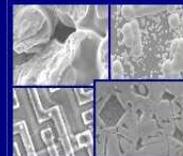




PUCRS

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia
Faculdade de Física
Faculdade de Química



PGETEMA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS
MAGNÉTICAS COMO AGENTE DE CONTRASTE EM IMAGENS
BIOMÉDICAS**

FRANCISCO ANTÓNIO PAQUETE LIMA

ENGENHEIRO QUÍMICO

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

Porto Alegre

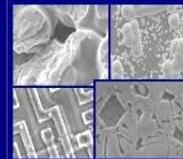
Agosto, 2012



PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia
Faculdade de Física
Faculdade de Química



PGETEMA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS
MAGNÉTICAS COMO AGENTE DE CONTRASTE EM IMAGENS
BIOMÉDICAS**

FRANCISCO ANTÔNIO PAQUETE LIMA

ENGENHEIRO QUÍMICO

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO MEURER PAPALÉO

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

**Porto Alegre
Agosto, 2012**

“O Homem deve ter fé que o incompreensível pode ser compreendido; caso contrário, ele não iria pensar nisso.”

Johann Wolfgang Goethe (1749-1832)



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

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS MAGNÉTICAS COMO AGENTE DE CONTRASTE EM IMAGENS BIOMÉDICAS

CANDIDATO: FRANCISCO ANTÔNIO PAQUETE LIMA

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

DR. RICARDO MEURER PAPALEO - ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

DR. LUIS GUSTAVO PEREIRA - DO PG EM FÍSICA - UFRGS

DRA. ANA MARIA MARQUES DA SILVA - DO PPGE/FENG - PUCRS

DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

PUCRS

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Francisco e Eugénia pelo amor, incentivos e dedicação prestado a mim, hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, a vida e por me acompanhado por todo tempo sempre indicando as melhores diretrizes na minha vida.

À minha Mãe e meu Pai, pelo amor incondicional pelos apoios nas minhas decisões, indicando sempre as melhores soluções, pelos conselhos, que às vezes parecem estranhas, mas sempre eram para o meu bem.

Aos meus familiares pela preocupação e pelos apoios em todos os sentidos, em especial as minhas irmãs pela infância inesquecível e pelos apoios e incentivos durante todos os momentos.

Ao meu orientador pela orientação, incentivos, ensinamentos realizados ao longo do trabalho e a oportunidade de trabalhar neste projeto de pesquisa .

Aos professores e funcionários do PEGTEMA de uma forma geral em compartilhar os conhecimentos durante o curso em especial a Professora Nara e Mara pelos auxilio e acompanhamento no desenvolvimento dos experimentos.

Aos meus conterrâneos e amigos pelos momentos divididos ao longo desses anos que vou levar por toda a vida.

Aos colegas do grupo nano pelas ajudas, amizade e momentos de descontração e em especial ao Christian e Raquel pelos auxilio na obtenção das imagens do AFM.

Ao auxiliares dos laboratórios da UFRGS pelos apoios oferecido durante o desenvolvimento das análises físico-químicas.

Ao auxiliares do Laboratório da Química e CM da PUCRS pelos apoios na realização da síntese e na caracterização físico-química.

A CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desse projeto de pesquisa

E a todos que não foram citados, mas que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho de pesquisa, fica aqui o meu agradecimento.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
SUMÁRIO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE QUADROS.....	12
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	13
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos Específicos	20
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1. Nanoestruturas	21
3.1.1. Propriedades Magnéticas dos Materiais	22
3.1.2. Nanopartículas Magnéticas de Oxido de Ferro.....	27
3.1.2.1. Magnetita	28
3.1.2.2. Aplicações biomédicas	30
3.1.3. Princípios básicos de imageamento por ressonância magnética	31
3.1.3.1. Agentes de contraste	32
3.2. Métodos de Síntese.....	33
3.2.1. Processo de coprecipitação	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Procedimento Experimental da Síntese das Nanopartículas	36
4.1.1. Reagentes.....	36
4.1.2. Síntese das nanopartículas de óxido de ferro via coprecipitação	37
4.2. Caracterização Físico-Química	40
4.2.1. Espectroscopia UV-Visível.....	40

4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS)	41
4.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	43
4.2.3.1. Preparação das amostras para o TEM	45
4.2.4. Microscopia de força atômica (AFM)	45
4.2.5. Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	47
4.2.5.1. Detalhamento das medidas para o DLS	48
4.2.6. Espectrometria por Retroespalhamento Rutherford (RBS).....	49
4.2.7. DSC – TGA Simultâneo (SDT)	51
4.2.8. Magnetômetro de Gradiente de Força Alternada	51
4.2.9. Medidas de relaxação magnética nuclear.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1. Síntese	55
5.2. Análise quantitativa do conteúdo de ferro	56
5.3. Morfologia e Tamanho das nanopartículas	57
5.4. Composição química das amostras de solução das nanopartículas	62
5.5. Propriedades magnéticas e de relaxação	66
5.5.1. Medidas de relaxividade	68
6. CONCLUSÕES	78
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Ilustração dos arranjos dos momentos magnéticos nos fenômenos de diamagnetismo e23	23
Paramagnetismo, (a) sem campo e (b) com campo aplicado [24].23	23
Figura 3.2: Ilustração dos arranjos dos dipolos magnético para o fenômeno de ferromagnetismo, antiferromagnetismo e ferrimagnetismo [24]24	24
Figura 3.3: Curva de histerese magnética, H é o campo externo aplicado e M a magnetização do material [5]25	25
Figura 3.4 - Ilustração de comportamento magnético de um multidomínio em (A) e monodomínio em (B).....26	26
Figura 3.5: Curva de histerese magnética de um material superparamagnético [35].27	27
Figura 3.6: Representação da estrutura cristalina da magnetita. Fonte: (Treble and28 Craick, 1969; Harris, 2002)[40]28	28
Figura 4.1: Arranjo experimental para a síntese das nanopartículas. (1) balão de reação, (2) agitador magnético, (3) rolha para vedação, (4)seringa para adição dos reagentes, (5) termômetro, (6) manta aquecedora, (7) condensador, (8) fluxo de água para resfriar o condensador (9) linhar de vácuo/ nitrogênio38	38
Figura 4.2: Fluxograma dos procedimentos experimental da síntese.39	39
Figura 5.7: Micrografia de amostra da síntese I com aumento de 40000X.....63	63
Figura 5.8: Análise EDS da região 'A' na figura 5.4.63	63
Figura 5.9 Espectro RBS de amostras secas de NPs depositadas sobre Si. Foi utilizado feixe de He ⁺ 2,2 MeV e ângulo detecção de 170 ⁰ . Amostra da síntese I.....64	64
Figura 5.10: Gráfico do peso (em%) em função da temperatura na análise TGA da amostra da síntese I. Os símbolos I, II e III indicam diferentes estágios de perda de massa.65	65
Figura 5.11: Gráfico do peso (em%) em função da temperatura na análise TGA da amostra da síntese III.....65	65

Figura 5.12: Ampliação da curva de TGA da amostra da síntese I.....	66
Figura 5.13: Curva magnetização obtida por AGFM da amostra das NPs na temperatura ambiente para a síntese I.	67
Figura 5.14: Curva de magnetização obtida por AGFM da amostra das NP na temperatura ambiente para síntese II.	67
Figura 5.17: Curvas de intensidade do pixel em função de TE para as diferentes concentrações de NPs e a água.	70
Figura 5.18: Gráfico de R2 em função da concentração de ferro para as síntese I, II e III.	72
Figura 5.19: Imagens de recuperadas da inversão do <i>phantom com soluções de NPs</i> , com um TR de 1000ms e tempo de inversão de 50ms(a), 150ms(b), 800ms(c), 2000ms(d). O círculo central grande é a amostra de H2O. Os círculos menores são as soluções de NPs.....	73
Figura 5.20: Intensidade do pixel em função de TI para diferentes concentrações de NPs e para a água.	74
Figura 5.21: Gráfico da taxa de relaxação R1 em função da concentração para cada síntese.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1– Reagentes usados para a síntese.....	36
Tabela 5.1: Concentração de Ferro [Fe] das amostras obtidas nas diferentes sínteses e determinada através da absorbância (A) em $\lambda=410\text{nm}$	57
Tabela 5.2: Diâmetro médio e o desvio padrão em número, volume e intensidade das nanopartículas	59
Tabela 5.3: Tamanho médio de partícula determinado por diferentes técnicas	62
Tabela 5.4: Valores da taxa de relaxação R2 e dos tempos T2 em função da concentração de ferro.	71
Tabela 5.5: Valores da concentração e os respectivos R2 para cada síntese.....	72
Tabela 5.6: Valores dos tempos T1 e das taxas de relaxação R1 para diferentes concentrações de nanopartículas.	75
Tabela 5.7: Valores de R1 para cada síntese em função da concentração de ferro.	75
Tabela 5.8: Valores da relaxividade de cada uma das sínteses.	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1: Propriedades físicas da magnetita	29
-----------------------------------------------------	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	absorbância	
ε	absorvidade molar ou coeficiente de extinção	
DNA	ácido desoxirribonucleico	
RNA	ácido ribonucleico	
TGA	análise termogravimétrica, do inglês <i>Thermogravimetric analysis</i>	
DSC	calorimetria diferencial de varredura, do inglês <i>Differential scanning calorimetry</i>	
B	campo magnético aplicado	(T)
H _r	campo magnético externo	(A/m)
HDC	campo magnético DC	
C _e	capacidade calorífica da amostra	
D	coeficiente de difusão translacional	
λ	comprimento de onda	(nm)
C	concentração do material absorvedor	(M)
k	constante de Boltzmann/v	(J/K)
φ	constante de fase	
D _c	diâmetro crítico	(m)
D _H	diâmetro hidrodinâmico	(nm)

E_a	Energia	(J)
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz, do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>	
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva	
L	espessura da amostra através da qual a luz passa	(m)
F_m	força magnética	
f	Freqüência de reversão	(s ⁻¹)
MRI	Imageamento por Ressonância Magnética, do inglês <i>Magnetic Resonance Imaging</i>	
I_0	intensidade da luz incidindo na solução	(cd)
I	intensidade da luz saindo da solução	
H_c	campo coercivo	(A/m)
M	magnetização do material	(A/m)
M_r	magnetização remanente	(A/m)
M_s	magnetização de saturação	(A/m)
AGFM	Magnetômetro de Gradiente de força Alternada, do do inglês, <i>Alternating Gradient Force Magnetometer</i>	
VSM	Magnetrômetro de Amostra Vibrante, do inglês <i>vibrating sample magnetometer</i>	
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão	
MEV	microscopia eletrônica de varredura	

AFM	microscopia de força atômica, do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i>	
FeNP	nanopartículas de óxido de ferro	
NPM	nanopartícula magnética	
μ_0	permeabilidade do vácuo	(H/m)
PVA	Polivinilacetato	
pH	potencial hidrogeniônico	
RBS	Espectrometria por Retroespalhamento Rutherford	
SQUID	(<i>Superconducting Quantum Interference Device</i>)	
χ_m	susceptibilidade magnética	(m ³ /kg)
SAR	taxa de absorção específica, do inglês <i>Specific absorption rate</i>	
T	temperatura absoluta	(K)
T _B	Temperatura de bloqueio	(K)
T _C	temperatura de Curie	(K)
σ_B	tempo de relaxação do movimento Browniano	
T ₁	tempo de relaxação longitudinal	(s)
T ₂	tempo de relaxação transversal	(s)
UV	ultravioleta	
UV-Vis	ultravioleta e visível	
η	viscosidade dinâmica	g/(cm·s)
V	volume da partícula	
V'	volume hidrodinâmico da partícula	

RESUMO

Nesse trabalho investigou-se a síntese e caracterização morfológica, estrutural e magnética de nanopartículas de óxido de ferro, recobertas com dextran e funcionalizadas com grupos amina, úteis como uma plataforma de agentes de contraste para imageamento por ressonância magnética. Para a síntese, foi usado o método de coprecipitação do Fe (III) e Fe (II) com hidróxido de amônio. Foram sintetizados três lotes de amostras. A análise de amostras de cada um dos lotes revelou algumas diferenças quanto à estabilidade frente a aglomeração e a concentração de ferro (variando de 8 -10 mg/mL). Foi observado por Espalhamento de Luz Dinâmico uma distribuição estreita de tamanho das nanopartículas em todos os casos, com um diâmetro hidrodinâmico médio em torno de 5-8 nm, confirmados pelas imagens de TEM (Microscopia Eletrônica de Transmissão). Através de análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e Retroespalhamento Rutherford (RBS) obtivemos uma distribuição elementar compatível com a do óxido de ferro, e padrão de decomposição térmico dominado pelo recobrimento polimérico demonstrado nas curvas do análise termogravimétrica (TGA). Curvas de magnetização obtidas por um Magnetômetro de Gradiente de força Alternada (AGFM) confirmaram a característica magnética das partículas e ausência de histerese. Medidas de relaxividade magnética nuclear foram feitas diretamente num equipamento de imagens por ressonância magnética (MRI) através de um *phantom* contendo amostras com diferentes concentrações das nanopartículas de óxido de ferro (FeNP). O estudo da relaxação magnética em objetos teste indicou um efeito claro de perturbação do sinal pelas partículas, com diminuições do tempo de relaxação longitudinal (T1) e do tempo de relaxação transversal (T2) em soluções aquosas, confirmando a obtenção do efeito de contraste desejado, com relaxividades que variaram entre 41 e 24 mM⁻¹s⁻¹ para relaxividade (r₂) e 2,0 a 1,7 mM⁻¹s⁻¹ para a relaxividade (r₁). Concluímos que, o método químico por coprecipitação de Fe(II) e Fe(III) utilizado na síntese de nanopartículas magnéticas mostrou-se apropriado para produzir nanopartículas (NPs) com propriedades adequadas para uso como agente de contraste em imagens por MRI.

Palavra chave: Nanopartículas Magnéticas, Agente de Contraste, MRI

ABSTRACT

In this study we investigated the synthesis and characterization (morphological structural and magnetic) of iron oxide nanoparticles coated with dextran and functionalized with amino groups, which are useful as contrast agents for magnetic resonance imaging. For the synthesis we used the method of co-precipitation of Fe (III) and Fe (II) with ammonium hydroxide. Three batches of samples were synthesized under identical conditions. The analysis of samples from each batch revealed some differences in the stability against agglomeration and iron concentrations (ranging from 10 to 8 mg / mL). A narrow size distribution of the nanoparticles was observed by DLS (Dynamic Light Scattering) in all cases with a mean hydrodynamic diameter of about 10 nm. The mean particle size was confirmed by TEM (Transmission Electron Microscopy), images. Elemental analysis by Rutherford Backscattering Spectrometry (RBS) and Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) revealed a structure compatible with iron oxide, and a thermal decomposition pattern dominated by the polymer coating of the particles. The magnetic properties of the particles were confirmed by Alternating Gradient Force Magnetometer (AGFM) which reveals a vanishing hysteresis loop. Measurements of the magnetic nuclear relaxivity were performed directly in a magnetic resonance imaging (MRI) equipment with an MRI phantom containing samples with different concentrations of the FeNP. The study of magnetic relaxation with test objects indicated a clear effect of the FeNP on the MRI signal through the decreases of T1 and T2 in aqueous solutions. Measured relaxivities obtained from the curves of the relaxation rate versus FeNP concentration were between 41 and 24 mM⁻¹s⁻¹ for r₂ and 2,0 to 1,7 mM⁻¹s⁻¹ for r₁. We conclude that the method applied in the synthesis of the FeNP was very efficient in producing NPs with suitable properties for use as a contrast agent in MRI images.

Keyword: Magnetic nanoparticles , contrast agents, MRI

1. INTRODUÇÃO

Imagens médicas vêm desempenhando um papel muito importante na prática da medicina moderna. Várias modalidades de imagem podem ser empregadas para obter informações detalhadas sobre estrutura anatômicas e processos metabólicos ou funcionais como auxílio para o diagnóstico médico adequado [1, 2]. Dentre esses métodos temos a tomografia computadorizada, o imageamento por ressonância magnética (do inglês MRI, *magnetic resonance imaging*) e imageamento óptico em infravermelho próximo. Recentes avanços em MRI permitem avaliações espaciais não invasivas de vários processos biofísicos e bioquímicos nos sistemas vivos [3]. Mas para isto é necessário muitas vezes a utilização de um meio de contraste para resolver detalhes estruturais da imagem. Por exemplo, o sal de gadolínio, é usado em vários procedimentos de rotina, administrado por via intravenosa. Existem, no entanto novos desenvolvimentos em agentes de contraste, tais como as sondas nanoestruturadas multifuncionais, que é o foco deste trabalho [4, 5].

Dentre os diversos tipos de sistemas nanoestruturados, destacam-se as nanopartículas de óxido de ferro (FeNP). Essas estruturas, além da sua utilização como meio de contraste em imageamento por ressonância magnética (MRI) também são úteis em outras aplicações médicas como carreamento de drogas para locais específicos no organismo, indução de hipertermia e na separação magnética de células, proteínas, DNA/RNA, bactérias, vírus e outras biomoléculas [6 - 9].

No que concerne a sua utilização como agente de contraste em MRI, as FeNP, em geral, induzem uma diminuição da intensidade do sinal no local onde são absorvidos, para promover um melhor contraste entre os tecidos saudáveis e doentes [3, 7]. Para que essas partículas sejam utilizadas como agente de contraste, no entanto, é necessário que a metodologia desenvolvida e utilizada em sua produção possa conferi-las certas características físico-químicas. Dentre elas,

temos: estabilidade, superparamagnetismo, elevada absorção na região de interesse e cinética favorável, fácil eliminação do corpo e biocompatibilidade. Esses fatores devem ser controlados através da metodologia utilizada na sua síntese [4, 8].

O objetivo deste trabalho é a síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro multifuncionais que atuem como agente de contraste para imageamento por ressonância magnética. Tais nanopartículas têm como centro sinalizador um caroço superparamagnético (que por tanto induz um contraste via alteração nas propriedades de relaxação magnética do meio) e um recobrimento com polissacarídeo com terminação amina (NH_2).

Este trabalho está estruturado como segue. O capítulo 1 traz a introdução do trabalho e o capítulo 2, os objetivos gerais e específicos. O capítulo 3 traz os embasamentos teóricos pertinentes à análise dos resultados. O capítulo 4 descreve as metodologias utilizadas na condução dos experimentos, bem como materiais e métodos. O capítulo 5 apresenta e discute os resultados obtidos. As conclusões sobre os temas dessa dissertação estão apresentados no capítulo 6. Ao final o capítulo 7 apresenta as sugestões e as propostas para trabalhos futuros.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta dissertação de mestrado foi o desenvolvimento de sondas nanoestruturadas superparamagnéticas que possam ser utilizadas como agente de contraste multifuncional em sistemas de ressonância magnética.

2.1. Objetivos Específicos

Mais especificamente procurou-se alcançar as seguintes metas:

- Sintetizar nanopartículas de óxido de ferro pelo método de coprecipitação.
- Caracterizar morfológica e estruturalmente as NPs.
- Determinar a relaxividade magnética das sondas em buffer salinos diretamente em um equipamento clínico de Ressonância Magnética.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O presente capítulo é dedicado à discussão dos principais temas que embasam essa dissertação.

3.1. Nanoestruturas

O prefixo “nano” vem do grego antigo e significa “*anão*”, usado para designar a bilionésima parte de uma unidade. Por conseguinte, é utilizado para classificar uma nova classe de materiais ou dispositivos que, na sua composição, inclua estruturas com pelo menos uma das suas dimensões menores que 100nm [7, 10]. Um dos idealizadores desta nova área de conhecimento foi um dos maiores físicos do século XX: Richard P. Feynmann. Ainda antes dos cientistas desenvolverem instrumentos para caracterização e manipulação de átomos individualmente, ele já havia levantado questões sobre o que aconteceria se pudéssemos construir novos materiais, manipulando átomo a átomo diretamente [11,12].

Atualmente materiais nanoestruturados estão sendo amplamente investigados em função da possibilidade de obtenção de novas propriedades físicas e químicas, determinadas pelo reduzido tamanho de suas fases (confinamento espacial) e pelo aumento da razão superfície/volume (efeitos de superfície) [5, 12]. Dessa maneira, diversos tipos de materiais nanoestruturados têm sido objeto de intensa pesquisa, envolvendo metais e ligas metálicas, cerâmicas em geral, polímeros, óxidos e matéria orgânica [13]. Dentre esses materiais, nanopartículas de óxido de ferro têm sido amplamente investigadas devido ao seu diversificado campo de aplicações, como por exemplo, em dispositivos de armazenamento de dados, em sistema de entrega de fármacos, como agente de catálise e como contraste para imagens por ressonância magnética [5, 13, 14]. Esse último tópico é o objeto de estudo dessa dissertação.

Existem vários tipos de outras nanoestruturas que tem sido utilizadas ou testadas para o diagnóstico e a terapia na medicina, como por exemplo, as nanopartículas inorgânicas (nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas), nanopartículas poliméricas (micelas, quitosana) [13,15], nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanotubos de carbono [16], assim como estruturas conjugadas envolvendo essas nanopartículas [17]. A utilização de cada uma delas em estudos envolvendo diagnóstico ou terapia é escolhida de acordo com as propriedades específicas das nanopartículas e os objetivos pretendidos [18].

3.1.1. Propriedades Magnéticas dos Materiais

As propriedades de nanomateriais magnéticos resultam tanto de características intrínsecas quanto das interações entre partículas. Assim, as propriedades macroscópicas das “nanopartículas” magnéticas são largamente afetadas pela sua estrutura microscópica [19]. A existência do momento magnético em átomos, moléculas e sólidos é explicada pela estrutura eletrônica do material. Os movimentos dos elétrons que originam o momento magnético são o movimento do elétron em torno do núcleo, dado pelo momento angular orbital e pelo momento de spin dos elétrons [20, 21]. A caracterização das respostas magnéticas dos materiais pode ser dada em termos dos dipolos magnéticos e da susceptibilidade magnética χ_m , que é a grandeza que caracteriza a resposta do material ao campo magnético aplicado:

$$\chi_m = \frac{M}{H} \quad (3.1)$$

Onde M é a magnetização do material e H é o campo aplicado. Assim, dependendo da sua susceptibilidade magnética, materiais em geral podem ser caracterizados em diferentes tipos. Um material é dito diamagnético, quando susceptibilidade for pequena e negativa ($\chi_m < 0$) de modo que a magnetização induzida é contrária e proporcional ao campo aplicado. Um material é classificado como paramagnético quando for caracterizado por uma pequena susceptibilidade

positiva ($\chi_m > 0$) e conseqüentemente uma magnetização na direção do campo aplicado. Podemos observar, conforme figura 3.1, os arranjos dos dipolos magnéticos para essas situações [20, 22, 23].

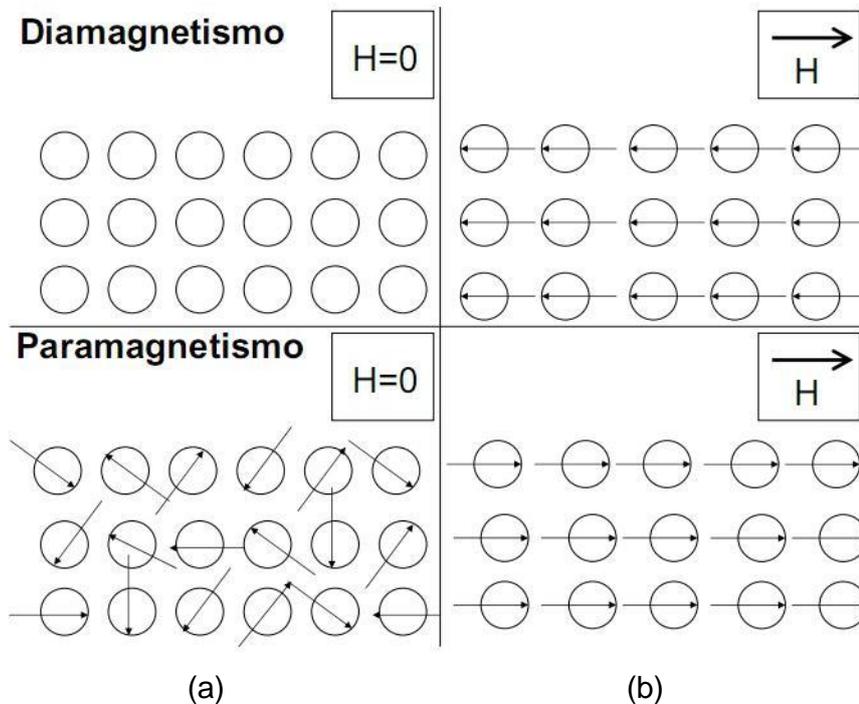


Figura 3.1: Ilustração dos arranjos dos momentos magnéticos nos fenômenos de diamagnetismo e Paramagnetismo, (a) sem campo e (b) com campo aplicado [24].

Os materiais ditos ferromagnéticos são caracterizados pela existência de uma magnetização espontânea, tal que esta persiste mesmo na ausência de um campo magnético externo e $\chi_m \gg 0$. Os processos de magnetização em materiais ferromagnéticos estão intimamente ligados à estrutura magnética que existe dentro do material. Entende-se por estrutura magnética a descrição da forma como a magnetização esta distribuída pelo volume do material. Nos materiais ferromagnéticos ideais a magnetização espontânea varia com a temperatura e atinge um valor máximo a $T=0K$ e tende a zero a uma temperatura T_C , denominada temperatura de Curie ferromagnética [25, 26].

Na classe de materiais antiferromagnéticos, a interação de troca força átomos vizinhos a assumir orientações de “momentos antiparalelos”. Por exemplo,

como o que ocorre em muitos compostos de materiais de transição, tais como: MnO_2 , FeO , FeCl_2 e muitos outros compostos orgânicos. Tais materiais apresentam, dessa forma, um magnetismo efetivo nulo e quando aquecidos suficientemente tornam-se paramagnéticos. A temperatura em que um material sofre a transição de fase de antiferromagnético para paramagnético é denominada de temperatura de Néel [20, 27].

Por fim, as substâncias ferrimagnéticas possuem tipos diferentes de redes magnéticas, como por exemplo, na ferrita de níquel, onde os dois íons são Ni^{2+} e Fe^{3+} . Nesses materiais, existe também uma interação antiferromagnética de troca, que orienta os momentos de dipolos magnéticos “antiparalelamente”, porém, como existem redes de dois tipos, com módulos diferentes de momento de dipolo magnético, a magnetização resultante não é nula. Os efeitos magnéticos externos resultantes são intermediários entre o ferromagnetismo e o antiferromagnetismo, e neste caso também a interação de troca desaparece se o material for aquecido acima de certa temperatura característica [26 - 28].

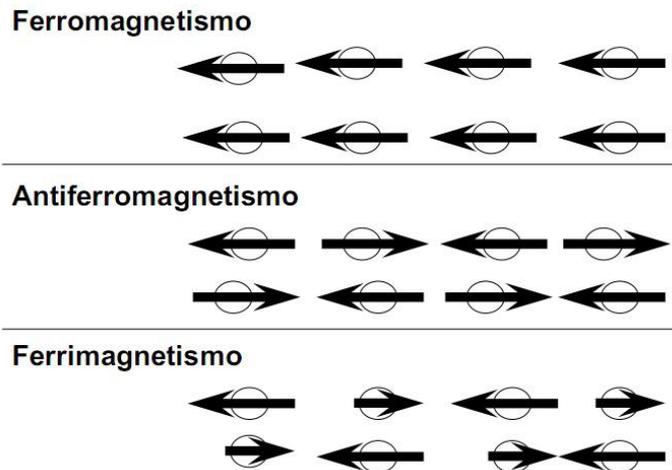


Figura 3.2: Ilustração dos arranjos dos dipolos magnéticos para o fenômeno de ferromagnetismo, antiferromagnetismo e ferrimagnetismo [24]

A curva de histerese (figura 3.3) resume as propriedades magnéticas de materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos. Supomos inicialmente que os momentos desses materiais estão randomicamente orientados por todo o material e se cancelam, resultando em uma magnetização mínima ou nula. Aplicando-se um

campo magnético externo H suficientemente grande, os momentos magnéticos em cada domínio giram até se alinharem na direção do campo aplicado. A magnetização aumenta até atingir um valor máximo que é a magnetização de saturação (M_s)[26].

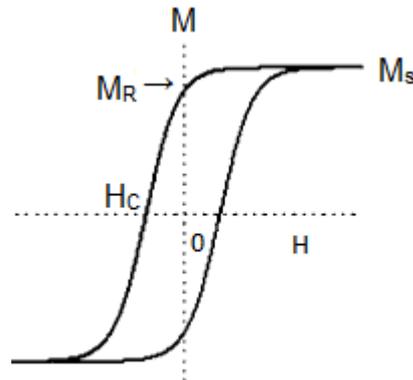


Figura 3.3: Curva de histerese magnética, H é o campo externo aplicado e M a magnetização do material [5]

Quando o campo magnético é reduzido, se a magnetização não acompanha a curva de magnetização inicial, o material apresenta histerese. Diminuindo o campo a partir do valor de magnetização de saturação, obtém-se um valor residual de magnetização: a magnetização remanente M_R , para o campo magnético nulo $H = 0$. Aplicando o campo no sentido contrário, a magnetização passa por zero, sendo o campo necessário para se atingir esse valor de magnetização denominado campo coercivo H_C . Variando novamente o módulo, chega-se a uma região de saturação e repetindo-se o ciclo no sentido inverso, obtém-se a curva fechada, que é o ciclo de histerese [13, 20, 29].

Os processos envolvidos na varredura de M em função de H são os movimentos das paredes de domínios e ou a rotação dos momentos. Os movimentos das paredes ocorrem através do aumento das regiões que têm as direções de magnetização alinhadas com o campo magnético aplicado. Quando este mecanismo não é mais possível, ocorre rotação dos momentos magnéticos que se alinham com o campo aplicado. [29, 22].

A forma da curva é determinada, em parte, pelo tamanho da partícula. Para partículas grandes, multidomínios, a energia necessária para mover as paredes de

domínio é pequena, o que faz com que a curva histerese seja larga. Já as partículas pequenas, monodomínio, necessitam de uma energia mais alta para girar os momentos na direção do campo aplicado, portanto exibem uma curva de histerese estreita [20].

A estrutura local, e as propriedades magnéticas de materiais de tamanhos nanométricos são significativamente diferentes daqueles que correspondem ao “bulk”. Por exemplo, os precipitados nanométricos de Fe, Co e Ni passam a ter comportamento superparamagnético, ao invés de ferromagnético, como o correspondente em “bulk” [24, 30]. O superparamagnetismo é uma propriedade exclusiva das nanopartículas magnéticas, caracterizado por uma susceptibilidade típica de materiais ferromagnéticos e uma magnetização reversível como a dos materiais paramagnéticos [5, 31].

Esta propriedade decorre da influência das flutuações térmicas sobre o momento magnético quando as nanopartículas monodomínio tem um diâmetro menor que o chamado diâmetro crítico, D_c . Nesta faixa de tamanho, a energia associada à anisotropia diminui até que a energia térmica seja suficiente para superar a orientação preferencial do momento da partícula [7, 32, 33].

Em um sistema de monodomínio, a reversão da magnetização se dará pela rotação coerente dos spins e não pelo movimento das paredes de domínio que não mais existirão [33, 34]. Quando o tamanho das partículas for menor que a parede de o domínio magnético de um material ferromagnético comum, a partícula se comporta como um único átomo em um monodomínio magnético como mostra a Figura 3.4 [29].

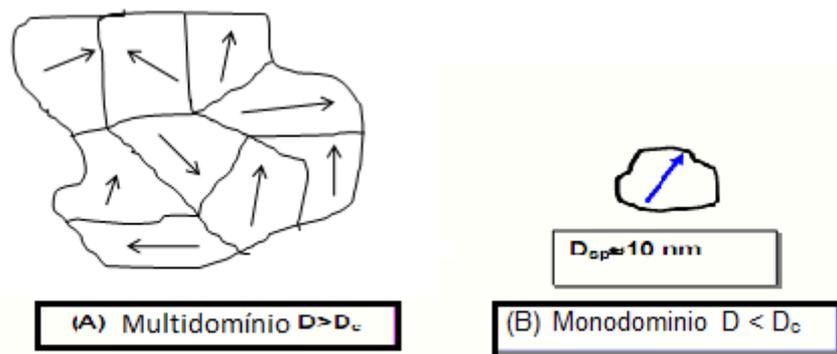


Figura 3.4 - Ilustração de comportamento magnético de um multidomínio em (A) e monodomínio em (B).

Uma partícula superparamagnética alcança o equilíbrio de magnetização a temperaturas experimentais em um período de tempo relativamente curto. A competição entre as energias térmica e magnética determina o estado no qual o material se encontra que pode ser o estado superparamagnético ou o estado bloqueado [29]. Abaixo da temperatura de bloqueio T_B os momentos magnéticos encontram-se bloqueados. Acima de T_B , o material sai do estado bloqueado e pode comportar-se como um paramagneto. Nas partículas superparamagnéticas, os momentos magnéticos atômicos estão alinhados paralelamente numa só direção e não há histerese, assim a magnetização residual (M_r) e o campo coercivo (H_c) são nulos (figura 3.5). Esses materiais têm susceptibilidade magnética entre a dos materiais ferromagnéticos e paramagnéticos e seu comportamento pode ser afetado por fatores anisotrópicos [20,35].

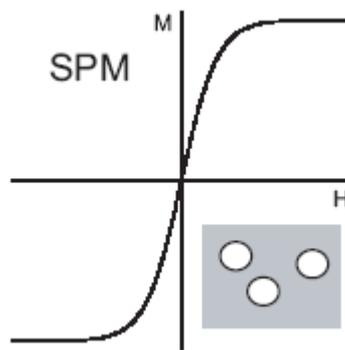


Figura 3.5: Curva de histerese magnética de um material superparamagnético [35].

3.1.2. Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro

As nanopartículas magnéticas (NPM) são constituídas de um núcleo de um metal ou de um óxido metálico altamente magnético (superparamagnético ou ferromagnético) [36]. No caso das NP de óxido de ferro, elas podem ser divididas em dois grupos básicos, de acordo com o tamanho e a distribuição de tamanho. Os óxidos de ferro superparamagnéticos, cujas nanopartículas têm tamanhos maiores que 50nm, incluindo o revestimento são classificados como SPIOs (*superparamagnetic iron oxide*), enquanto que óxidos menores que 50nm são denominados USPIOs (*ultrasmall superparamagnetic iron oxide*) [37, 38].

3.1.2.1. Magnetita

A magnetita é um óxido de ferro magnético de valência mista com estrutura cúbica de espinélio inverso. Sua fórmula química é melhor representada por $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$. A estrutura do tipo espinélio tem fórmula geral dada por $(\text{A})[\text{B}]_2\text{O}_4$. Cada célula unitária é constituída pela fórmula $\text{A}_8\text{B}_{12}\text{O}_{32}$ e apresenta os íons oxigênio regularmente distribuídos em posições cúbicas (figura 3.6). Os cátions divalentes, no caso da magnetita Fe^{2+} , e os cátions Fe^{3+} ocupam os espaços entre os íons oxigênio, sendo estes espaços de dois tipos: os sítios tetraédricos e os octaédricos. O sítio tetraédrico ou sítio (A) é assim chamado porque o cátion encontra-se no centro do tetraedro que tem como vértices os íons oxigênio. O sítio octaédrico tem os oxigênios ocupando os vértices de um octaedro e os cátions ocupando os espaços entre eles. A magnetita apresenta metade dos íons Fe^{3+} coordenados tetraedricamente, a outra metade ocupa os sítios octaédricos juntamente com os íons Fe^{2+} [25, 39].

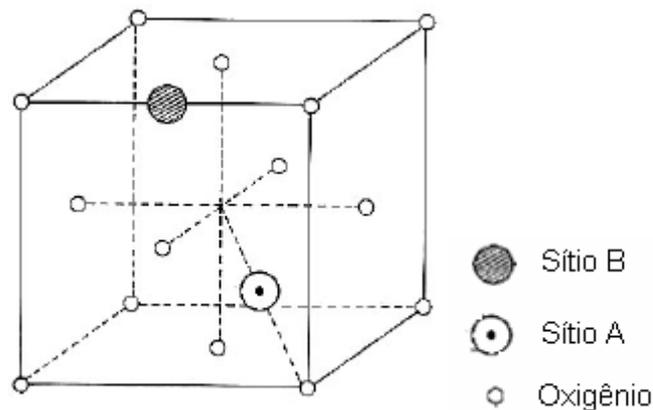


Figura 3.6: Representação da estrutura cristalina da magnetita. Fonte: (Treble and Craick, 1969; Harris, 2002) [40]

A magnetita exibe magnetização espontânea devido à sua estrutura de espinélio inverso. Existe uma forte interação de troca entre os cátions tetraédricos e octaédricos devido à geometria dos orbitais envolvidos, que podem ser interações

do tipo A-O-B ou interações B-O-B. Interações do tipo A-O- B com ângulos próximos de 135° são dominantes na estrutura de espinélio inverso, levando a uma magnetização de saturação, na temperatura 0K. Esta magnetização depende somente dos íons Fe^{2+} , já que os spins dos cátions Fe^{3+} coordenados octaedricamente se cancelam com os spins do Fe^{3+} do sítio tetraédrico por serem antiparalelos. Cada elétron desemparelhado dos íons Fe^{2+} produz um momento magnético, resultando na magnetização de saturação [20]:

$$M_s = \frac{8n\mu_B}{V} \quad (3.2)$$

Onde n é o número de momentos magnéticos por célula unitária e V é o volume da célula unitária. A constante de anisotropia cristalina K é $1,4 \times 10^5 \text{ erg/cm}^3$ e o tamanho crítico da partícula abaixo do qual ela apresenta superparamagnetismo, estimado de $KV \sim 25kT$, é aproximadamente 25nm, tamanho menor que 128nm que é o tamanho obtido para o monodomínio [29,41]. Algumas constantes importantes da magnetita relacionadas com suas propriedades magnéticas e cristalinas são mostradas na Quadro 3.1.

Quadro 3.1: Propriedades físicas da magnetita

Parâmetro de rede (a)	8,393 – 8,3963 Å
Magnetização de saturação (M_s)	92 emu/g
Constantes de anisotropia magnetocristalina a 300 K	$K_1 = -1,35 \times 10^5 \text{ erg/cm}^3$ $K_2 = -0,44 \times 10^5 \text{ erg/cm}^3$
Temperatura de Curie (θ_c)	847 K

A superfície da magnetita tem átomos de ferro que não estão ligados aos átomos de oxigênio e podem agir como ácidos de Lewis, coordenando as moléculas que podem doar par de elétrons (bases de Lewis). Em sistemas aquosos, os átomos de ferro coordenam-se com moléculas de água, que se dissociam deixando a superfície do óxido de ferro funcionalizada com grupos hidroxila, que podem reagir com ácidos ou bases, devido seu caráter anfótero [42]. A superfície da magnetita

pode ser, positiva ou negativa em dispersões aquosas dependendo do pH da solução. O pH no qual a superfície tem o mesmo número de cargas positivas e negativas é o chamado ponto isoelétrico, que é 6.8, para a magnetita [43]. A magnetita nanoparticulada pode ser estabilizada por estabilização estérica ou por modificação do ponto isoelétrico com revestimentos diversos como, por exemplo, a sílica. A estabilização é necessária para a obtenção de ferrofluidos estáveis contra agregação na presença de campo magnético [16].

3.1.2.2. Aplicações biomédicas

Em aplicações biomédicas, as nanopartículas magnéticas são encapsuladas por um revestimento polimérico ou inorgânico que pode funcionar como suporte de biomoléculas e que torna a nanopartícula biocompatível e estável [36]. O sistema básico para liberação magneticamente direcionada de fármacos consiste de um núcleo magnético revestido por um material biocompatível, no qual a droga encontra-se imobilizada [31]. O núcleo magnético normalmente é um óxido de ferro, como a magnetita. O revestimento tem a função de proteger a nanopartícula magnética do meio e acoplar a droga citotóxica ou anticorpos específicos a tal partícula. Este acoplamento pode ocorrer através de ligações da droga com grupos funcionais localizados na superfície do revestimento, ou ainda por imobilização da droga no interior dos poros do material. É necessário que os materiais do revestimento sejam biocompatíveis, sendo comum a utilização de polímeros como PVA ou dextran (polissacarídeo sintético), além de materiais inorgânicos como a sílica [8, 18, 44].

A utilização de nanopartículas magnéticas como carregadores de fármacos visa à redução de muitos problemas relacionados à administração sistêmica de fármacos. Esses problemas incluem a biodistribuição insatisfatória de fármaco no corpo, a falta de especificidade para aumento na região de interesse, a necessidade de grandes doses para alcançar altas concentrações locais e outros efeitos colaterais derivados de altas doses de fármaco [45, 46]. O sistema de liberação controlada de fármacos magneticamente direcionada produz inúmeras vantagens, quando comparados a outros de dosagem convencional. As vantagens da utilização desses sistemas incluem a maior eficácia terapêutica, redução significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; administração segura (sem

reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses); direcionamento a alvos específicos; incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas [18, 45].

3.1.3. Princípios básicos de imageamento por ressonância magnética

Imagens por Ressonância Magnética (MRI) são baseadas na interação de um campo magnético com os núcleos de átomos que possuem spins nucleares não nulos [47]. As amostras são expostas a um campo magnético forte e uniforme \mathbf{B}_0 na direção z, que orienta os spins (ou os momentos magnéticos) nucleares e induz em uma magnetização nuclear líquida \mathbf{M}_0 . Além disso, os spins precessionam em torno de B_0 com uma frequência característica chamada de frequência de Larmor:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (3.3)$$

Durante as medidas, uma bobina de RF emite um pulso de radiofrequência ressonante na frequência de Larmor ω_0 . A ação do campo de RF faz com que alguns ou todos os prótons spin *up* absorvam energia tornando-se então excitados. Isso afeta o valor de M_z (magnetização longitudinal) que pode ser reduzido, desaparecer, ou até mesmo reverter, dependendo da duração e intensidade do pulso de RF. Para um pulso de 90° , o M_z é rebatido ao plano transversal ao campo B_0 (o plano xy) [47, 48].

O MRI convencional envolve a aplicação de uma série de pulsos de 90° , repetidos em intervalo de tempo TR (tempo de repetição). Ao terminar o pulso de 90° o vetor magnético M_{xy} continua girando no plano transversal XY durante algum tempo. Isso induz na bobina de RF (que agora atua como receptor) uma voltagem alternada que é adquirida e digitalizada. Depois de ser processada por um computador, a amplitude é usada para controlar o nível de cinza do pixel na imagem de RM [47, 49].

Do ponto de vista clássico, após o pulso de excitação, a componente M_{xy} da magnetização perde a coerência e diminui de intensidade, enquanto a componente

longitudinal M_z cresce recuperando seu valor inicial ou de equilíbrio. O decaimento de M_{xy} e a recuperação de M_z ocorrem devido a dois mecanismos de relaxação: a relaxação spin-rede ou relaxação T1 e a relaxação spin-spin ou relaxação T2 [49].

Na relaxação T1 também chamada de relaxação longitudinal, os prótons excitados cedem energia para a rede molecular, voltando para o estado fundamental. M_z aumenta com um crescimento exponencial, caracterizado por uma constante de tempo T1:

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{-\left(\frac{t}{T1}\right)} \right) + M_z(0) e^{-\left(\frac{t}{T1}\right)} \quad (3.4)$$

A relaxação T2 modula o desaparecimento do sinal. Os dipolos magnéticos progressivamente se defasam, pois alguns giram mais rapidamente ou mais lentamente que outros. M_{xy} diminui ou decai exponencialmente com constante de tempo T2:

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0) e^{-\left(\frac{t}{T2}\right)} \quad (3.5)$$

T2 é o tempo para que o sinal de MR caia para 37% de seu valor máximo. [18, 47, 49]. A densidade dos prótons no tecido e o tempo de relaxação magnética T1 e T2 são os principais responsáveis pelo contraste na imagem. Como a densidade de prótons, T1 e T2 são diferentes para cada tecido, cada tecido produz um sinal com diferente intensidade como resposta ao pulso excitatório de radiofrequência [38, 51].

3.1.3.1. Agentes de contraste

O uso de nanopartículas magnéticas como agente de contraste em imageamento por ressonância magnética (MRI) tem sido bastante pesquisado nos últimos anos [4, 7, 13-18, 34, 35, 37, 38, 44, 46, 50, 52, 53]. O interesse na aplicação de nanopartículas magnéticas, principalmente os óxidos de ferro, como agentes de contraste tem aumentado nos últimos anos devido às vantagens apresentadas por estes materiais em relação a outros agentes de contraste. O controle da intensidade do sinal é obtido quando são usadas nanopartículas magnéticas devido à redução dos tempos de relaxação T_1 e T_2 na região aonde as

nanopartículas se localizam. Em geral o efeito de T2 predomina e as regiões com nanopartículas tendem a ficar escuras (contraste negativo) na imagem [51, 52].

Esse efeito de redução do tempo de relaxação pode ser explicado por dois prováveis mecanismos [47]. O processo de redução de T_1 exige uma interação próxima entre os prótons e agentes T_1 , porém a interação pode ser impedida pela espessura do revestimento da nanopartícula. O efeito na redução de T_2 deve-se à grande diferença de susceptibilidade que existe entre as partículas magnéticas e a vizinhança, levando a um gradiente de campo magnético microscópico. A difusão dos prótons através deste gradiente de campo magnético resulta em uma perda irreversível da coerência de fase, diminuindo o T_2 . Sendo assim, os tecidos que contêm óxidos de ferro aparecem na imagem de MRI relativamente mais escuros que os tecidos vizinhos [35, 49].

3.2. Métodos de Síntese

As nanopartículas de óxido de ferro podem ser preparadas por diversas técnicas físicas e químicas, ou uma mistura das duas. As rotas físicas incluem a redução de tamanho por meio de moagem de partículas micrométricas e a deposição por vapor. Entre os métodos químicos destacam-se a coprecipitação por meio de hidrólise alcalina em meio aquoso, micro emulsão e micelas reversas e o método sol-gel [34].

As propriedades magnéticas das nanopartículas são diretamente afetadas por alguns parâmetros físicos como o tamanho, a morfologia e uniformidade dos grãos que devem ser controlados durante a síntese. A determinação de condições experimentais que levem a obtenção de partículas com um controle dos parâmetros citados não é tão simples e tem sido um desafio para pesquisadores de nanopartículas magnéticas [54- 55].

O método de coprecipitação é mais bem discutido a seguir, já que foi utilizado para realizar a síntese de nanopartículas magnéticas no presente trabalho.

3.2.1. Processo de coprecipitação

A síntese por coprecipitação consiste basicamente da mistura de sais de ferro em solução aquosa e posterior precipitação com hidróxido. É um método relativamente simples e eficiente para obter partículas dentro de um largo espectro de tamanho de 5-180 nm [56, 57]. O processo de coprecipitação apresenta um grande número de vantagens como homogeneidade química, baixas temperaturas de reação, obtenção de partículas finas, produtos com boa reatividade e uniformidade, tempo de reação relativamente pequeno, baixo custo e possibilidade de processamento em grande escala [56, 57].

O crescimento do cristal é determinado por fatores cinéticos que dificultam o controle da distribuição de tamanho. O processo ocorre em duas etapas: a nucleação e o subsequente crescimento das partículas. A nucleação é um processo rápido que ocorre quando a concentração dos íons alcança uma supersaturação crítica. Posteriormente, ocorre o crescimento lento por difusão na superfície dos cristais. As taxas relativas de nucleação e crescimento das partículas controlam o tamanho e a polidispersão das partículas. Quando o processo de nucleação predomina são obtidas partículas pequenas em grande quantidade, porém, se o processo de crescimento for predominante, será obtido um pequeno número de partículas com grande tamanho [18, 58].

Propriedades como natureza, homogeneidade, tamanho, comportamento magnético e energia superficial das partículas são afetadas pelas condições nas quais as partículas são formadas, sendo necessário o controle de alguns parâmetros da síntese. Esses parâmetros incluem o pH final da solução de precipitação, força iônica do meio, ordem de adição dos reagentes, concentração e razão molar dos íons, temperaturas de precipitação e velocidade de agitação [18, 53, 59, 60].

A obtenção de magnetita com alto grau de pureza é diretamente influenciada pela razão estequiométrica dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} . A fórmula da magnetita $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ mostra que são necessários 2 moles de íons Fe^{3+} para cada mol de íon Fe^{2+} , porém a alta instabilidade dos íons Fe^{2+} diminui a concentração deste durante o processo de síntese. Jolivet et al. estudaram a influência da razão $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ e obtiveram magnetita estequiométrica com partículas homogêneas em tamanho e composição quando esta razão foi igual a 0,5 [54, 59]. Quando esta razão ficou em

torno de 0,3 foram obtidas duas fases distintas uma de oxihidróxido e outra constituída de magnetita não estequiométrica. Já pequenos valores da razão $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ levaram a formação de goetita [62]. Alguns autores sugerem o uso de uma quantidade maior de Fe^{2+} para manter a estequiometria final. Quando síntese é realizada em meio livre de oxigênio, melhores resultados são obtidos mantendo a razão dos íons $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+} = 0,5$ [60].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo abordará a metodologia aplicada no presente trabalho, enfocando a síntese das nanopartículas e os métodos de caracterização física e química.

4.1. Procedimento Experimental da Síntese das Nanopartículas

4.1.1. Reagentes

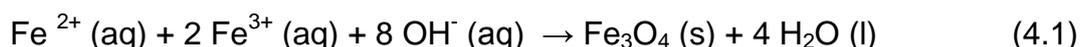
Os reagentes utilizados na síntese das nanopartículas estão listados na tabela 4.1.

Tabela 4.1– Reagentes usados para a síntese.

Reagente	Fórmula molecular
Dextran	$H(C_6H_{10}O_5)_xOH$
Cloreto de ferro (III) hexahidratado	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$
Cloreto de ferro (II) tetra hidratado	$FeCl_2 \cdot 4H_2O$
Hidróxido de amônio	NH_4OH
Epicloridrina	$CH_2Cl-CH(O)CH_2$
Citrato de sódio	$Na_3C_6H_5O_7$
Cloreto de sódio	$NaCl$
Água	H_2O

4.1.2. Síntese das nanopartículas de óxido de ferro via coprecipitação

A reação de síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro por coprecipitação do Fe (III) e Fe (II) com hidróxido de amônio é representado pela equação 4.1:



O procedimento de síntese foi baseado nas referencias [56, 57, 59, 62]. Trata-se de uma rota de síntese bastante simples, já que não exige a utilização de instrumentação cara, porém exige bastante cuidado, principalmente no que se diz respeito ao controle das variáveis envolvidas nas diferentes etapas da reação, o que pode levar a problemas de reprodutibilidade. Variáveis tais como a temperatura, velocidade de agitação e velocidade de gotejamento, aliadas à concentração inicial dos reagentes, têm um papel importante na estabilidade e concentração final do coloide. Tais parâmetros determinam a probabilidade de colisão e agregação dos átomos de ferro formados e a nucleação das nanopartículas, cujo tamanho é também limitado, por essas mesmas variáveis [62].

A síntese foi realizada utilizando um arranjo experimental (figura 4.1) composto por um balão de três bocas, um agitador magnético, uma barra magnética, uma manta aquecedora, um condensador e um termômetro, linha de vácuo e de nitrogênio e um borbulhador. A montagem foi feita de forma a assegurar que a mistura reacional ficasse sob atmosfera de gás inerte, no caso, nitrogênio.

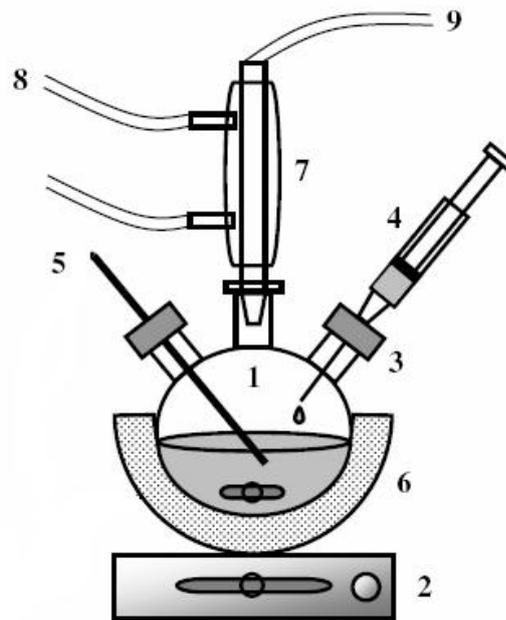


Figura 4.1: Arranjo experimental para a síntese das nanopartículas. (1) balão de reação, (2) agitador magnético, (3) rolha para vedação, (4)seringa para adição dos reagentes, (5) termômetro, (6) manta aquecedora, (7) condensador, (8) fluxo de água para resfriar o condensador (9) linhar de vácuo/nitrogênio

O processo, representado no fluxograma da figura 4.2, inicia-se com a dissolução do dextran em água (qualidade miliQ), e a dissolução de cloreto de ferro (III) hexahidratado e cloreto de ferro (II) tetra hidratado. Essas soluções foram misturadas no reator (balão de três bocas) em banho de gelo, sob agitação e numa atmosfera de nitrogênio. Após aproximadamente 30 min, uma solução aquosa de hidróxido de amônio foi adicionada gota a gota ainda sobre o banho de gelo. Em seguida, a mistura reacional foi então aquecida a 90° C sob agitação por alguns minutos em atmosfera inerte, seguido por uma redução de temperatura por algumas horas.

A solução contendo as nanopartículas de óxido de ferro revestidas com dextran foi centrifugada para remover excesso de Dextran, retirando o filtrado e colocando água miliq para a lavagem, completando o volume do tubo Falcon.

A solução aquosa filtrada foi colocada novamente no reator e adicionada uma solução aquosa de hidróxido de sódio e de epicloridrina (agente de reticulação do dextran). O sistema foi mantido em agitação durante a noite. Para aaminação da

solução contendo as nanopartículas, adicionou-se NH_4OH que permaneceu em agitação por 24 horas. Posteriormente foi feita a diálise para a retirada do excesso de amônia. Para a diálise, a solução reacional final foi colocada numa membrana, grampeada nas duas extremidades e introduzida num becker com água destilada sob agitação. Durante a diálise, a água foi trocada de 30 em 30 minutos. A solução final foi recolhida e colocada em tubo *Falcon* pra ser centrifugada com o objetivo de remover o excesso de água. Para que não houvesse tendência a aglomeração das nanopartículas, adicionamos uma solução tampão de pH de aproximadamente 7.

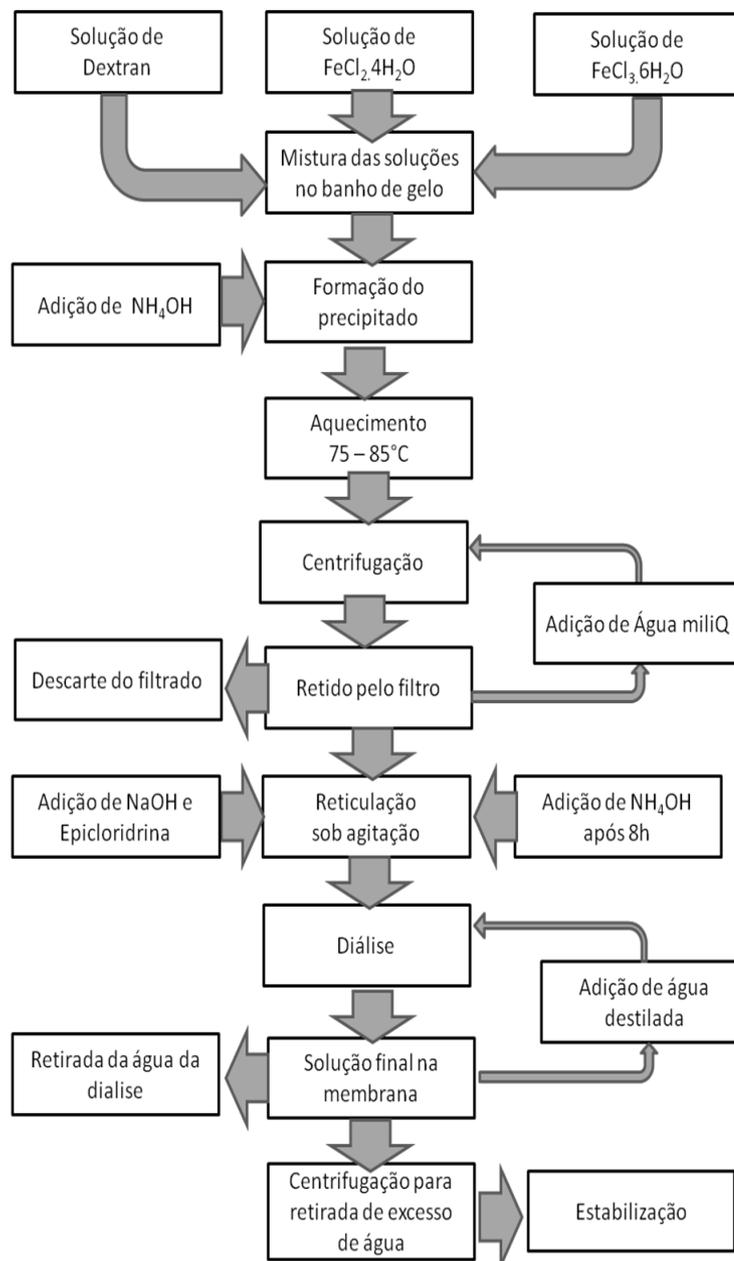


Figura 4.2: Fluxograma dos procedimentos experimentais da síntese.

4.2. Caracterização Físico-Química

Este subitem abordará, numa forma resumida, as técnicas de caracterização utilizadas no presente trabalho. A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica e estrutural, a composição elementar, a distribuição de tamanho de partícula, as curvas de magnetização e as medidas dos tempos de relaxação T1 e T2.

4.2.1. Espectroscopia UV-Visível

A espectrofotometria visível e ultravioleta é um dos métodos analíticos mais usados em diversas áreas, principalmente para a determinação quantitativa de compostos contendo grupos cromóforos absorventes [63]. A espectrofotometria utiliza fótons na faixa do ultravioleta (UV: $200 < \lambda < 400$ nm) e do visível (Vis: $400 \text{ nm} < \lambda < 780$ nm), podendo chegar ao IR próximo. Os fótons nessa faixa de energia interagem com as moléculas provocando transições moleculares vibro-eletrônicas [64].

De um ponto de vista prático, o aspecto mais importante é a determinação da absorção de luz pela amostra. Isto é descrito pela *lei de Beer-Lambert*, que dá a relação entre a intensidade da luz incidindo na solução (I_0), e a intensidade da luz saindo da solução (I).

$$\text{Log} \left(\frac{I_0}{I} \right) = A = \epsilon c x \quad (4.2)$$

onde A é a absorbância, ϵ a absorvidade molar ou coeficiente de extinção, c a concentração do material absorvedor e x é a espessura da amostra através da qual a luz passa. Os espectrofotômetros em geral, contêm cinco componentes principais: fontes de radiação eletromagnética (luz), um conjunto de componentes ópticos que levam esta radiação até a amostra incluindo o monocromador, um compartimento

de amostra, um ou mais detectores que medem a intensidade de radiação e indicadores de sinal [63,65, 66].

As medidas de absorção óptica foram feitas no Espectrofotômetro UV-Vis modelo Lambda 35, fabricado pela Perkin Elmer, localizado no Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM) da PUCRS. Esse espectrofotômetro pode realizar medidas de absorção óptica na faixa entre 190 e 1100 nm. Além disso, o equipamento utiliza dois feixes, um de referência e outro para análise das amostras. Nesse trabalho, utilizamos cubetas descartáveis poliméricas, de caminho óptico de 10 mm.

As medidas de absorbância UV-Vis foram utilizadas para quantificar o conteúdo de Fe das nanopartículas. Para tanto, inicialmente preparou-se 9 soluções padrão, em balões volumétrico de 50 mL de capacidade, a partir de solução certificada de 1,0 e 10,0 mg/mL de ferro. Em cada balão volumétrico preparou-se alíquotas de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/mL de Ferro.

Em cada cubeta adicionou-se a seguinte sequência de reagentes: 10 μ L da solução padrão com concentração variando entre 0,1 a 10,0mg/mL, 10 μ L de H₂O₂ 3% e 980 μ L de ácido clorídrico 6M, totalizando 1,0 mL em cada cubeta. Foi usado como branco água deionizada. Homogeneizou-se a solução e aguardou-se cerca de 30 minutos para realizar a leitura no espectrômetro.

Para leitura das absorbâncias de cada cubeta foi usado o comprimento de onda $\lambda = 410\text{nm}$. Em seguida, construímos uma curva de calibração com estes valores de absorbância com as suas respectivas concentrações já conhecidas.

Para a determinação da concentração da amostra da solução contendo as nanopartículas, pipetamos 10 μ L para a cubeta e seguiu-se a adição dos reagentes conforme a preparação das amostras padrão. Realizou-se a leitura da absorbância no mesmo comprimento de onda e a concentração foi obtida por interpolação na curva de calibração.

4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS)

O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução [63, 64]. No MEV, um feixe de elétrons

emitidos por um filamento é acelerado por uma alta voltagem, (comumente na faixa de 1 a 30 kV) e direcionado a uma coluna ótica eletrônica, consistindo de duas ou três lentes magnéticas. Essas lentes produzem um feixe fino de elétrons e o dirige sobre a superfície da amostra. Dois pares de placas de deflexão, colocados antes das lentes finais, fazem com que o feixe de elétrons colimado rastreie toda a superfície da amostra. Esse feixe produz na amostra vários fenômenos, dos quais a emissão de elétrons secundários é o mais comumente usado. Informações importantes também podem ser obtidas dos elétrons retroespalhados e dos raios-X produzido durante processo de freamento dos elétrons incidente [68 - 70].

A Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) é um acessório no estudo de caracterização microscópica de materiais. Quando o feixe de elétrons incide sobre um material, os elétrons mais internos dos átomos constituintes do material são excitados, deixando lacunas nos orbitais internos. Os átomos ao retornarem para seu estado de equilíbrio inicial liberam a energia adquirida, a qual é emitida em comprimento de onda no espectro de raios X. Um detector instalado na câmara de vácuo do microscópio mede a energia associada a esses fótons [67, 71].

Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, determinar quais os elementos químicos estão presentes no ponto de incidência do feixe. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição de amostras de tamanhos muito reduzidos ($<5\mu\text{m}$). A técnica de EDS, é semi-quantitativa e foi usada para obter uma informação global da composição elementar dos materiais [70, 71].

A preparação das amostras para o MEV obedeceu ao seguinte critério. Primeiramente foi realizada a sonificação da solução coloidal por 10 minutos na frequência de 60kHz para que haja uma boa homogeneidade antes de coletar a amostra representativa da solução. Em seguida 10 μL da solução primaria foi diluída em 2mL de álcool isopropílico e sonificada por 10 minutos para ser homogeneizada.

Uma gota dessa solução foi depositada num substrato de silício, previamente clivado e limpo com jatos de nitrogênio. O excesso de líquido foi absorvido, com um material absorvente e a amostra foi seca no ar ambiente. As amostras foram recobertas com ouro ou carbono a fim de evitar o seu carregamento. As micrografias foram obtidas no equipamento MEV/EDS, marca PHILIPS, modelo XL30, pertencente ao Centro de Microscopia e Microanálises (CEMM) da PUCRS, no modo de elétrons secundários.

4.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês *Transmission Electron Microscopy*) é a mais poderosa, dentre as técnicas atuais para a observação direta de estrutura de materiais a nível atômico. O TEM também pode gerar padrões de difração que contêm informações da estrutura cristalina. O microscópio consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada. A figura 4.5 mostra um diagrama esquemático de uma configuração típica de um TEM [71 - 73].

Um feixe de elétrons é produzido e acelerado no canhão eletrônico, sofrendo uma primeira focalização na sua saída, denominada “crossover” do canhão. A seguir, o feixe passa por duas lentes magnéticas, C1 e C2 (figura 4.5), que são ajustadas para iluminar a amostra com um feixe de elétrons, geralmente paralelos e com uma secção de alguns micrometros. Ainda nesse trecho existe uma abertura (diafragma) que controla a coerência, intensidade e paralelismo do feixe. A este conjunto que conduz os elétrons do canhão até a amostra dá-se o nome de sistema de iluminação [72, 74].

Os elétrons saem da amostra pela superfície inferior com uma distribuição de intensidade e direção controladas principalmente pelas leis de difração impostas pelo arranjo cristalino dos átomos na amostra. Em seguida, um conjunto de lentes magnéticas objetivas captura o feixe espalhado que atravessou a amostra, em especial na direção direta, e trabalha-o para conseguir a formação de uma imagem nítida e ampliada dessa distribuição angular dos feixes eletrônicos difratados. Após este processo importantíssimo da lente objetiva, as lentes restantes são posicionadas para controle de intensidade e contraste, para aumentar a imagem ou diagrama de difração para futura observação na tela fosforescente ou na chapa fotográfica [74, 75].

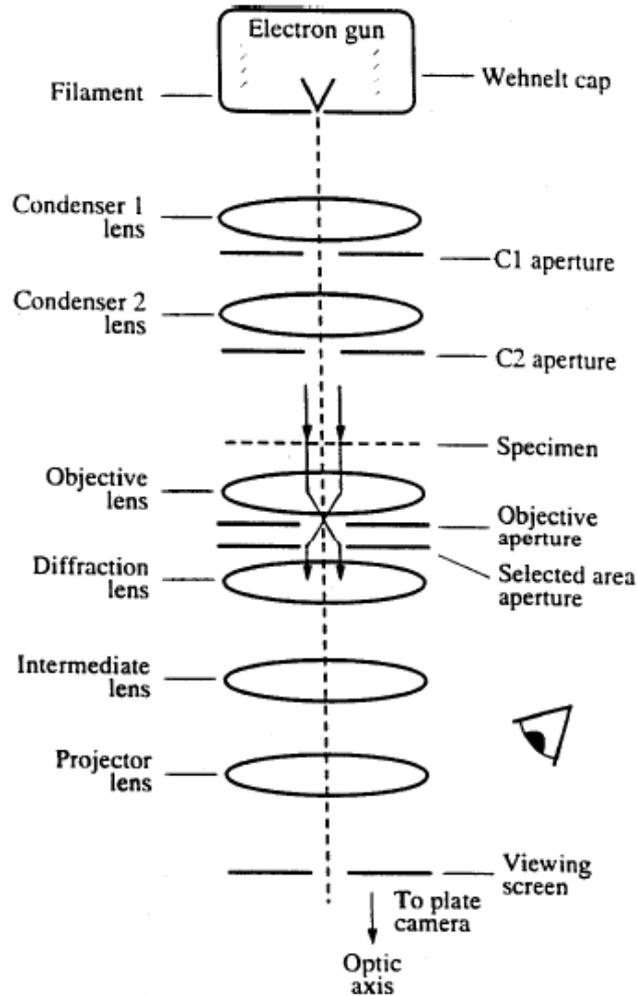


Figura 4.5 . Diagrama esquemático de uma configuração típica de um TEM [75].

Devido a maneira de operação do TEM, sinais secundários podem ser obtidos como, por exemplo, elétrons Auger e raios-X. Com isto, geralmente os TEMs possuem paralelamente equipamentos para detectar tais elétrons ou raios-X, que ajudam na sondagem da composição química, cristalografia e imagens da superfície da amostra em análise [71].

Apesar de ser uma técnica microscópica poderosa, ela também apresenta algumas limitações. A primeira é a amostragem, paga-se um alto preço por uma imagem de alta resolução, onde se vê somente uma parte muito pequena da amostra. Em geral, quanto maior a resolução, menor a amostragem. A segunda é a projeção em imagens 2D; a imagem é uma média através da espessura da amostra. Portanto, é necessário tomar cuidado na interpretação da imagem, pois ela é bidimensional, enquanto a amostra está em três dimensões. Por fim, danos causados pelo feixe de elétrons é outro aspecto limitador. O feixe de elétrons

funciona como uma radiação ionizante, danificando a amostra, especialmente se ela for cerâmica ou materiais orgânicos. A última vantagem é preparação de amostras. As amostras devem ser suficientemente finas, na ordem de micrometros ou menos, para que a intensidade de feixe que a atravessa consiga gerar uma imagem interpretável. O processo para preparar tais amostras pode afetar sua estrutura e composição [73].

4.2.3.1. Preparação das amostras para o TEM

Para a preparação das amostras, para a observação no microscópio eletrônico de transmissão foi seguido o mesmo processo de diluição apresentado na seção anterior. Algumas gotas da dispersão foram depositadas sobre um suporte (*grid* de *holey carbon* ou *formvar* de 200 mesh). O excesso de solução foi absorvido com material absorvente. Em seguida, o *grid* contendo a amostra seguiu o procedimento padrão de Microscopia Eletrônica de Transmissão. As micrografias foram obtidas no microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo EM 208S da PHILIPS pertencente ao Centro de Microscopia Eletrônica e Microanálises (CMM) da ULBRA.

4.2.4. Microscopia de força atômica (AFM)

O microscópio de força atômica, citado na maioria das literaturas como AFM (*Atomic Force Microscopy*) tem um princípio de funcionamento relativamente simples e a sua melhor propriedade é a visão da superfície dos objetos em três dimensões com capacidade para resolução atômica [76, 77].

Um AFM é composto basicamente por uma haste com uma ponta muito fina que varre a superfície da amostra em estudo. Mede-se a força de interação entre os átomos da ponta e os da superfície e, utilizando recursos computacionais, os resultados são transformados em imagens da amostra [76, 78]. Essas forças são de vários tipos, mas fundamentalmente resumem-se a forças atrativas de Van Der Waals – de origem química – que agem a distâncias entre 100 e algumas unidades de nanômetros e forças repulsivas que provêm do princípio de exclusão de Pauli e

que agem quando a ponta aproxima-se muito da superfície e os átomos da sonda e da amostra estão tão próximos que começam a se repelir [76, 79].

No AFM convencional, conforme ilustração da figura 4.6, um detector capta a deflexão da haste iluminada por um laser. Quando a haste se move, devido a mudanças na topografia da amostra, a luz que ele reflete se move sobre um fotodetector sensível a posição. O quanto o cantilever se moveu pode ser calculado a partir da diferença na intensidade de luz nos setores do fotodetector [68, 72]. As mudanças na saída do fotodetector são também utilizadas para realimentação, isto é, para ajustar uma cerâmica piezoelétrica na direção vertical z , cujo valor é registrado em função das coordenadas (x,y) , para depois ser traduzido em topografia, $z(x,y)$. As coordenadas x,y também são monitoradas através de voltagens aplicadas a cerâmicas piezoelétricas colocadas nos drives x,y do scanner, assim como em z . O controle de movimentos em distâncias tão pequenas é possível graças ao uso dessas cerâmicas piezoelétricas [80, 81].

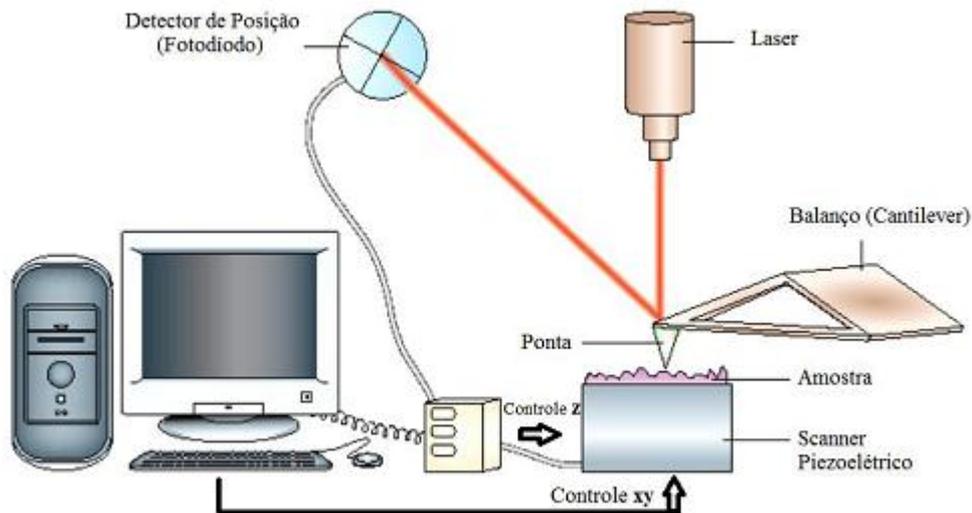


Figura 4.6 : Ilustração dos componentes principais de um AFM [78].

A preparação das amostras para o AFM obedeceu aos mesmos critérios, das amostras do MEV, mas sem a deposição do filme condutor.

As imagens de AFM foram obtidas no equipamento NANOSCOPE IIIa da Digital Instruments (Laboratório de Magnetismo do Instituto de Física, UFRGS) no modo de contacto intermitente (*tapping mode*). As pontas utilizadas foram de silício (Nanosensores) com raio de curvatura nominal de 10 nm. As varreduras utilizadas

foram entre 2,00 – 0,50 μm . As imagens foram adquiridas com set point de 1,5 – 3,0V e taxa de varredura de 1,00 – 2,00Hz e amplitude de oscilação entre 1,5 - 3,0V.

4.2.5. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS) é utilizada para medir tamanho de partículas de dimensões menores que alguns micrômetros. O equipamento usa a ideia que pequenas partículas em suspensão se movimentam aleatoriamente. Este movimento aleatório dessas pequenas partículas em um fluido é consequência dos choques das moléculas do fluido nas partículas, definido como “Movimento Browniano” e que modula o sinal de luz espalhada [82]. As flutuações de intensidade da luz espalhada num dado ângulo são convertidas em pulsos elétricos, os quais são alimentados a um correlacionador digital. Este gera uma função de autocorrelação, a qual se relaciona com o coeficiente de difusão das partículas, e este, por sua vez, com o tamanho das partículas. Na figura 4.7 é mostrado um esquema de um instrumento convencional de espalhamento dinâmico de luz [82 - 84].

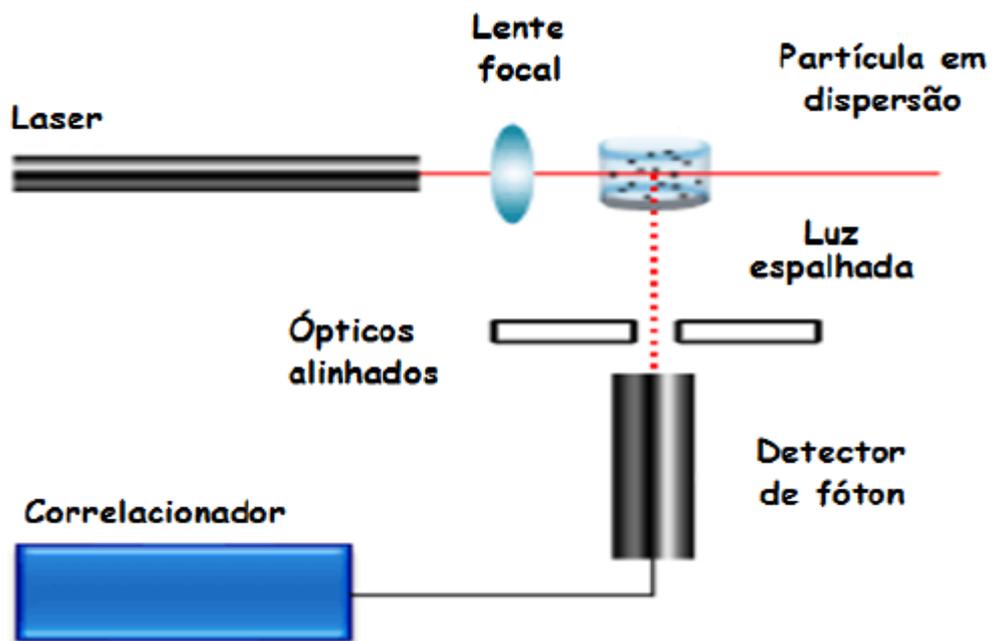


Figura 4.7 - Esquema do processo de espalhamento dinâmico de luz aplicado na determinação de tamanho médio de partículas [86].

A característica importante do movimento Browniano para o DLS é que partícula pequena move-se mais rapidamente que as partículas maiores. Ou seja, partículas maiores se movem mais lentamente e espalham menos o laser. A relação entre o tamanho da partícula e sua velocidade devido ao movimento Browniano é definida pela equação de Stokes-Einstein (eq. 4.2)

$$D_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (4.3)$$

Em que D_H é o diâmetro hidrodinâmico, k a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e D o coeficiente de difusão translacional. A velocidade do movimento Browniano medida, é chamada de coeficiente de difusão translacional D . Este coeficiente de difusão pode ser convertido para diâmetro hidrodinâmico (D_H) usando a equação de Stokes-Einstein [86].

Os resultados de um experimento de DLS podem ser apresentados como uma distribuição de intensidade de espalhamento, do número de partículas ou do volume fracional das partículas em função do diâmetro (ou raio) das partículas [84]. O DLS convencionalmente utiliza um feixe de laser monocromático coerente de He-Ne com um comprimento de onda de 633nm como fonte de luz, o qual converge para um centro focal na amostra por uso de focalização. A luz é espalhada pelas partículas em todos os ângulos, porém, um instrumento de espalhamento dinâmico de luz com um detector somente detecta este espalhamento para um ângulo fixo, comumente é usado 90°.

4.2.5.1. Detalhamento das medidas para o DLS

O diâmetro médio efetivo das partículas e sua distribuição foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz em um aparelho ZetaPlus (Brookhaven Inst. Corp., Instituto de Química, UFRGS), a um ângulo de detecção da luz espalhada fixo em 90°, na temperatura de 33°C, usando laser de estado sólido (12,21 mW, $\lambda = 633$ nm) e um sistema Peltier para controle de temperatura.

Nas medidas, para que haja um decaimento da função de autocorrelação, as dispersões tem de ser muito diluídas, uma vez que a técnica mede a flutuação na

intensidade de luz espalhada com o tempo, e verifica se o espalhamento em um tempo t está correlacionado a um espalhamento no tempo $t + dt$ (tempo em que a partícula se moveu em frente do detector). Por este motivo, trabalhamos com alíquotas de 200 μL de suspensões de 8mg/mL em água deionizada, que foram diluídos a 3 mL para leitura na cubeta.

4.2.6. Espectrometria por Retroespalhamento Rutherford (RBS)

A técnica de Retroespalhamento Rutherford (RBS) consiste em medir a energia de um feixe de íons monoenergético que sofreram colisões com os átomos do alvo que queremos analisar e que foram retroespalhadas (Backscattering) [88]. A redução de energia da partícula espalhada depende das massas da partícula incidente e do átomo alvo. Medindo-se a energia dos íons após o espalhamento, portanto, é possível identificar a massa dos átomos presentes no alvo e o elemento químico correspondente [87, 88]. A análise de RBS permite-nos determinar a composição química elementar de um material.

Para as medidas por RBS, as amostras foram preparadas a partir da solução concentrada das nanopartículas, que foi depositada no substrato de silício. Em seguida as amostras foram colocadas em estufa a 60°C por 2 minutos para secagem, formando um filme sobre o substrato. As amostras foram analisadas com feixe de He⁺ com 2,2 MeV num ângulo de detecção de 170° em relação a direção do feixe incidente. As medidas de espectrometria por RBS foram realizadas no acelerador eletrostático Tandetron de 3 MV do Laboratório de Implantação Iônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Inicialmente foi obtida uma curva de calibração do multicanal, utilizando um filme de bismuto e feixe primário de diferentes energias (figura 4.8).

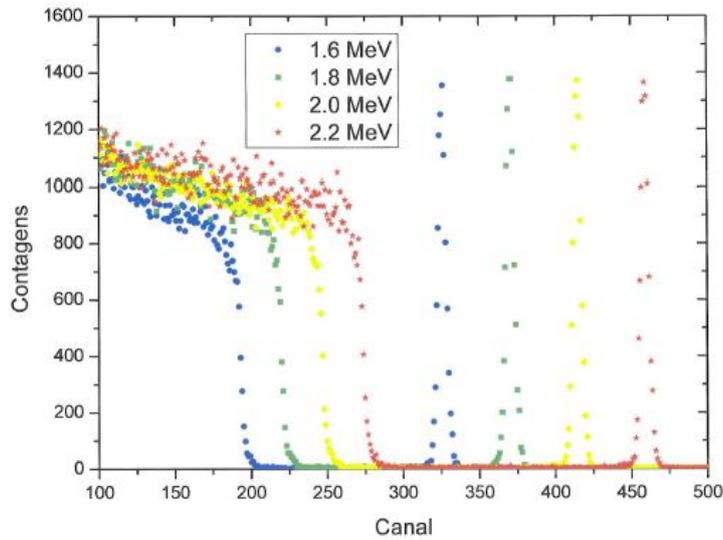


Figura 4.8: Espectro de RBS de filme de Bi usado para calibração do detector, com a energia do feixe primário de He variando de 1.6 a 2.2 MeV.

A partir dos dados do gráfico da figura 4.8 construímos uma curva de energia versus canal (figura 4.9) para obter a relação (linear) de canal com energia. Essa curva serve de base para a identificação da massa dos elementos detectados na amostra.

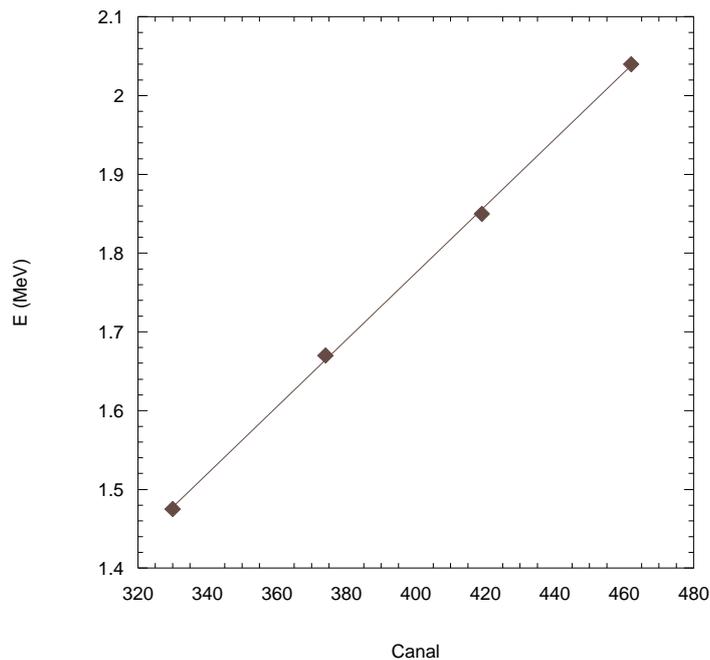


Figura 4.9: Curva de energia dos íons de He retroespalhados versus canal.

4.2.7. DSC – TGA Simultâneo (SDT)

O analisador simultâneo SDT Q-600 realiza, ao mesmo tempo, análise térmica diferencial (DTA), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA). As curvas TGA e sua derivada DTG são semelhantes às curvas obtidas em analisadores termogravimétricos convencionais. A análise TGA acompanha a variação de massa com a temperatura ou tempo e a análise DTG é a sua derivada primeira. Dessa forma, essa técnica é bastante utilizada para análise de materiais, visando determinar, por exemplo, a composição e a estabilidade térmica [89- 93].

Os ensaios foram realizados utilizando o Analisador Térmico SDT-Q600 TA Instruments com o software TA Advantage 5008 do Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Através da análise térmica simultânea de TGA/DTA/DSC, em atmosfera inerte (nitrogênio puro, <5ppm H₂O), da temperatura ambiente até 800°C, a uma vazão do gás de 50 mL.min⁻¹, com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ a fim de acompanhar o comportamento da decomposição térmica das amostras e assim, determinar a perda de massa. A massa de amostra inicial utilizada nas análises foi de aproximadamente 10 mg. As amostras foram analisadas em porta-amostras de alumina de 90µl (sem tampa).

4.2.8. Magnetômetro de Gradiente de Força Alternada

O Magnetômetro de Gradiente de força Alternada (do inglês, *Alternating Gradient Force Magnetometer* AGFM), é um dispositivo capaz de medir variações no momento magnético com alta sensibilidade ($\sim 10^{-9}$ Am²). Através dele é possível realizar medidas de magnetização em filmes com espessuras da ordem de 1nm ou de nanopartículas. O AGFM é um equipamento muito mais sensível que um VSM (Magnetômetro de Amostra Vibrante) convencional, e pode traçar curvas de histerese mais rapidamente que um sistema SQUID (do inglês *superconducting quantum interference device*). Seu princípio de funcionamento baseia-se na força

sofrida por um momento magnético quando submetido a um gradiente de campo magnético [20].

O AGFM utilizado na caracterização magnética das amostras estudadas, não é um equipamento comercial, tendo sido produzido no Laboratório de Magnetismo (LAM) do Instituto de Física/UFRGS. A figura 4.10 mostra esquematicamente a configuração do equipamento. Ele é constituído basicamente por uma haste, uma cápsula protetora, um eletroímã e pequenas bobinas de gradiente. A haste é formada por um tubo capilar de vidro. Em uma das suas extremidades encontra-se um pedaço retangular de vidro, que serve como porta amostra, enquanto na outra temos um elemento de material piezoelétrico colado a um suporte plástico. Pequenos fios de cobre são soldados ao piezoelétrico e o conectam ao suporte plástico, onde se encontram coletores para a leitura do sinal elétrico [94].

Para que a medida seja realizada, colocamos uma amostra das nanopartículas magnética na extremidade da haste, onde se encontra o suporte de vidro, fixando-a com graxa. A amostra é então magnetizada por um campo magnético DC, H_{DC} , produzido pelas bobinas do eletroímã.

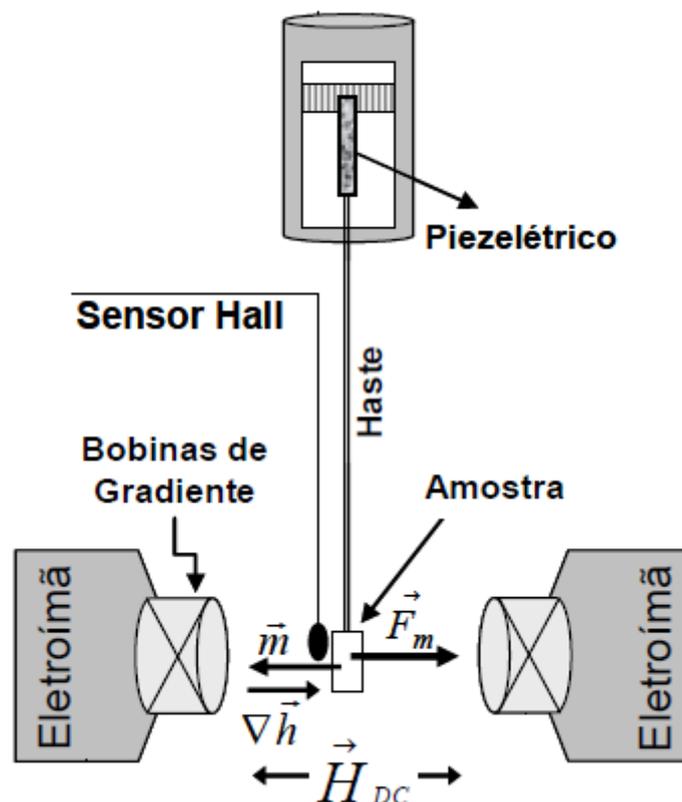


Figura 4.10: Configuração esquemática do AGFM [94]

Simultaneamente, a amostra é submetida a um campo alternado, proveniente das bobinas de gradiente. Essas pequenas bobinas configuram-se de forma a produzirem campos em sentidos opostos, h' , produzindo um gradiente de campo magnético. A aplicação de tal gradiente alternado gera uma força F_m na amostra, também alternada, que causa uma deflexão da haste e, conseqüentemente, produz uma diferença de potencial no piezoelétrico. O sinal elétrico produzido será proporcional à magnitude do gradiente de campo e a componente da magnetização da amostra m na direção do campo H_{DC} . Conhecendo o valor do gradiente alternado, podemos obter informação sobre a magnetização da amostra. Procura-se aplicar o gradiente de campo na mesma freqüência da ressonância mecânica do sistema (piezoelétrico, haste, porta-amostra), aumentando a amplitude de oscilação da haste, e maximizando o sinal de saída. Pode-se, assim, traçar as curvas de histerese magnética, bastando apenas variar H_{DC} , responsável pela magnetização da amostra. É importante notar que o equipamento não fornece uma medida absoluta de magnetização, apenas um sinal elétrico proporcional a esta quantidade [94, 95].

Para a medida, colocamos uma pequena quantidade da amostra da solução de nanopartículas concentrada na extremidade fechada de um tubo capilar e fixada com graxa na haste de suporte de vidro. Coletou-se as curvas de magnetização com um passo 200 Oe para campos altos e um passo menor, de 20 Oe para H pequenos, as medidas foram realizadas até um H Máximo de 4000 Oe.

4.2.9. Medidas de relaxação magnética nuclear

As medidas dos tempos de relaxação magnéticas nuclear T_1 e T_2 foram efetuadas usando o equipamento de Ressonância Magnética SIGNA XDXT de 3T (G&E) no Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer) da PUCRS. Para a medição foram preparadas várias diluições da solução final das nanopartículas com concentrações de C_0 ; $C_0/2$ $C_0/50$; $C_0/100$; $C_0/200$; $C_0/500$; $C_0/500$; $C_0/2000$ onde C_0 é a concentração inicial. Essas amostras diluídas foram colocadas em seringas e dispostas num cilindro de espuma (*phantom*), com um recipiente com água ao centro que serviu de referência, como está representado na figura 4.11.

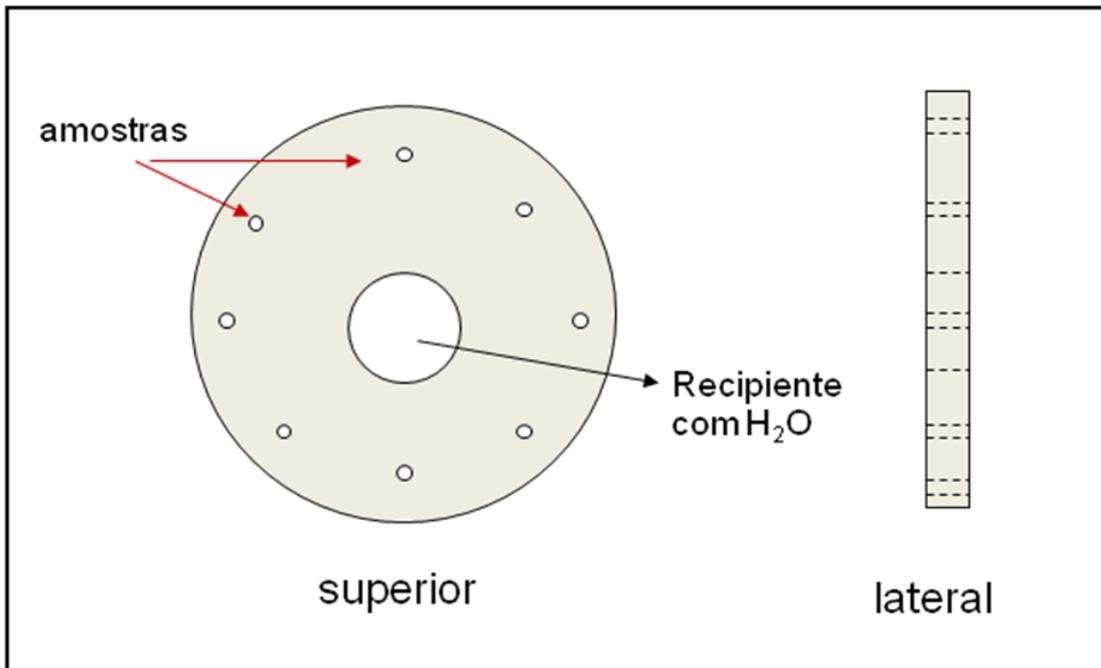


Figura 4.11: Esquema representativo do *phantom* construído para as medidas de relaxometria.

As medidas foram efetuadas com bobina de crânio em três fatias do phantom usando sequências de spin eco rápidas (FSE) para obter mapas de T1 e T2 do *phantom*. Para a obtenção dos mapas T2 foram usadas as seguintes condições: eco train de 7; TR de 1000ms, uma matriz de 512×512 pixels variando o tempo de eco TE em: 7,5; 10,0; 14,0; 18,0; 25; 35; 50; 75; 100; 150; 200 e 250ms. Para aquisição dos mapas T1 adotamos as seguintes condições: sequência fast spin eco IR com matriz 512×512pixels, TE de 20ms, TR de 3000ms variando o tempo de inversão (TI) entre 50 e 2500ms.

A partir dessas estas medidas, determinamos T1 e T2 que foi utilizado para calcular a relaxividade da dispersão de nanopartículas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados referentes aos estudos das amostras sintetizadas, das caracterizações físico-químicas e da ação de contraste das NPs em soluções salinas.

5.1. Síntese

Três sínteses foram realizadas, usando condições similares de temperatura, quantidade e concentração inicial dos reagentes e seguindo o mesmo protocolo metodológico de modo a testar a reprodutibilidade do processo proposto. O processo mostrou ser sensível a pequenas variações nas condições da reação com e isto, houve algumas diferenças no produto final. Essas diferenças são relacionadas a algumas perturbações durante a síntese.

A primeira síntese foi a que apresentou melhores resultados em termos da distribuição de tamanho das nanopartículas e da estabilidade frente à aglomeração. Na segunda síntese, verificaram-se algumas anomalias quanto ao comportamento da dispersão de nanopartículas, as quais apresentaram uma tendência a aglomeração e formação de gel quando diluídas. Uma das hipóteses de não conformidade com os parâmetros estabelecidos poderia estar relacionada a um pequeno aumento de forma acidental da temperatura na primeira etapa da síntese, ou ao excesso de dextran remanescente na solução.

Já na terceira síntese, houve flutuações de temperatura (por não dispormos de um sistema de controle e manutenção da temperatura da manta aquecedora) e agitação deficiente, o que resultou numa aparente gelificação da solução reacional. Isso pode ser atribuído, ao formato da barra magnética, que por não ser oval, saiu do centro do balão contendo a solução reacional; ou deficiência, não constatada previamente, no agitador magnético.

Apesar dessas dificuldades, o método químico por co-precipitação de Fe(II) e Fe(III) utilizada na síntese de nanopartículas magnéticas mostrou-se ser eficaz tendo em conta os resultados que obtivemos das caracterizações físico-químicas da solução final obtida e nas medidas por MRI, discutidas nas seções seguintes.

Condições como concentração inicial dos reagentes, da velocidade de agitação, da temperatura, da velocidade de adição de hidróxido de amônia para a precipitação e do tempo de reação mostraram-se adequadas, visto que, nos levaram a obtenção de partículas com os parâmetros desejados.

5.2. Análise quantitativa do conteúdo de ferro

A determinação da concentração de ferro presente na solução coloidal das nanopartículas é um parâmetro fundamental para a avaliação do desempenho de contraste no MRI. Para isto, utilizamos a técnica de espectrometria por UV-Vis para determinamos a concentração de ferro na solução final contendo as nanopartículas.

Primeiramente, foram feitas as leituras das absorvâncias no comprimento de onda de 410nm dos padrões de ferro de concentração conhecidas com esses dados construímos uma curva de calibração absorvância versus concentração (figura 5.1). A determinação da concentração de ferro foi também realizada para as outras duas sínteses.

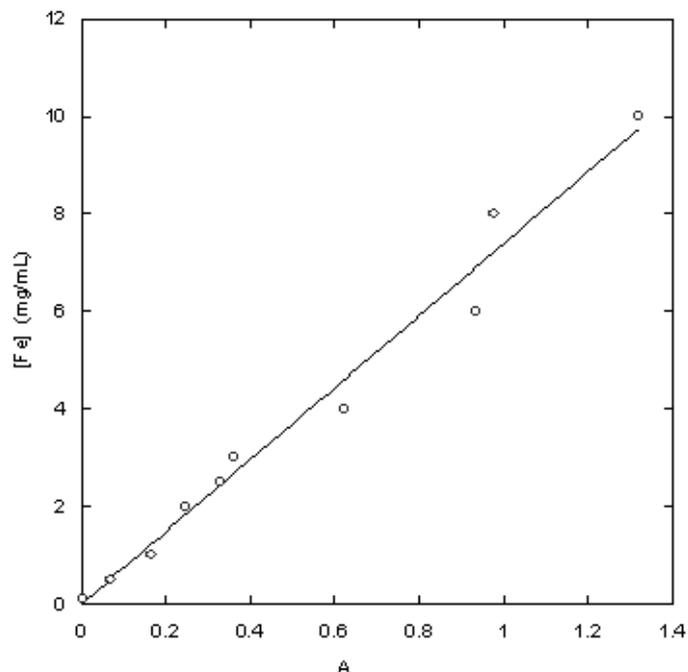


Figura 5.1: Curva de absorvância (A) versus concentração do padrão de ferro.

Com a equação da reta e as absorvâncias nas amostras de solução aquosa das nanopartículas determinamos a concentração da solução final de cada síntese, dispostas na tabela 5.1. Através dos dados da Tabela 5.1 verificamos que a concentração de ferro na solução final ficou em 10,4 mg/mL na síntese I; 8,2 mg/mL na síntese II e 7,3 mg/mL na síntese III.

Tabela 5.1: Concentração de Ferro [Fe] das amostras obtidas nas diferentes sínteses e determinada através da absorvância (A) em $\lambda=410\text{nm}$.

Amostra	Média das Absorbâncias	Equação da curva	Concentração da amostra diluída (mg/mL)	Concentração da solução (mg/mL)
Síntese I	1,105	[Fe]= 4,691*A	5,183	10,4
Síntese II	0,561	[Fe] = 7,389*A	4,068	8,2
Síntese III	0,649	[Fe] = 5,641*A	3,664	7,3

5.3. Morfologia e Tamanho das nanopartículas

A morfologia e a distribuição do tamanho das nanopartículas foram estudadas com auxílio de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, microscopia de força atômica e espalhamento dinâmico de luz.

Os gráficos da figura 5.2 e 5.3 apresentam a distribuição de tamanho das partículas em numero, volume e intensidade, obtidas por empalhamento dinâmico de luz (DLS) para as sínteses I e II. Os dados obtidos dessas distribuições estão representados de forma resumida na tabela 5.2.

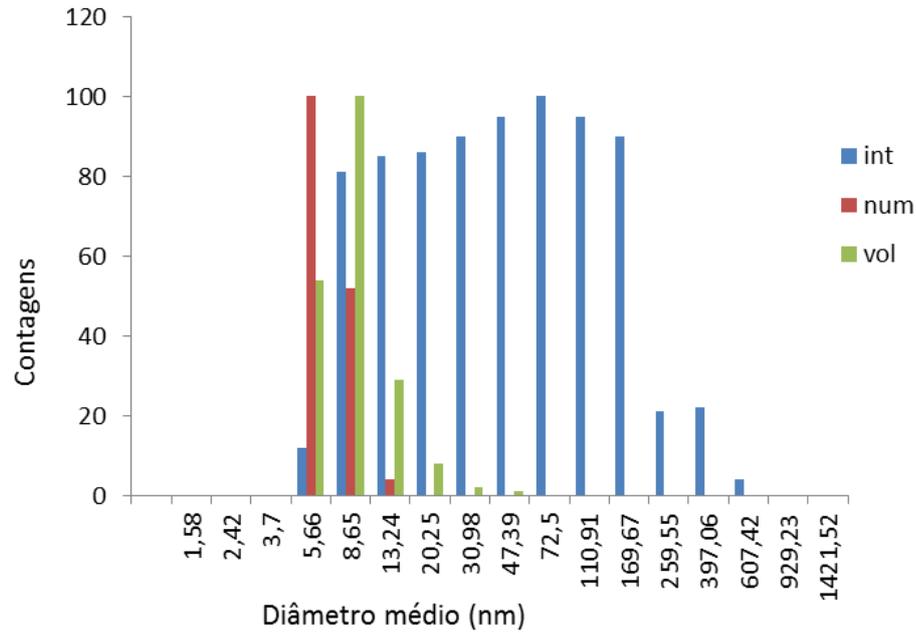


Figura 5.2: Distribuição de tamanho das partículas função de número, volume e intensidade obtidas por DLS para a síntese I.

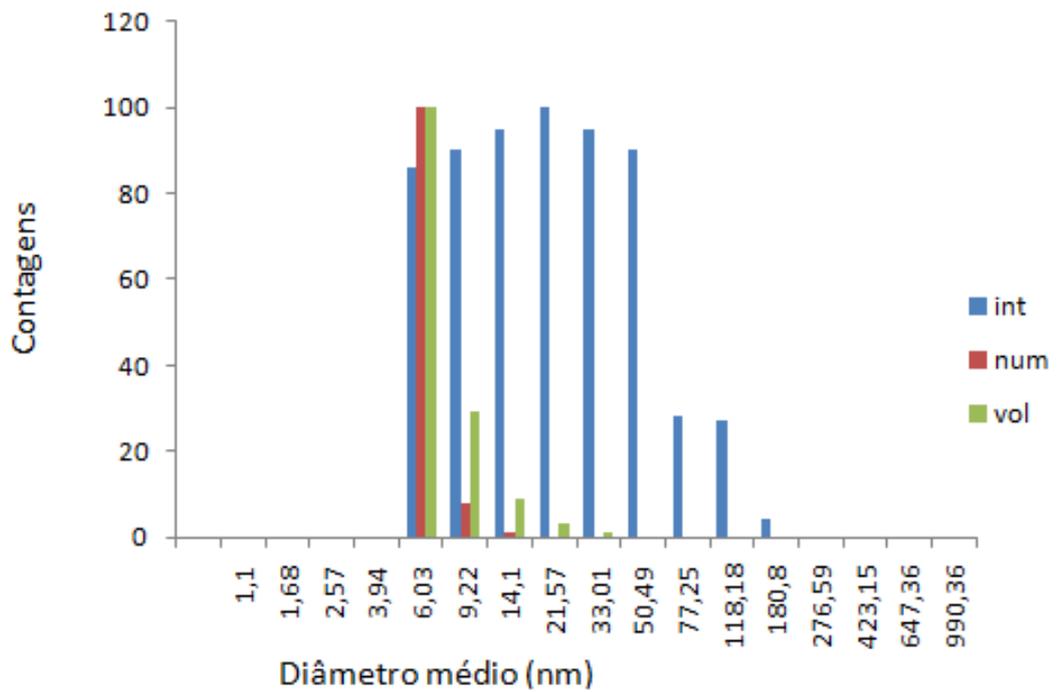


Figura 5.3: Distribuição de tamanho das partículas função de número, volume e intensidade obtidas por DLS para a síntese II.

Tabela 5.2: Diâmetro médio e o desvio padrão em número, volume e intensidade das nanopartículas

Amostra	\bar{d} Número (nm)	\bar{d} Volume (nm)	\bar{d} Intensidade (nm)
Síntese I	7,80 ± 0,06	10,0 ± 0,4	65 ± 1
Síntese II	4,10 ± 0,02	7,7 ± 0,3	39 ± 2
Síntese III	-	-	-

Verificamos que, em todos os casos, as nanopartículas têm distribuição de tamanho relativamente estreito. O tamanho médio das partículas varia dependendo da ponderação utilizada: número, volume ou mesmo intensidade. O tamanho médio medido pela ponderação em número das partículas está na proporção de (1:1), enquanto que no caso da ponderação em volume é 1000 vezes maior numa proporção de (1:1000). Isto ocorre, porque o volume de uma esfera é igual a $\frac{4}{3}\pi r^3$. Mais ainda para a ponderação do tamanho médio pela intensidade que é 1000000 vezes maior, mesmo no caso de quantidade muito pequena de partículas grandes pode ser impulsionado para valores elevados. Isto porque as partículas grandes dispersam muito mais luz do que pequenas partículas (a intensidade de dispersão de uma partícula é proporcional à sexta potência do seu diâmetro). Quanto à terceira síntese, não foi possível efetuar as medidas. Aparentemente, isso se deve a presença de partículas com tamanhos que espalham muito a luz, impossibilitando as medidas. O instrumento permite analisar partículas de tamanho inferior a 1 μm .

A figura 5.4 mostra uma micrografia de TEM de uma amostra da solução das nanopartículas diluída em álcool iso-propílico e dispersa em *grid formvar* de 200 mesh. Esta imagem é uma ampliação de uma micrografia de 63000 vezes de aumento.

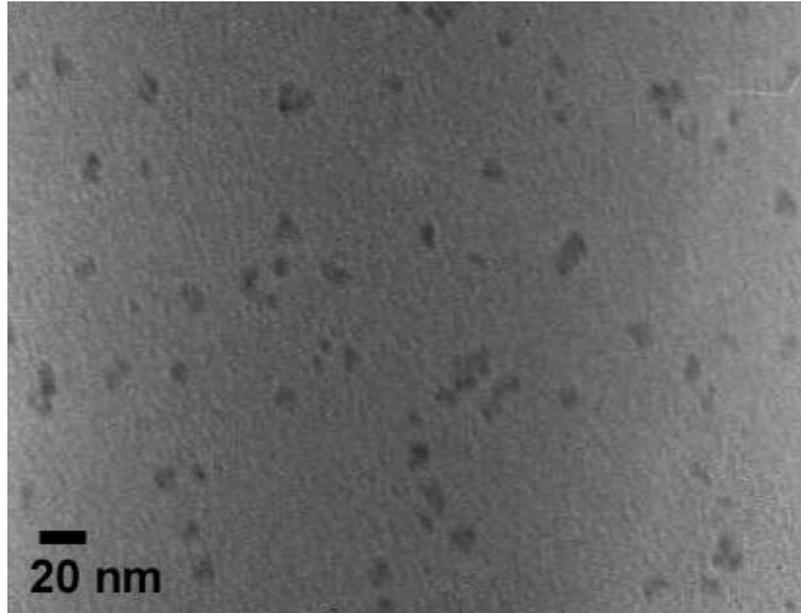


Figura 5.4: Micrografia de TEM (aumento de 63000 X) de uma amostra da síntese.

Através da análise da figura verificamos que as nanopartículas Fe_3O_4 aparecem na imagem como pontos cinza escuros. As imagens do TEM revelaram partículas individuais e algumas aglomeradas; o valor médio estimado dos seus diâmetros é de aproximadamente 7,5 nm. Quanto à morfologia, fica claro que elas não são esféricas: apresentam formato irregular e em alguns casos aglomerações. Os valores obtidos por TEM mostraram-se em boa concordância com os valores dados pela distribuição de tamanho medido por DLS.

Houve certa dificuldade em encontrar um método de preparação da amostra que revelasse partículas isoladas na análise por microscopia de força atômica. Contudo fizemos algumas micrografias utilizando substrato de mica com uma grande diluição da solução de nanopartículas com o álcool iso-propílico nas quais se pode observar algumas protuberâncias na superfície da mica que aparentam ser as nanopartículas (figura 5.5). A figura 5.6 mostra um perfil ao longo de uma das partículas da Fig 5.5, e ilustra o método usado para medir o seu tamanho. A análise da distribuição de tamanho foi feita utilizando o software do microscópio, tomando 30 pontos analisados na imagem. Através de um estudo de distribuição de tamanho das protuberâncias verificamos que as mesmas possuem em media um diâmetro de 10,8 nm com um desvio padrão de 0,7 nm. Esses valores são um pouco maiores dos que observados por DLS e TEM. Devemos levar em consideração que os

formatos das estruturas observadas estão muito ligados ao tamanho das pontas utilizadas na varredura, que podem influenciar nas medidas.

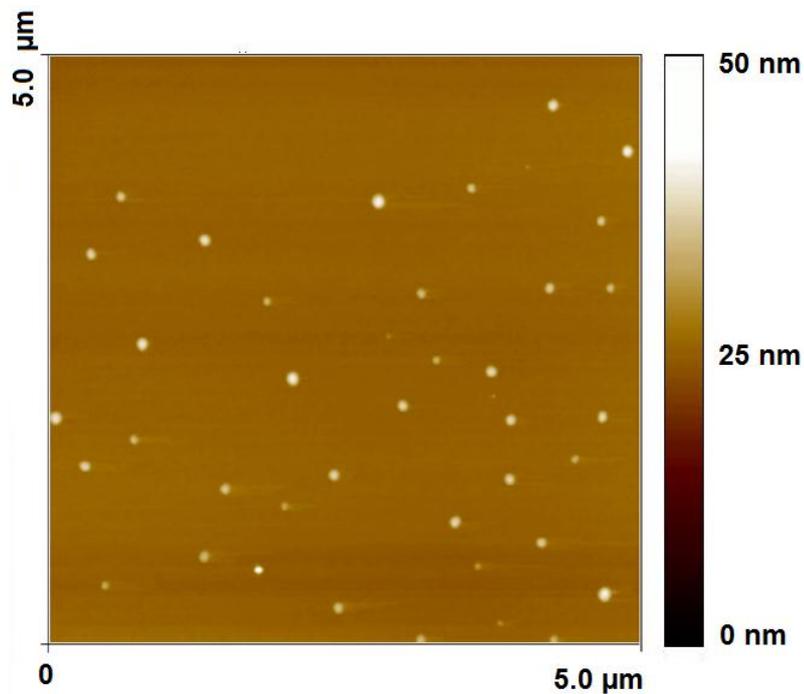


Figura 5.5: Imagem de AFM de uma amostra de solução de nanopartículas dispersa num substrato de mica.

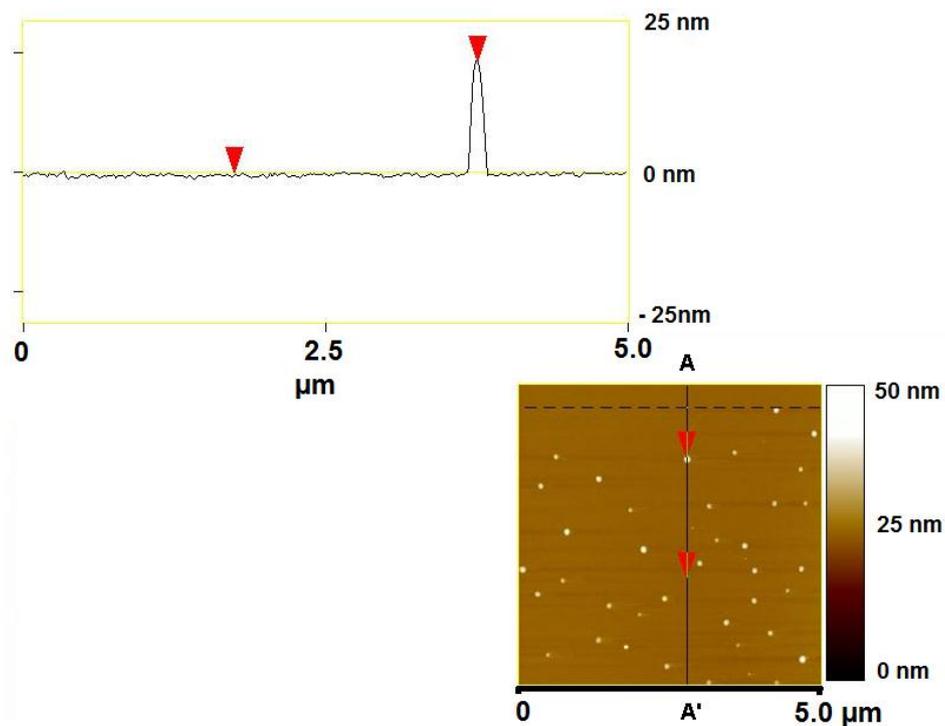


Figura 5.6: Medida de tamanho através de corte transversal ao longo da linha AA' na micrografia da figura 5.5.

A tabela 5.3 resume os valores dos diâmetros médios obtidos utilizando as varias técnicas de caracterização que dispúnhamos.

Tabela 5.3: Tamanho médio de partícula determinado por diferentes técnicas

Amostra	Tamanho médio (nm)		
	DLS	AFM	TEM
Síntese I	7,8	10,8	7,5
Síntese II	4,1	-	-
Síntese III	-	-	-

5.4. Composição química das amostras de solução das nanopartículas

A composição química das dispersões contendo nanopartículas foi estudada usando de técnicas de RBS e EDS. A figura 5.7 mostra uma micrografia de microscopia eletrônica de uma gota da solução de nanopartículas depositada sobre o substrato de silício. Tal solução continha o *buffer* salino, e no processo de secagem formam-se pequenos cristais de sal na superfície contendo as partículas de Fe_3O_4 . A análise EDS focando num desses cristais (região A na figura 5.7) está representado na figura 5.8.

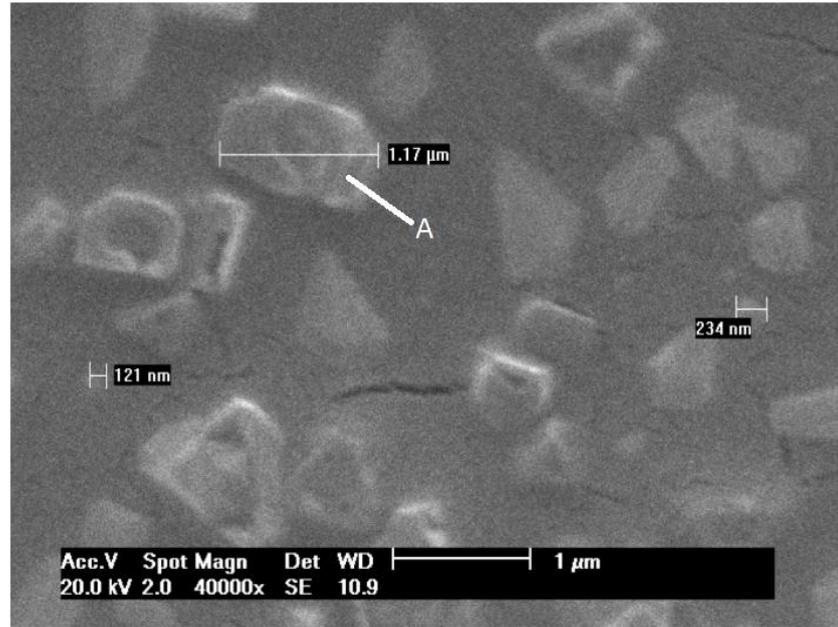


Figura 5.7: Micrografia de amostra da síntese I com aumento de 40000X

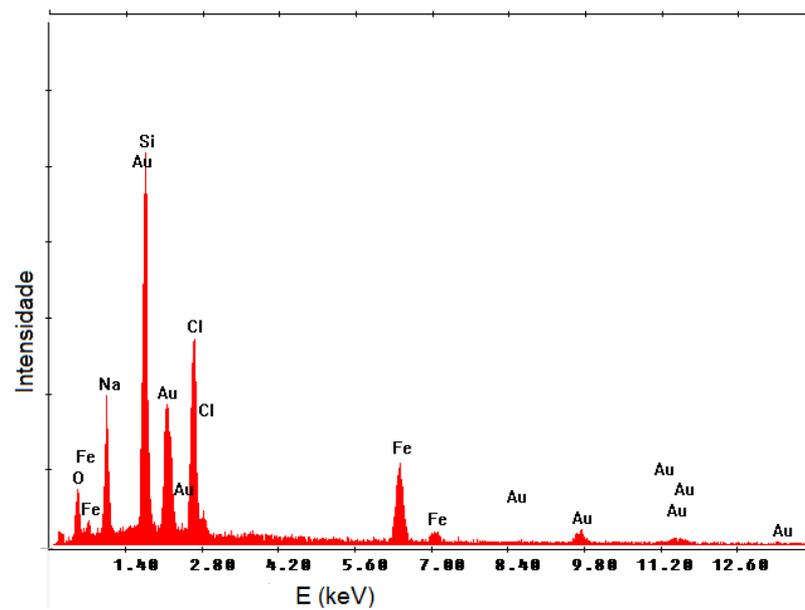


Figura 5.8: Análise EDS da região 'A' na figura 5.4.

Verificou-se, como esperado, a presença de Ferro (Fe) e Oxigênio (O) correspondente às nanopartículas. Também foram detectados outros elementos como sódio (Na), e cloro (Cl) oriundos da solução salina para estabilização, silício (substrato de deposição) e o ouro, que foi o elemento de recobrimento da amostra. Os resultados de EDS foram confirmados com as análises por RBS, conforme os espectros de análise das amostras da solução coloidal, representados na figura 5.9.

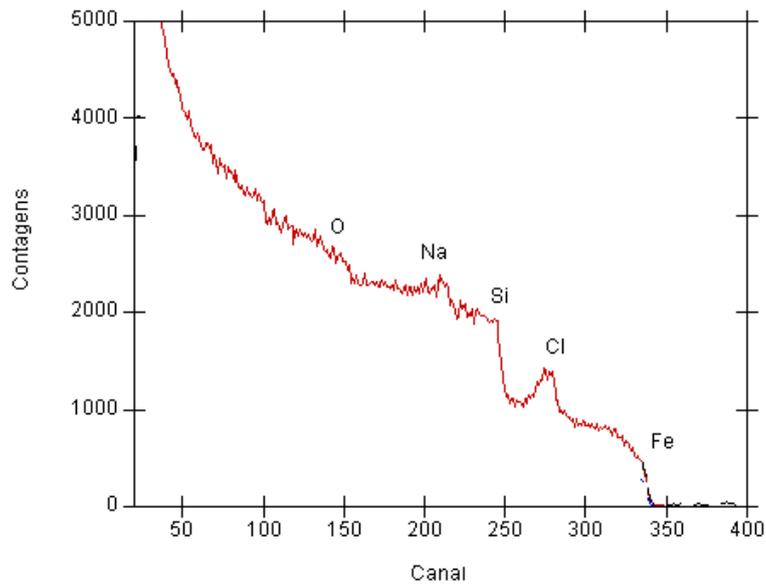


Figura 5.9 Espectro RBS de amostras secas de NPs depositadas sobre Si. Foi utilizado feixe de He⁺ 2,2 MeV e ângulo detecção de 170⁰. Amostra da síntese I.

O espectro da figura 5.9 apresenta um pico próximo ao canal 338 que corresponde a energia dos átomos de He retroespalhado por átomos de Fe da superfície da amostra. Em torno do canal 280, temos o sinal de retroespalhamento por átomos de Cl. Em seguida, temos retroespalhamento dos átomos de Si próximo ao canal 250 que corresponde ao substrato. E, por último, temos o retroespalhamento dos átomos de Na e O próximos aos canais 210 e 150, respectivamente.

Foram realizadas análises de TGA para as sínteses I e II, conforme mostram as figura 5.10 e 5.11. Verificou-se nas curvas de TGA uma perda de massa acentuada de mais de 90% até a temperatura próxima de 100°C devido à perda de água. Na figura 5.12, dois outros eventos assinalados na figura 5.10 como, II e III foram ampliados para melhor visualização. Observamos que existe uma perda de massa de cerca de 1 a 2 % da massa inicial na temperatura de 280 até 350°C, sinalizado por um pico na curva da derivada próximo dos 300°C. Isso pode ser atribuído à degradação do material orgânico (dextran) usado no recobrimento do Fe₃O₄. Uma terceira perda de massa entre 630 e 700°C é atribuída a uma segunda etapa de degradação do material orgânico, caracterizado por um pico 660°C na curva da derivada.

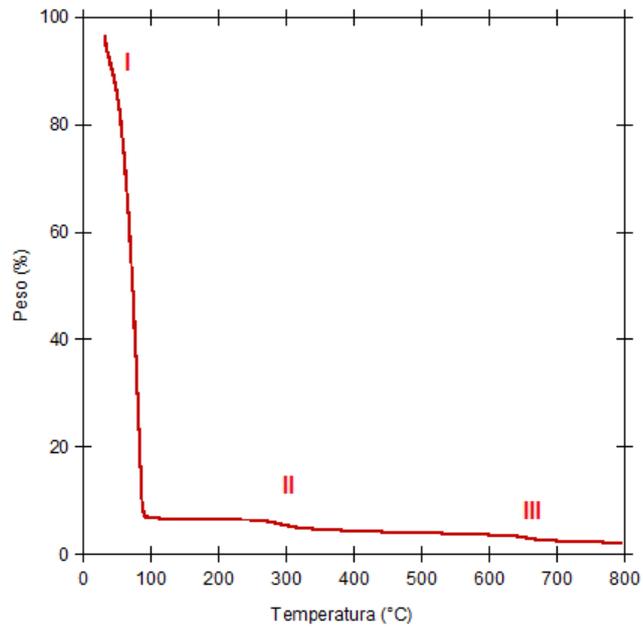


Figura 5.10: Gráfico do peso (em%) em função da temperatura na análise TGA da amostra da síntese I. Os símbolos I, II e III indicam diferentes estágios de perda de massa.

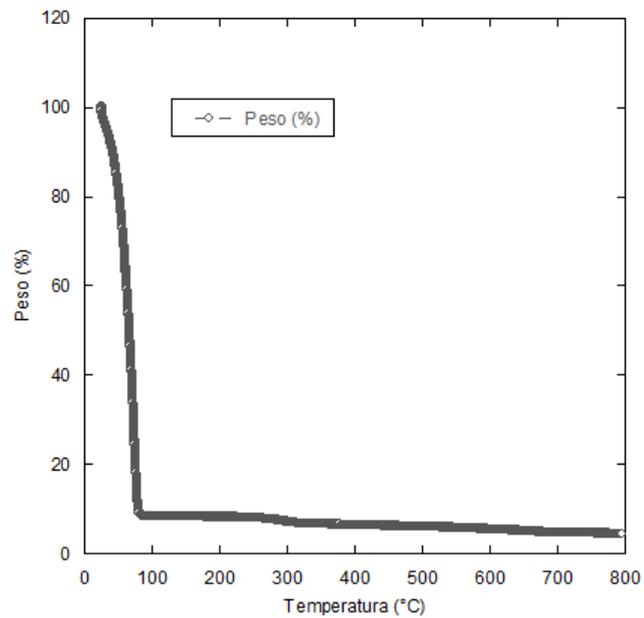


Figura 5.11: Gráfico do peso (em%) em função da temperatura na análise TGA da amostra da síntese III.

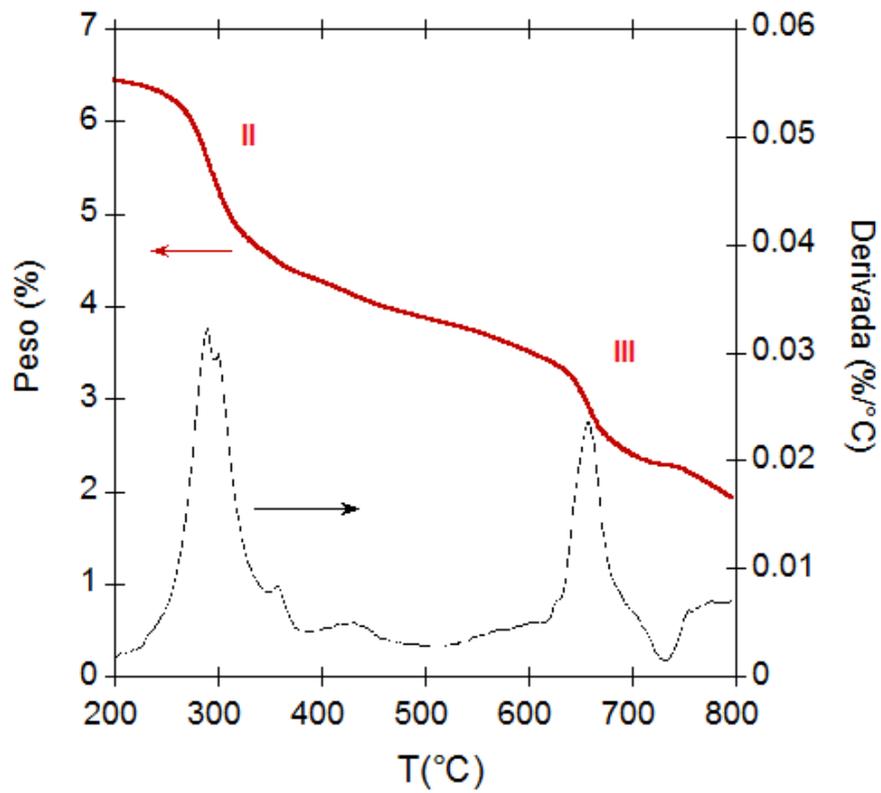


Figura 5.12: Ampliação da curva de TGA da amostra da síntese I.

5.5. Propriedades magnéticas e de relaxação

As figuras 5.13 e 5.14 apresentam medidas da magnetização em função do campo magnético externo para as amostras da solução coloidal contendo as nanopartículas obtidas nas sínteses I e II.

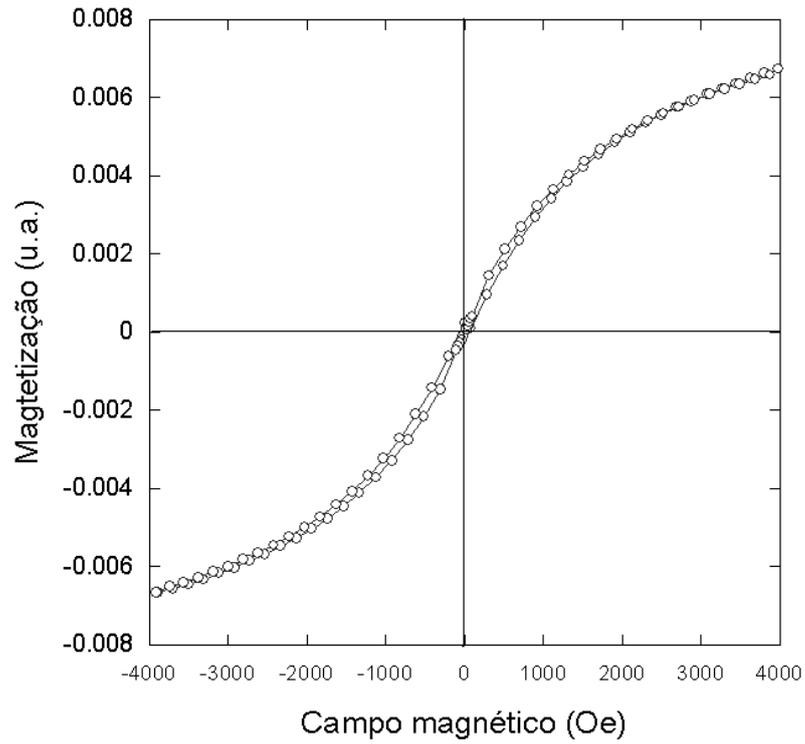


Figura 5.13: Curva magnetização obtida por AGFM da amostra das NPs na temperatura ambiente para a síntese I.

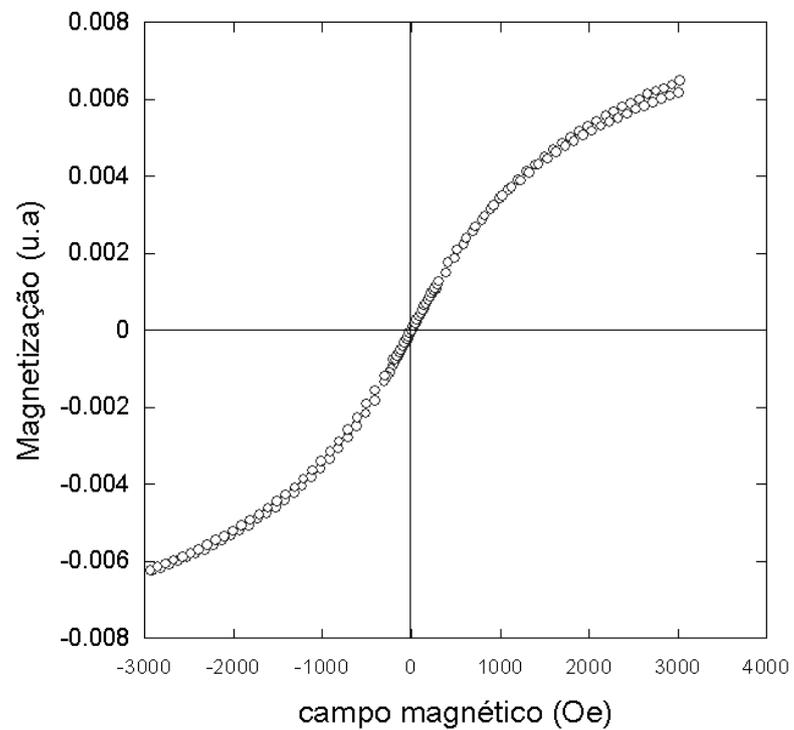


Figura 5.14: Curva de magnetização obtida por AGFM da amostra das NP na temperatura ambiente para síntese II.

Observa-se que as nanopartículas nas duas sínteses não apresentaram nenhum magnetismo residual quando este campo foi removido. Isso pode ser verificado pela ausência de histerese na curva de magnetização. Na síntese I foi observada pequena histerese o que indica a presença também de partículas de características ferromagnéticas, com tamanhos maiores que o raio crítico. Contudo, tal medida ainda não pode ser tomada como prova definitiva de superparamagnetismo, já que no estado líquido os momentos magnéticos podem girar livremente. Os dados indicam a característica magnética do sistema.

5.5.1. Medidas de relaxividade

As medidas de relaxividade foram obtidas com o uso de um *phantom* descrito da seção 4. A figura 5.15, mostra um esquema representando como foram dispostas as seringas com concentração variando do C_0 (solução concentrada) até a diluição de 2000 vezes. As imagens de MRI da figura 5.16 mostram as fatias do *phantom* contendo as seis seringas com soluções de NPs de concentrações diferentes. Os círculos menores correspondem às seções transversais das seringas. O círculo central refere-se ao recipiente com água pura. Para a aquisição dessas imagens foi utilizado: um TR de 1000 ms, uma matriz de 512x512 pixels e um tempo de eco TE de 6, 25, 75 e 200ms.

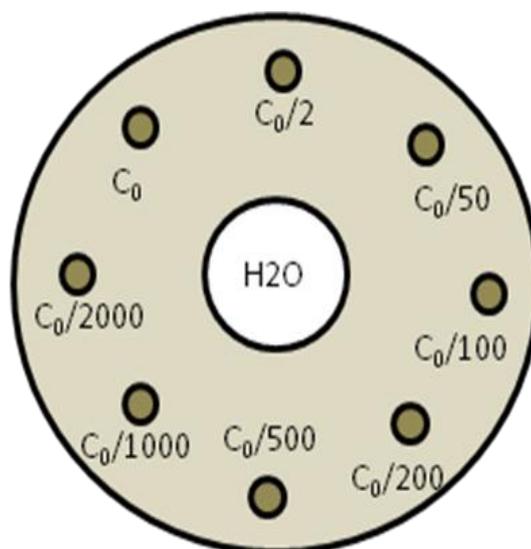


Figura 5.15: Esquema do posicionamento das seringas com as respectivas concentrações utilizadas na obtenção da imagem a seguir.

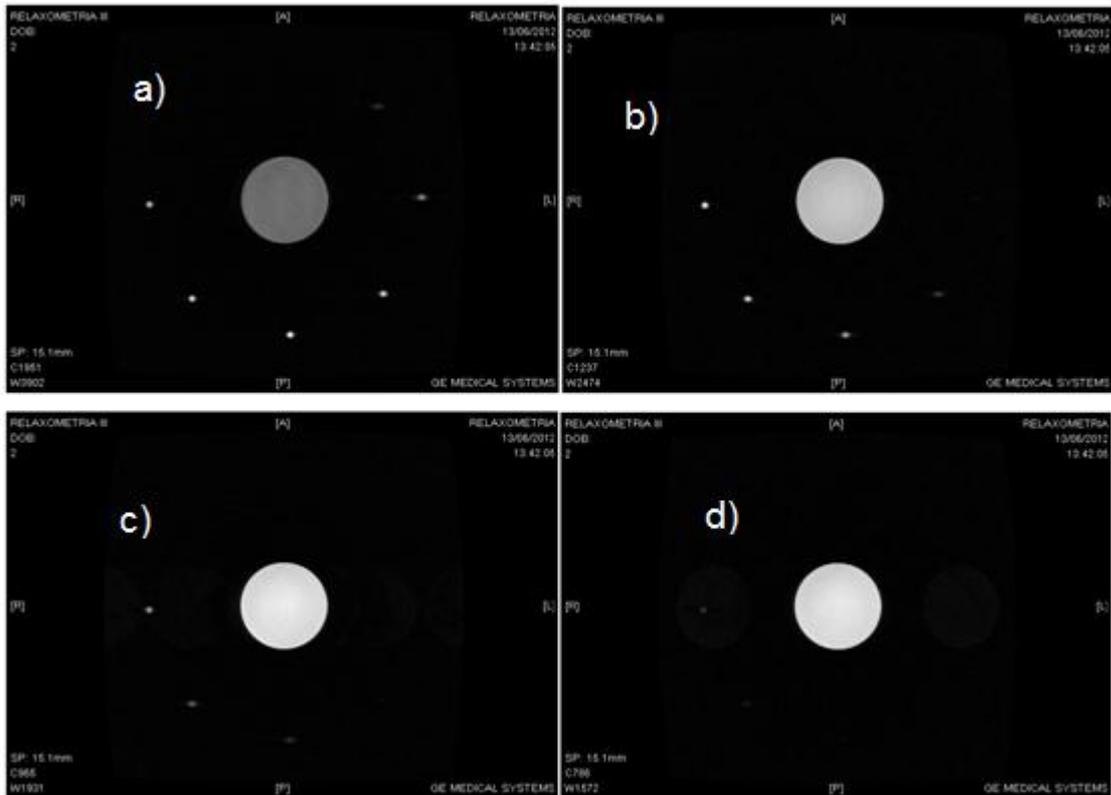


Figura 5.16: Imagem de MRI do *phantom* com um TR de 1000ms e tempo de eco de 6ms(a), 25ms(b), 75ms(c), 200ms(d). A escala de cinza tem ajuste automático para realçar as intensidades envolvidas em cada imagem, e por isso, são diferentes em cada quadro.

Pode-se verificar através das imagens, que existem diferenças no contraste (variação do nível de intensidade) com a variação da concentração de óxido de ferro presente na solução, diminuindo a intensidade do menos concentrado para o mais concentrado. Com o aumento do tempo de eco também existe uma diminuição no sinal, como esperado.

Para a obtenção dos tempos de relaxação T2 foram adquiridas imagens com sequencia de eco de spin rápido em diferentes tempos de aquisição TE. A intensidade do sinal em cada seção transversal foi medida e utilizada para a obtenção da curva de sinal em função do tempo. Para cada concentração da solução de nanopartículas disposta no *phantom* foi construída uma curva de intensidade de pixel em função de tempo de eco, como está representado no gráfico da figura 5.17.

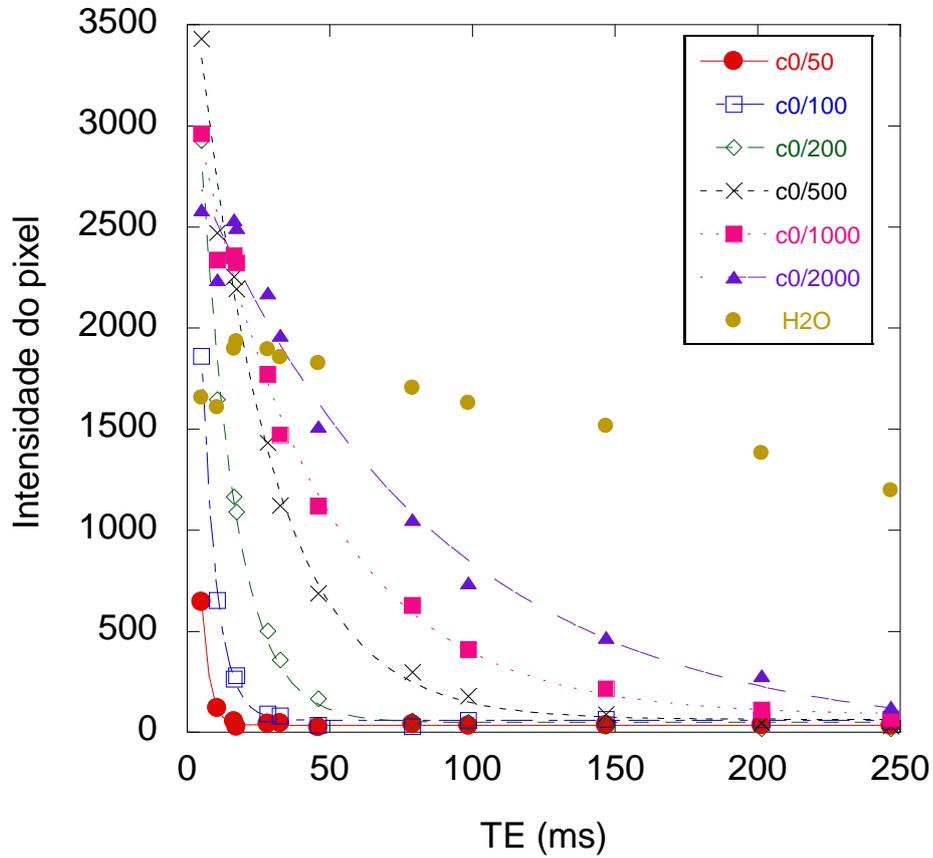


Figura 5.17: Curvas de intensidade do pixel em função de TE para as diferentes concentrações de NPs e a água.

Através das curvas pode-se afirmar que existe um rápido decaimento do sinal com o aumento de tempo de eco, e este decaimento é mais acentuado para concentrações maiores. Usando como modelo de ajuste, a equação 5.1, chegamos aos valores de T2 e R2 para cada concentração das soluções de NPs preparada.

$$I = M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{-\left(\frac{t}{T_2}\right)} \quad (5.1)$$

$$\frac{1}{T2} = R2 \quad (5.2)$$

Os valores de R2 obtidos da regressão dos pontos da curva para cada concentração estão representados na tabela 5.4, juntamente com os valores tempo de relaxação transversal T2, obtidos através do inverso dos valores de R2.

Tabela 5.4: Valores da taxa de relaxação R2 e dos tempos T2 em função da concentração de ferro.

[Fe] (mg/mL)	R2 (Hz)	T2 (ms)
0,204	0,370 ± 0.02	2,74
0,102	0,22 ± 0.02	4,51
0,051	0,084 ± 0.004	11,92
0,0204	0,039 ± 0,003	25,71
0,0102	0,023 ± 0.002	43,07
0,0051	0,0121 ± 0.002	82,66
H₂O	0,0016 ± 0,0003	628,10

Pode-se verificar através da tabela 5.4 que o tempo de relaxação transversal T2 diminui fortemente com o aumento da concentração de nanopartículas demonstrando boa característica de contraste para as NPs. Tomando a água pura como referência observa-se que o seu tempo de relaxação é bem maior que as soluções contendo as nanopartículas. Esta comparação é feita por a água ser usada como padrão de relaxação e as imagens obtidas através do MRI são geradas pelos sinais provenientes dos prótons da água presente no corpo do indivíduo.

Os procedimentos anteriores foram realizados para as duas outras sínteses e representados de forma resumida na tabela 5.5 através dos valores de R2 de cada síntese, com as suas respectivas concentrações. Com esses valores foi elaborado um gráfico com as curvas de R2 em função de concentração de Fe (figura 5.18).

Tabela 5.5: Valores da concentração e os respectivos R2 para cada síntese

[Fe] (mg/mL)	R2 (Hz) I	R2 (Hz) II	R2 (Hz) III
C₀/50	0,370 ± 0.02	0.254 ± 0,005	0.232 ± 0,003
C₀/100	0,22 ± 0.02	0.105 ± 0,006	0.1038 ± 0,0008
C₀/200	0,084 ± 0.004	0.0528 ± 0,0003	0.0513 ± 0,0003
C₀/500	0,039 ± 0,003	0.0223 ± 0,0006	0.0177 ± 0,0005
C₀/1000	0,023 ± 0.002	0.0114 ± 0,0004	0.0089 ± 0,0004
C₀/2000	0,0121 ± 0.002	0.0061 ± 0,0003	0.0042 ± 0,0001

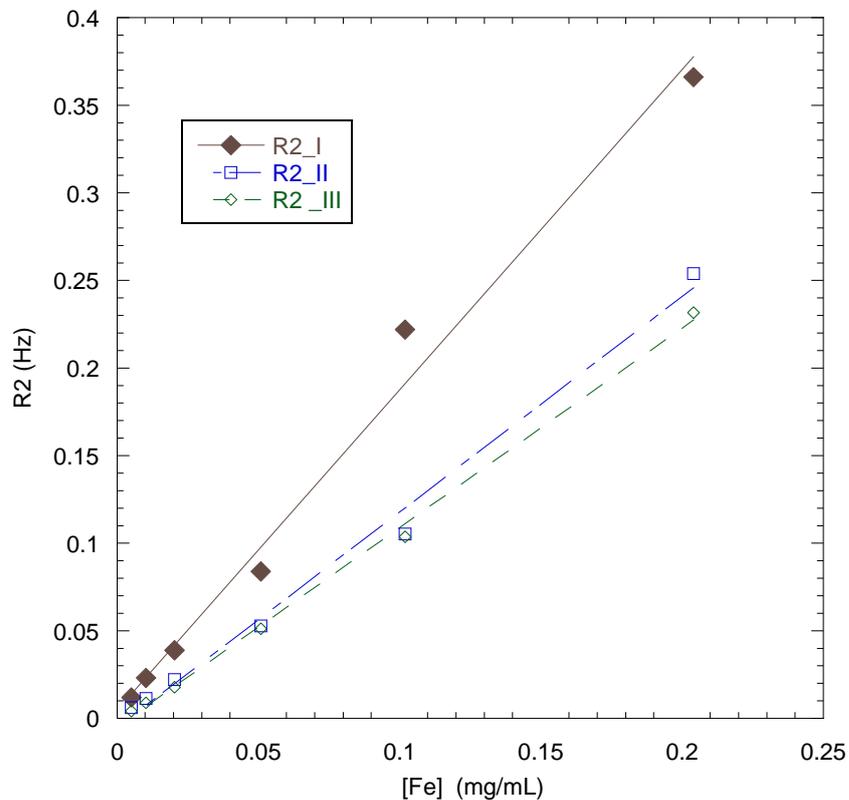


Figura 5.18: Gráfico de R2 em função da concentração de ferro para as síntese I, II e III.

Pode-se observar que cada reta possui uma declividade que representa a relaxividade (r_2), parâmetro físico-químico importante para a classificação do agente de contraste desenvolvido. Esta eficiência baseia-se na sua habilidade para reduzir seletivamente o tempo de relaxação dos prótons da água nos tecidos biológicos.

Um procedimento similar foi realizado para determinação dos tempos de relaxação T1, mudando a sequência de aquisição para recuperação da inversão (*fast spin eco IR*). Na figura 5.19 estão representadas imagens do MRI de fatias do *phantom*, obtidas com essa sequência, utilizando um TR de 100ms, matriz de 512x512, e tempo de inversão (TI) em 50, 150, 800, 2000ms. Os valores de intensidade do sinal em função de TI estão dispostos na figura 5.20 para diferentes concentrações de NPs.

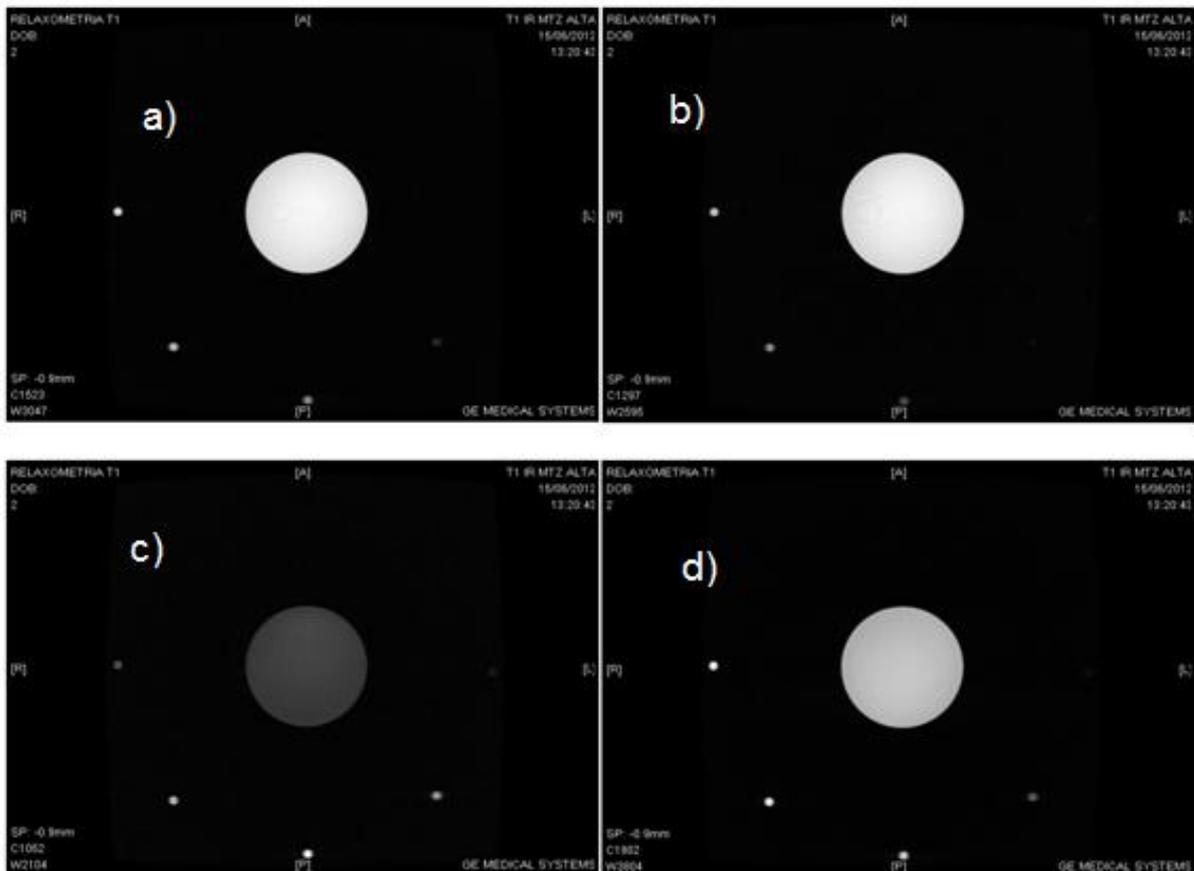


Figura 5.19: Imagens de recuperadas da inversão do *phantom com soluções de NPs*, com um TR de 1000ms e tempo de inversão de 50ms(a), 150ms(b), 800ms(c), 2000ms(d). O círculo central grande é a amostra de H2O. Os círculos menores são as soluções de NPs.

Procedimentos similares como os realizados para a obtenção de R2 foram feitos para obtenção do R1 através da regressão dos pontos das curvas (figura 5.20), usando como modelo de ajuste a equação 5.3:

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{-\left(\frac{t}{T_1}\right)} \right) + M_z(0) e^{-\left(\frac{t}{T_1}\right)} \quad (5.3)$$

$$\frac{1}{T_1} = R_1 \quad (5.4)$$

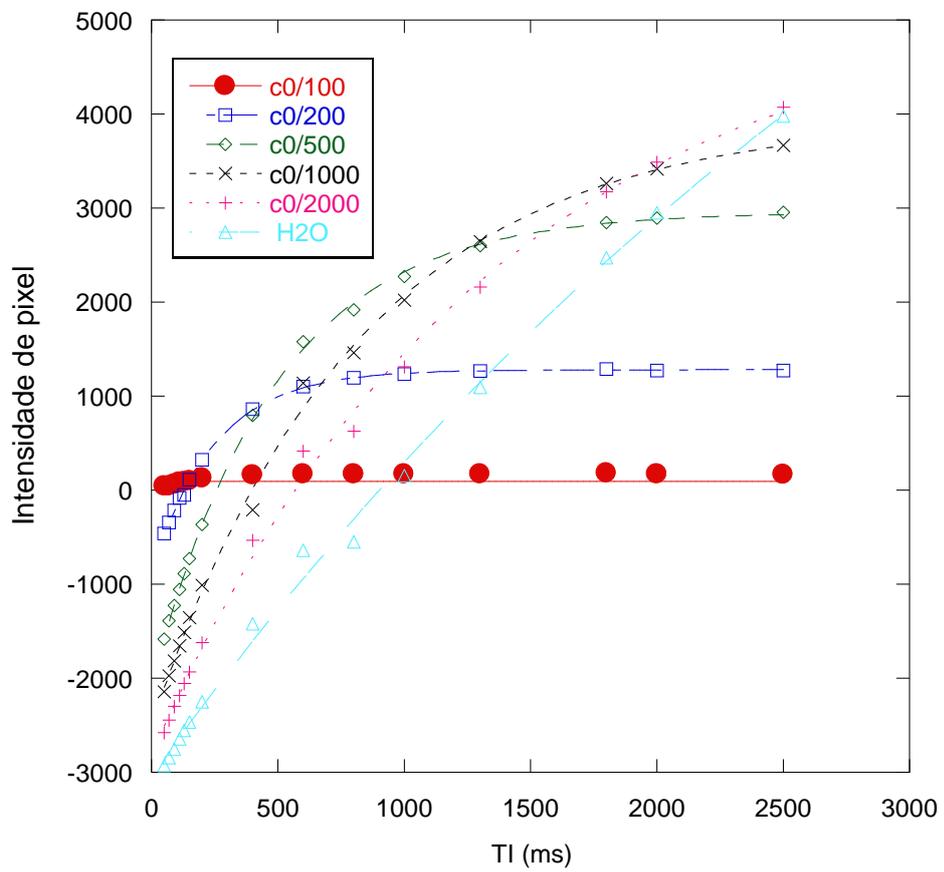


Figura 5.20: Intensidade do pixel em função de TI para diferentes concentrações de NPs e para a água.

Os valores de T1 obtidos da regressão dos pontos das curvas de recuperação das diferentes concentrações estão dispostos na tabela 5.6.

Tabela 5.6: Valores dos tempos T1 e das taxas de relaxação R1 para diferentes concentrações de nanopartículas.

Concentração	R1 (Hz)	T1 (ms)
0.102	0.0066	151 ± 13
0.051	0.0040	248 ± 6
0.0204	0.0021	485 ± 9
0.0102	0.0012	817 ± 42
0.0051	0.0007	1330 ± 101
H₂O	0,0002	4091 ± 869

Os procedimentos anteriores foram realizados para as duas outras sínteses e os valores de R1 de cada síntese com as suas respectivas concentrações estão representados de forma resumida na tabela 5.7. Com esses valores foi elaborado um gráfico com as curvas de R1 em função de concentração de Fe (figura 5.21).

Tabela 5.7: Valores de R1 para cada síntese em função da concentração de ferro.

[Fe] (mg/mL)	R1 (Hz) I	R1 (Hz) II	R1 (Hz) III
C ₀ /100	0.0066 ± 0,0007	0.0079 ± 0,0003	0.0075 ± 0,0002
C ₀ /200	0.0040 ± 0,0002	0.0047 ± 0,0008	0.0040 ± 0,0006
C ₀ /500	0.0020 ± 0,0001	0.0021 ± 0,0005	0.0018 ± 0,0001
C ₀ /1000	0.0012 ± 0,0002	0.0011 ± 0,0007	0.0009 ± 0,0003
C ₀ /2000	0.0007 ± 0,0009	0.0006 ± 0,0003	0.0004 ± 0,0008

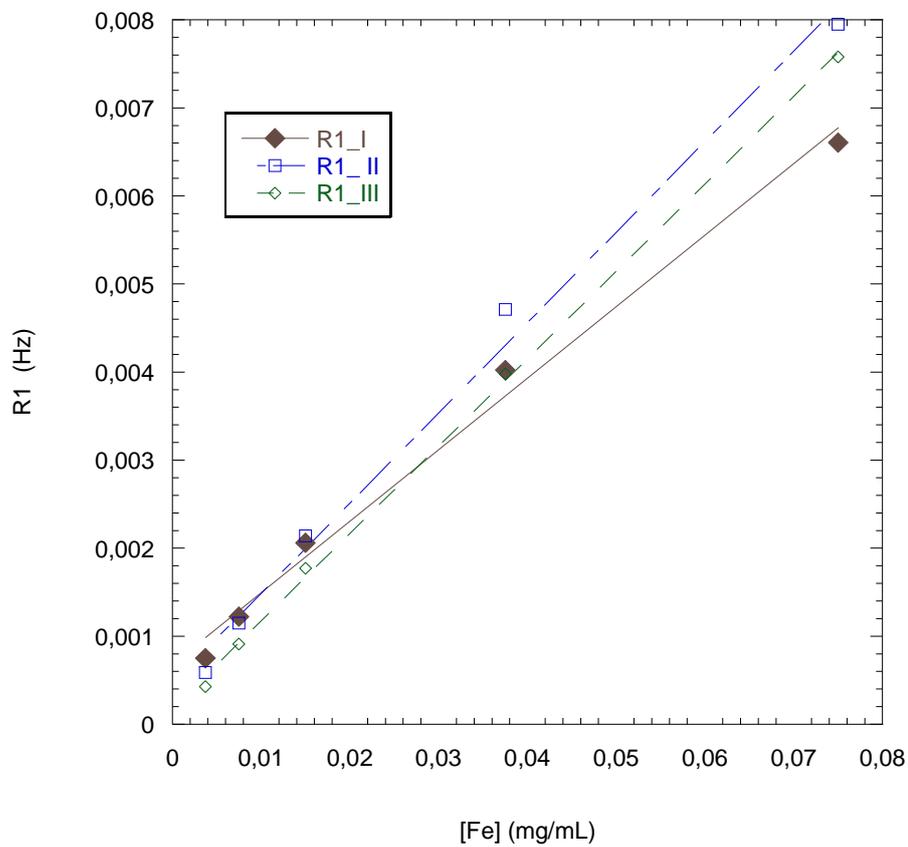


Figura 5.21: Gráfico da taxa de relaxação R1 em função da concentração para cada síntese.

Como descrito para a relaxividade r_2 , cada reta possui uma declividade que representa a relaxividade (r_1). Os valores de relaxividade r_1 e r_2 efetuadas no campo magnético de 3T para cada síntese, estão representados na tabela 5.8. r_1 variou de de 41- 24 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ e r_2 de 2,0 – 1,7 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Tabela 5.8: Valores da relaxividade de cada uma das sínteses.

Amostras	Relaxividade			
	r_2 (mL/mg.s)	r_2 (mM.s) ⁻¹	r_1 (mL/mg.s)	r_1 (mM.s) ⁻¹
Síntese I	2,32 ± 0,09	41 ± 5	0.094 ± 0,007	1,7 ± 0,4
Síntese II	1.48 ± 0,05	26 ± 3	0.111 ± 0,005	2,0 ± 0,3
Síntese III	1.37 ± 0,03	24 ± 2	0.103 ± 0,002	1,8 ± 0,1

A eficácia de um agente de contraste de MRI é geralmente avaliada em termos da sua relaxividade r_1 e r_2 . com base nisso, definiram-se duas classes de agentes de contraste para a RM. Os contrastes ditos positivos têm uma relação de r_2/r_1 baixo, e fornecem uma imagem mais brilhante onde o contraste esta acumulado. Substancias como o Gadolínio – Gd, Manganésio – Mn e seus íons aquosos fazem parte desse grupo. Por outro lado, os agentes de contraste com uma relação r_2/r_1 elevada são chamados de negativos, pois geram um realce de contraste diminuindo o sinal nas imagens. Este agentes de contraste são geralmente baseados em oxido de ferro [96]. A proporção entre as relaxividades r_2/r_1 foi calculada para cada síntese e deu valores entre 24 e 13 o que está próximo, mas levemente superior aos valores encontrados para substâncias comerciais como o Feridex e Resovist que estão no intervalo de 7 – 17 [96-98].

6. CONCLUSÕES

O método químico de síntese das nanopartículas magnéticas por coprecipitação de Fe(II) e Fe(III), mostrou-se ser eficiente tendo em conta os resultados que obtivemos das caracterizações físico-químicas da solução final e nas medidas por MRI. As análises das amostras de cada um dos lotes revelaram algumas diferenças frente à estabilidade e a concentração de ferro (variando de 8 -10 mg/mL), demonstrando a sensibilidade do processo, a pequenas variações nas condições de síntese. Através de análise de EDS e RBS obtivemos uma distribuição elementar compatível com a do óxido de ferro, e padrão de decomposição térmico dominado pelo recobrimento polimérico demonstrado nas curvas do TGA. Dados de DLS indicam uma distribuição estreita de tamanho para a primeira e segunda síntese, com um diâmetro hidrodinâmico médio entre 5-8 nm, confirmadas pelas imagens do TEM. Estudo da relaxação magnética em objetos teste indicou um efeito claro de perturbação do sinal, com diminuições de T1 e T2 em soluções aquosas, confirmando a obtenção do efeito de contraste desejado, com relaxividades que variaram entre 41 e 24 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para r_2 e 2,0 a 1,7 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para r_1 . A relação r_2/r_1 que foi de 24 e 13 indicando que elas, depois de estabilizadas podem ser um bom agente de contraste de T2.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a melhoria do processo desenvolvido durante o trabalho ficam duas sugestões maior sistemática de análise das partículas e estudo dos parâmetros que influenciam na variação das condições de síntese.

Além disso, em função do grande campo de ação e de aplicação dessas nanopartículas, podemos indicar uma vasta gama de temas como sugestões de pesquisa para trabalhos futuros:

- Conjugar as nanopartículas de óxido de ferro recobertas com dextran com corantes para obtenção de uma sonda de contraste para infravermelho próximo.
- Determinação do efeito das etapas de conjugação no tamanho médio e na distribuição de tamanhos das nanopartículas.
- Determinar o comportamento das nanopartículas (cinética de absorção e localização) *in vitro* em cultura de células.
- Determinar a relaxividade magnética das sondas em soro sanguíneo.
- Determinar cinética de absorção e meia-vida das nanopartículas *in vivo* em animais modelo.
- Estudar o nível de toxicidade das NPs.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAIRAGI, Vinayak K.; Ashok M. Sapkal e Ankita Tapaswi. Texture-Based Medical Image Compression. **Journal of Digital Imaging** v.13, n.2, 2012.
- [2] MAIDMENT, A. D. A.; The Future of Medical Imaging. **Radiation Protection Dosimetry**. v. 139, n. 1–3, p. 3–7, 2010.
- [3] CHRIT, T. W. MOONEN, PETER C. M. VAN ZIJL, JOSEPH A. FRANK, DENIS LE BIHAN, EDWIN D. BECKER; Functional Magnetic Resonance Imaging in Medicine and Physiology. **Science** v. 250 n. 4977 p. 53-61, 1990.
- [4] HUANG, Shih-Hung and Ruey-Shin Juang Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a review. **Journal of nanoparticle research** v.13, n.10, 2011.
- [5] HUBER, Dale L. Synthesis, Properties, and Applications of Iron **Nanoparticles** **Small** v.1, n.5, p.482 -501, 2005.
- [6] SHI, Jinjun; Alexander R. Votruba, Omid C. Farokhzad e Robert Langer; Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications **Nano letters** V.10, n.9, pp. 3223 -323, 2010.

- [7] QIAO, Ruirui; Chunhui Yang e Mingyuan Gao. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications **Journal of Materials Chemistry** v. 19, p. 6274–6293, 2009.
- [8] SALABAS, An-Hui Lu, E. L. and Ferdi Schuth. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angew. Chem. Int.** v. 46, p. 1222 – 1244, 2007.
- [9] TANAKA, kazoo; Kitamura Narufumi; Chujo Yoshiki. Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Assembled on Nucleic Acids **Nucleic acids symposium series** v. 52, n. 52, p. 693-694, 2008.
- [10] ALBANESE, Alexandre; Peter S. Tang e Warren C.W. Chan; The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. **Annual review of biomedical engineering** v. 14, n. 1, p. 1-16, 2012.
- [11] LINDSAY, Stuart Martin; **Introduction to Nanoscience** Oxford University Press Inc., New York 2010, 458p.
- [12] HORNYAK, G.L. et al. **Introduction to nanoscience**. Boca Raton: CRC, 2008, 815 p.
- [13] FREY, Natalie A.; Sheng Peng; Kai Cheng; Shouheng Sun Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage **Chemical Society Reviews**. V. 38, p. 2532–2542, 2009.

[14] JINHAO, Gao; Hongwei Gu; Bing Xu. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications **Accounts of Chemical Research** v. 42, n. 8, p.1097-1107, 2009.

[15] SONG, Er-Qun; Jun Hu; Cong-Ying Wen; Zhi-Quan Tian; Xu Yu Zhi-Ling Zhang; Yun-Bo Shi and Dai-Wen Pang. Fluorescent-Magnetic-Biotargeting Multifunctional Nanobioprobes for Detecting and Isolating Multiple Types of Tumor Cells. **ACS NANO** v. 5 n. 2, p.761–770, 2011.

[16] INSIN, Numpon; Joseph B. Tracy; Hakho Lee; John P. Zimmer; Robert M. Westervelt, and Mounji G. Bawendi. Incorporation of Iron Oxide Nanoparticles and Quantum Dots into Silica Microspheres. **ACS NANO** v. 2, n. 2, p.197–202, 2008.

[17] TONG ,Sheng; Sijian Hou; Zhilan Zheng; Jun Zhou e Gang Bao. Coating Optimization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for High T2 Relaxivity **Nano letters** v. 10, n. 11, p. 4607 – 4613, 2010.

[18] LAURENT, Sophie; Delphine Forge, Marc Port, Alain Roch, Caroline Robic, Luce Vander Elst e Robert N. Mullerv; Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **Chemical reviews** v. 108, n. 6, p. 2064 -2110, 2008.

[19] AMULEVICIUS, A; D. Baltrunas, V. Bendikiene, A. Daugvila, R. Davidonis, K. Mazeika; Investigation of the Magnetic Properties of Nanocrystalline Fe₃O₄ Precipitated on the Surface of Chitin. **Physica status solidi. A, Applied research** v. 189, n. 1, p. 243 -252, 2002.

[20] CULLITY, B. D. **Introduction to magnetic materials**. Addison Wesley Publishing Company, 1972, 544 p.

- [21] FERREIRA, Roberta Viana. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas com Núcleo Magnético de Magnetita** Belo Horizonte 2009 104 p. dissertação Faculdade de Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Brasil
- [22] KITTEL, C. **Introdução à Física do Estado Sólido**,. 8a edição, Rio de Janeiro: LTC, 2005 578 p.
- [23] CALLISTER, W. D. Jr. **Ciência e Engenharia de Materiais – uma Introdução**. 7ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2002 589 p.
- [24] MENEZES, Julio C. de A. **Obtenção de Nanopartículas de Níquel Via Processo Aquoso e sua Aplicação na Metalização de Fibras Naturais**. São Cristóvão - SE 2010, 125 p. Tese (Pós Graduação em Física) Faculdade de Física Universidade Federal de Sergipe.
- [25] WILEY, C. M. Sorensen in: *Nanoscale Materials in Chemistry* (Ed.: K. J. Klabunde), New York, p. 169–222, 2001.
- [26] GUIMARÃES, A. P. **Magnetismo e ressonância magnética em sólidos** Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, Rio de Janeiro, 2009 370 p.
- [27] SINNECKER , J. P. **Materiais Magnéticos Doces e Materiais Ferromagnéticos Amorfos**. *Revista Brasileira de Ensino de Física*. v. 22, n. 3, p. 396-404, 2000.
- [28] MATTIS, D. C. **The theory of magnetism made simple: an introduction to physical concepts and to some useful mathematical methods**. New Jersey: World Scientific, 2006, 565 p.

- [29] KNOBEL, M. Partículas Finas: superparamagnetismo e magnetoresistência gigante. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, p. 387 - 396, 2000.
- [30] OLIVEIRA, Ivan S. Vitor L. B. de Jesus **Introdução à física do estado sólido** São Paulo, Livraria da Física, 2005, 360 p.
- [31] LI, Dongqing. **Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics**. Sylvia Blago, Heidelberg 2008, Part 19, 1900p.
- [32] BEDANTA, Subhankar e Wolfgang Kleemann. Supermagnetism. **Journal of physics. D, Applied physics** v. 42, p. 28, 2009.
- [33] STEIGENBERGER, N.; K. Stierstadt; Critical superparamagnetism **Physica status solidi. A**, v. 12, n. 1, p. 133 -142, 1972
- [34] SCHLADT, Thomas D.; Kerstin Schneider; Hansjörg Schild; Wolfgang Tremel. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. **Dalton Transactions**. v. 40, n. 24, pp. 6301–6576, 2011.
- [35] PANKHURST, Q. A.; et al. Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine, **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, p. R167-R181, 2003.
- [36] ARRUEBO, M.; Fernández-Pacheco, R. & Ibarra, M. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Nanotoday**, 2, 3, 22-32, 2007.

[37] TATJANA Atanasijevic, Maxim Shusteff, Peter Fam, and Alan Jasanoff. Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin **PNAS**. V. 103 n. 40 p. 14707-14712 2006.

[38] LAWACZECK, Rüdiger; Michael Menzel; Hubertus Pietsch. Superparamagnetic iron oxide particles: contrast media for magnetic resonance imaging. **Applied organometallic chemistry**. v. 18, n.10, p. 506-513, 2004.

[39] NGO, A. T., P. Bonville, M. P. Pileni. Spin canting and size effects in nanoparticles of nonstoichiometric cobalt ferrite. **Journal of Applied Physics**. V. 89, n. 6, p. 3370-3376, 2001.

[40] HARRIS, Linda A. **Polymer Stabilized Magnetite Nanoparticles and Poly(Propylene Oxide) Modified Styrene-Dimethacrylate Networks**. Blacksburg, Virginia. 2002, 173 p. Dissertation Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, USA.

[41] VALENZUELA, R. **Magnetic Ceramics**, Cambridge University Press, 1994, 336p.

[42] Udovic, Terrence J. ; Dumesic, J.A. Preparation and characterization of magnetite surfaces on metallic iron substrates. **Journal of Catalysis**. v. 89 n. 2 p. 303-313, 1984.

[43] JIT, Kang Lim; Sara A. Majetich; Robert D. Tilton. Stabilization of Superparamagnetic Iron Oxide Core-Gold Shell Nanoparticles in High Ionic Strength Media. **Langmuir**, v. 25, n. 23, p. 13384–13393, 2009.

[44] SHOURONG, Wan; Junsheng Huang; Miao Guo; Hongkai Zhang; Youjia Cao; Husheng Yan; Keliang Liu. Biocompatible Superparamagnetic iron oxide

nanoparticle dispersions stabilized with poly(ethylene glycol)– oligo(aspartic acid) hybrids *Journal of biomedical materials research*. v. 80, n. 4, p. 946-954, 2007.

[45] BERRY, C.C.; CURTIS, A.S.G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 36, p. 198-206, 2003.

[46] FARAJI, A.H., WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.17, p. 2950-2962, 2009.

[47] HASHEMI, Ray H.; William G. Jr. Bradley. **MRI the Basics** USA: Williams & Wilkins, 1997, 336 p.

[48] REIMER, P., P.M. Parizel, F.-A. Stichnoth. **Clinical MR Imaging Wolfgang**. Second edition Printed in Germany: Schering, 2010, 585p.

[49] CHRYSIKOPOULOS, Haris S. **Clinical MR Imaging and Physics**. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2009, 176 p.

[50] SMOLENSKY, Eric D.; Hee-Yun E. Park; Thelma S. Berquó; Valérie C. Pierre. Surface functionalization of magnetic iron oxide nanoparticles for MRI applications – effect of anchoring group and ligand exchange protocol. **Contrast media & molecular imaging**. v. 6, n. 4, p. 189 -199, 2011

[51] ITO, A.; SHINKAI M.; HONDA H.; KOBAYASHI T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.100, p. 1-11, 2005.

- [52] TARAT, P., MORALES, M. P., GONZÁLEZ-CARRENO, T., VEINTEMILLASVERDAGUER, S., SERNA, C.J. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 290, p. 28-34, 2005.
- [53] GUPTA, A. K., GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, v.26, p. 3995-4021, 2005.
- [54] LAK, Aidin; Frank Ludwig, Ilka-Maria Grabs, Georg Garnweitner e Meinhard Schilling; Influence of Synthesis Parameters on Magnetization and Size of Iron Oxide Nanoparticles. *AIP conference proceedings* v. 1311 p. 224, 2010.
- [55] ZHU, Yan; Kaimin Chen; Xiang Wang and Xuhong Guo. Spherical polyelectrolyte brushes as a nanoreactor for synthesis of ultrafine magnetic nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 23 n. 26, pp.265601 (9pp), p.265601 (9pp), 2012.
- [56] SUH, Su Kyung; Kai Yuet; Dae Kun Hwang; Ki Wan Bong; Patrick S. Doyle; T. Alan Hatton. Synthesis of Nonspherical Superparamagnetic Particles: In Situ Coprecipitation of Magnetic Nanoparticles in Microgels Prepared by Stop-Flow Lithography. *American Chemical Society*. v. 134, p. 7337–7343, 2012.
- [57] SALAVATI-NIASARI, Masoud; Tahmineh Mahmoudi; Omid Amiri. Easy Synthesis of Magnetite Nanocrystals via Coprecipitation Method *Journal of cluster science* v. 23, n. 2, p. 597-602, 2012.
- [58] SATO T., IJIMA, T., SEKIN, M. INAGAKI, N., Magnetic properties of ultrafine ferrite particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 65, 252- 256, 1987.

[59] URQUIJO, J. P.; Herley Casanova ; Javier Garces ; Alvaro L. Morales. Synthesis of magnetic nanoparticles: effects of polyelectrolyte concentration and pH. **Hyperfine Interactions**, v. 203, n. 1, pp.85-91, 2011.

[60] TAO, Ke ; Dou, Hongjing ; Sun, Kang. Interfacial coprecipitation to prepare magnetite nanoparticles: Concentration and temperature dependence. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 320, n. 1, pp.115-122, 2008.

[61] JOLIVET, J.P., BELLEVILLE, P., LIVAGE, J. Influence of Fe(II) on the formation of the spinel iron oxide in alkaline medium. **Clays Clay Minerals**, v. 40, 531- 539, 1992.

[62] WEISSLEDER, R. G. Elizondo, J. Wittenberg, A.S. Lee, L. Josephson, T.J. Brady, Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging, **Radiology** v. 175, n. 2, p. 494–498, 1990.

[63] Bohren, C. F.; Huffman, D. R. **Absorption and Scattering of Light by Small Particles**, Wiley-Interscience: New York. 1983.

[64] CIENFUEGOS, Freddy; VAITSMAN, Delmo. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Editora Interferência, 2000.

[65] SKOOG, Douglas A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8ª edição espanhola. México: Thomson, 2005.

[66] ENOKI, Thais Azevedo. **Caracterização por espalhamento de luz de dispersões aquosas de agregados lipídicos aniônicos.** Universidade de S. Paulo Instituto de Física. S.Paulo SP 2010.

[67] GOLDSTEIN, J.I., Newbury D.E., Echlin P., Joy D.C., Fiori G., Lifshin G.. **Scanning electronmicroscopy and X-Ray microanalysis.** 2th ed. New York: Springer, 1992, 840 p.

[68] DEDAVID, Berenice Anina; Carmem Isse Gomes; Giovanna Machado. **Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores** EDIPUCRS Porto Alegre, 2007, 60p.

[69] GRAEF, Marc De. **Introduction to conventional transmission electron microscopy** Cambridge Univ. Cambridge (UK) 2003.

[70] JORGE Jr.,Alberto Moreira, Walter José Botta Filho. **Introdução à Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise** LCE - DEMa – UFSCar São Carlos 2005

[71] GOODHEW, P. J. ;Humphets, J.; Beanland, R. **Electron Microscopy and analysis.** Taylor & Francis, 3th ed. , 2001.

[72] CARTER B.; WILLIAMS C.; DAVID B. **Transmission Electron Microscopy.** Cap. 10. Specimen Preparation. New York: Plenum Press, 1996.

[73] WILLIAMS, D.B. Carter, C. B. **Transmission eletroan microscopy: a textbook for materials science** . Springer, 2009

- [74] CHESCOE, D.; GOODHEW, P. J. **The operation of the transmission electron microscope.** oxford University Press, 1984
- [75] REIMER, L.; H. Kohl **Transmission Electron Microscopy** 5th Spring Verlag, Berlin, 2008
- [76] IRONOV ,V. L. **Fundamentals of Scanning Probe Microscopy.** The Russian Academy of Sciences institute of Physics of Microstructures, 2004.
- [77] BINNIG, G.; C.F. Quate; C. Gerber. Atomic force microscope. **Phys. Res.Lett.**, V. 56 n. 9 P.930 - 930, 1986.
- [78] HOWLAND ,R.; L. Benatar. **A practical Guide to Scanning Probe Microscopy.** Park Scientific Instruments, 1996.
- [79] JEAN,M. Saint; Hudlet; C. Guthmmam; J. Berger – Van derWaals an capacitive force in atomic force microscopies **Appl. Phys.** V. 86 (9) p. 5245 -5248, 1999.
- [80] WIESENDANGER,R. **Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Metthods and Aplications,** 1998.
- [81] HU, X. et al Nanoscale oxide structures induced by dynamic electric fiel on Si with AFM. **Applied Surface Science** V. 217, p. 34-38, 2003.
- [82] Malvern Instruments **Zetasizer Nano User Manual,** Worcestershire, 2007.

[83] BRENE, R.; B.J; Pecora,R. **Dynamic Light Scattering**. John Wiley & Sons: New York, 1976

[84] JAKES, Jaromír. Regularized Positive Exponential Sum (REPES) Program - A Way of Inverting Laplace Transform Data Obtained by Dynamic Light Scattering. **Collect czechos. chem. Communc**, v. 60, n. 11, p.1781, 1995.

[85] BROWN W. **Dynamic Light Scattering: The Method and Some Applications**. carendon press Oxford Science, London. (1993)

[86] PUSEY, P N.; Tough R. J. A. **Dynamic Light Scattering**. ed Pecora (Plenum, New York), pp 85–179, 1985.

[87] CHU, Wei- K.; Mayer, James W.; Nicolet, Marc-A. **Backscattering Spectrometry**. 1 ed Now York: Academic Press, 1978. 384p.

[88] BERNARDI, Fabiano. **Determinação da Posição reticular de Fr em Si**. Intituto de Física UFRGS: Porto Alegre, 2006, 122p

[89] HAINES, P. J. **Thermal Methods of Analysis Principles**, Applications and Problems, Editora Blackie Academic & Professional; 1ª edição, London, 1995.

[90] METHÉ, C. G.; Azevedo, A. D. **Analise Termica de materiais**. I edição S. Paulo , 300p, 2002.

[91] CAVALHEIRO, E. T. G.; Ionashiro, M.; Breviglieri, S. T.; Marino, G.; Chierice,

G. O.; A influência de fatores experimentais nos resultados de análises termogravimétricas. **Quim. Nova**, v.18, p.305 1995.

[92] WENDLANDT, W. W.; **Thermal Analysis**. 3rd ed., Wiley: Nova Iorque, p. 213-460, 1985.

[93] SKOOG, D. A.; Leary, J. J.; **Principles of Instrumental Analysis**, 4a ed., Saunders: New York, p. 571, 1992.

[94] OLIVEIRA, Artur Harres . **Exchange Bias em Filmes Policristalinos: Estudo da Importância dos Spins de Interface e de Volume do Antiferromagneto**. Programa de Pós- Graduação em Física, UFRGS, Porto Alegre 2011 80p.

[95] FLANDERS, P. J. An alternating-gradient magnetometer **Journal of Applied Physics**, v. 63, p. 3940, 1988.

[96] LIAO, Zhenyu; Hanjie Wang, Xiaodong Wang, Chunling Wang, Xiufeng Hu, Xiaohong Ca, Jin Chang. Biocompatible surfactin-stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 370 n. 1, p. 1-5, 2010.

[97] ROHRER, M.; H. Bauer, J. Mintorovitch, M. Requardt, H.J. Weinmann, Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths, **Invest. Radiol.** V. 40, n. 11, p. 715–724, 2005.

[98] SRIVASTAVA, S.; Rishi Awasthi, Namdeo S. Gajbhiye, Vikas Agarwal, Amit Singh, Abhishek Yadav, Rakesh K. Gupta. Innovative synthesis of citrate-coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and its preliminary applications. **Journal of colloid and interface science**, , v. 359, n. 1, p.104-11, 2011.

