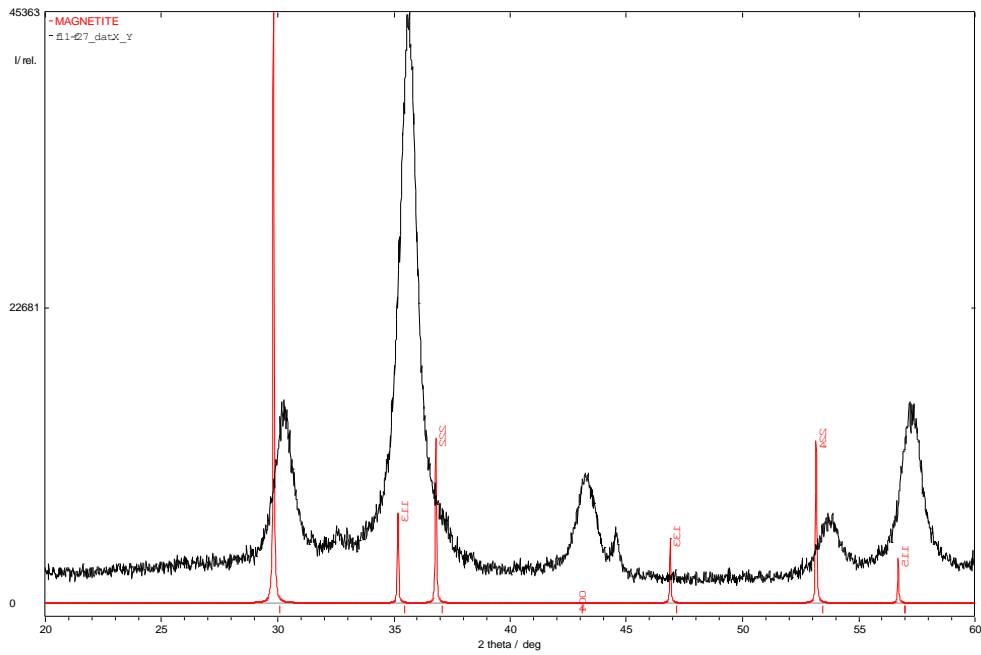
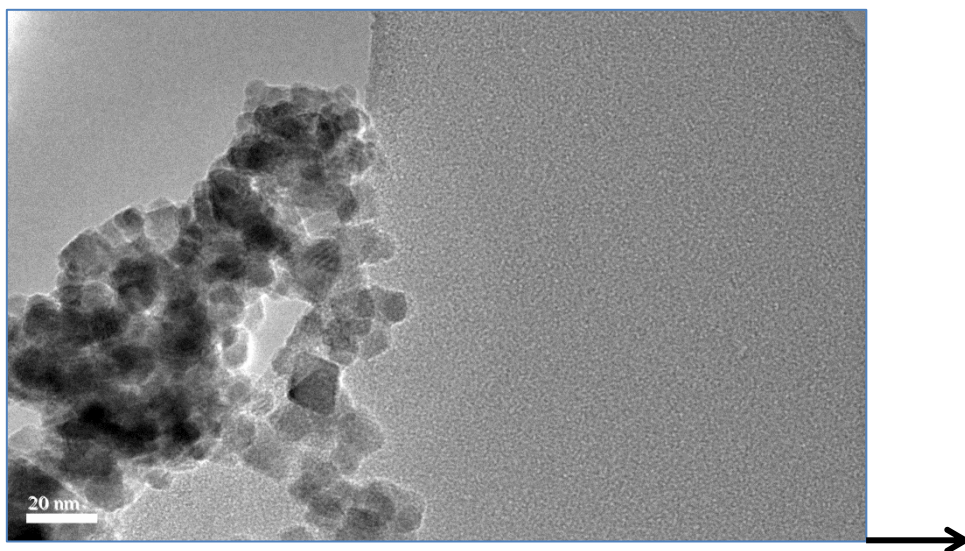


Figura 4.8 - Difratoograma de raios-X de NPMs (preto) e padrão de magnetite (vermelho).

Adicionalmente, por análise quantitativa do difratograma com o PowderCell 2.4 (software), as amostras revelaram apenas a presença de maghemite. Com o mesmo *software*, e aplicando a equação de *Scherrer*, estimou-se um diâmetro de 17,91 nm, considerando o ângulo de Bragg 57,17 (2θ).

As imagens de TEM (**Figura 4.9**) mostram a morfologia indefinida das nanopartículas (Fe11), que apresentam uma estrutura cubica com faces planas. É possível ver também que o tamanho das NPMs é de cerca de 10 nm.



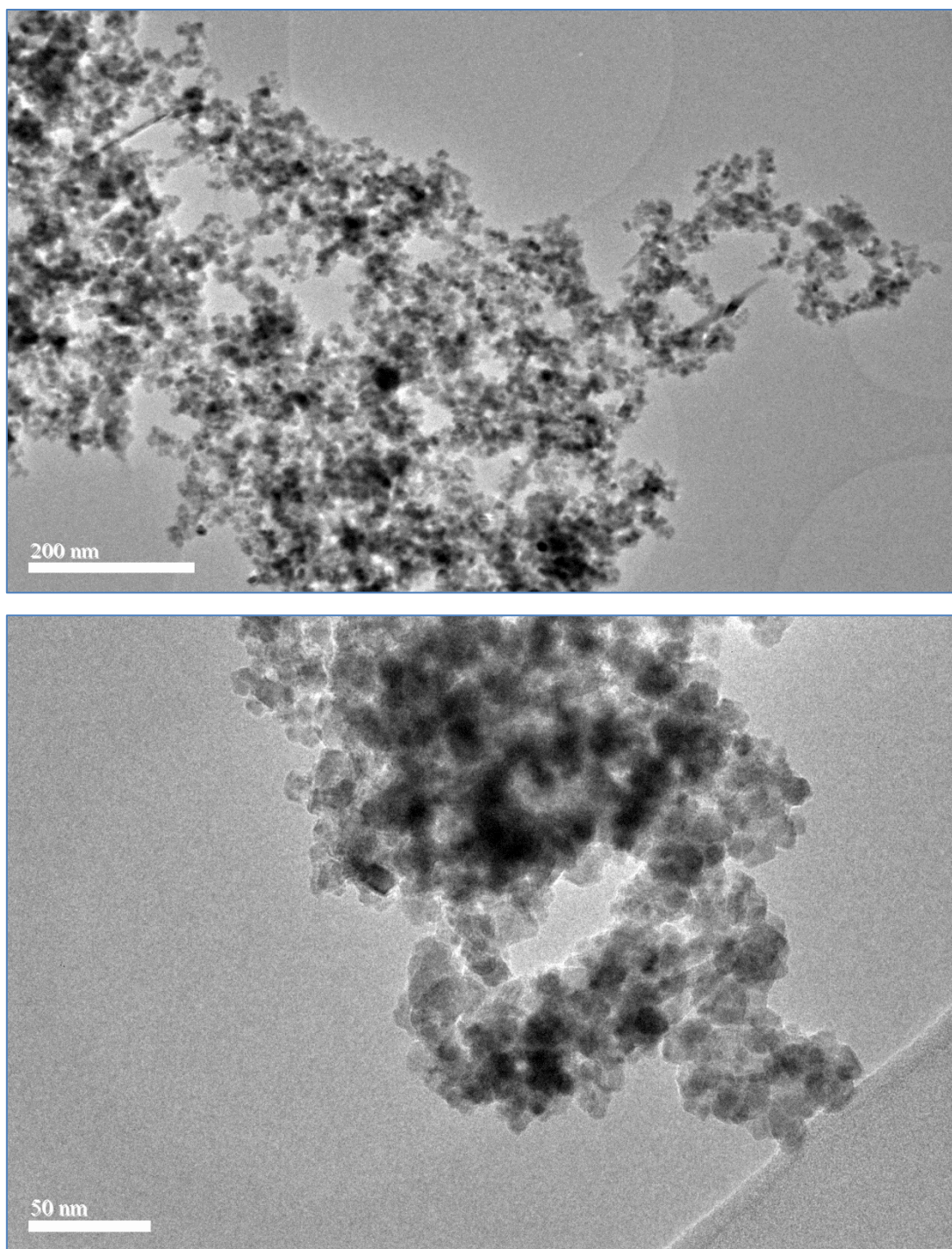


Figura 4.9 - Imagens TEM onde se vislumbram aglomerados de NPMs em forma de anel

O tamanho médio das partículas determinado por TEM é inferior aos valores obtidos por DLS. Tal deve-se, sobretudo, ao fato de mesmo na ausência de campo magnético externo as interações magnetoestáticas, entre partículas (dipolo magnético-dipolo), poderem causar aglomeração das mesmas (Aqil, Vasseur *et al.* 2008). Já foi demonstrado experimentalmente e por simulação/modelação, que as partículas formam estruturas em anel e “loop” devido às interações magnetoestáticas. Estas estruturas possuem um coeficiente de difusão menor que partículas isoladas e o diâmetro medido por dispersão da luz (DLS) será maior do que o tamanho elementar da partícula revelado por outras técnicas (DRX e TEM). Nas imagens apresentadas, é possível observar esses aglomerados de partículas e as estruturas em anel (Bradbury, Meneer *et al.* 1986)

Relativamente à carga superficial (ou da periferia) das NPMs (Fe11) a diferentes pH's, os resultados (**Figura 4.10**) indicam que as NPMs atingem alguma estabilidade apenas a pH's básicos, concretamente, a partir do pH≈9 onde apresenta um potencial $\zeta = -31,1 \pm 0,44$ mV.

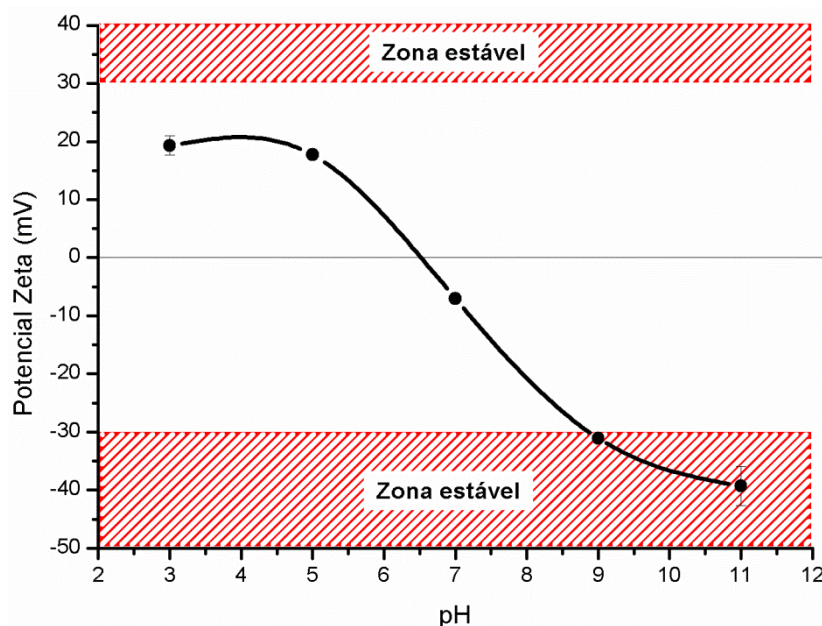


Figura 4.10 - Curvas do potencial ζ e respectivas barras de erro das NPMs em diferentes condições de pH. Para cada pH foram realizadas dez medições.

A estabilidade, também ilustrada no gráfico, está geralmente indexada a valores de potencial ζ mais positivos do que +30 mV e mais negativos do que -30 mV (Müller, Jacobs *et al.* 2001). À medida que o potencial ζ aumenta, as interações repulsivas serão maiores, conduzindo à formação de partículas mais estáveis e com uma distribuição mais uniforme de tamanhos. Como já foi referido, a estabilidade é crucial para mitigar a formação de agregados.

Deste modo, torna-se clara a necessidade de uma modificação da superfície das NPMs com intuito de controlar o seu potencial ζ e concomitantemente estabilizá-las viabilizando a sua aplicação (Vila, Sánchez *et al.* 2002).

4.4 – Esferas magnéticas de sílica para remoção de níquel em solução aquosa

Tal como já foi abordado durante a caracterização das NPMs e de acordo com a **Figura 4.11 a)**, o espectro de raios-X aponta para a presença de NPMs de magnetite ou maghemite (espectros similares). No entanto, tendo em conta o procedimento usado para sintetizar as NPMs – em presença de oxigénio - bem como a avaliação qualitativa oferecida pelo *software* Powdercell, a presença de maghemite é dada como certa em detrimento da magnetite (Maity and Agrawal 2007). Ainda sobre os espectros ilustrados na figura, é possível verificar a presença de um pico próximo dos 22° inerente à sílica (de Ferri, Lottici *et al.* 2011), tanto nas amostras de P1 como em P2. O presente espectro serve ainda para revelar a integridade da fase cristalina das NPMs, mesmo depois da exposição das NPMs a elevadas temperaturas durante os procedimentos para a síntese das esferas de sílica P1 e P2.

Na **Figura 4.11 b)**, os espectros de FTIR inerentes a ambas as amostras de esferas de sílica e ao CTAB, revelam que este foi completamente removido das amostras (P1 e P2).

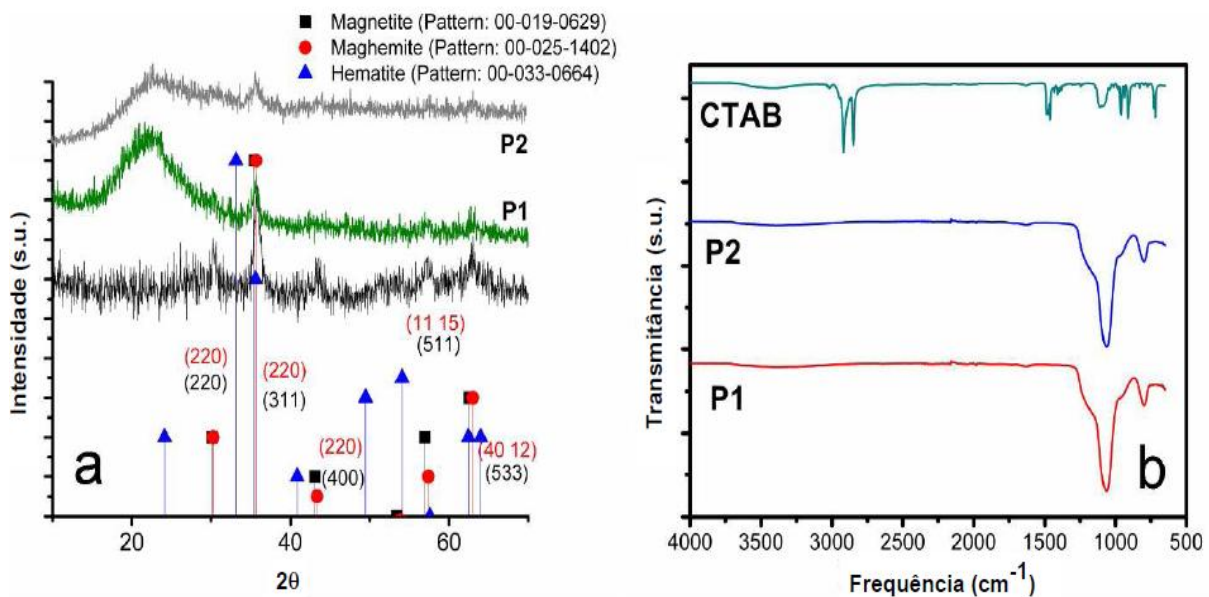


Figura 4.11 - a) Espectro de DRX das NPs sintetizadas (preto) e das amostras P1 e P2; b) espectro de ATR-FTIR das NPs sintetizadas, das amostras P1 e P2 e do surfatante CTAB.

A **Figura 4.12** revela imagens TEM das esferas de sílica P2, que foram calcinadas antes do tratamento hidrotérmal. Os compostos obtidos não apresentam uma morfologia “oca”. Além disso, pode ser observado um elevado número de esferas de sílica com reduzida ou sem incorporação de NPMs, ou seja, é visível a presença de algumas nanopartículas só de sílica.

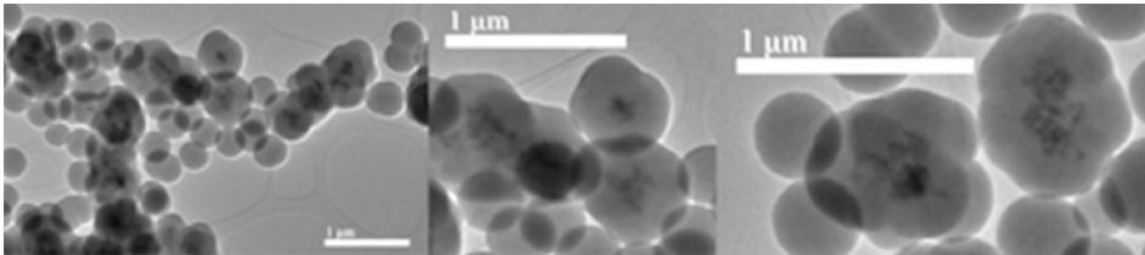


Figura 4.12 - Imagens TEM das amostras P2 exibindo formas quase esféricas com incorporação de nanopartículas/nanoagregados de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Também se pode observar um número assinalável de esferas de sílica com baixa incorporação de nanopartículas magnéticas.

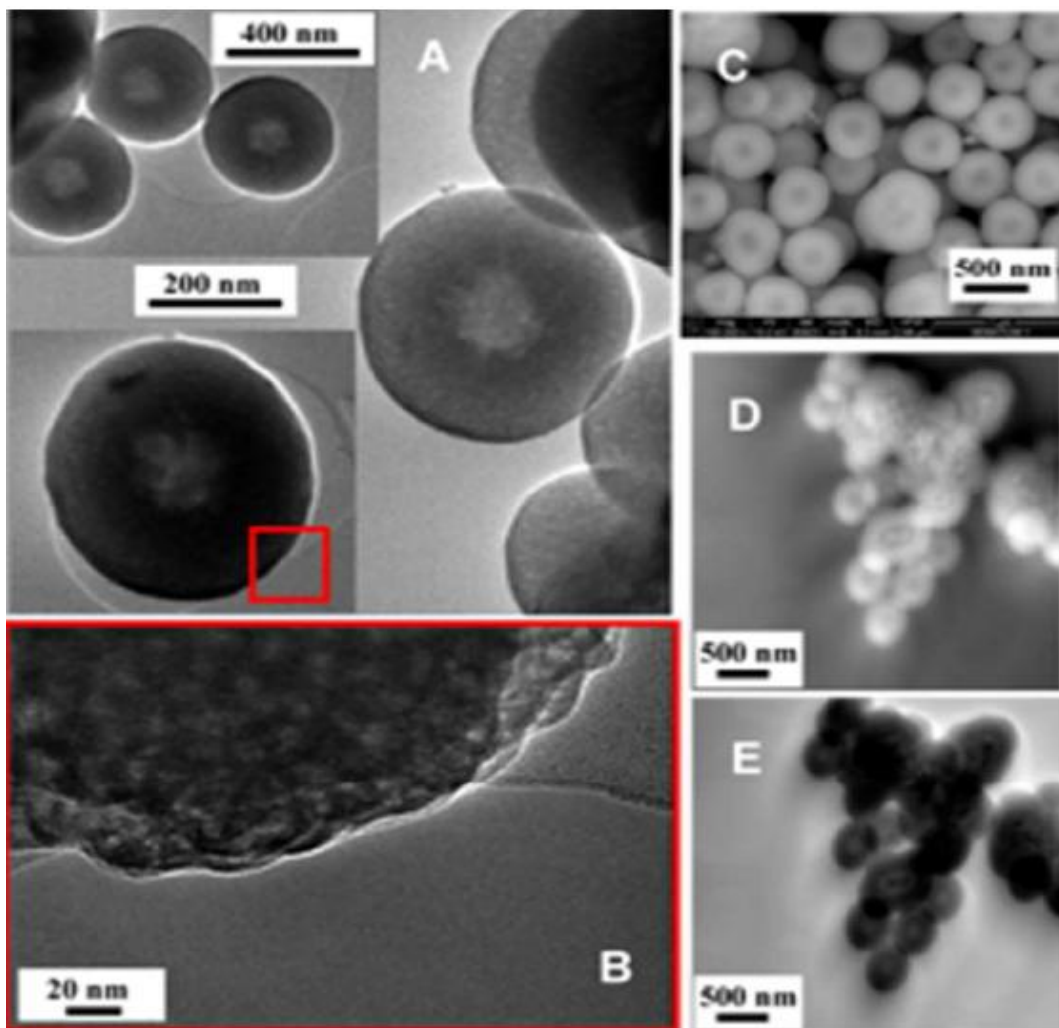


Figura 4.13 - Imagens TEM (A e B) e SEM (C) de amostras P1 que ilustram a morfologia oca das esferas magnéticas de sílica. D e E representam imagens de campo claro e campo escuro, respetivamente.

A **Figura 4.13** apresenta imagens de TEM e SEM obtidas com a amostra das nanopartículas de sílica P1. Estas exibem uma morfologia porosa homogênea e uma forma esférica com um diâmetro de cerca de 400 nm. As imagens de SEM revelam o mesmo tipo de morfologia.

A **Figura 4.14** mostra as curvas de magnetoforese das amostras P1 e P2 com um gradiente de campo magnético de 60 T/m. A concentração das amostras era de 5 g/L. No caso das amostras P1, todo o processo de separação teve a duração de apenas 16 min. Este é o comportamento típico de uma curva de magnetoforese (De Las Cuevas, Faraudo *et al.* 2008), apresentando um primeiro estágio relativo ao processo de agregação reversível das partículas, seguido por um decaimento paulatino da opacidade da suspensão, até se atingir uma transparência de 100%.

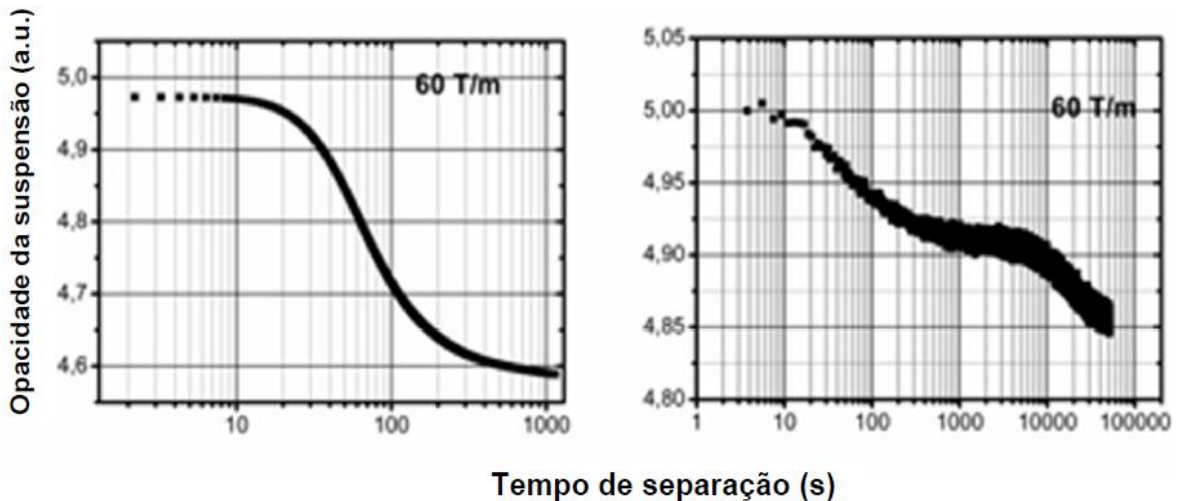


Figura 4.14 - Magnetoforese das amostras P1 e P2 em gradiente de campo magnético 60 T/m.

Relativamente à amostra P2, a curva de magnetoforese revela um primeiro momento onde ocorre uma ligeira diminuição da opacidade, e um segundo onde se dá progressivo decaimento da opacidade. Este comportamento indica que o processo de separação ocorre em duas etapas. A primeira separação magnética dura cerca de 16 minutos enquanto a segunda protela-se, aproximadamente, até 27 horas. Adicionalmente, mesmo ao cabo das 27 horas não se atingiu uma transparência de 100%. Esta situação está relacionada com as esferas de sílica sem incorporação de nanopartículas magnéticas que, permanecendo em solução (pois não são arrastadas para as paredes do recipiente introduzido no orifício do separador magnético), oferecem à mesma uma tonalidade branca opaca. Estes resultados são consentâneos com as imagens de TEM da Fig.4, que ilustra, precisamente, a presença esferas de sílica sem

incorporação de nanopartículas magnéticas. A redução da opacidade em P1 é aproximadamente 60% superior à verificada em P2.

A produção de esferas siliciosas é um processo algo complexo (**Figura 4.15**) no qual estão envolvidos de forma determinante três parâmetros inerentes à síntese, nomeadamente a cinética de reação (hidrólise e condensação), a interação entre Fe_2O_3 com as micelas de CTAB e ainda a interacção entre CTAB e a sílica. Inicialmente as NPMs são colocadas em contato com o CTAB numa mistura água-etanol a pH 10. Neste meio ocorrem interações eletrostáticas entre os compostos presentes que são responsáveis pela organização da suspensão – as nanopartículas e nanoagregados estão carregados negativamente enquanto as micelas apresentam carga positiva.

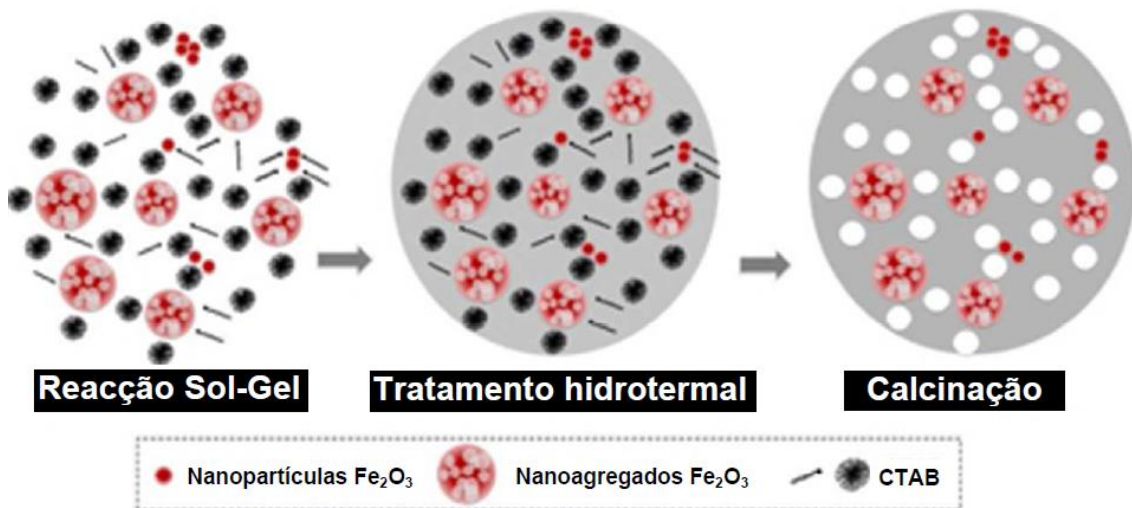


Figura 4.15 - Mecanismo de formação das esferas magnéticas porosas de sílica.

A aplicação do tratamento hidrotérmico permite remover o solvente retido nos poros do gel e concomitantemente promover uma uniforme distribuição dos agregados de nanopartículas magnéticas pelo volume da esfera de sílica (Cabella, Crich *et al.* 2006).

Na etapa de calcinação, a cápsula de sílica das esferas P1 é ligeiramente mais resistente, suportando a tensão superficial da força dos capilares durante o processo de secagem. Ainda neste processo, o CTAB contido na cápsula é removido. O processo de calcinação, que ocorre a 400 °C, não provoca a recombinação das ligações Si-O-Si, nem afeta a integridade da parede.

A confrontação entre as amostras P1 e P2 permite perceber o papel crucial que o tratamento hidrotérmico desempenha na formação de esferas de sílica com uma morfologia

aparentemente “oca”. Em concreto, no caso das esferas obtidas em P1 a sílica condensa na superfície periférica das esferas, originando deste modo um interior constituído por surfatante aglomerado e/ou nanoagregados magnéticos (Li, Shi *et al.* 2003). Acresce ainda que devido às elevadas pressões inerentes a este tipo de tratamento, as nanopartículas magnéticas livres, remanescentes em suspensão, tendem a associar-se às esferas de sílica. Posteriormente, a calcinação desemboca na formação de esferas que apresentam nanoagregados e nanopartículas magnéticas disseminados por toda a esfera de sílica (Lee, Park *et al.* 2007). A estrutura descrita está de acordo com o evidente contraste entre as extremidades escuras e o núcleo pálido evidenciados nas imagens de SEM e TEM (Fig. 3), condizentes com a morfologia oca. Por outro lado, imagens TEM das esferas de sílica em campo claro e campo escuro (figuras 3D e 3E), ilustram, mais uma vez, um acentuado contraste entre extremidade clara e núcleos pálido e a extremidade escura e o núcleo pálido, respetivamente - representando a incorporação de agregados magnéticos no centro da sílica. Os resultados atestam que as esferas magnéticas obtidas não são ocas. No caso das amostras P2, a morfologia é indefinida.

- Desempenho das esferas magnéticas, P1 e P2, na remoção de Ni^{2+} em solução aquosa

Como já foi previamente aludido, os valores de potencial zeta são um valioso indicador da estabilidade das NPMs, o mesmo princípio se aplica às esferas de sílica. Adicionalmente o processo de remoção de Ni^{2+} em solução aquosa, será tanto mais eficiente quanto mais estáveis forem as esferas magnéticas em solução. Deste modo, o estudo da variação do potencial zeta em função da variação do pH permitiu inferir quais os valores de pH aos quais as esferas magnéticas apresentam superior estabilidade. A maior estabilidade exibida pelas esferas magnéticas está de forma indelével associada a forças repulsivas entre estas, mitigando a agregação e ulterior sedimentação das mesmas. Assim, como se pode verificar na **Figura 4.16**, as esferas magnéticas de sílica possuem maior estabilidade a pH's básicos (superior a 9) e as esferas de P1 possuem maior estabilidade que as esferas de P2 para um mesmo valor de pH.

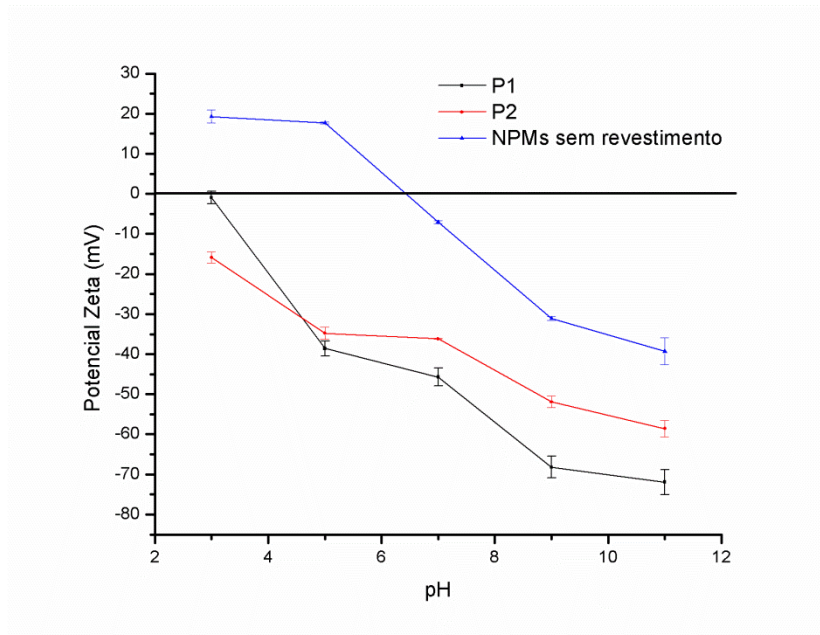


Figura 4.16 - Potencial- ζ e respectivas barras de erro das amostras P1, P2 e nanopartículas de OF sem revestimento a diferentes pH's em diferentes suspensões. Para cada valor de pH foram realizadas dez medições.

De acordo com os resultados do estudo do potencial zeta em função da variação do pH e tendo ainda em conta condicionantes associadas ao equipamento de medição das concentrações finais de Ni^{2+} em água (espectrómetro de absorção atômica) – evitar pH's demasiado básicos, o pH inicial do estudo da remoção foi ajustado a 9. Este valor de pH resultou em potenciais zeta de $-67,2 \pm 2,68$ mV (P1) e $-51,9 \pm 1,47$ mV (P2). A evolução do processo de adsorção de iões Ni^{2+} em função do tempo de contato entre esferas magnéticas de sílica e a solução aquosa é exibida na **Figura 4.17**.

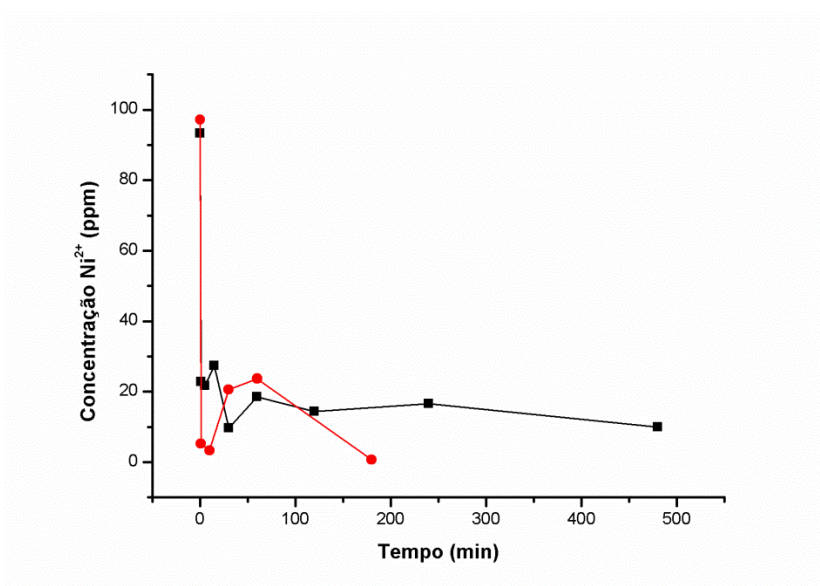


Figura 4.17 - Evolução da concentração de Ni^{2+} em solução aquosas em contato com as amostras P1 (vermelho) e P2 (preto).

Os resultados obtidos ilustram uma demarcada dissemelhança entre as amostras P1 e P2. Em P1, com menos tempo de contato (180 min) entre as esferas de sílica e os iões Ni^{2+} conseguiu-se remover praticamente a totalidade dos iões presentes em solução. No caso da amostra de P2, mesmo com mais tempo de contato (480 min) das esferas com a solução, cerca de 15 ppm de Ni^{2+} permaneceram em solução. A eficiência de remoção das esferas P1 foi de 99,3%, enquanto as esferas P2 foram capazes de remover apenas 89,3% do níquel em solução.

Em ambos os ensaios de remoção levados a cabo (com esferas de P1 e P2) é evidente no gráfico a ocorrência de flutuações das concentrações de Ni^{2+} , na solução final, ao longo do tempo. Tal situação pode ser explicada por condicionalismos associados ao desenho experimental ou ao próprio mecanismo envolvido na remoção dos iões em solução. Assim, uma das putativas explicações assenta na conhecida natureza reversível do processo de adsorção, ou seja, o processo de desadsorção também ocorrerá, o que explicaria aumentos transitórios da concentração na escala de tempo estudada. Outra explicação poderá estar relacionada com o facto de os diferentes tempos de contato serem estudados separadamente (diferentes recipientes – *falcons*), bastando pequenas diferenças no volume da solução com Ni^{2+} ou na quantidade de esferas para que a resposta ao longo do tempo seja distinta em cada um desses recipientes (onde à partida se pretendia apenas variar o tempo de contato). Alternativamente, uma outra explicação pode estar na génese das flutuações da concentração de Ni^{2+} , nomeadamente o facto de existirem esferas de sílica sem incorporação de NPMs. Esta situação poderá constituir um óbice à interpretação dos resultados na medida em que não se conseguindo separar magneticamente (ou recuperar) as esferas, depois do contato com a solução com níquel, estas permanecem em solução com o níquel adsorvido à superfície e ficam sujeitas a variações de temperatura e de agitação, até serem analisadas no espectrómetro de absorção atómica – desconhecendo-se as consequências da situação.

Por observação, a olho nu, das soluções aquosas de níquel (**Figura 4.18**), antes e depois do contato com as partículas magnéticas de sílica, é também possível verificar o desaparecimento da tonalidade esverdeada (caraterística do níquel) nas amostras com maior tempo de contato.

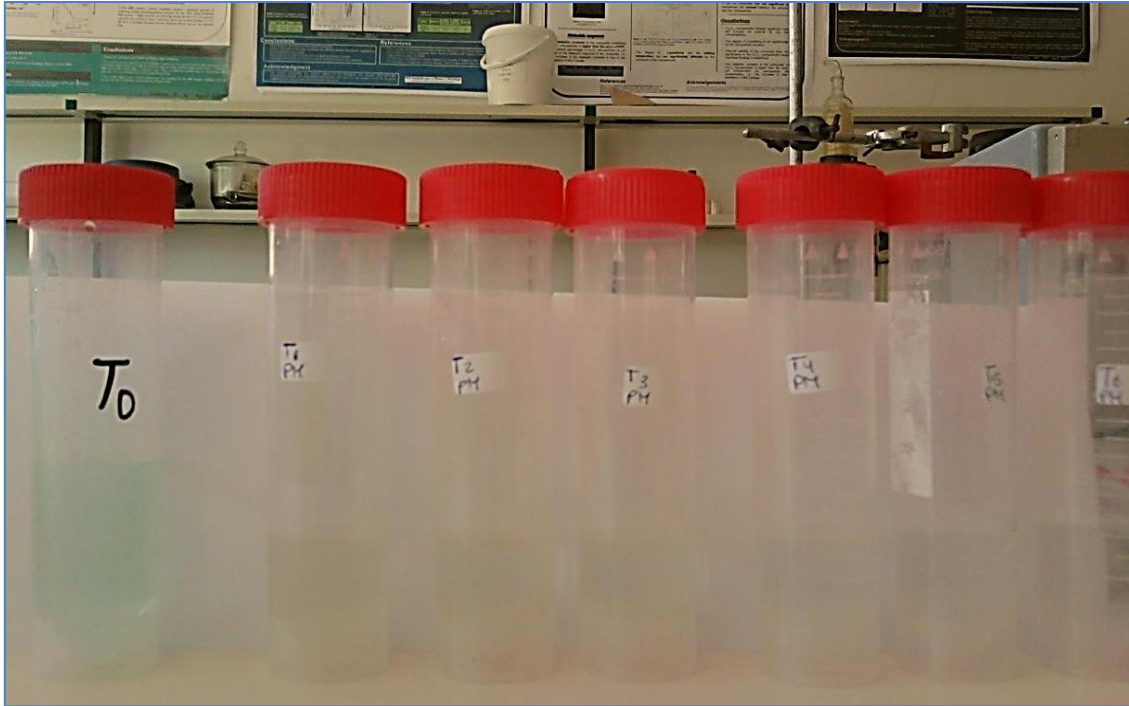


Figura 4.18 - Aspeto das amostras de água com níquel antes (T0) e depois do contato com as partículas magnéticas de sílica (P2) – aumento do tempo de contato da esquerda para a direita.

A remoção evidenciada pelas amostras P1 e P2, resulta da propalada capacidade da sílica atuar como agente adsorvente de cátions, como o níquel (Huang and Chen 2009; Kursunlu, Guler *et al.* 2009; Girginova, Daniel-da-Silva *et al.* 2010). Além disso, verifica-se um efeito dos terminais -OH e -NH₂ no processo de adsorção, com remoções de 18,6% e 100% usando os terminais -OH e -NH₂, respetivamente, e 12,8% no caso de nanopartículas não funcionalizadas (Girginova, Daniel-da-Silva *et al.* 2010). Neste contexto, Modaressi *et al.* (Modaressi, Sifaoui *et al.* 2007) reportaram que a capacidade de remoção de iões Hg²⁺ por nanopartículas de sílica, não funcionalizadas, está limitada a 24%.

A topografia irregular da superfície das esferas magnéticas de sílica poderá ser um coadjuvante preponderante no processo de remoção, ajudando a aumentar o nível de equilíbrio, onde o ponto de saturação é atingido (limita a adsorção). A área superficial específica das esferas magnéticas de sílica (P1) é responsável pela remoção total dos iões de Ni²⁺ da água, tendo um papel chave na estabilização da adsorção do Ni²⁺ à sua superfície.

CAPÍTULO 5

:CONCLUSÕES E PERSPETIVAS

FUTURAS:

Este capítulo destina-se a consolidar as conclusões mais significativas do trabalho desenvolvido, apresentando ainda algumas perspectivas quanto a futuros trabalhos neste âmbito.

Os resultados revelados permitiram obter algumas conclusões inerentes à: i) síntese de nanopartículas pelo método de coprecipitação, ii) Surfatação/estabilização de NPMs, iii) caracterização de NPMs e iv) Remoção de Ni^{2+} em solução aquosa por partículas magnéticas de sílica.

Os resultados obtidos relativos às sínteses por coprecipitação indicam que menores quantidades de sais permitem obter monodispersões de NPMs com tamanhos menores do que com maiores massas de sais (mantendo proporção de sais $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$).

Acerca da estabilização de NPMs, os dados indicam que concentrações elevadas de ácido cítrico favorecem NPMs menores e monodispersas, pois ao adsorver à superfície das NPMs o AC evita o seu crescimento e aglomeração das mesmas (mais estáveis).

A caracterização por DRX revela a presença de uma estrutura cristalina em espinela, indexada à maghemite (óxido de ferro), adicionalmente, pela equação de *Scherrer*, foi obtido o diâmetro das NPMs (17,91 nm). Foram ainda obtidos valores de diâmetro por DLS (21,09 nm) e por TEM (≈ 10), estando próximos do obtido por DRX e de acordo com as especificidades inerentes a cada técnica. Por TEM foi ainda possível observar a morfologia prismática das nanopartículas das NPMs. Os valores do potencial ζ (carga da partícula) indicam que as partículas sem revestimento são pouco estáveis e possuem tendência a aglomerar a pH's inferiores a 9.

Relativamente à aplicação testada, foram produzidas pelo método de *Stöber* em combinação com o tratamento hidrotermal esferas magnéticas de sílica, porosas e com boa distribuição do tamanho. Foi demonstrado que é possível suplantarmos a limitação da formação de esferas de sílica sem incorporação de nanopartículas magnéticas pelo uso do tratamento hidrotermal, antes do processo de calcinação.

As esferas magnéticas de sílica obtidas por este processo possibilitam a remoção de 100% do conteúdo de íons Ni^{2+} em solução aquosa, sem necessidade de funcionalizar a superfície de sílica. As esferas magnéticas de sílica obtidas por calcinação anterior ao tratamento hidrotermal, atingiram o equilíbrio quando 85% da adsorção dos íons Ni^{2+} foi atingida. Estes resultados irão contribuir para a otimização do processo de produção de esferas magnéticas de sílica à escala industrial. Adicionalmente, a morfologia obtida pelo

procedimento apresentado torna estas esferas uma ferramenta útil para a captura de espécies metálicas e purificação de água, com base na adsorção por afinidade ao metal.

Perspetivas futuras:

No sentido de compreender melhor a potencialidade da aplicação destas partículas magnéticas de sílica na purificação de água, seria importante desenvolver ensaios de adsorção com outros metais e estudar a influência de concentração, pH, temperatura e velocidade de agitação na eficiência de remoção.

Depois de perceber a potencialidade do modelo actual, poderia seguir-se a tendência contemporânea da engenharia de nanopartículas que aponta para nanopartículas com múltiplos componentes no nanomaterial, permitindo uma acção alargada da mesma. Nesse sentido, seria interessante o desenvolvimento de nanopartículas multifuncionais capazes, não só de remover catiões, pela afinidade destes com a matriz (sílica) da NP, mas adicionalmente outro composto (não metálico) presente na solução, por funcionalização das NPMs.

Bibliografia

- Afkhami, A. and R. Norooz-Asl (2009). "Removal, preconcentration and determination of Mo(VI) from water and wastewater samples using maghemite nanoparticles." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **346**(1-3): 52-57.
- Alexiou, C., W. Arnold, et al. (2000). "Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting." Cancer Research **60**(23): 6641-6648.
- Allinger, N. L. and M. P. Cava (1980). Organic Chemistry. New York, Worth Publ.
- Andreu, J. S., J. Camacho, et al. (2011). "Aggregation of superparamagnetic colloids in magnetic fields: the quest for the equilibrium state." Soft Matter **7**(6): 2336-2339.
- Aqil, A., S. Vasseur, et al. (2008). "PEO coated magnetic nanoparticles for biomedical application." European Polymer Journal **44**(10): 3191-3199.
- Ascencio, J. A., C. Gutiérrez-Wing, et al. (1998). "Structure determination of small particles by HREM imaging: theory and experiment." Surface Science **396**(1-3): 349-368.
- Babes, L., B. Denizot, et al. (1999). "Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study." Journal of Colloid and Interface Science **212**(2): 474-482.
- Babic, M., D. Horak, et al. (2009). "Poly(N,N-dimethylacrylamide)-coated maghemite nanoparticles for stem cell labeling." Bioconjug Chem **20**(2): 283-294.
- Bajaj, B., B. D. Malhotra, et al. (2010). "Preparation and characterization of bio-functionalized iron oxide nanoparticles for biomedical application." Thin Solid Films **519**(3): 1219-1223.
- Bandyopadhyay, A. K. (2007). Nano materials. New Delhi, New Age International.
- Bee, A., R. Massart, et al. (1995). "Synthesis of very fine maghemite particles." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **149**(1-2): 6-9.
- Benelmekki, M., C. Caparros, et al. (2011). "Horizontal low gradient magnetophoresis behaviour of iron oxide nanoclusters at the different steps of the synthesis route." Journal of Nanoparticle Research **13**(8): 3199-3206.
- Boissiere, M., J. Allouche, et al. (2007). "Potentialities of silica/alginate nanoparticles as Hybrid Magnetic Carriers." International Journal of Pharmaceutics **344**(1-2): 128-134.
- Bradbury, A., S. Menear, et al. (1986). "A Monte Carlo calculation of the magnetic properties of a ferrofluid containing interacting polydispersed particles." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **54-57, Part 2**(0): 745-746.
- Buchholz, B. A., L. Nunez, et al. (1996). "Radiolysis and hydrolysis of magnetically assisted chemical separation particles." Journal Name: Separation Science and Technology; Journal Volume: 31; Journal Issue: 14; Other Information: PBD: Aug 1996; Medium: X; Size: pp. 1933-1952.
- C.C, M.-G. (2004). "Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **58**(2): 343-356.
- Cabella, C., S. G. Crich, et al. (2006). "Cellular labeling with Gd(III) chelates: only high thermodynamic stabilities prevent the cells acting as 'sponges' of Gd³⁺ ions." Contrast Media & Molecular Imaging **1**(1): 23-29.
- Campelj, S., D. Makovec, et al. (2008). "Preparation and properties of water-based magnetic fluids." Journal of Physics: Condensed Matter **20**(20): 204101.
- Čampelj, S., D. Makovec, et al. (2009). "Functionalization of magnetic nanoparticles with 3-aminopropyl silane." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **321**(10): 1346-1350.
- Cannas, C., D. Gatteschi, et al. (1998). "Structural and Magnetic Properties of Fe₂O₃ Nanoparticles Dispersed over a Silica Matrix." The Journal of Physical Chemistry B **102**(40): 7721-7726.

- Carja, G., R. Nakamura, et al. (2005). "Tailoring the porous properties of iron containing mixed oxides for As (V) removal from aqueous solutions." Microporous and Mesoporous Materials **83**(1-3): 94-100.
- Chanéac, C., E. Tronc, et al. (1995). "Thermal behavior of spinel iron oxide-silica composites." Nanostructured Materials **6**(5-8): 715-718.
- Chen, D. and R. Xu (1998). "Hydrothermal synthesis and characterization of nanocrystalline Fe₃O₄ powders." Materials Research Bulletin **33**(7): 1015-1021.
- Chen, K.-J., S. M. Wolahan, et al. (2011). "A small MRI contrast agent library of gadolinium(III)-encapsulated supramolecular nanoparticles for improved relaxivity and sensitivity." Biomaterials **32**(8): 2160-2165.
- Chen, M. (2003). "Gold-coated iron nanoparticles for biomedical applications." J. Appl. Phys. **93**(10): 7551.
- Chen, S., C.-I. Chiang, et al. (2010). "Simulating physiological conditions to evaluate nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia (MFH) therapy applications." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **322**(2): 247-252.
- Cheng, F.-Y., C.-H. Su, et al. (2005). "Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications." Biomaterials **26**(7): 729-738.
- Cheng, K. and S. Sun (2010). "Recent advances in syntheses and therapeutic applications of multifunctional porous hollow nanoparticles." Nano Today **5**(3): 183-196.
- Chockalingam, A. M., H. K. Babu, et al. (2010). "Gum arabic modified Fe₃O₄ nanoparticles cross linked with collagen for isolation of bacteria." J Nanobiotechnology **8**: 30.
- Cornell, R. M. and U. Schwertmann (2003). The iron oxides : structure, properties, reactions, occurrences, and uses. Weinheim, Wiley-VCH.
- da Costa, G. M., E. De Grave, et al. (1994). "Synthesis and Characterization of Some Iron Oxides by Sol-Gel Method." Journal of Solid State Chemistry **113**(2): 405-412.
- Dai, Z., F. Meiser, et al. (2005). "Nanoengineering of iron oxide and iron oxide/silica hollow spheres by sequential layering combined with a sol-gel process." Journal of Colloid and Interface Science **288**(1): 298-300.
- de Ferri, L., P. P. Lottici, et al. (2011). "Study of silica nanoparticles – polysiloxane hydrophobic treatments for stone-based monument protection." Journal of Cultural Heritage **12**(4): 356-363.
- De Las Cuevas, G., J. Faraudo, et al. (2008). "Low-Gradient Magnetophoresis through Field-Induced Reversible Aggregation." The Journal of Physical Chemistry C **112**(4): 945-950.
- Delgado, A. V., F. González-Caballero, et al. (2007). "Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena." Journal of Colloid and Interface Science **309**(2): 194-224.
- Dumestre, F., B. Chaudret, et al. (2004). "Superlattices of Iron Nanocubes Synthesized from Fe[N(SiMe₃)₂]₂." Science **303**(5659): 821-823.
- Evans, M. E. and F. Heller (2003). Environmental magnetism : principles and applications of enviromagnetics. Amsterdam; Boston, Academic Press.
- Figuerola, A., R. Di Corato, et al. (2010). "From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications." Pharmacological Research **62**(2): 126-143.
- Freitas, R. A. (2005). "Current status of nanomedicine and medical nanorobotics." Journal of Computational and Theoretical Nanoscience **2**(1): 1-25(28) 1546-1955.
- Frenz, L., A. El Harrak, et al. (2008). "Droplet-Based Microreactors for the Synthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles." Angewandte Chemie International Edition **47**(36): 6817-6820.
- Gaihre, B., Y. Hee Lee, et al. (2011). "In-vitro cytotoxicity and cell uptake study of gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles." J Microencapsul **28**(4): 240-247.
- Gaihre, B., M. S. Khil, et al. (2009). "Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and in vitro drug release study." Int J Pharm **365**(1-2): 180-189.

- Geng, B., X. Liu, et al. (2007). "A new nonhydrolytic single-precursor approach to surfactant-capped nanocrystals of transition metal sulfides." Materials Science and Engineering: B **145**(1-3): 17-22.
- Girginova, P. I., A. L. Daniel-da-Silva, et al. (2010). "Silica coated magnetite particles for magnetic removal of Hg²⁺ from water." Journal of Colloid and Interface Science **345**(2): 234-240.
- Gonsalves, K. E. (2008). Biomedical nanostructures. Hoboken (N.J.), Wiley-Interscience.
- Goya, G. (2003). "Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles." J. Appl. Phys. **94**(5): 3520.
- Gupta, A. K. and A. S. G. Curtis (2004). "Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors." Biomaterials **25**(15): 3029-3040.
- Gupta, A. K. and M. Gupta (2005). "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications." Biomaterials **26**(18): 3995-4021.
- Gupta, R. B. and U. B. Kompella (2006). Nanoparticle technology for drug delivery. New York, Taylor & Francis.
- Hadjipanayis, G. C. and R. W. Siegel (1994). Nanophase materials : synthesis - properties - applications, Dordrecht; London, Kluwer Academic.
- Hee Kim, E., H. Sook Lee, et al. (2005). "Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **289**(0): 328-330.
- Henglein, A. (1989). "Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles." Chemical Reviews **89**(8): 1861-1873.
- Hong, R. Y., B. Feng, et al. (2008). "Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles." Biochemical Engineering Journal **42**(3): 290-300.
- Horak, D., M. Babic, et al. (2007). "D-mannose-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling." Bioconjug Chem **18**(3): 635-644.
- Huang, S.-H. and D.-H. Chen (2009). "Rapid removal of heavy metal cations and anions from aqueous solutions by an amino-functionalized magnetic nano-adsorbent." Journal of Hazardous Materials **163**(1): 174-179.
- Hyeon, T., S. S. Lee, et al. (2001). "Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanocrystallites without a Size-Selection Process." Journal of the American Chemical Society **123**(51): 12798-12801.
- I, C. (2004). "Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions." Advances in Colloid and Interface Science **110**(1-2): 49-74.
- Israelachvili, J. (1991). Intermolecular and Surface Forces, Academic Press.
- Ito, A., F. Matsuoka, et al. (2003). "Heat shock protein 70 gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles." Cancer Gene Ther **10**(12): 918-925.
- Itoh, H. and T. Sugimoto (2003). "Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles." Journal of Colloid and Interface Science **265**(2): 283-295.
- Iwaki, T. (2003). "Preparation of high coercivity magnetic FePt nanoparticles by liquid process." J. Appl. Phys. **94**(10): 6807.
- Jolivet, J.-P., C. Chaneac, et al. (2004). "Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks." Chemical Communications(5): 477-483.
- Jolivet, J.-P. and E. Tronc (1988). "Interfacial electron transfer in colloidal spinel iron oxide. Conversion of Fe₃O₄- γ -Fe₂O₃ in aqueous medium." Journal of Colloid and Interface Science **125**(2): 688-701.
- Kaminski, M. D. and L. Nuñez (1999). "Extractant-coated magnetic particles for cobalt and nickel recovery from acidic solution." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **194**(1-3): 31-36.

- Kealey, D. and P. J. Haines (2002). Analytical chemistry. Oxford, BIOS.
- Kenkel, J. (2003). Analytical chemistry for technicians. Boca Raton, Lewis Publishers.
- Kim, D. K., Y. Zhang, et al. (2001). "Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **225**(1-2): 30-36.
- Knauth, P. and J. Schoonman (2002). Nanostructured materials: selected synthesis methods, properties, and applications, Kluwer Academic Publishers.
- Krotz, F., H.-Y. Sohn, et al. (2003). "Magnetofection Potentiates Gene Delivery to Cultured Endothelial Cells." Journal of Vascular Research **40**(5): 425-434.
- Kumar, C. S. S. R., J. Hormes, et al. (2005). Nanofabrication towards biomedical applications : techniques, tools, applications, and impact. Weinheim, Wiley-VCH.
- Kursunlu, A. N., E. Guler, et al. (2009). "Chemical modification of silica gel with synthesized new Schiff base derivatives and sorption studies of cobalt (II) and nickel (II)." Applied Surface Science **255**(21): 8798-8803.
- Lam, U. T., R. Mammucari, et al. (2008). "Processing of Iron Oxide Nanoparticles by Supercritical Fluids." Industrial & Engineering Chemistry Research **47**(3): 599-614.
- Laurent, S., D. Forge, et al. (2008). "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications." Chemical Reviews **108**(6): 2064-2110.
- Lee, D.-W., S.-J. Park, et al. (2007). "One-Pot Synthesis of Pt-Nanoparticle-Embedded Mesoporous Titania/Silica and Its Remarkable Thermal Stability." The Journal of Physical Chemistry C **111**(21): 7634-7638.
- Lee, J., T. Isobe, et al. (1996). "Magnetic properties of ultrafine magnetite particles and their slurries prepared via in-situ precipitation." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **109**: 121-127.
- Li, Shi, et al. (2003). "Hollow Spheres of Mesoporous Aluminosilicate with a Three-Dimensional Pore Network and Extraordinarily High Hydrothermal Stability." Nano Letters **3**(5): 609-612.
- Li, G.-y., Z.-d. Zhou, et al. (2010). "Surface functionalization of chitosan-coated magnetic nanoparticles for covalent immobilization of yeast alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **322**(24): 3862-3868.
- Li, Z., Q. Sun, et al. (2005). "Preparation of Water-Soluble Magnetite Nanocrystals from Hydrated Ferric Salts in 2-Pyrrolidone: Mechanism Leading to Fe₃O₄." Angewandte Chemie International Edition **44**(1): 123-126.
- Lian, S., E. Wang, et al. (2004). "Synthesis of magnetite nanorods and porous hematite nanorods." Solid State Communications **129**(8): 485-490.
- Liveri, V. T. (2006). Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems.
- Liz-Marzán, L. M. and P. V. Kamat. (2004). "Nanoscale Materials."
- Lu, A.-H., E. L. Salabas, et al. (2007). "Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application." Angewandte Chemie International Edition **46**(8): 1222-1244.
- Ma, H.-l., X.-r. Qi, et al. (2007). "Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate." International Journal of Pharmaceutics **333**(1-2): 177-186.
- Maity, D. and D. C. Agrawal (2007). "Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **308**(1): 46-55.
- Mehnert, W. and K. Mäder (2001). "Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications." Advanced Drug Delivery Reviews **47**(2-3): 165-196.
- Mikhaylova, M., D. K. Kim, et al. (2004). "Superparamagnetism of Magnetite Nanoparticles: Dependence on Surface Modification." Langmuir **20**(6): 2472-2477.

- Modaressi, A., H. Sifaoui, et al. (2007). "CTAB aggregation in aqueous solutions of ammonium based ionic liquids; conductimetric studies." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **296**(1-3): 104-108.
- Moghim, S. M., A. C. Hunter, et al. (2001). "Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice." Pharmacological Reviews **53**(2): 283-318.
- Morales, M. P., S. Veintemillas-Verdaguer, et al. (1999). "Surface and Internal Spin Canting in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles." Chemistry of Materials **11**(11): 3058-3064.
- Mornet, S., J. Portier, et al. (2005). "A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **293**(1): 127-134.
- Müller, R. H., C. Jacobs, et al. (2001). "Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future." Advanced Drug Delivery Reviews **47**(1): 3-19.
- Munshi, N., T. K. De, et al. (1997). "Size Modulation of Polymeric Nanoparticles under Controlled Dynamics of Microemulsion Droplets." Journal of Colloid and Interface Science **190**(2): 387-391.
- Ng V, L. y. V. C. B. T. and A. O. Adeyeye (2002). "Nanostructure array fabrication with temperature-controlled self-assembly techniques." Nanotechnology **13**(5): 554.
- Niederberger, M. and N. Pinna. (2009). "Metal Oxide Nanoparticles in Organic Solvents Synthesis, Formation, Assembly and Application." from <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-84882-671-7>.
- Nikodem, T., J. Dominik, et al. (2009). "Designer polymer–quantum dot architectures." Prog Polym Sci **34**(5): 393-430.
- Nobuto, H., T. Sugita, et al. (2004). "Evaluation of systemic chemotherapy with magnetic liposomal doxorubicin and a dipole external electromagnet." International Journal of Cancer **109**(4): 627-635.
- O'Handley, R. C. (1999). Modern magnetic materials : principles and applications. New York, J. Wiley & Sons.
- Oh, J. (2010). "Engineering of nanometer-sized cross-linked hydrogels for biomedical applications." Canadian Journal of Chemistry **88**(3): 173-184.
- Oh, J. K. and J. M. Park (2011). "Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical application." Progress in Polymer Science **36**(1): 168-189.
- Osada, Y. and J.-P. Gong (1998). "Soft and Wet Materials: Polymer Gels." Advanced Materials **10**(11): 827-837.
- Panyam, J. and V. Labhasetwar (2003). "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue." Advanced Drug Delivery Reviews **55**(3): 329-347.
- Park, J., E. Lee, et al. (2005). "One-Nanometer-Scale Size-Controlled Synthesis of Monodisperse Magnetic Iron Oxide Nanoparticles." Angewandte Chemie International Edition **44**(19): 2872-2877.
- Pecora, R. (1985). Dynamic light scattering : applications of photon correlation spectroscopy. New York, Plenum Press.
- Pillai, V., P. Kumar, et al. (1995). "Preparation of nanoparticles of silver halides, superconductors and magnetic materials using water-in-oil microemulsions as nano-reactors." Advances in Colloid and Interface Science **55**(0): 241-269.
- Pilloni, M., J. Nicolas, et al. (2010). "PEGylation and preliminary biocompatibility evaluation of magnetite–silica nanocomposites obtained by high energy ball milling." International Journal of Pharmaceutics **401**(1-2): 103-112.
- Pinna, M. N. N. (2009). "Metal oxide nanoparticles."
- Plank, C., F. Scherer, et al. (2003). "Magnetofection: Enhancing and Targeting Gene Delivery with Superparamagnetic Nanoparticles and Magnetic Fields." Journal of Liposome Research **13**(1): 29-32.

- Pratsinis, S. E. and S. Vemury (1996). "Particle formation in gases: A review." Powder Technology **88**(3): 267-273.
- Qu, J., G. Liu, et al. (2010). "Preparation of Fe₃O₄-chitosan nanoparticles used for hyperthermia." Advanced Powder Technology **21**(4): 461-467.
- Rahimi, M., A. Wadajkar, et al. (2010). "In vitro evaluation of novel polymer-coated magnetic nanoparticles for controlled drug delivery." Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **6**(5): 672-680.
- Salazar-Alvarez, G. and m. Tekniska högskolan i Stockholm. Institutionen för (2004). Synthesis, characterisation and applications of iron oxide nanoparticles. Stockholm.
- Scherrer (2002). "Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo."
- Schillinger, U., T. Brill, et al. (2005). "Advances in magnetofection—magnetically guided nucleic acid delivery." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **293**(1): 501-508.
- Schwertmann, U., & Cornell, R. M. (1991). Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization. Weinheim.
- Shamim, N., L. Hong, et al. (2006). "Thermosensitive-polymer-coated magnetic nanoparticles: Adsorption and desorption of Bovine Serum Albumin." Journal of Colloid and Interface Science **304**(1): 1-8.
- Shen, Y. F., J. Tang, et al. (2009). "Preparation and application of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles for wastewater purification." Separation and Purification Technology **68**(3): 312-319.
- Shimura, N. and M. Ogawa (2007). "Preparation of surfactant templated nanoporous silica spherical particles by the Stöber method. Effect of solvent composition on the particle size." Journal of Materials Science **42**(14): 5299-5306.
- Shultz, M., S. Calvin, et al. (2007). "Enhanced ferrite nanoparticles as MRI contrast agents." Journal of Magnetism and Magnetic Materials **311**(1): 464-468.
- Smith, W. F. (1998). Princípios de Ciência e Engenharia dos Materiais. Lisboa, McGraw-Hill.
- Solinas, S., G. Piccaluga, et al. (2001). "Sol-gel formation of γ -Fe₂O₃/SiO₂ nanocomposites." Acta Materialia **49**(14): 2805-2811.
- Song (2005). "Preparation of Polystyrene Fe₃O₄ Nanoparticles in Triton."
- Stöber, W., A. Fink, et al. (1968). "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range." Journal of Colloid and Interface Science **26**(1): 62-69.
- Storm, G., S. O. Belliot, et al. (1995). "Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system." Advanced Drug Delivery Reviews: 31-48.
- Sun, C., J. Lee, et al. (2008). "Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery☆." Advanced Drug Delivery Reviews **60**(11): 1252-1265.
- Suwa, M. and H. Watarai (2011). "Magnetoanalysis of micro/nanoparticles: A review." Analytica Chimica Acta **690**(2): 137-147.
- Taboada, E., R. Solanas, et al. (2009). "Supercritical-Fluid-Assisted One-Pot Synthesis of Biocompatible Core(γ -Fe₂O₃)/Shell(SiO₂) Nanoparticles as High RelaxivityT₂-Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging." Advanced Functional Materials **19**(14): 2319-2324.
- Takamatsu, S., O. Matsui, et al. (2008). "Selective induction hyperthermia following transcatheter arterial embolization with a mixture of nano-sized magnetic particles (ferucarbotran) and embolic materials: feasibility study in rabbits." Radiat Med **26**(4): 179-187.
- Tartaj, P., M. P. Morales, et al. (2006). chapter 5 Synthesis, Properties and Biomedical Applications of Magnetic Nanoparticles. Handbook of Magnetic Materials. K. H. J. Buschow, Elsevier. **Volume 16**: 403-482.
- Tautzenberger, A., L. Kreja, et al. (2011). "Effect of phosphonate-functionalised nanoparticles on human mesenchymal stem cells and osteoclasts." Bone **48**, **Supplement 2**(0): S125.
- Tavakoli, A., M. Sohrabi, et al. (2007). "A review of methods for synthesis of nanostructured metals with emphasis on iron compounds." Chemical Papers **61**(3): 151-170.

- Teja, A. S. and P.-Y. Koh (2009). "Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles." Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials **55**(1-2): 22-45.
- Vidal-Vidal, J., J. Rivas, et al. (2006). "Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **288**(1-3): 44-51.
- Vila, A., A. Sánchez, et al. (2002). "Design of biodegradable particles for protein delivery." Journal of Controlled Release **78**(1-3): 15-24.
- Wang, X., J. Zhuang, et al. (2005). "A general strategy for nanocrystal synthesis." Nature **437**(7055): 121-124.
- Wang, Z. L. (2000). Characterization of nanophase materials. Weinheim; New York, Wiley-VCH.
- Wei, Q., T. Li, et al. (2010). "Fe₃O₄ nanoparticles-loaded PEG-PLA polymeric vesicles as labels for ultrasensitive immunosensors." Biomaterials **31**(28): 7332-7339.
- Xu, R. (2008). "Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement." Particuology **6**(2): 112-115.
- Xu, Z. P., Q. H. Zeng, et al. (2006). "Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery." Chemical Engineering Science **61**(3): 1027-1040.
- Zhang, J., F. Huang, et al. (2010). "Progress of nanocrystalline growth kinetics based on oriented attachment." Nanoscale **2**(1): 18-34.
- Zhang, L.-y., X.-j. Zhu, et al. (2010). "Control synthesis of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles under UV irradiation in aqueous system." Current Applied Physics **10**(3): 828-833.
- Zhang, Y., N. Kohler, et al. (2002). "Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake." Biomaterials **23**(7): 1553-1561.
- Zhi, J., Y. Wang, et al. (2006). "In situ preparation of magnetic chitosan/Fe₃O₄ composite nanoparticles in tiny pools of water-in-oil microemulsion." Reactive and Functional Polymers **66**(12): 1552-1558.
- Zhu, H., D. Yang, et al. (2007). "Hydrothermal growth and characterization of magnetite (Fe₃O₄) thin films." Surface and Coatings Technology **201**(12): 5870-5874.