

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Alexandre D'Agostini Zottis

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E TESTES *IN VITRO* DE  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  PARA  
ATUAREM COMO AGENTES DE CONTRASTES NEGATIVOS  
 $T_2$  PARA O DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zottis, Alexandre D'Agostini

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E TESTES IN VITRO DE  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> PARA ATUAREM COMO  
AGENTES DE CONTRASTES NEGATIVOS T2 PARA O DIAGNÓSTICO DE  
CÂNCER DE MAMA / Alexandre D'Agostini Zottis ; orientador,  
Bruno Szpoganicz - Florianópolis, SC, 2015.

191 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, . Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. nanopartículas superparamagnéticas. 3.  
Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. 4. imagem por ressonância magnética. I. Szpoganicz,  
Bruno. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

**ALEXANDRE D'AGOSTINI ZOTTIS**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E TESTES *in VITRO* DE  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> PARA  
ATUAREM COMO AGENTES DE CONTRASTES NEGATIVOS  
T<sub>2</sub> PARA O DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA**

Tese de doutorado avaliada e aprovada pelo orientador e membros da banca, em sua forma final, como requerimento para obtenção do título de "Doutor em Química Inorgânica" no Programa de Pós-Graduação em Química, na Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 21 de Dezembro de 2015

---

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado  
Coordenador do Curso

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Bruno Szpoganicz  
(Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rozangela Curi Pedrosa  
(BQA-UFSC)

---

Prof. Dr. Fábio da Silva Miranda  
(Relator-IQ-UFF)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hérica Aparecida Magosso  
(DQ-UFSC)

---

Prof. Dr. Mauro C.M Laranjeira  
(DQ-UFSC)

---

Dr. Thiago Guimarães Costa  
ATECOR  
(Fundação Catarinense de Cultura)

Ao meu amor eterno, minha esposa  
Vanice e a Egisto Garcia *in memoriam*

## AGRADECIMENTOS

A uma força existente e uma energia no nosso Universo que chamamos de Deus, que nos dá a razão ao acordar todos os dias e nos impulsiona e que nos possibilita apreendermos com nossos erros e evoluirmos a cada dia.

A quem sempre esteve ao meu lado, me incentivando mesmo nos momentos mais difíceis que passei no decorrer da minha vida, superando todas dificuldades, uma verdadeira companheira, e me apoiando sempre, e que jamais deixou de acreditar em min, á minha esposa querida e companheira amada Vanice (Nice).

Agradeço a meus pais Orvelino e Nelcinda, que sempre me incentivaram e sempre deram bons exemplos de amor, educação, carinho e principalmente pela oportunidade que me deram ao me apoiar desde cedo aos estudos e pelas lições aprendidas.

Aos meus irmãos Aroldo (gêmeo), José Eduardo e Cláudia que de alguma forma sempre me incentivaram e torceram por min para a concretização desse trabalho final.

Ao meu Orientador, Prof. Bruno Szpoganicz, pelos seus ensinamentos, orientações e melhoria dos estudos, que me acolheu em seu laboratório e que mesmo, eu não tendo a formação na área nunca deixou de acreditar em meu potencial, e pela amizade adquirida nesses quatro anos juntos.

Á prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rozangela Curi Pedrosa, que pela amizade há mais de 15 anos, e principalmente por ter sido minha professora no Mestrado, agora reencontrei como minha colaboradora no desenvolvimento da tese, referente aos testes biológicos *in vitro*, e que sempre acreditou e me incentivou para que eu concluísse essa difícil jornada.

Ao prof. Dr. Fábio Miranda, pela realização dos experimentos envolvendo as medidas de XPS na UFF, pela colaboração e auxílio na discussão dos resultados e pela aceitação como relator, em minha banca.

Ao Dr. Thiago pelo incentivo, observação e estudos iniciais que possibilitaram á inspiração no desenvolvimento de um novo trabalho associado ao que ele havia investigado e também principalmente pela síntese e caracterização de FT-IR.

Ao prof. Dr. Mauro César Laranjeira, por ter aceitado a participação como membro da banca, e pelas contribuições envolvendo as caracterizações físico-químicas envolvendo os dados de TGA, DRX.

Ao prof. Dr. Alexandre Cas Viegas, pelas dicas e ensinamentos quanto ao uso e análise das amostras por VSM.

Ao Jeovandro Beltrame, meu ex-bolsista de IC e agora aluno de Mestrado de Engenharia Química, a qual sempre pegou junto comigo no LEQ (Laboratório de Equilíbrio Químico) na realização dos experimentos envolvendo as sínteses, e no acompanhamento das caracterizações físico-químicas, VSM, FT-IR, TGA, TEM, DLS e no auxílio para discussão dos resultados, e principalmente nas curvas de relaxividade.

Ao Dr. Luciano Lara, pelos auxílios na discussão dos resultados envolvendo as nanopartículas magnéticas e na organização dos dados para a publicação do artigo.

Às alunas de doutorado, Fabiana e Valdelúcia do LABIOEX, pela realização dos experimentos envolvendo os testes de citotoxicidade (MTT) e os ensaios com o “prussian blue”.

Aos colaboradores externos, Dr. Luiz Felipe Nobre e Dr. Miguel Carrão por possibilitar e oportunizar a realização dos experimentos envolvendo os primeiros testes de IRM com as amostras, e ao Lucas de Souza pela realização e medidas dos tempos de relaxação T1 e T2 na clínica. A prof<sup>a</sup> Dra Naira Maria Balzaretto do IF-UFRGS pelas medidas Raman, e DRX de pó, e ao prof. Alexandre Cas Viegas pelas medidas de magnetização.

Ao Caio Murilo por me substituir durante minha capacitação, como meu ex-aluno que se vê hoje no papel de professor. A todos meus colegas, professores do Curso de Graduação Tecnológica em Radiologia pelo apoio e incentivo, e, especialmente pela amizade e companheirismo, prof<sup>a</sup> Juliana Coelho, Giovani Cavalheiro e Dr<sup>a</sup> Tatiane Camozatto que durante a chefia, não mediram esforços para que eu pudesse dar continuidade aos estudos.

À Reitoria, pelo incentivo a qualificação por meio de edital, a todos docentes do IFSC, e aos meus alunos do curso, meus bolsistas que já passaram por min, e aos que estão atualmente participando em novas pesquisas.

“O que não consigo criar, não consigo compreender”  
**Richard Feymann**



## RESUMO

Em função da limitação na detecção de tumores malignos primários com agentes de contrastes (ACs) com quelatos de  $Gd^{3+}$ , a agência “*Food Drug Administration*” liberou há dez anos o uso de nanopartículas (NPs) superparamagnéticas de  $Fe_3O_4$  e  $\gamma-Fe_2O_3$ , “SPIONS” em pesquisas e testes clínicos nos Estados Unidos e Europa. Para esse propósito, as “SPIONS” devem ser recobertas com materiais orgânicos ou inorgânicos, metabolizadas pelo organismo, ser biocompatíveis e apresentarem baixa citotoxicidade. O presente trabalho teve como objetivo sintetizar pelo método de co-precipitação, caracterizar e testar *in vitro* “SPIONS” de  $Fe_3O_4$  recobertas pelo bio-oligômero *pheomelanina* ( $Fe_3O_4@Pheo$ ) para aplicações em nanomedicina. As “SPIONS” constituindo as NPs de  $Fe_3O_4@Pheo$  foram caracterizadas por técnicas físico-químicas, tais como, espectroscopia de infravermelho, termogravimetria, espalhamento de luz dinâmico, espectrofotometria por fotoelétrons de raios X, microscopia eletrônica de transmissão, magnetização por amostra vibrante, análise elementar, espectrometria por absorção atômica, e difração de raios-X de pó. Os resultados comprovaram que apesar de certa limitação quanto à monodispersividade e valor de magnetização das “SPIONS”, o método de co-precipitação conseguiu atender às exigências para aplicações biomédicas. Uma vez que, as NPs de  $Fe_3O_4@Pheo$  apresentaram índice de polidispersividade abaixo do limite ( $PDI < 0,2$ ), e o tamanho do “core” (10-13 nm) mostrou que as NPs são superparamagnéticas e que as mesmas foram estabilizadas *via* ligação covalente entre o óxido de ferro (Fe-O) com os grupos catecolatos e tióis da *pheomelanina* em meio aquoso. Além disso, os resultados associados às medidas de tempo de relaxamento  $T_1$  e  $T_2$  apontaram que as NPs exibiram potencial como AC negativo  $T_2$  (elevado valor de relaxividade transversa, ou seja,  $r_2 = 218 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  em relação a  $r_1 = 1,6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) para o diagnóstico de câncer de mama usando imagem por ressonância magnética (IRM). E, por fim, os testes *in vitro* das NPs de  $Fe_3O_4@Pheo$  atenderam às condições de baixa citotoxicidade (viabilidade celular até 100 ppm) em células MCF-7. Além disso, as características de biocompatibilidade também foram atingidas e comprovadas pelos resultados apresentados nos ensaios *in vitro* de “*uptake*” nessas células.

**Palavras-chave:** nanopartículas superparamagnéticas;  $Fe_3O_4$ ; imagem por ressonância magnética.

## ABSTRACT

Due to the limitation on the early malign tumour detection with contrast agents (CAs) with quelates of  $Gd^{3+}$ , the regulatory agency “*Food Drug Administration*” authorized about ten years ago the utilization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (“SPIONs”) of  $Fe_3O_4$  and  $\gamma$ - $Fe_2O_3$ , “SPIONs” for research and clinical studies. For this goal, the SPIONs must be coated with organic or inorganic materials, metabolized by the organism, to present biocompatibility and low cytotoxicity. In such a way, the current work aimed to synthesizing by coprecipitation approach, characterizing and testing *in vitro* “SPIONs” of  $Fe_3O_4$  coated by the bio-oligomer *pheomelanin* addressed to the nanomedicine applications. The “SPIONs” nanoparticles (NPs) of magnetite coating *pheomelanin* ( $Fe_3O_4@Pheo$ ) were thoroughly characterized by physical-chemistry techniques such as, infrared spectroscopy, thermogravimetric, dynamic light scattering, X-ray photoelectrons spectroscopy, transmission electronic microscopy, vibrating sample magnetization, elemental analysis, absorption atomic spectrometry and powder X-ray diffraction. Even though that some results showed some limitations (saturation magnetization, and low monodispersivity) our “SPIONs” of  $Fe_3O_4@Pheo$  prepared by coprecipitation method could reach the requirements for biomedical applications. So that, the NPs of  $Fe_3O_4@Pheo$  exhibited a polydispersivity index lower than the borderline ( $PDI < 0,2$ ), and the core size (10-13 nm) demonstrated that the NPs are superparamagnetics and those were stabilized *via* covalente or electrostatic bonding iron oxide (Fe-O) onto the surface with catecholate and thiol groups of the *pheomelanin* in aqueous medium. Besides, the results related to the measurements of relaxation time  $T_1$  e  $T_2$  pointed out that the NPs exhibited a potential feature as  $T_2$  negative CA (high value of transverse relaxivity, such as,  $r_2 = 218 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  in comparison to the longitudinal relaxivity,  $r_1 = 1,6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) due to breast cancer diagnostic using magnetic resonance imaging (IRM). And, in brief, the tests *in vitro* of NPs of  $Fe_3O_4@Pheo$  served to the low-cytotoxicity requirements (cellular viability up to 100 ppm) in cells MCF-7. In addition, the demands of biocompatibility were reached once that are proved by the results given by the assays *in vitro* de “*uptake*” in the MCF-7.

**Keywords:** superparamagnetic nanoparticles;  $Fe_3O_4$ ; magnetic ressonance imaging.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema ilustrativo da proposta da tese envolvendo (A) a preparação de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* e (B) o efeito da redução de tempo de relaxação transversal  $T_2$  utilizado como AC negativo de IRM para diagnóstico de câncer de mama. .. 31
- Figura 2** - Presença de domínios magnéticos em ímãs de elevado campo magnético construídos de neodímio-ferro-boro (Nd-Fe-B). (Adptação da referência (K.THANH, 2012)). ..... 35
- Figura 3** - Algumas configurações hipotéticas de domínios magnéticos de material “bulk” ferromagnético e na condição de monodomínio (A) em constituindo as paredes de domínios (B) e (C) (imagem adaptada da referência (MORRISH, 1965)). ..... 37
- Figura 4** - Diferentes comportamentos dos momentos de dipolos magnéticos representando os cinco tipos de propriedades magnéticas dos materiais (adaptado de (CUNHA, 2014))...... 38
- Figura 5** - Gráfico da susceptibilidade  $\chi$  para os materiais diamagnéticos em que a magnetização  $M$  apresenta comportamento inverso e negativo à direção do campo magnético aplicado  $H$ .(CUNHA, 2014) ..... 39
- Figura 6** - Gráfico da susceptibilidade  $\chi$  para os materiais paramagnéticos em que a magnetização  $M$  apresenta comportamento transitório e a magnetização efetiva ( $M_o$ ) é zero quando se retira o campo magnético  $H$ . (CUNHA, 2014) ..... 40
- Figura 7** - Gráfico da susceptibilidade  $\chi$  para os materiais ferromagnéticos (ferro, cobalto, níquel etc.), ferrimagnéticos (óxido de ferro) e antiferromagnético em que a magnetização  $M$  apresenta comportamento elevado e positivo à direção do campo magnético aplicado  $H$ . (CUNHA, 2014)..... 42

<b>Figura 8</b> - Estrutura cristalina da célula unitária (cfc) do spinélio, onde A: ocupação sítio tetraédrico $Mg^{2+}$ e B: ocupação sítio octaédrico $Al^{3+}$ (FERREIRA, 2009). .....	43
<b>Figura 9</b> - Em destaque os cátions $Fe^{3+}$ ocupando os sítios tetraédricos (vermelho) adjacente aos cátions $Fe^{3+}$ ocupando os sítios octaédricos (amarelo) compartilhando um átomo de oxigênio para a estrutura da magnetita de acordo com a referência (FRIÁK; SCHINDLMAYR; SCHEFFLER, 2007). .....	44
<b>Figura 10</b> - A estrutura cristalina da célula unitária cúbica de face centrada (cfc) do spinélio da magnetita (Adaptada de (FRIÁK et al., 2007)). Em vermelho, estão os íons de $Fe^{3+}$ e $Fe^{2+}$ ocupando os sítios tetraédricos e em amarelo, os íons de $Fe^{3+}$ ocupando os sítios octaédricos. ....	45
<b>Figura 11</b> - Ilustração esquemática apontando o comportamento dos momentos magnéticos de $Fe_3O_4$ (Adaptado de (CUNHA, 2014))....	45
<b>Figura 12</b> - Diferentes comportamentos magnéticos apresentados por materiais “bulk” ferromagnéticos e nanopartículas superparamagnéticas (LEE, N.; HYEON, 2012). .....	48
<b>Figura 13</b> - Mudança da magnetização $M$ em uma partícula através da barreira de energia de anisotropia sob a ação de um campo magnético aplicado $H$ (a) apontando para baixo, (b) nenhum campo e (c) apontando para cima. (K.THANH, 2012). .....	49
<b>Figura 14</b> - Nanopartículas estabilizadas por repulsões (a) eletrostáticas, (b) estéricas e (c) eletro estéricas (Adaptação de(LARA et al., 2015)).....	59
<b>Figura 15</b> - Esquema apresentado para preparação de NPMs de $Fe_3O_4$ estabilizadas com surfactante e troca de ligante com dopamina. (Adaptado de Nagesha e colaboradores(NAGESHA et al., 2009)).....	65

- Figura 16** - Micrografias de NPs de óxido de ferro estabilizadas por (a) ácido oleico e após (b) troca de ligante NPs estabilizadas por dopamina. (Retirado de estudo de Nagesha (NAGESHA et al., 2009))..... 67
- Figura 17** - Ilustração mostrando a dopaquinona e a cisteinil-dopa como precursores dos bio-oligômeros *eumelanina* e da *pheomelanina* (Adaptado da referência (TONG YE, 2008)). ..... 69
- Figura 18** - Unidades dos principais monômeros que contribuem para a formação do biopolímero *pheomelanina* (Adaptado da referência (TESEMA et al., 2008))..... 69
- Figura 19** - Micrografia por MET (A) histograma de nanocristais de magnetita com diâmetro médio de 9,9 nm (B). Padrão de difração de elétrons (C) e de DRX de pó de nanocristais de magnetita (D).(Adaptado da referência (YU et al., 2004)). ..... 73
- Figura 20** - Padrões de DRX de pó de nanopartículas de  $MFe_2O_4$  preparadas em solução de estabilizantes de cadeias longas: M = Mn (a), Fe (b), Co (c), Ni (d) e Zn (e). (Adaptado da referência (THANH; GREEN, 2010))..... 75
- Figura 21** - Espectros de infravermelho para NPs de magnetita e maghemita preparada por diferentes métodos de co-precipitação e em diversos tamanhos. (Adaptado da referência (K.THANH, 2012)). .. 77
- Figura 22** - Principais parâmetros associados ao ciclo de histeresse de materiais magnéticos e o acompanhamento da variação do campo magnético aplicado ( $H$ ), retirado da referência (COELHO, T. C., 2011) ..... 80
- Figura 23** - Curvas de magnetização associados a (a) processos reversíveis presentes em NPs superparamagnéticas com  $H_c$  nulo e (b) processos irreversíveis caracterizando a formação de uma

histerese, presente em materiais ferromagnéticos. (Adaptado da referência (COELHO, T. C., 2011)) ..... 82

**Figura 24** - Curvas de magnetização associados a tamanhos médios das NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> com (a) processos a baixíssimas temperaturas (5 K) em (b) medidas de  $H_c$  e  $M_r$  em T =300 K. Figura retirada de referência (GUARDIA et al., 2010). ..... 83

**Figura 25** - Curvas de potencial zeta *versus* pH de NPs de maghemita sem recobrimento, com NPs de maghemita com superfície aminada (APS: 3-aminopropiltrimetoxisilano) e NPs de maghemita encapsuladas em ligação cruzada com coroa de dextrana. (Adaptado da referência (K.THANH, 2012)). ..... 85

**Figura 26** - Curva representando decaimento exponencial da magnetização transversal ( $M_{xy}(t)$ ) e sua relação com a relaxação transversal  $T_2$  em diferentes tecidos em função da densidade de prótons. Adaptado da referência (LEE, C. H.; WEINREB, 2004)... 88

**Figura 27** - Curva representando recuperação da magnetização longitudinal ( $M_z(t)$ ) e sua relação com a relaxação longitudinal  $T_1$  em diferentes tecidos em função da densidade de prótons (Adaptado de (LEE, C. H.; WEINREB, 2004)). ..... 89

**Figura 28** - Efeitos da relaxação  $T_1$  e  $T_2$  nos tecidos presentes no crânio associados às diferentes alterações nos contrastes da imagem por IRM, exibindo hipersinal em A)  $T_1$  curto (gordura, tecido muscular) e em B)  $T_2$  longo (fluido cérebro espinhal, substância cinzenta e branca) (LEE, C. H.; WEINREB, 2004)..... 90

**Figura 29** - ACs positivos que apresentaram a síndrome nefrogenica sistêmica (FSN) devido às complicações decorrentes da toxicidade do Gd<sup>3+</sup> (Adaptada da referência (PETER CARAVAN, 1999)). ..... 92

**Figura 30** - Detecção de metastase em baço (A) antes e (B) após 60 minutos de injeção de partículas superparamagnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

recobertas por dextrana (AMI-25 SPIONs). É possível notar que a grande maioria do tecido do baço (lado direito da imagem em (B)) ficou escurecido ou “reduziu sinal da IRM na relaxação transversal  $T_2$ ) devido ao acúmulo de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, enquanto que as metástases estão claramente visíveis como os pontos claros (hipersinal) indicado pelas setas amarelas. (Adaptado de (ROSEN et al., 2012))...... 94

**Figura 31** - Fluxograma da metodologia a ser aplicada. .... 100

**Figura 32** - Descrição esquemática da metodologia empregada para a preparação de NPMs de  $Fe_3O_4@Pheo$ . .... 103

**Figura 33** - Espectro de infravermelho referente às principais frequências de absorção correspondentes às amostras em pó de (A) NPMs de  $Fe_3O_4$  estabilizadas pela *pheomelanina* ( $Fe_3O_4@Pheo$ ) e de (B) bio oligômero *pheomelanina* pura..... 115

**Figura 34** - Espectro de infravermelho referente aos modos vibracionais atribuídos ao estiramento da ligação C-S e Fe-O respectivamente, associados aos grupos benzotiazóis e de magnetita estabilizados com NPMs de  $Fe_3O_4$  ( $Fe_3O_4@Pheo$ ). .... 118

**Figura 35** - Curva termogavimétrica relacionando o percentual de perda de massa com o grau de recobrimento do biopolímero *pheomelanina* sob as NPMs de  $Fe_3O_4$ . .... 120

**Figura 36** - Micrografias das NPMs de óxido de ferro recobertas por *pheomelanina* ( $Fe_3O_4@Pheo$ ) em (A e B) mostrando relativa monodispersividade e elevada cristalinidade e em (C) histograma da distribuição de tamanho para o diâmetro médio do “core” de  $Fe_3O_4$ . .... 124

**Figura 37** - Imagens de TEM de baixa resolução de NPMs de  $Fe_3O_4$  recobertas por (A) *pheomelanina*, (B) carboxi metil dextrana (CMD)

(DUTZ et al., 2009), (C) dietilenoglicol (DEG) e citrato (LARTIGUE et al., 2012) e (D) carboximetil celulose (CMC) (HABIBI, 2014). ..... 126

**Figura 38** - Padrões indexados da amostra de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo e os principais planos foram identificados. .... 128

**Figura 39** - Superposição de padrão de ferritas e os valores experimentais obtidos por SAED. .... 129

**Figura 40** - Planos de difração correspondendo a perfil de magnetita nas amostras obtidas pelas análises de DRX pelo pico mais intenso (311). ..... 131

**Figura 41** - Análise por XPS para as NPMs recobertas por *pheomelanina*. ..... 133

**Figura 42** - Espectros de XPS de alta resolução de padrões para Fe2p de NPMs nas fases  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (a) e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (b) por estudos de Jian e colaboradores. (LU, J. et al., 2009). ..... 134

**Figura 43** - Espectro de XPS para as NPMs recobertas por *pheomelanina*. ..... 136

**Figura 44** - Espectro de XPS apontando a existência de dois picos satélites em 718,5 e 732,1 eV. .... 137

**Figura 45** - Espectro de XPS de Fe2p de NPMs revestidas por  $\text{SiO}_2$  sob tratamento por ultrassom (Adaptado da referência (GU, H. et al., 2005)). ..... 138

**Figura 46** - O espectro de XPS para as ligações de Fe-O. .... 139

**Figura 47** - Espectro de XPS para energia de ligação C1s. .... 140

**Figura 48** - Análise por VSM de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina*. ..... 142

<b>Figura 49</b> - Análise por DLS de NPMs de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> recobertas por <i>pheomelanina</i> com o diâmetro hidrodinâmico médio (90,75 nm) e o índice de polidispersividade (PDI) (0,179) em solução tampão (pH = 8,0).....	146
<b>Figura 50</b> - Análise da superfície Potencial zeta das NPMs de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> recobertas por <i>pheomelanina</i> (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Pheo) (potencial ζ de -38,1 mV) estabilizadas em solução tampão em pH = 8,0. ....	149
Figura 51 – Ajuste da curva associada à taxa de relaxação $T_2$ pela intensidade do sinal (I(t)) versus (TE) para cada valor de concentração de ferro [Fe] obtido das análises de FASS. ....	153
<b>Figura 52</b> - Intensidade do sinal de IRM ponderada em $T_2$ versus concentração de Fe. ....	154
<b>Figura 53</b> - Realce do efeito de redução de $T_2$ das NPMs recobertas por <i>pheomelanina</i> . ....	155
<b>Figura 54</b> - (A) taxas de relaxação $T_1$ ( $1/T_1$ ) e (B) taxas de relaxação $T_2$ (amostra) - $T_2$ (controle) plotadas contra concentração de ferro para as nanopartículas de magnetita em solução aquosa para obter as relaxividades longitudinal ( $r_1$ ) e transversal ( $r_2$ ), respectivamente. ....	157
<b>Figura 55</b> - Curvas de Magnetização de NPMs de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nuas (vermelho) e recobertas (azul) por quitosana (SANJAI et al., 2014) (A) e de NPMs de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> recobertas por <i>pheomelanina</i> (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Pheo).....	162
<b>Figura 56</b> - (A) Resultados de IRM de ponderação $T_1$ e $T_2$ em solução gel agar 3% com suspensão de NPMs de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @quitosana (Adaptado de (SANJAI et al., 2014)) e em (B) Resultados de IRM de ponderação $T_2$ em solução gel ágar 2,5% com suspensão de NPMs de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Pheo.....	163

**Figura 57** - Resultados de MET de NPMs preparadas por co-precipitação de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@p\text{heomelanina}$  estabilizadas em  $p\text{H}$  8,0 (a) e de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@q\text{uitosana}$  estabilizadas em  $p\text{H}$  6,0 (retirado de referência (SANJAI et al., 2014)) (b). ..... 165

**Figura 58** - Resultados de MET de NPMs preparadas por co-precipitação apontando melhor distribuição de tamanho das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@p\text{heomelanina}$  estabilizadas em  $p\text{H}$  8,0 (c) em comparação com NPMs preparadas por co-precipitação de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@q\text{uitosana}$  estabilizadas em  $p\text{H}$  6,0 (retirado de referência (SANJAI et al., 2014)) (d). ..... 166

**Figura 59** - Ensaio por MTT das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por pheomelanina mostrando viabilidade celular em MCF-7 em função da concentração de ferro..... 168

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Frequências de absorção na região do infravermelho de amostras em pó de <i>pheomelanina</i> pura e NPMs recobertas por pheomelanina ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@Pheo$ ).....	116
<b>Tabela 2</b> - Índice de componentes atômicos determinados por análise elementar. ....	119
<b>Tabela 3</b> - Valores encontrados por espectroscopia por Energia dispersiva de raios X (EDX) de NPMs recobertas por pheomelanina. ....	121
<b>Tabela 4</b> - Percentual de quantidade de Fe presente nas NPMs de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . ....	122
<b>Tabela 5</b> - Diâmetro médio dos “cores” de NPMs de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ por diferentes métodos de co-precipitação.....	127
<b>Tabela 6</b> - Valores do espaçamento interplanar- <i>d</i> de SAED para as NPMs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Pheo$ obtidas através de TEM (100kV) em relação ao padrão da magnetita.....	129
<b>Tabela 7</b> - Estimativas de parâmetros cálculos teóricos para espectro XPS de $\text{Fe}2p_{3/2}$ em óxidos de ferro.....	135
<b>Tabela 8</b> - Magnetização de saturação ( <i>M<sub>s</sub></i> ) de NPMs de alguns materiais ferrimagnéticos medidos a 300 K. (Adaptação da referência de (COLOMBO et al., 2012))......	143
<b>Tabela 9</b> - Magnetização de saturação ( <i>M<sub>s</sub></i> ) de NPMs de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ recobertas com diferentes estabilizantes em função do diâmetro de “core”. ....	144
<b>Tabela 10</b> - Valores de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta de vários tipos de NPMs. ....	147

**Tabela 11** - Comparativo com diferentes diâmetros hidrodinâmicos e relaxividade de NPMs. .... 160

**Tabela 12** - Células MCF-7 mantidas (4h) em meio DMEM contendo concentrações crescentes de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Pheo (1 – 50 ppm) (coradas de azul pelo “Prussian blue”). O núcleo e citoplasma (em vermelho). Imagens adquiridas em microscopia de campo claro (40X). .... 170

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1).....	35
Equação (2).....	36
Equação .....	.....
.....	(3)
.....	38
Equação (4).....	48
Equação (5).....	48
Equação (6).....	50
Equação (7) .....	56
Equação (8).....	57
Equação (9).....	74
Equação (10).....	74
Equação (11).....	74
Equação (12) .....	87
Equação (13) .....	88
Equação (14) .....	91
Equação (15).....	92
Equação (16) .....	109
Equação (17).....	109
Equação (18) .....	109
Equação (19) .....	110
Equação (20).....	151
Equação (21).....	151
Equação (22) .....	156
Equação (23).....	156
Equação (24).....	158
Equação (25) .....	159
Equação (26) .....	159



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu_B$	Magnetons de Bohr
AC	Agente de contraste
AHs	Ácidos húmicos
APS	3-aminopropiltrimetoxisilano
$B_0$	vetor indução magnético estático
$B_1$	vetor indução magnético aplicado
CMC	Carboximetil celulose
CCD	“ <i>charge-couple device</i> ”, tipo de sensor de
câmera	
CoO	óxido de cobalto(II)
Cr	cromo(0) metálico
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	óxido de cromo(III)
Cu(II)	íons cobre(II)
Cu <sub>2</sub> MnAl	ligas de manganês alumínio cobre
CuCl <sub>2</sub>	cloreto de cobre(II)
DE	dietileno
DHI	5,6-dihidroindol
DHICA	5,6-dihidroindol-2-ácido carboxílico
DLS	espalhamento de luz dinâmico
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSA	Ácido dimecarptosucínico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DOPA	dopamina
DRX	difração de raios X
DSC	Calorimetria Diferencial por Varredura
$E_B$	energia de barreira anisotropia
$E_c$	Energia cinética
EDX	Espectroscopia por dispersão de energia
dispersiva de raios X	
$E_l$	Energia de ligação
emu/g	unidade eletromagnética
$E_T$	Energia térmica
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com
atomização em chama	
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Ferro

Fe(acac) <sub>3</sub>	Ferro (III) acetilacetato
Fe(CO) <sub>5</sub>	Ferro pentacarbonila
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	Nitrato de ferro(III)
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	Sulfato de ferro(III)
Fe <sup>2+</sup>	Íon ferro(II)
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Hematita
Fe <sup>3+</sup>	Íon ferro(III)
γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Maghemita
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Magnetita
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Pheo <i>pheomelanina</i>	Nanopartículas de magnetita recobertas por
FeCl <sub>2</sub>	Cloreto ferroso não hidratado
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Cloreto ferroso tetrahidratado
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto ferro(III) anidro
FeCl <sub>3</sub> ·6(H <sub>2</sub> O)	Cloreto férrico hexahidratado
Fe-OH	ferro-hidroxi
Ferro α (CCC) centrado	Ferro alfa fase rede cúbica de corpo
FeS	Sulfeto de ferro
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de ferro(II) heptahidratado
FSN	Síndrome nefrogênica sistêmica
FT-IR	Espectroscopia por infravermelho por
transformada de Fourier	
Gd <sup>3+</sup>	Íon gadolínio(III)
<i>H</i>	Campo magnético aplicado
<i>H<sub>c</sub></i>	Campo coercivo
IRM	imagem por ressonância magnética
IV	intravenosamente
K	Temperatura em Kelvin
<i>k<sub>B</sub></i>	constante de Boltzmann
<i>k<sub>B</sub>T</i>	Energia térmica
kDa	quilodalton
KOH	hidróxido de potássio
LaB <sub>6</sub>	Hexaboreto de lantânio
<i>M</i>	Magnetização espontânea
MCF7	Células de câncer de mama humano
MET	microscopia eletrônica por transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	ferrita
MgAl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	espinélio

Mn	manganês
MnBi	bismuto de manganês
MnO	óxido de managanês
MnS	sulfeto de manganês
MnSe	seleneto de manganês
<i>Mr</i>	Magnetização remanente ou remanência
<i>M<sub>s</sub></i>	Magnetização de saturação
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-
difeniltetrazólio	
<i>M<sub>z</sub></i>	Magnetização no plano longitudinal
NaOH	hidróxido de sódio
NH <sub>4</sub> OH	hidróxido de amônio
NiO	óxido de níquel
NPMs	Nanopartículas magnéticas
NPs	Nanopartículas
O <sub>2</sub>	Oxigênio
°C	Grau Celsius
OLEDs	Diodos orgânicos emissores de luz
P.I	Ponto isoelétrico
PBS	Tampão fosfato salina
PDRX	difração de raios X de pó
PEG	Polietilenoglicol
PEG5-nitroDOPA	Polietilenoglicol nitrodopamina
PEG-b-PVBP	PEG bloco poli(4-vinilbenzilfosfonato)
<i>pH</i>	Potencial de hidrogênio
<i>pKa</i>	constante de dissociação ácida
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinil pirolidona
RES	Sistema endotelial reticular
RF	Radiofrequência
ROI	Região de interesse
SAED	Difração de elétrons da área selecionada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SI	Sistema Internacional
SPIONs	Nanopartículas superparamagnéticas de
óxido de ferro	
<i>T<sub>1</sub></i>	Tempo de relaxamento longitudinal
<i>T<sub>2</sub></i>	Tempo de relaxamento transversal
<i>T<sub>c</sub></i>	Temperatura de Curie

TC	Tomografia computadorizada
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TGA	Análise Termogravimétrica
Tiron	4,5-dihidroxi-1,3-ácido benzenodisulfônico
VME ou Mo	Vetor de magnetização efetivo
VSM	Magnetização por amostra vibrante
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados
por raios X	
$\zeta$	Potencial zeta
$\lambda$	Comprimento de Onda
$\Sigma$	densidade de carga de superfície
$\omega_L$	Frequência de Larmor

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>2 ESTADO DA ARTE.....</b>	<b>32</b>
2.1 NANOMATERIAIS .....	32
2.2 PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DOS MATERIAIS “BULK” E DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO .....	34
2.3 EFEITO DO SUPERPARAMAGNETISMO.....	47
2.4 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ OU $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) .....	51
2.4.1 Decomposição térmica.....	52
2.4.2 Microemulsão.....	Erro! Indicador não definido.
2.4.3 Solvotérmico.....	54
2.4.4 Co-precipitação.....	Erro! Indicador não definido.
2.5 SOLUBILIDADE EM ÁGUA E ESTABILIZAÇÃO DE NPMS POR MOLÉCULAS POLIMÉRICAS .....	59
2.6 DERIVADOS DE CATECÓIS COMO ESTABILIZANTES DE NPS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO .....	63
2.7 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE $\text{Fe}_3\text{O}_4$ PARA APLICAÇÕES MÉDICAS .....	70
2.7.1 Morfologia, fase e determinação do diâmetro de “core” de NPMs (MET, MET-AR, DE, MAV, DRX) .....	71
2.7.2 Caracterização da estrutura química .....	76
2.7.3 Caracterização das propriedades Magnéticas das NPs de óxido de ferro .....	79
2.7.4 Caracterização da Carga da Superfície (potencial zeta) e diâmetro hidrodinâmico.....	84
2.8 TÉCNICA DE IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA [5] .....	86
2.8.1 Tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ) dos prótons (gadolínio) .....	87

2.8.2	Uso dos agentes de contrastes positivos e negativos em IRM .....	90
2.9	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> DAS NPMS DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	96
3	OBJETIVOS.....	99
3.1	ESPECÍFICOS .....	99
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	100
4.1	REAGENTES.....	101
4.3	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) RECOBERTAS POR PHEOMELANINA .....	102
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA .....	104
4.2.1	Análise Elementar .....	104
4.2.2	Análise de Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	104
4.2.3	Análise Termogravimétrica (TGA) .....	105
4.2.4	Espectrometria de energia dispersiva de Raios-X	105
4.2.5	Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Difração de Elétrons de Área Seleccionada (SAED) .....	105
4.2.6	Difração de Raios X de Pó (DRX) .....	106
4.2.7	Medidas de Magnetização por Amostra Vibrante (VSM) .....	106
4.2.8	Medidas de concentração de ferro por FASS.....	107
4.2.9	Técnica de Espectroscopia por Fotoelétrons de Raios X (XPS) .....	107
4.2.10	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta.....	107
4.2.11	Preparação do “phantom” de gel ágar para análises por IRM .....	108
4.2.12	Medidas das características de aquisição de imagem das NPMS em “phantom” gel ágar por IRM.....	108
4.2.13	Ensaio MTT (teste <i>in vitro</i> ) para citotoxicidade contra células MCF-7 .....	110
4.2.14	Ensaio de “uptake” das NPMS de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Pheo com células MCF-7.....	111

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>113</b>
5.1 SÍNTESE DAS NPMS DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ESTABILIZADAS POR <i>PHEOMELANINA</i> (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @PHEO).....	113
5.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DAS NPMS RECOBERTAS POR <i>PHEOMELANINA</i> (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @PHEO).....	114
5.3 ANÁLISE ELEMENTAR (C, H, N, S).....	118
5.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	119
5.5 ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDX).....	121
5.6 ESPECTROMETRIA POR ABSORÇÃO ATÔMICA (FASS).....	121
5.7 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM) E DIFRAÇÃO DE ELÉTRONS DE ÁREA SELECIONADA (SAED).....	122
5.8 DIFRAÇÃO DE ELÉTRONS DE ÁREA SELECIONADA (SAED).....	127
5.9 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓ (DRX).....	130
5.10 ESPECTROSCOPIA POR FOTOELÉTRONS DE RAIOS X (XPS).....	133
5.11 MEDIDAS DE MAGNETIZAÇÃO POR AMOSTRA VIBRANTE (VSM).....	141
5.12 ANÁLISE DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA (Z).....	144
5.13 MEDIDAS DO EFEITO DE REDUÇÃO DO SINAL $T_1$ E $T_2$ POR IRM DAS NPMS DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @PHEO EM “PHANTOM” GEL ÁGAR.....	150
5.14 TEORIA SOBRE O EFEITO DE REDUÇÃO DO SINAL DE $T_2$ NAS NPMS DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @PHEO.....	158
5.15 TESTE <i>IN VITRO</i> DE CITOTOXICIDADE POR MTT DAS NPMS DE Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> RECOBERTAS PELO BIO-OLIGÔMERO <i>PHEOMELANINA</i> .....	167

5.16	TESTE <i>IN VITRO</i> DE “UPTAKE” DAS NPMS DE $\text{Fe}_3\text{O}_4$ RECOBERTAS PELO BIO-OLIGÔMERO <i>PHEOMELANINA</i> .....	168
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>172</b>
6.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	173
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>174</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo, e recebe a denominação de neoplasia especificamente quando se trata de tumores malignos (COLEMAN et al., 2008; SILVA, 2014). Em particular, o câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 1,67 milhões de casos novos dessa neoplasia foram registrados no ano de 2012, em todo o mundo, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres (SILVA, 2014). O câncer de mama constitui a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos, atrás somente do de pulmão, e a maior causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento (SILVA, 2014). E, no Brasil, as maiores incidências de câncer de mama (número de casos / 100.000 habitantes) estão presentes nas regiões Sul e Sudeste (71,0), superando até mesmo a média nacional (56,1) (SILVA, 2014). Nos últimos 40 anos, a sobrevida vem aumentando nos países desenvolvidos e, atualmente, é de 85% em cinco anos, enquanto, nos países em desenvolvimento, permanece com valores entre 50% e 60% (SILVA, 2014). Em comparação com outros tipos de câncer (estômago, pâncreas, intestino), o de mama pode ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente. No entanto, o que se nota, é que as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados (SILVA, 2014). Apesar de a mamografia constituir uma das principais modalidades radiodiagnósticas recomendadas para investigação de câncer de mama (principalmente em mulheres acima de 50 anos), essa técnica é menos sensível para mulheres mais jovens (abaixo de 40 anos) e para aquelas que apresentam predisposição genética com histórico familiar (genes *BRCA1* e *BRCA2*) ao câncer de mama (LORD et al., 2007). Assim, tem sido registrado um aumento do número de casos de câncer de mama em mulheres jovens por apresentarem falsos negativos (4-34%) em exames mamográficos, uma vez que características radiológicas (baixa resolução de contraste) podem não ser detectadas para câncer de mama no estágio precoce desta doença (LEE, C. H.; WEINREB, 2004). Por outro lado, o rastreamento de câncer de mama vem sendo incentivado nos Estados Unidos e Europa nos últimos anos com o uso complementar da técnica de imagem por

ressonância magnética (IRM) (APTE et al., 2013) especialmente para mulheres de alto risco por apresentar melhor sensibilidade de detecção quando adicionado com mamografia (> 90%) (LORD et al., 2007). Sendo assim, a investigação de tumores primários é feita por IRM, e o método empregado é pela pesquisa do linfonodo sentinela (SESTIER et al., 2002) para detecção precoce de câncer de mama e outros órgãos. Utilizam-se agentes de contrastes (ACs), que são complexos de gadolínio ( $Gd^{3+}$ ), estabilizados por quelatos a fim de que esses quando injetados intravenosamente no paciente, possam auxiliar no exame de IRM, para realçamento do contraste da imagem nos tecidos da mama (CARAVAN, 2006; LEE, N.; HYEON, 2012; PETER CARAVAN, 1999). No entanto, o uso de AC à base de gadolínio para a investigação de tumores primários de mama apresenta certa limitação, por não ser específico uma vez que este permite o realce no contraste (diminui o tempo de relaxamento longitudinal  $T_1$ ) de forma generalizada para patologias e inflamações, indicando falsos positivos para tumores de mama (CARAVAN, 2006). Além disso, em 2007, o FDA emitiu um alerta a comunidade médica referente aos ACs de IRM à base de gadolínio que eram responsáveis pela síndrome nefrogênica sistêmica (FSN), causada por um processo associado à toxicidade desse lantanídeo em pacientes que apresentam a função renal diminuída ou debilitada, devido ao comprometimento em sua excreção (PENFIELD; REILLY, 2007).

Em função da limitação na detecção de tumores primários com ACs com quelatos de  $Gd^{3+}$ , o FDA liberou há dez anos o uso de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (conhecidas do inglês “SPIONS”) recobertas por polímeros para pesquisas e testes clínicos nos Estados Unidos e Europa como ACs de IRM para investigação de tumores malignos (YOFFE et al., 2013). As NPs superparamagnéticas de óxido de ferro podem ser projetadas para serem “direcionadas” a tecidos biológicos específicos (ZHANG, L. et al., 2007) ou tumores malignos, a fim de atuar como AC realçadores com precisão, principalmente quando ligados a receptores ou agentes biológicos (ZHANG, L. et al., 2007). Ao contrário dos compostos de  $Gd^{3+}$ , as “SPIONS” são metabolizadas pelo organismo por meio de proteínas transportadoras de ferro presentes no plasma sanguíneo e armazenado na forma de ferritina (GROTTO, 2008). Estas “SPIONS” geralmente são constituídas por núcleos de óxido de Fe (magnetita,  $Fe_3O_4$ , ou maghemita,  $\gamma Fe_2O_3$ ) e podem ser recobertas com polímeros biocompatíveis, tornando-se um ferro fluído ou fluído magnético (REDDY et al., 2012a), (VEISEH et al., 2010), (XU, H. et al., 2007) constituído de inúmeros ligantes.

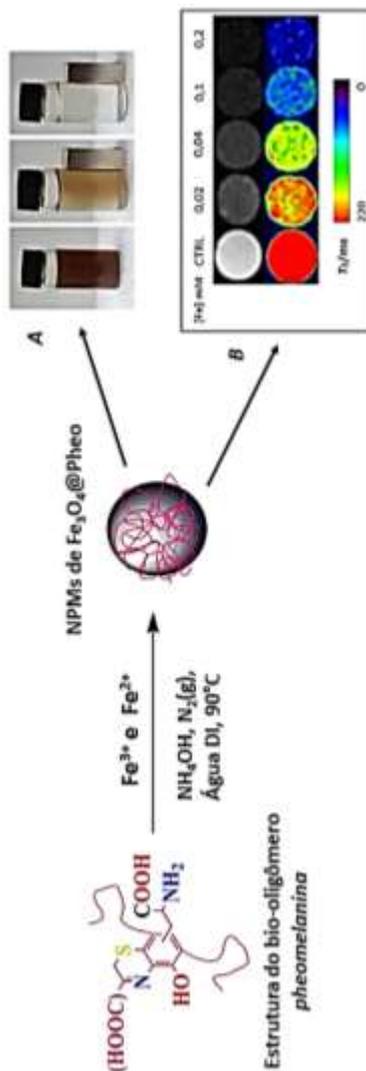
Dentre estes ligantes, a literatura destaca como material de recobrimento de “SPIONS” de magnetita e maghemita: álcool polivinílico (PVA), dextrana, carboxidextrana (EASO; MOHANAN, 2013a), quitosana e polietileno glicol (PEG); (RUIZ-HERNÁNDEZ et al., 2008), (GUPTA; GUPTA, 2005), (KIM, J. Y.; HARISINGHANI, 2004). Estes apresentam a menor citotoxicidade, são hidrofílicos, permitem maior tempo de circulação sanguínea, boa biocompatibilidade e menor chance de gerar algum efeito de imunogenicidade, podendo ser testados facilmente *in vitro* e *in vivo* em modelos animais (REDDY et al., 2012a).

Dentro desse contexto, a proposta da tese é justificada pela grande atenção dada pela comunidade científica em Nanomedicina, na produção de sondas tumorais de IRM com a aplicação de nanomateriais para diagnóstico do câncer de mama usando materiais de recobrimento que satisfaçam as condições apresentadas anteriormente (TEJA; KOH, 2009).

É importante considerar que o grupo de pesquisa do laboratório do professor Szpoganicz vem trabalhando há mais de dez anos com compostos de melanina e ácido húmico, onde registram estudos a respeito da interação entre metais divalentes (Zn(II) e Cu(II) e trivalentes (Fe(III)) com os bio-oligômeros contendo os seguintes grupos: catecol, ácido carboxílico, quinona-imina (COSTA et al., 2012; SZPOGANICZ et al., 2002; THIAGO G. COSTAA, 2015). As melaninas responsáveis pela coloração escura de pele e cabelos são chamadas de *eumelaninas*, e aquelas responsáveis pelas colorações mais claras são chamadas de *pheomelaninas*, onde também são encontrados grupamentos contendo enxofre como tióis e tiofenóis (TONG YE, 2008). Uma vez que estudos anteriores (THIAGO G. COSTAA, 2015) mostraram que é possível realizar modificações químicas que permitam às melaninas diversas funções e características únicas como quelação seletiva de íons metálicos, atividades antioxidantes distintas, diferentes solubilidades em água, a *pheomelanina* se apresentou como potencial material estabilizante atendendo às características hidrofílicas e de biocompatibilidade para aplicações biomédicas.

Sendo assim, estabeleceu-se como desafio (Figura 1) e como proposta inédita a síntese de nanopartículas superparamagnéticas de  $Fe_3O_4$  utilizando como material de recobrimento o bio-oligômero *pheomelanina*. De modo que o método de preparação das nanopartículas magnéticas (NPMs) rotuladas  $Fe_3O_4@Pheo$  a ser escolhido foi o de coprecipitação por apresentar-se como uma metodologia envolvendo síntese em meio aquoso utilizando procedimentos ambientalmente favoráveis uma vez que dispensou o uso de solventes orgânicos. A outra razão é por

dispensar etapas mais demoradas ou complexas de síntese, possibilitar um elevado rendimento e apresentar relativo controle de tamanho das NPs. De modo que para os propósitos biomédicos e farmacêuticos, plataformas magnéticas devem atender a certas exigências: tamanho muito reduzido (abaixo de 20 nm, (TEJA; KOH, 2009), valor elevado de magnetização de saturação ( $M_s$ ), coercividade nula, serem hidrossolúveis. Dessa forma, essas nanopartículas puderam ser projetadas para atuar como um agente de contraste (AC) negativo (redução do tempo de relaxação transversal  $T_2$ ) para células de câncer de mama humano (MCF7).



**Figura 1** - Esquema ilustrativo da proposta da tese envolvendo (A) a preparação de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* e (B) o efeito da redução de tempo de relaxação transversal  $T_2$  utilizado como AC negativo de IRM para diagnóstico de câncer de mama.

## 2 ESTADO DA ARTE

### 2.1 NANOMATERIAIS

Basicamente consideramos um material toda substância que apresenta propriedades óticas, magnéticas, mecânicas, catalíticas, elétricas etc. e que a ele está conferida uma função em particular. Tomando como um exemplo, o ferro (Fe), pertencente ao grupo 8B da tabela periódica, constitui um metal de transição bivalente (Fe(II) e trivalente (Fe(III))) (SHRIVER, 1999). Esse metal pode formar complexos quelatos e é facilmente identificado por formar soluções coloridas, além de exibir propriedades acentuadas de magnetismo. Em consequência de seu comportamento químico, o ferro dificilmente é encontrado na forma livre na natureza, e é apresentado geralmente na forma de pirita FeS, hematita Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e magnetita Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (VOGEL, 1981). Além disso, a importância biológica do ferro está associada ao transporte de oxigênio para as células, estando presente nas hemácias (responsáveis pela coloração vermelha do sangue) formadas pelas moléculas de hemoglobina que contêm este elemento (LEHNINGER, 1995).

Na busca de um material novo a ser fabricado, Zarbin (ZARBIN, 2007) destaca que a Química de Materiais se encarrega primeiramente de compreender qual é a propriedade que o material deve possuir (no caso particular do ferro, o ferromagnetismo), para que seja usado em determinada aplicação especial (dispositivos magnéticos). E a partir desta escolha inicial, infere-se a respeito da composição química e da propriedade que o material deverá possuir para tal fim. Assim, procedem-se as investigações a respeito da rota de preparação (síntese) capaz de produzir com a máxima eficiência aquele material que atenderá às características estruturais e composição química desejadas.

A Nanoquímica foi criada por volta do início da década de 1990, como a área que define a utilização de todo o conhecimento (teórico e prático) em Química para preparar, caracterizar e estudar as propriedades e aplicações de nanomateriais em diferentes tamanhos, formas, composições, estruturas, cargas e funcionalidades, com rigoroso controle de cada um destes parâmetros. Uma vez que todas as propriedades dos nanomateriais exibidas (óticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas etc.), da forma pela qual as conhecemos, manifestam-se a partir de um determinado tamanho, chamado de crítico, pode-se afirmar que a Nanoquímica acabou rompendo o paradigma apresentado pela Química

de Materiais. Isso significa dizer que nanomateriais são materiais cujas dimensões na faixa de 1 a 100 nm exibem propriedades químicas e físicas diferentes dos mesmos materiais em dimensões “bulk” ou massivos, volumosos. Por exemplo, o tamanho crítico para propriedades óticas de um determinado nanomaterial pode ser 20 nm, enquanto que para as propriedades magnéticas pode ser 80 nm. Além disso, quando abaixo do tamanho crítico, as propriedades do material dependem também da forma das partículas, ou seja, nanopartículas esféricas com diâmetro de 5 nm têm propriedades diferentes daquelas encontradas para o mesmo material, porém, na forma de bastão com 5 nm de comprimento. Muito antes de surgirem os primeiros trabalhos associados à produção de nanomateriais, cerca de quase 50 anos atrás, foi o Físico Norte-Americano Richard Feymann quem previu que a nanotecnologia futuramente iria despontar como uma das descobertas científicas mais revolucionárias na sociedade envolvendo a preparação de materiais em escala atômica e molecular que levaria mais tarde à construção de novos dispositivos tecnológicos (FEYMANN, 1960), tais como sistemas OLEDs, nanosensores, cosméticos e peças no setor automobilístico mais leves, e resistentes ao calor ou ao tempo de uso etc.

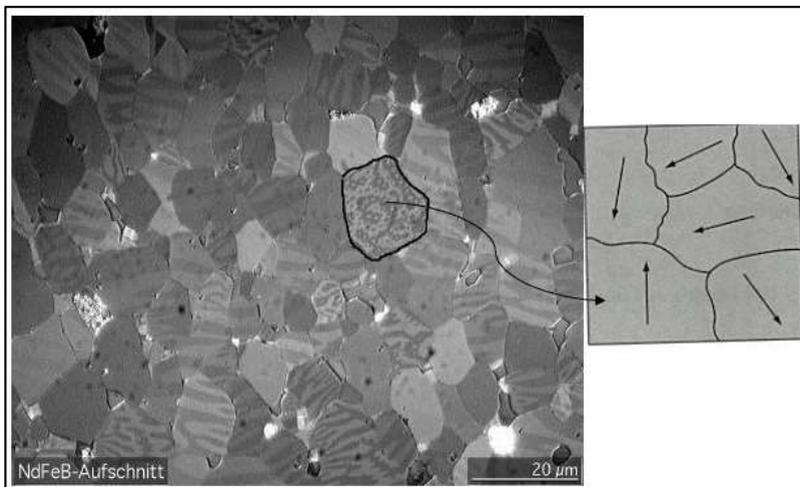
Particularmente, há duas décadas muitos pesquisadores na área de Nanoquímica vêm desenvolvendo estudos com a preparação de nanopartículas magnéticas (principalmente magnetita) e um estudo clássico presente na literatura é o da bactéria magnetotática, que se alinha ao campo magnético da Terra por meio de grãos de magnetita que são produzidos no seu interior por um processo físico denominado de biomineralização (EFFENBERGER, 2012). Além disso, as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (II e III) nos últimos dez anos têm sido extensivamente estudadas para aplicações biomédicas, tais como magneto hipertermia, “*drug-delivery*”, biosensores, separação de proteínas e principalmente como agentes de contrastes (ACs) para IRM.

## 2.2 PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DOS MATERIAIS “BULK” E DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO

O que pode justificar o crescente estudo e desenvolvimento de pesquisas associadas às nanopartículas de óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) para diversas aplicações tecnológicas por pesquisadores é o seu caráter associado ao tamanho crítico das partículas exibindo a propriedade de superparamagnetismo. Esse efeito constitui uma condição diferenciada das nanopartículas em relação aos materiais magnéticos “bulk” (K.THANH, 2012; LEE, N.; HYEON, 2012; SERGE YOFFE, 2013) e permite que sejam aplicados em diversos setores da sociedade contemporânea.

Porém, para compreender o superparamagnetismo, é necessário antes ter clareza a respeito das principais diferenças encontradas nas propriedades magnéticas entre os materiais tipo “bulk” e as nanopartículas metálicas ou óxidos metálicos que podem apresentar tamanhos de dezenas de nanômetros ( $10^{-9}$  m).

Primeiramente, materiais ferromagnéticos na dimensão de “bulk”, tais como, ferro, níquel, cobalto e alguns terras raras (gadolínio, disprósio) exibem uma magnetização espontânea (AMSTAD et al.), devido ao forte ordenamento dos *spins* dos elétrons desemparelhados do momento dipolar atômico que se alinham paralelamente entre eles, constituindo um vetor de magnetização efetivo (VME ou  $M_0$ ). Mesmo após a retirada desse campo magnético aplicado ( $H$ ) na presença do material, nota-se que o alinhamento desses momentos dipolos magnéticos se mantém em uma região chamada de *domínio magnético* (CULLITY, 2002) e a teoria de Weiss de ferromagnetismo apontou a existência de multidomínios, como é mostrado na Figura 2, sendo que cada um dos domínios magnéticos pode apresentar diferentes orientações dos seus VMEs. Nota-se também que dentro do domínio, o campo magnético é intenso e, em uma amostra “bulk”, o material será geralmente desmagnetizado porque os muitos domínios irão se cancelar entre si, devido à condição de buscar a energia livre mínima de equilíbrio do sistema (KITTEL, 1978).



**Figura 2** - Presença de domínios magnéticos em ímãs de elevado campo magnético construídos de neodímio-ferro-boro (Nd-Fe-B). (Adptação da referência (K.THANH, 2012)).

De acordo com a literatura (MORRISH, 1965), a energia livre total de um material ferromagnético devido ao alinhamento e ordenamento dos *spins* dos elétrons dos átomos de ferro, por exemplo, é composta por um conjunto de vários termos de energia livre  $F$ , sendo dada pela Equação (1):

$$F_T = F_H + F_D + F_K + F_\sigma + F_e + F_0 \quad (1)$$

Onde  $F_T$  é a energia livre total dos espécimes ferromagnéticos em um campo magnético aplicado  $H$ , e o primeiro termo,  $F_H$ , corresponde à energia de magnetização das mesmas no campo  $H$ . O segundo termo,  $F_D$ , é autoenergia da magnetização do próprio campo ou energia magnetoestática, devido à interação do campo magnético criado pela magnetização em alguma parte da amostra nas outras partes da mesma amostra, e a redução dessa energia implica principalmente na criação de domínios magnéticos. O terceiro termo,  $F_K$ , corresponde à energia de anisotropia cristalina e está associado a uma condição experimental onde é observada que a magnetização espontânea ( $M$ ) dos materiais ferromagnéticos tende a permanecer ao longo de certos eixos cristalográficos, denominados de *eixos fáceis* preferencialmente ocorrendo em cristais de simetria cúbica (KITTEL, 1978). O quarto

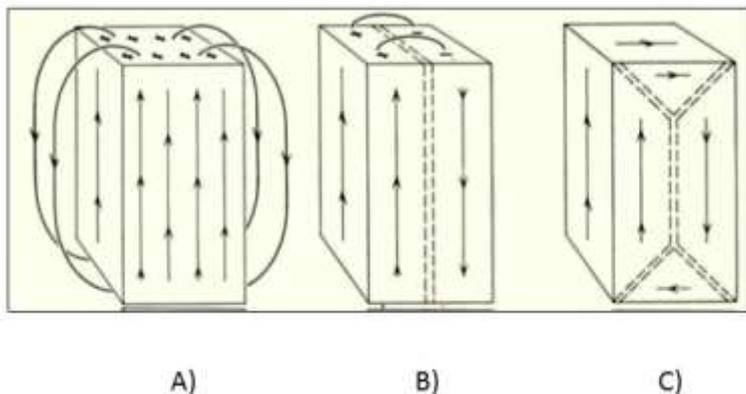
termo,  $F_{\sigma}$ , indica a energia magnetoestrutiva ou de anisotropia magnetoelástica e corresponde a uma sútil mudança nas dimensões ou na forma do cristal quando magnetizado, e esse fenômeno foi observado por Joule em 1842. O sexto termo,  $F_e$ , é dado pela energia livre de troca e representa o modo como o acoplamento dos *spins* dos elétrons entre pares de átomos em uma rede cristalina ocorre (MORRISH, 1965), sendo que matematicamente é possível expressar uma Hamiltoniana de energia que descreve como se dá essa interação entre seus pares de átomos vizinhos de acordo com a Equação (2).

$$H = -2 \sum J_{ij} \cdot S_i \cdot S_j \quad (2)$$

Onde  $J_{ij}$  corresponde à constante de troca de Heisenberg para os dois elétrons de cada átomo,  $S_i$  e  $S_j$  correspondem respectivamente à soma total dos *spins* dos átomos localizados na posição  $i$  e  $j$  da rede cristalina de um material magnético.

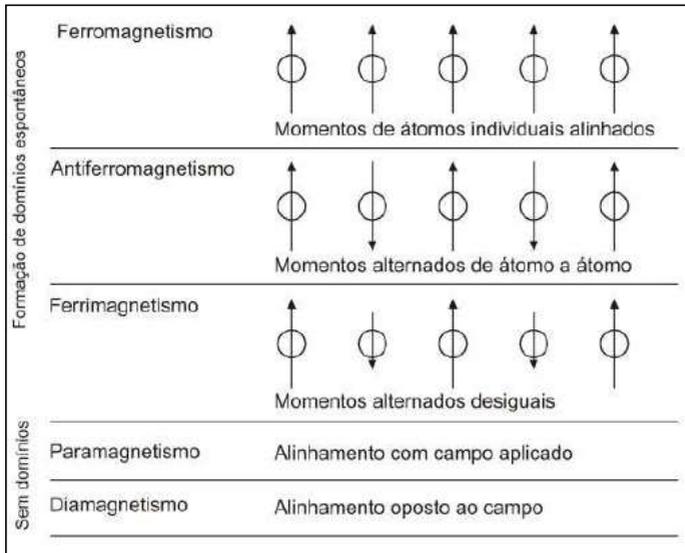
Por fim, o último termo da equação (1),  $F_0$ , representa qualquer contribuição associada à energia livre total, por exemplo, a presença de defeitos ou não-homogeneidade do material cristalino.

Desse modo materiais ferromagnéticos “*bulk*”, tais como ferro, cobalto e níquel tendem a minimizar sua energia interna por desdobrar espontaneamente os seus domínios magnéticos em duas ou mais regiões de contorno entre dois (Figura 3b) ou mais arranjos (Figura 3c) para seus momentos de dipolos magnéticos, denominados *paredes de domínios*. Por outro lado, pode ser mostrada que a energia livre total  $F_T$  para os dois domínios é geralmente menor que para um simples domínio (Figura 3a), devido à presença da energia livre associada à energia magnetostática  $F_D$ . (MORRISH, 1965)



**Figura 3** - Algumas configurações hipotéticas de domínios magnéticos de material “bulk” ferromagnético e na condição de monodomínio (A) em constituindo as paredes de domínios (B) e (C) (imagem adaptada da referência (MORRISH, 1965)).

Então, o comportamento magnético dos materiais é dado pelo vetor de magnetização efetiva (VME ou  $M_o$ ), que representa o somatório dos momentos de dipolos magnéticos dentro dos domínios magnéticos dos seus átomos individuais ou de seus vizinhos, conforme é descrito na Figura 4.



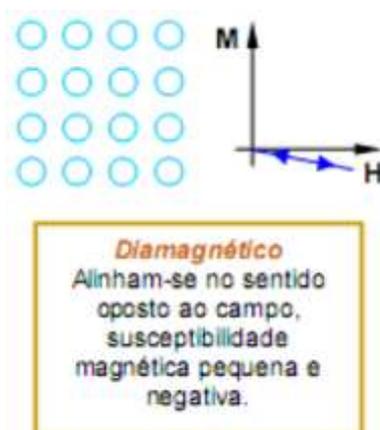
**Figura 4** - Diferentes comportamentos dos momentos de dipolos magnéticos representando os cinco tipos de propriedades magnéticas dos materiais (adaptado de (CUNHA, 2014)).

Dessa forma, experimentalmente é possível determinar os cinco tipos principais de propriedades magnéticas dos materiais “bulk” ao exibir magnetização espontânea ( $M$ ) zero (diamagnetismo indicado na Fig.5), transitória (paramagnetismo indicado na Fig.6) ou permanente (ferromagnetismo, ferrimagnetismo e antiferromagnetismo indicados na Fig.7) em função de um campo magnético aplicado  $H$ , dado pelo comportamento das curvas de magnetização indicada pela histerese magnética. Além disso, a magnetização pode ser entendida como momento magnético dividido pela unidade de volume do material, ou associada a uma característica intrínseca de todo material, sua susceptibilidade magnética  $\chi$  ((MORRISH, 1965), é dada pela equação 3.

$$\chi = M / H \quad (3)$$

Materiais diamagnéticos são aqueles que não possuem dipolos magnéticos permanentes, ou seja, cujos átomos têm camadas eletrônicas completas. E assim, a magnitude do momento magnético induzido pelo campo externo é extremamente pequena e sua direção é oposta à direção do campo aplicado  $H$  e apresentam susceptibilidade magnética  $\chi$  na faixa

de  $-10^{-6}$  a  $-10^{-5}$ , a qual não varia com a temperatura e seu comportamento está descrito na Fig.5. São diamagnéticos os gases inertes, muitos metais, elementos não metálicos (B, Si, P e S), muitos íons e seus sais, moléculas diatômicas ( $H_2$  e  $N_2$ ), compostos orgânicos e água (LORRAIN; KOUTCHMY, 1998).



**Figura 5** - Gráfico da susceptibilidade  $\chi$  para os materiais diamagnéticos em que a magnetização  $M$  apresenta comportamento inverso e negativo à direção do campo magnético aplicado  $H$ .(CUNHA, 2014)

Nos materiais paramagnéticos, os átomos individuais possuem momentos magnéticos, mas suas orientações ao acaso resultam em magnetização nula para um grupo de átomos. Por isso, os materiais paramagnéticos têm susceptibilidade magnética positiva, com ordem de grandeza entre  $+10^{-5}$  e  $+10^{-3}$  (SI), e exibem magnetização transitória de acordo com a Figura 6. A tendência ao alinhamento encontra oposição na agitação térmica, assim, a susceptibilidade paramagnética  $\chi$  é inversamente proporcional à temperatura ( $T$ ) (CUNHA, 2014). O paramagnetismo pode ser observado em numerosos materiais, tais como: alguns metais (por exemplo, Cr e Mn), alguns gases diatômicos (por exemplo,  $O_2$  e NO), íons de metais de transição, terras raras e seus sais e óxidos de terras raras (CUNHA, 2014).



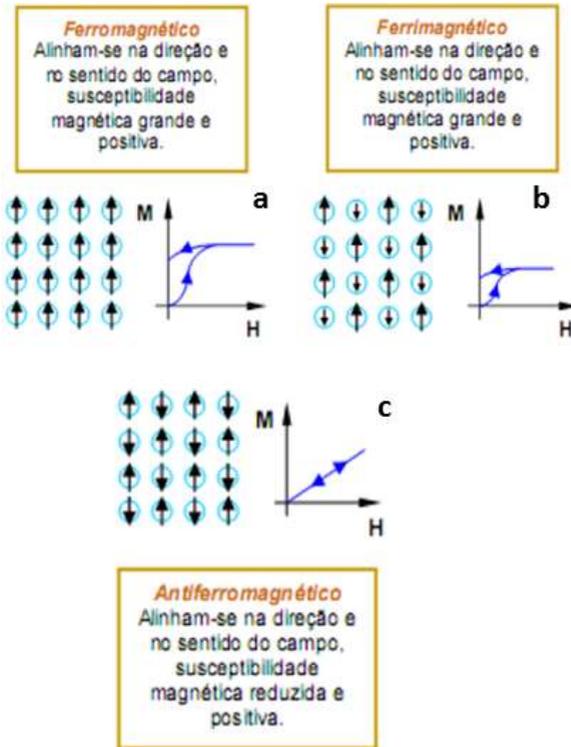
**Figura 6** - Gráfico da susceptibilidade  $\chi$  para os materiais paramagnéticos em que a magnetização  $M$  apresenta comportamento transitório e a magnetização efetiva ( $M_0$ ) é zero quando se retira o campo magnético  $H$ . (CUNHA, 2014)

Já os materiais ferromagnéticos possuem uma característica marcante que é conhecida como magnetização espontânea  $M$ , ou seja, eles apresentam uma magnetização não nula, mesmo na ausência de campo externo aplicado  $H$ , (RIFFLE et al., 2002), (SINNECKER et al., 2000). Nos materiais ferromagnéticos, os *spins* estão todos alinhados numa dada direção, mesmo na ausência de um campo externo  $H$ , e podem apresentar valores de  $\chi$  tão elevados como  $10^6$  (cerca de 1 bilhão de vezes superior aos paramagnéticos). Além disso, a magnetização espontânea  $M$  em materiais ferromagnéticos acaba atingindo um máximo para  $T = 0$  K, e cai a zero para uma temperatura  $T_c$ , denominada de temperatura de Curie, acima da qual estes materiais tornam-se paramagnéticos (BHANDARY; CULLITY, 1962). Os principais exemplos de materiais ferromagnéticos são: ferro  $\alpha$  (CCC), cobalto, níquel e gadolínio. Algumas ligas e compostos de manganês, tais como  $MnBi$  e  $Cu_2MnAl$ , também apresentam ferromagnetismo, (SINNECKER et al., 2000).

O antiferromagnetismo, como o ferromagnetismo, é originado pela interação entre os *spins* (denominada interação de troca), mas esta tende a alinhar os momentos magnéticos (*spins*) em direções opostas, assim os momentos vizinhos se cancelam mutuamente (Figura 7). O comportamento da magnetização em função do campo é semelhante a de

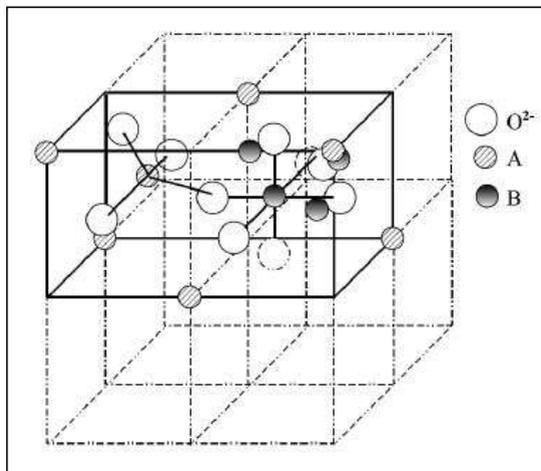
um paramagneto, mas as origens deste comportamento para um antiferromagneto são totalmente diferentes, pois este é um estado ordenado de longo alcance, enquanto o paramagnetismo é um estado desordenado (KITTEL, 1978). Vários compostos de metais de transição apresentam comportamento antiferromagnético:  $MnO$ ,  $CoO$ ,  $NiO$ ,  $Cr_2O_3$ ,  $MnS$ ,  $MnSe$  e  $CuCl_2$  (MORRISH, 1965). A susceptibilidade dos materiais antiferromagnéticos é da mesma ordem de grandeza dos materiais paramagnéticos e diminui com o aumento de temperatura (RIFFLE et al., 2002).

Assim como os materiais antiferromagnéticos, os ferrimagnéticos também apresentam forças entre os átomos adjacentes que forçam os momentos de dipolos magnéticos atômicos a se alinharem de modo antiparalelo, porém, os momentos não são iguais (Figura 7). Este tipo de material apresenta uma forte resposta a campos magnéticos externos, como é o caso dos óxidos de ferro, tais como a magnetita e as ferritas de cobalto e níquel (MORRISH, 1965). Os materiais ferrimagnéticos também apresentam temperatura crítica, denominada temperatura de Curie ( $T_c$ ), ou seja, com o aumento da temperatura o material passa para o estado paramagnético. E em particular, a magnetita ( $Fe_3O_4$ ) na forma “bulk” é ferrimagnética entre a temperatura de Curie,  $\Theta_C \approx 850\text{ K}$  ( $585^\circ\text{C}$ ) (FLÁVIA DOS SANTOS COELHO, 2005). A susceptibilidade dos materiais ferrimagnéticos é da mesma ordem de grandeza dos materiais ferromagnéticos e diminui com o aumento de temperatura.



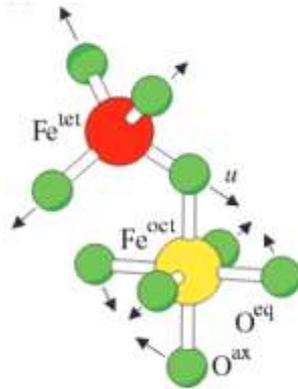
**Figura 7** - Gráfico da susceptibilidade  $\chi$  para os materiais ferromagnéticos (ferro, cobalto, níquel etc.) (a), ferrimagnéticos (óxido de ferro) (b) e antiferromagnético (c) em que a magnetização  $M$  apresenta comportamento elevado e positivo à direção do campo magnético aplicado  $H$ . (CUNHA, 2014)

As ferritas podem ser representadas pela fórmula geral  $MFe_2O_4$ , onde  $M$  é um elemento metálico divalente ( $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  etc). A estrutura cristalina das ferritas é do tipo espinélio, inicialmente descrita no caso do mineral  $MgAl_2O_4$ , (K.THANH, 2012) no qual os íons alumínio ( $Al^{3+}$ ) ocupam os sítios octaédricos e os íons magnésio ( $Mg^{2+}$ ) os sítios tetraédricos de uma estrutura de simetria cúbica do tipo face centrada (fcc), conforme ilustrada na Figura 8.



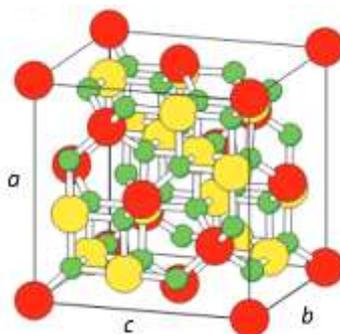
**Figura 8** - Estrutura cristalina da célula unitária (cfc) do spinélio, onde A: ocupação sítio tetraédrico  $Mg^{2+}$  e B: ocupação sítio octaédrico  $Al^{3+}$  (FERREIRA, 2009).

Dependendo do tipo de íons ( $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  etc.), conforme dito anteriormente, o espinélio pode ser classificado como direto, inverso ou misto. No caso especial, em um espinélio inverso, os íons metálicos divalentes  $M^{2+}$  ocupam uma parte dos interstícios octaédricos (B), os íons  $Fe^{3+}$  a outra parte e também os interstícios tetraédricos (A). No estado ferrimagnético da magnetita, os momentos magnéticos dos átomos de ferro nos sítios tetraédrico e octaédrico são alinhados antiparalelamente. No entanto, no sítio octaédrico há duas vezes mais átomos de ferro que no sítio tetraédrico, o que induz o aparecimento de um momento magnético efetivo (FLÁVIA DOS SANTOS COELHO, 2005). Logo, na estrutura cúbica da magnetita, conforme mostra a Figura 9, o cátion  $Fe^{2+}$  ocupa interstícios octaédricos e o cátion  $Fe^{3+}$  ocupa os interstícios tetraédricos e octaédricos, sendo que o ânion  $O^{2-}$  é magneticamente neutro.



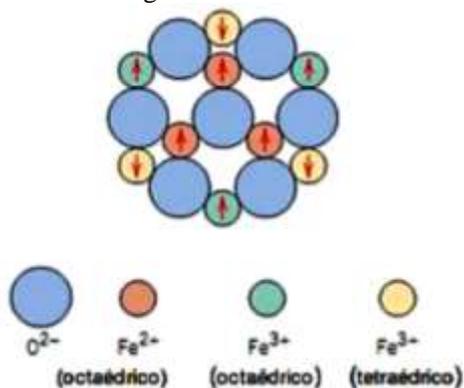
**Figura 9** - Em destaque os cátions  $\text{Fe}^{3+}$  ocupando os sítios tetraédricos (vermelho) adjacente aos cátions  $\text{Fe}^{3+}$  ocupando os sítios octaédricos (amarelo) compartilhando um átomo de oxigênio para a estrutura da magnetita de acordo com a referência (FRIÁK; SCHINDLMAYR; SCHEFFLER, 2007).

Então, cada um dos sítios da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) pode formar uma sub-rede magnética dada pelos seus *spins*. Por outro lado, na maghemita, os íons ferro são distribuídos nos sítios octaédricos (Oh) e tetraédricos (Td) da estrutura espinélio, mas a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) difere da magnetita pela presença de vacâncias catiônicas dentro do sítio octaédrico (LAURENT, S. et al., 2008). Então, a descrição da estrutura cristalina da ferrita de  $\text{Fe}^{2+}$  tipo magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , e a fórmula cristalográfica que melhor representa as nanopartículas em estudo, e apresenta estrutura cúbica do spinélio inverso (FRIÁK et al., 2007), (FERREIRA, 2009) e seu grupo espacial Fd3m com um parâmetro de rede de 8,394 Å é mostrada na Figura 10.



**Figura 10** - A estrutura cristalina da célula unitária cúbica de face centrada (cfc) do espinélio da magnetita (Adaptada de (FRIÁK et al., 2007)). Em vermelho, estão os íons de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  ocupando os sítios tetraédricos e em amarelo, os íons de  $\text{Fe}^{3+}$  ocupando os sítios octaédricos.

Além disso, é fácil notar que os íons  $\text{Fe}^{3+}$  nas posições octaédricas e tetraédricas, e em temperatura ambiente apresentam ordenamento de seus spins alinhados antiparalelamente e permitem o acoplamento antiferromagnético pela constante interação de troca ( $J$ ) conforme apresentado anteriormente na Figura 4 anulando os seus *spins* entre seus átomos vizinhos, e deixando dois spins desemparelhados apontando no sentido contrário dos átomos de  $\text{Fe}^{2+}$  no sítio octaédrico na sub-rede magnética conforme mostra a Fig.11.



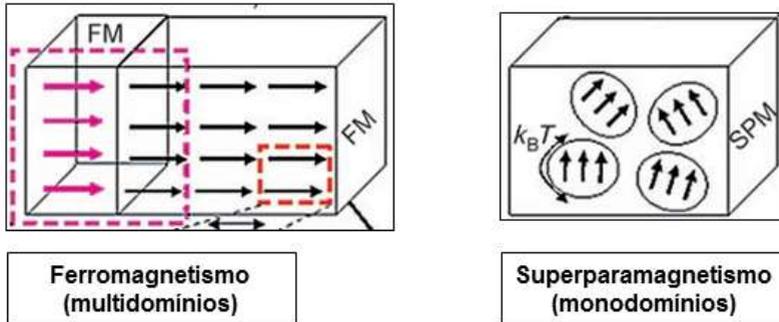
**Figura 11** - Ilustração esquemática apontando o comportamento dos momentos magnéticos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Adaptado de (CUNHA, 2014)).

Isso resulta em um momento dipolo magnético de  $4,0 \mu_B$  ( $\mu_B =$  magnétons de Bohr) (MORRISH, 1965). No entanto, nota-se que os sítios restantes dos íons  $Fe^{2+}$  residem nos interstícios octaédricos, sendo estes íons responsáveis pela magnetização espontânea ( $M$ ), ou, ainda, pelo comportamento magnético do material, exibindo o ferrimagnetismo, conforme pode ser visto na Figura 11, uma vez que deixa vacâncias nos interstícios tetraédricos, permitindo que haja interações dos *spins* magnéticos em direções paralelas, resultando em magnetização total não nula.

No entanto, atualmente o maior interesse envolvendo nanopartículas de  $Fe_3O_4$  (magnetita) reside no fato de que elas apresentam um efeito denominado superparamagnetismo, que será discutido agora.

### 2.3 EFEITO DO SUPERPARAMAGNETISMO

Conforme visto anteriormente, materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos possuem uma característica marcante que é conhecida como magnetização espontânea, exibindo estados ordenados com multidomínios magnéticos. A existência de múltiplos domínios contribui para reduzir a energia livre do sistema, correspondendo à energia magnetostática,  $F_D$  (MORRISH, 1965). Por outro lado, considerando que materiais ferromagnéticos sejam reduzidos em tamanho das partículas com dimensões menores que um domínio magnético (cerca de 0,05  $\mu\text{m}$ ), estas deixam de apresentar o comportamento ferromagnético e passam a exibir o efeito de superparamagnetismo (LUIZ C. A. OLIVEIRA, 2013). Este efeito foi destacado por Chubukov (CHUBUKOV; FRENKEL, 1995), segundo o qual uma partícula de material ferromagnético, abaixo de um tamanho de partícula crítico (abaixo de 15 nm) apresentaria um monodomínio magnético ou “*single-domain*”, ou seja, uma partícula com um estado de magnetização uniforme em qualquer campo. Isso significa afirmar que nessa condição, a quantidade de energia para produzir a parede de domínio se torna maior do que a redução da energia magnetostática, desfavorecendo a formação de multidomínios. Logo, nanopartículas de magnetita com um diâmetro inferior ao crítico, apresentam apenas um domínio magnético (monodomínio). Assim, todos os momentos dipolos magnéticos de cada átomo presente no domínio, acabam se somando ( $\mu = \mu_{\text{at}} \cdot N$ , onde  $\mu$  é o momento magnético e  $N$  é o número de átomos magnéticos), constituindo um momento de dipolo magnético muito maior que os momentos magnéticos atômicos individuais, dando origem ao termo superparamagneto (EFFENBERGER, 2012) onde a Figura 12 aponta esse efeito observado.



**Figura 12** - Diferentes comportamentos magnéticos apresentados por materiais “bulk” ferromagnéticos e nanopartículas superparamagnéticas (LEE, N.; HYEON, 2012).

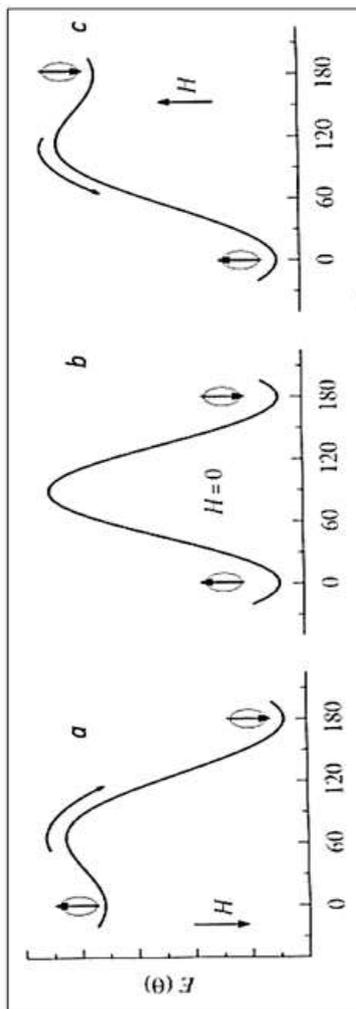
A direção dos momentos dipolares magnéticos  $\mu$  é determinada por uma energia anisotropia uniaxial,  $E(\theta)$ , a qual significa que os estados de orientação de seus *spins* dados pelo seu vetor de magnetização efetivo ( $M_0$ ) em uma nanopartícula são separados através de uma barreira de energia. Isso indica que esta energia tende a manter a magnetização em uma direção cristalográfica particular, chamada *direção fácil* ou *eixo fácil* (KITTEL, 1978). Mais precisamente falando, a direção fácil dita onde a magnetização  $M$  irá apontar de forma espontânea na ausência do campo magnético aplicado  $H$  e está associada com uma constante de anisotropia magnetocristalina que depende de estrutura do cristal, dada por  $K$  conforme a Equação (4).

$$E(\theta) = V(K_0 + K_1 \sin^2 \theta + K_2 \sin^4 \theta + \dots) \quad (4)$$

Aí temos que  $\theta$  é o ângulo formado entre a magnetização  $M$  e o *eixo fácil* de anisotropia e  $V$  é o volume das nanopartículas. E, considerando o caso para as nanopartículas magnéticas de magnetita com anisotropia uniaxial, a energia  $E(\theta)$  fica simplificada na seguinte expressão, de acordo com a Equação (5).

$$E_B = KV \quad (5)$$

De modo que é possível estabelecer três perfis no estado de orientação dos *spins* de uma partícula quando sujeita à ação de um campo magnético aplicado  $H$  conforme pode ser visto na Figura 13.



**Figura 13** - Mudança da magnetização  $M$  em uma partícula através da barreira de energia de anisotropia sob a ação de um campo magnético aplicado  $H$  (a) apontando para baixo, (b) nenhum campo e (c) apontando para cima. (K.THANH, 2012).

Então, após a aplicação de um campo  $H$  para baixo ou para cima (Figura 13a e Figura 13c) se o estado de orientação aponta na direção do campo, torna-se energeticamente favorável e o sistema irá consequentemente mudar sua configuração para “*spin-down*” ou “*spin-*

*up*”, respectivamente. Por outro lado, após a remoção do campo ( $H=0$ ), o sistema irá retornar ao equilíbrio fazendo com que a partícula possa apresentar duas possíveis configurações (Figura 13b) (K.THANH, 2012). E se a partícula apresentar um tamanho reduzido a ponto de demonstrar dimensão de uma nanopartícula de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) com um monodomínio, então em  $H = 0$ , o tamanho crítico da nanopartícula será tal que a energia térmica ( $k_B T$ ) irá superar a energia de barreira anisotropia  $E_B$  causando na magnetização  $M$ , uma flutuação de um estado de orientação para outro, conforme a equação (6) indica. Uma vez que cada partícula possui um tempo de relaxamento característico que é essencialmente o tempo médio para reverter o momento magnético de um mínimo de energia para outro, conforme Figura 13b, denominado de tempo de relaxamento  $\tau$  de Néel-Arrhenius (EFFENBERGER, 2012)

$$\tau = \tau_0 \exp(E_B / k_B T) \quad (6)$$

Aí temos que  $\tau$  é o tempo de relaxamento de Néel-Brown,  $E_B$  é a barreira de energia de anisotropia ( $\approx KV$ ) que separa diferentes configurações angulares de momento magnético da partícula e  $k_B$  é a constante Boltzmann, logo  $k_B T$  é a energia térmica disponível para vencer a barreira. Mais ainda,  $\tau_0$  é um fator pré-exponencial e é dependente de vários parâmetros tais como, temperatura, magnetização de saturação ( $M_s$ ) ou campo aplicado, e a faixa de valores dessa constante está entre  $10^{-9}$  e  $10^{-13}$  s. De acordo com a Equação (6), nota-se que ao diminuir a temperatura  $T$ , o tempo de relaxamento  $\tau$  aumenta, e o sistema aparenta estar estático, pois, o tempo de relaxamento médio  $\tau$  do sistema é maior que o tempo característico da medida  $\tau_0$ , e o sistema é dito “bloqueado”, pois, cada partícula terá seu momento dipolo magnético total,  $\mu$  sem energia térmica suficiente para vencer a barreira de energia  $E_B$  e reverter o sentido dos *spins*. E a temperatura passa a ser um parâmetro importante que estabelece o comportamento desse regime, e denomina-se *temperatura de bloqueio*, pela qual as partículas ainda possuem energia suficiente para modificar a direção do seu momento magnético. Denomina-se de regime superparamagnético aquela condição em que se estabelece o relaxamento magnético proposto por Néel-Brown (K.THANH, 2012) e esse termo foi empregado pela primeira vez por Bean e Livingston (EFFENBERGER, 2012) para partículas muito pequenas. E o efeito de superparamagnetismo foi originado da observação de que a flutuação térmica da magnetização  $M$  irá levar o comportamento das nanopartículas magnéticas a uma situação muito semelhante à dos

paramagnetos. Porém, a exceção aqui, é que as nanopartículas possuirão um vetor de magnetização efetivo ( $M_0$ ) com várias ordens de grandeza superior dos materiais paramagnéticos.

Por outro lado, é possível estabelecer o perfil de superparamagnetismo das nanopartículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) experimentalmente pela curva de magnetização ( $M$ ) versus campo magnético aplicado ( $H$ ), isso será discutido com mais detalhes na seção sobre caracterização físico-química.

## 2.4 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO ( $Fe_3O_4$ OU $\gamma$ - $Fe_2O_3$ )

Nas duas últimas décadas, a síntese de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, conhecidas normalmente em inglês como “SPIONs”, tem despertado elevado interesse por pesquisadores no mundo todo não só para estudos científicos, mas também para uso industrial, especialmente nas áreas de medicina, associadas às seguintes aplicações biomédicas: a nanocatálise (LARA et al., 2015), a separação de proteínas e células (SHEN et al., 2013), sistemas de “drug-delivery” (ZHOU et al., 2014), e principalmente na área de desenvolvimento de agentes de contrastes particulados em imagem por ressonância magnética (APTE et al., 2013), (LEE, N.; HYEON, 2012; ZOTTIS et al., 2015). Particularmente para área de IRM, é importante dar muita atenção ao fato de que as NPMs devem possuir geralmente certa monodispersividade, elevada cristalinidade e valor de magnetização de saturação ( $M_s$ ) o suficiente que apresente um sinal de RM, não apresentar citotoxicidade e serem biocompatíveis (BATEER et al., 2014), (KHARISOV et al., 2014), (SUN, S. N. et al., 2014). Além disso, de preferência espera-se que essas NPs tenham aproximadamente um tamanho total (considerando o diâmetro do “core” e do recobrimento) abaixo de 100 nm, um controle de tamanho uniforme (diferença máxima de 5-10%) e sejam estabilizadas em ambiente aquoso ou em condições fisiológicas (LAURENT, S. et al., 2008) a fim de que possam atender às condições exigidas para as aplicações indicadas anteriormente.

Existem inúmeros métodos para a obtenção dessas NPMs de óxido de ferro descritas na literatura, destacando-se principalmente as revisões apresentadas por Gao e colaboradores (QIAO; YANG; GAO, 2009) e Frank Gu (SERGE YOFFE, 2013), as quais apontam basicamente que os dois principais métodos são divididos em físicos, tais como moagem

mecânica ou conhecidos como “*top-down*”, e os químicos, como “*bottom-up*”. Estes últimos envolvem tecnologias de preparação de NPs superparamagnéticas e são divididos em duas categorias de rotas sintéticas por via úmida: a) hidrolíticas e b) não-hidrolíticas, sendo que as hidrolíticas, como o nome sugere, estabelecem métodos associados à hidrólise de íons ferrosos e férricos, tais como, co-precipitação (MASSART, 1981), (MASSART et al., 1995), método de microemulsão (SERGE YOFFE, 2013), síntese sol-gel (AMSTAD et al., 2009), processos hidrotérmicos/solvotérmicos (MA, M. et al., 2012), (SUN, S. et al., 2003) e sonoquímica (HEE KIM et al., 2005). Por outro lado, para rotas de síntese não hidrolíticas, o processo é associado à pirólise de compostos orgânicos de ferro, destacando a decomposição térmica (ZHANG, B. et al., 2013); (GU, L. et al., 2012) e o método poliol (etilenoglicol, como solvante orgânico) (LAURENT, S. et al., 2008).

Apesar de existirem vários métodos de preparação de NPMs de óxido de ferro, serão abordados somente os métodos que permitem com que as partículas magnéticas sintetizadas, possam ser dispersas em meios líquidos e de acordo com a literatura (K.THANH, 2012), (LU, A.-H.; SALABAS; SCHÜTH, 2007) os mais utilizados por apresentarem elevado grau de rendimento para a aplicação biomédica são a co-precipitação, decomposição térmica e microemulsão, que serão descritos nas seções seguintes, quando será apresentado de modo sucinto suas principais vantagens e desvantagens bem como as limitações associadas a cada rota sintética envolvendo a preparação de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

#### **2.4.1 Decomposição térmica**

O método de preparação de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  por decomposição térmica constitui uma rota sintética não hidrolítica, por utilizar um ambiente de reação com uso de solventes orgânicos de elevado ponto de ebulição (PARK et al., 2004); (LÓPEZ-CRUZ et al., 2009) (difetil éter, benzil éter, a  $260^\circ\text{C}$  e  $298^\circ\text{C}$ , respectivamente) e surfactantes (ácido oleico) e co-surfactantes (oleilamina) e alguns álcoois primários como agentes redutores (1,2-hexadecanodiol) servem para auxiliar na dispersão e estabilização evitando o problema de agregação das NPs. A preparação é realizada a temperaturas elevadas ( $100 - 400^\circ\text{C}$ ), pois utiliza complexos surfactante-metal, tais como: oleato de ferro (PARK et al., 2004) ou compostos organometálicos que incluem ligante polidentado, como o ferro (III) acetilacetato ( $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ) (SUN, S.; ZENG, 2002) (SUN, S. et al., 2003) ou o ferro pentacarbonil  $\text{Fe}(\text{CO})_5$  (YUN TACK;

KYOUNGJA; KYU-SIL, 2008) na presença de um solvente orgânico. Em geral, produz NPs cristalinas e com elevado grau de monodispersividade, com valores de  $M_n$  próximos do óxido de ferro na concentração de “bulk” (K.THANH, 2012).

O método de síntese de NPs superparamagnéticas de óxido de ferro por decomposição térmica tornou-se extremamente popular desde a sua invenção, em 2002 (SUN, S.; ZENG, 2002), e é geralmente o preferencial relatado na literatura por muitos pesquisadores (YOFFE et al., 2013), (GUARDIA et al., 2010) por apresentar um excelente controle de tamanho das NPs de magnetita. De fato, os estudos de Hyeon e colaboradores (PARK et al., 2004) comprovaram que a temperatura de reação constitui um dos principais fatores que permite estabelecer condições para que se tenham NPs superparamagnéticas de óxido de ferro com melhor monodispersividade para que seja possível diferenciar os processos de nucleação e de crescimento desses núcleos para o controle de tamanho. Nesse estudo, os autores observaram que a etapa de nucleação, que se inicia entre 200 a 240°C, é governada pela dissociação de um ligante oleato (ácido oleico, decanoico, láurico etc.) e a fase de maior crescimento ocorre próximo a 300°C (PARK et al., 2004).

Porém, apesar dessa rota sintética apresentar muitas vantagens, há algumas limitações e desvantagens das NPs superparamagnéticas preparadas por esse método, principalmente no que se refere sua utilização para aplicações biomédicas, como agentes de contrastes para imagem por ressonância magnética (YOFFE et al., 2013). Uma vez que as partículas magnéticas são hidrofóbicas devido ao recobrimento pelo ácido oleico (devido à elevada cadeia de carbonos, de grupos alquil), sendo estabilizadas e dispersas em solventes orgânicos tais como tolueno, clorofórmio e hexano. Consequentemente, não podem ser utilizadas devido à elevada citotoxicidade desses solventes orgânicos (QIAO et al., 2009). Sendo assim, faz-se necessário realizar uma outra etapa de modificação e pós-preparação da superfície dessas NPMs de óxido de ferro hidrofóbicas para hidrofílicas, denominada de “*ligand-exchange*” ou troca de ligante (XU, Y. et al., 2011) envolvendo diversos grupos de íons orgânicos associados a polímeros ou monômeros (carboxilatos, silanos, aminos, fosfonatos etc.) de modo que possam ser dispersos em água ou solventes aquosos (BARRERA et al., 2009). Porém, a dificuldade é garantir com certeza se houve a transferência garantida para o meio hidrofílico, em meio aquoso, pois, esse processo demanda certa dificuldade pela inexistência de mecanismos concretos que visem funcionalização com polímeros ou moléculas que apresentem sucesso

com relação à baixa citotoxicidade e biocompatibilidade com células a fim de que atendam às exigências para serem desenvolvidas em escala industrial para aplicações biomédicas (LEE, N.; HYEON, 2012); (QIAO et al., 2009).

O outro inconveniente nesta técnica é o uso de alguns reagentes tóxicos a seres vivos e ao meio ambiente (ferro pentacarbonil) e a exigência de temperatura não inferior a 200°C durante o processo de síntese, acarretando maior cautela com e os procedimentos de purificação se mostram extremamente complicados, isso somado ao baixo rendimento obtido devido a necessidades de uso dos reagentes em grandes quantidades (QIAO et al., 2009).

#### **2.4.2 Solvotérmico**

A síntese de NPMs de óxido de ferro pelo método solvotérmico ganhou recentemente popularidade por permitir que as nanopartículas formadas em sua maioria possam apresentar superfície hidrofílica, (HO et al., 2011) e hidrofóbica (ZHANG, B. et al., 2013) de acordo com a aplicação desejada e com o solvente utilizado, mostrando ser um método versátil e prático. Outra vantagem apontada nesse método em relação aos anteriores é a ausência de procedimentos e etapas mais complexas para os processos de síntese de NPMs, sem a necessidade de atmosfera controlada durante a reação do meio (PÉREZ-MIRABET et al., 2013). Além do que, com esse método, há geralmente a utilização de processos mais limpos e sem uso de solventes orgânicos de elevada toxicidade, uma vez que dispensa processos de separação e filtração mais demorados e complexos. Estudo desenvolvido com síntese de NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> indicou que os tamanhos podem ser controlados na faixa de 7,5-190 nm levando em consideração alguns parâmetros experimentais, tais como o tempo de reação, a concentração inicial do reagente, o tempo de reação e a razão molar do reagente protetor etc. (YAN et al., 2007). A literatura destaca o uso de diversos ligantes (dextrana (MA, M. et al., 2012), PEG e/ou SDS (LIU, X. et al., 2008), ácido oleico) que podem ser solubilizados em solventes (tais como, metanol anidro, etilenoglicol (YAN et al., 2007), oleilamina e n-hexano (ZHANG, B. et al., 2013), trietilenoglicol (PÉREZ-MIRABET et al., 2013)) em temperatura ambiente ou abaixo de 60°C. A presença de acetato de sódio no meio é necessária, uma vez que é responsável por manter o *pH* alcalino, após isso, são adicionados sais de Fe<sup>3+</sup> (cloreto em sua maioria, por ser menos tóxico (LIU, X. et al., 2008) que compostos de ferro, por exemplo, o pentacarbonil (PÉREZ-

MIRABET et al., 2013)). Sendo que todo o meio de reação é transferido para um copo de teflon (volume de 40 até 100 mL), e o mesmo é selado em um autoclave de aço inoxidável (MA, M. et al., 2012) em um forno tipo mufla ou similar, com controle de temperatura (100 -200 °C) e tempo (6 – 72 h) (PÉREZ-MIRABET et al., 2013) (LIU, X. et al., 2008). Apesar de o método solvotérmico poder ser considerado o mais versátil entre os outros anteriormente discutidos por ser executado com uma variedade de reagentes de partida, e condições de reação, o controle de tamanho ainda se torna um dos grandes obstáculos nessa metodologia, e também acaba interferindo na qualidade dos padrões de cristalinidade das NPMs, e no baixo rendimento dos produtos, condições necessárias para serem usadas em aplicações médicas (K.THANH, 2012).

### 2.4.3 Co-precipitação

A co-precipitação é o método mais usado para NPs superparamagnéticas comercialmente disponíveis devido à facilidade do processo envolvido e à biocompatibilidade relativa do produto resultante. Sendo assim, Gao e colaboradores (QIAO et al., 2009) destacam que esta rota sintética hidrolítica atualmente é uma das mais utilizadas e, além disso, aponta que cerca de 90% dos agentes de contrastes em IRM constituídos por óxido de ferro (magnetita ou maghemita), produzidos comercialmente e aprovados para uso clínico são provenientes deste método.

Historicamente, relata-se que em se tratando de método de co-precipitação voltado a aplicações como agentes de contraste em IRM, merecem destaque os trabalhos desenvolvidos por Massart, há mais de 30 anos (MASSART, 1981; MASSART et al., 1995), (KEKKONEN et al., 2009) sendo um dos métodos mais utilizados para a produção de NPMs de óxido de ferro por pesquisadores até hoje. Considerado por muitos autores como o pioneiro nesse tipo de rota sintética hidrolítica, por apresentar preparação controlada de NPs superparamagnéticas de óxido de ferro, usando sais de  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{FeCl}_2$ , e obteve-se partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  relativamente esféricas e seu diâmetro médio caracterizado por DRX foi de 8 nm (MASSART, 1981). Além disso, Massart procedeu estudos dos principais parâmetros associados ao controle de crescimento e a polidispersividade das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sintetizadas, e suas ideias permitiram o desenvolvimento de vários estudos envolvendo parâmetros químicos associados às condições de síntese e obtenção das NPMs.

Atualmente são realizadas algumas adaptações desse método, destacando o procedimento pela primeira vez adotado por Qu e colaboradores (QU et al., 1999) onde foi realizada a redução parcial de uma solução aquosa de sais de Fe(III) e foram formadas NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, confirmadas por difratometria de raios X de pó, diâmetro médio do “core” de 10 nm.

Conforme anteriormente destacado, a técnica de co-precipitação é uma das rotas sintéticas hidrolíticas mais simples e ao mesmo tempo mais eficientes para obtenção de duas classes importantes de NPMs de óxido de ferro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ou γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) destinadas para aplicações biomédicas.

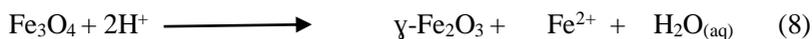
Nesse método, a obtenção de partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> envolve geralmente uma mistura aquosa de hidrato de sais férricos (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O ou Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> ou Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O) e ferrosos (FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O ou FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ou Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) em solução ácida em meio aquoso e se inicia com a adição de uma base (NaOH, KOH ou NH<sub>4</sub>OH), para aumentar o pH da solução entre 8 e 14 (GUPTA; GUPTA, 2005),(LAURENT, S. et al., 2008), de acordo com o que mostra na Equação (7) de forma generalizada tem-se:



Normalmente, a relação molar recomendada para os cátions de Fe<sup>3+</sup> e Fe<sup>2+</sup> é de 2:1, respectivamente (KEKKONEN et al., 2009) conforme é possível observar na Equação (7). Uma vez que estudos anteriores envolvendo a influência da razão estequiométrica de Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> entre 10 e 2 desenvolvidos há mais de dez anos por Jolivet e colaboradores (JOLIVET et al., 1992) demonstraram que por co-precipitação, sob atmosfera de nitrogênio, o tamanho médio e a polidispersividade aumentavam proporcionalmente com as razões estequiométricas de Fe(III) e Fe(II). Em paralelo, um estudo por Alibeigi e Vaezi(ALIBEIGI; VAEZI, 2008) sugeriu que ao usar razão acima de 2,0 levaria as partículas a ficarem muito grandes, extrapolando o limite de tamanho para exibir superparamagnetismo. Além disso, a literatura (LARA et al., 2015; MASSART, 1981; PAUL et al., 2004), (QIAO et al., 2009) destaca que a razão de Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> mantida em 2:1 participa de forma efetiva e influencia fortemente no controle de tamanho e na monodispersividade das NPMs e pode indicar que ao variar essa condição experimental, foi possível produzir NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> com tamanho de “core” entre 10 a 50 nm. De modo que Laurent e colaboradores (LAURENT, S. et al., 2008) relatam que nanopartículas superparamagnéticas sintetizadas bem

sucedidas foram possíveis de ser obtidas somente quando obedeceram razões entre 0,4 e 0,6 para que possam atender às aplicações biomédicas, principalmente como agentes de contrastes por IRM.

Dado que termodinamicamente as partículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) sujeitas à oxidação pela presença de oxigênio podem apresentar limitada estabilidade sendo oxidadas e transformadas em maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) conforme é descrita na Equação (8), alguns parâmetros podem permitir com que esse efeito possa ser reduzido.



Um desses parâmetros associado às condições experimentais, de síntese, é o controle do *pH* da solução onde estão os ferrofluidos, uma vez que os processos de oxidação envolvem transferências de íons ou elétrons. Por isso, em solução contendo  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mantida sob condições de atmosfera inerte, as superfícies dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  são desorvidas como complexos hexa-aquo e por outro lado, em condições alcalinas (*pH* entre 9 e 14), o processo de oxidação da magnetita pode ocorrer de forma mais controlada dado pelas reações de redução-oxidação da superfície de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . De modo que métodos espectroscópicos (FT-IR, XPS) combinados com cristalográficos (DRX) podem contribuir para identificação da fase do óxido de ferro, dessas NPMs, sendo caracterizada pela maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ou magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (LAURENT, S. et al., 2008). Além disso, o ajuste no *pH* da solução durante a síntese foi apontado por Thanh (THANH; GREEN, 2010) como parâmetro que permite controlar o tamanho das NPMs de tal modo que à medida que se aumenta o *pH* e a força iônica do meio, ocorre uma diminuição do tamanho do “core” das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  podendo variar no intervalo entre 15 a 2 nm.

Outros parâmetros que foram investigados com relação à sua condição de preparação influenciam no tamanho das nanopartículas magnéticas e envolveram a temperatura de reação, e o borbulhamento de nitrogênio na solução, sendo que foi destacado que a temperatura durante a co-precipitação é conhecida em afetar o tamanho e a *Ms* das nanopartículas magnéticas resultantes (MURBE; RECHTENBACH; TOPFER, 2008), onde foi demonstrado que o aumento da temperatura na reação de 25 a 70°C implicou em um aumento do tamanho médio de 16 a 39 nm e também de seus valores de *Ms* de 76 a 88 emu/g (quando comparado com 92 emu/g para a magnetita “bulk”). Porém, o mesmo estudo observou que quanto maior o tamanho médio das NPs, maior a

coercividade (magnetização remanente), o que comprometeu a propriedade de superparamagnetismo. Por outro lado, muitos pesquisadores na literatura apontam que o uso de uma temperatura elevada na reação influencia na formação do cristal e faz com que partículas de magnetita menores sejam produzidas (LAURENT, S. et al., 2008).

Apesar de ser realizado em larga escala e apresentar baixo custo, esse procedimento é limitado por apresentar alguns problemas, principalmente na distribuição e uniformidade do tamanho das partículas, apontando padrões baixos de cristalinidade, quando comparados com outros métodos. Outra condição é que o processo de síntese exige atmosfera controlada a fim de evitar a oxidação das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e também dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  em solução que não reagiram ainda, pois a superfície exterior das NPs superparamagnéticas rapidamente oxida-se em  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , e acaba reduzindo o valor de  $M_s$  das partículas (GUPTA; GUPTA, 2005), (LU, A.-H. et al., 2007).

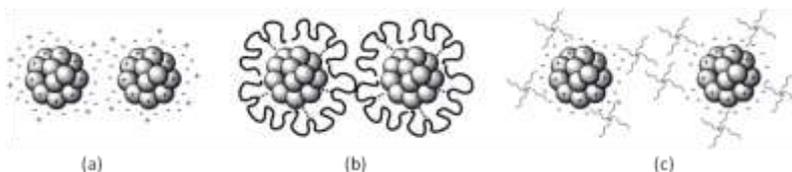
No entanto, o método de co-precipitação projetado por Massart (MASSART, 1981) para síntese de nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  permitiu que fossem investigadas melhorias para prevenir a aglomeração dessas partículas. E assim, os recobrimentos envolvem uma ampla faixa de espécies monoméricas, tais como, aminoácidos,  $\alpha$ -hidroxiácidos (ácidos glucônicos, tartárico e cítrico), ácido dimecarptosucínico (DMSA) (LAURENT, S. et al., 2008). Mais ainda, a literatura destaca que os efeitos de ânions orgânicos, tais como os íons hidroxil carboxilatos e carboxilatos pode ser compreendido por dois mecanismos competitivos. O primeiro é a quelação dos íons metálicos que pode prevenir a nucleação e conseqüentemente levaria à produção de NPs maiores, uma vez que o número de núcleos formados seria pequeno e, então, o sistema estaria sendo dominado pelo crescimento das partículas. Por sua vez, quando aditivos orgânicos forem adsorvidos nos núcleos e os cristais estiverem em crescimento, este pode ser inibido, o qual favorecerá a formação de pequenas unidades (LU, A.-H. et al., 2007).

Por fim, observa-se que as diferentes rotas sintéticas associadas à estabilidade coloidal das NPMs apresentam pontos fracos ou fortes, dependendo do que se deseja obter, tais como, a funcionalidade ou a aplicação a que se destinam. Porém, independente do método adotado para a produção de NPs superparamagnéticas de magnetita ou maghemita é importante notar que todas estão associadas ao controle dos parâmetros associados à estabilidade coloidal que são: a repulsão eletrostática e a estérica, as funções orgânicas dos estabilizantes utilizados para o

recobrimento e também as condições de polaridade do solvente (THANH; GREEN, 2010), (LU, A.-H. et al., 2007).

## 2.5 SOLUBILIDADE EM ÁGUA E ESTABILIZAÇÃO DE NPMS POR MOLÉCULAS POLIMÉRICAS

Estudar a forma de controlar a intensidade dessas forças torna-se peça-chave para a preparação de NPs estáveis em solução, como os ferrofluidos, que são definidos na literatura como suspensões estáveis de NPMs em um meio líquido, o qual pode ser tanto polar como a água, ou não polar como o hexano (THANH; GREEN, 2010), (K.THANH, 2012). Em particular, para a obtenção de NPMs de  $Fe_3O_4$  para aplicações biomédicas, a solubilidade dessas partículas em água é fundamental e significa que podem formar ferrofluidos termodinamicamente estáveis resultando do equilíbrio entre forças repulsivas e atrativas (LU, A.-H. et al., 2007). Essas forças atrativas podem ser originadas das forças de van der Waals, dipolares e forças dipolares magnéticas (LAURENT, S. et al., 2008), (THANH; GREEN, 2010), (LEE, N.; HYEON, 2012), (K.THANH, 2012) enquanto que as forças repulsivas são dadas pelas repulsões eletrostática, estérica e eletroestérica (THANH; GREEN, 2010), (K.THANH, 2012), (LU, A.-H. et al., 2007). Desse modo nota-se que as forças repulsivas auxiliam no processo de estabilização dos ferrofluidos, e conforme é indicado (Figura 14) existem basicamente três tipos principais, sendo por repulsão eletrostática, estérica e eletroestérica, sendo as duas primeiras as mais utilizadas como método de estabilização para a síntese de NPMs de óxido de ferro como destacados por muitos autores na literatura (GALLO; LONG; ABOAGYE, 2013); (YOFFE et al., 2013); (QIAO et al., 2009).



**Figura 14** - Nanopartículas estabilizadas por repulsões (a) eletrostáticas, (b) estéricas e (c) eletroestéricas (Adaptação de (LARA et al., 2015)).

As forças de repulsão eletrostáticas em (a) são originadas quando a superfície das NPMs apresenta cargas elétricas devido à adsorção de

íons ou pela ionização de grupos tais como hidroxila presentes na superfície de óxido de Fe (LAURENT, S. et al., 2008). Neste caso, as NPMs possuem multicamadas, que se repelem por possuírem superfícies de cargas iguais, provocando uma força de repulsão Coulômbica entre cada partícula, podendo evitar a aglomeração (HIERREZUELO et al., 2010). Nota-se (Figura 14a) que alguns dos contra-íons devem especificamente adsorver próximos à superfície e formar uma subcamada interior, denominada camada de Stern (QIAO et al., 2009), onde as moléculas de água são altamente estruturadas por uma capa de solvatação de cargas superficiais. Em particular, no caso dos óxidos de ferro, os átomos de ferro superficiais atuam como ácidos de Lewis e acabam coordenando com moléculas que doam o par de elétrons não compartilhado (grupos hidroxila, amina, carboxilatos etc.(THANH; GREEN, 2010),(K.THANH, 2012)). Portanto, em soluções aquosas, os átomos de Fe coordenam-se com água, que se dissocia para deixar a hidroxila adsorvida na superfície de óxido de ferro, e a ligação entre Fe-OH pode ser identificada pela técnica de FT-IR. Uma vez que estes grupos hidroxila são anfóteros, podem reagir com ácidos ou bases, e então, dependendo do pH da solução, (LEFEBURE et al., 1998) a superfície da magnetita será positiva ou negativa. Medidas por potencial Zeta permitem determinar o ponto isoelétrico (P.I), ou seja, o valor de pH em que a carga na superfície é zero. Para o caso das magnetitas, o P.I é observado em pH 6,8 (BACRI et al., 1990) significando que a densidade de carga de superfície ( $\Sigma$ ) é muito pequena, e as partículas não são mais estáveis em água. Geralmente, as NPs de magnetita, preparadas por co-precipitação sendo estabilizadas por repulsão eletrostática, se apresentam positivamente carregadas na superfície do óxido de ferro(LU, A.-H. et al., 2007),(MASSART, 1981),(MASSART et al., 1995). Entretanto, a estabilidade coloidal das NPMs em torno de *pH* neutro não é o suficiente para que sejam úteis como agentes de contrastes administrados IV (intravenosamente), pois, elas devem também ser suficientemente estáveis em meios onde a força iônica seja próxima das condições fisiológicas (em torno de 170 mM) para tampão fosfato salina (PBS)(QIAO et al., 2009),(K.THANH, 2012). Logo, se a força iônica do meio aquoso for aumentada para além desses valores citados, a dupla camada elétrica ou de Stern seria suprimida em torno das partículas carregadas e conseqüentemente poderia levar à precipitação ou floculação das partículas magnéticas dos ferrofluidos (QIAO et al., 2009). Por fim, observa-se que para aplicações biomédicas, a estabilização por repulsão eletrostática não é muito adequada, pois, qualquer variação da força

iônica anteriormente destacada leva à instabilidade coloidal das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Por outro lado, a literatura aponta que os polímeros apresentam preferencialmente a condição de estabilidade por repulsão estérica (Figura 14b), principalmente porque as NPMs estabilizadas estericamente não são influenciadas pela força iônica ou variações sensíveis ao pH do meio (GALLO et al., 2013; QIAO et al., 2009). Assim, esse método consiste em recobrir ou usar um estabilizante na superfície das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com moléculas poliméricas hidrofílicas, neutras ou carregadas a fim de que possa evitar a degradação, aglomeração e a oxidação dos ferrofluidos em solução aquosa (YOFFE et al., 2013). Além disso, a literatura aponta vários métodos e abordagens desenvolvidas para revestir NPs de óxido de ferro com polímeros, incluindo recobrimento *in situ* e pós-síntese. No primeiro método, NPs de óxido de ferro são recobertas durante a síntese pelo polímero. Nesse caso, é relatado a preparação de NPs superparamagnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por PVP (alcool polivinílico-coil pirolidona) que se apresentaram estáveis e solúveis em água e em diferentes solventes orgânicos preparadas por decomposição térmica (QIAO et al., 2009). Mais ainda, é destacado na literatura por co-precipitação, a preparação de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por dextrana para serem aplicadas como agentes de contraste em IRM (LAURENT, S. et al., 2008). Já no segundo método de estabilização, o recobrimento pós-síntese consiste em enxertar o polímero (surfactantes poliméricos) nas NPMs recém-sintetizadas e, nesse caso, a estabilização adotada envolve repulsão eletroestérica (Figura 14c) em que há a existência dos dois tipos de forças repulsivas ao mesmo tempo (GALLO et al., 2013), (LAURENT, S. et al., 2008).

Quanto aos tipos de recobrimento por polímeros, tem sido dada atenção especial a biopolímeros ou polímeros hidrofílicos de modo que apresentem boa biocompatibilidade, baixa citotoxicidade com tecidos, órgãos e células a fim de permitirem aplicações biomédicas em IRM (YOFFE et al., 2013), e que serão destacados a seguir.

A dextrana é um polímero de polissacarídeo (formado por muitas moléculas de glicose) composto exclusivamente pela unidade monomérica  $\alpha$ -D-glucopiranosil composta de cadeias variando seu comprimento e ramificação (3-2000 kDa) com uma cadeia linear de uma ponte glicosídica  $\alpha$ -1,6 (EASO; MOHANAN, 2013b). Estudos demonstram que o tamanho adequado das cadeias de dextrana permite melhores interações polares (principalmente quelação e ligação de hidrogênio), com superfícies de óxido de ferro, favorecendo o controle de

tamanho das NPs e sua estabilidade coloidal com magnetita (LAURENT, S. et al., 2008). Pois, apesar de que energeticamente as ligações de hidrogênio são fracas por natureza, a energia total dessas ligações sobre o comprimento de uma molécula do polissacarídeo pode ser muito elevada devido ao grande número de grupos hidroxila por molécula, o que explicaria sua estabilidade com NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (EASO; MOHANAN, 2013b). Além disso, derivados de dextrana (carboximetil-dextrana, carboxi-dextrana) e outros polissacarídeos tais como, amido apresentam-se como principal escolha como materiais de recobrimento de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  para aplicações biomédicas por apresentarem boa biocompatibilidade e baixa citotoxicidade (THANH; GREEN, 2010).

Outro biopolímero polissacarídeo, a carboximetil celulose (CMC) recentemente tem ganhado bastante atenção tendo seu uso sido relatado como material para recobrimento de NPs superparamagnéticas de óxido de ferro via oxidação de Fe(III), com adição do biopolímero para uso em sistema “*drug-delivery*” de rodamina (MALLICK et al., 2015). Por ser um biopolímero hidrofílico e, então, permite o encapsulamento de fármacos hidrofílicos (LEMARCHAND; GREFF; COUVREUR, 2004), sendo um polieletrólito aniônico (devido à presença de numerosos grupos carboxílicos) e também por possuir quantidade enorme de grupos hidroxila nas unidades do açúcar, esse polissacarídeo pode ser considerado por muitos autores um agente de recobrimento capaz de apresentar boa afinidade com interação de NPs de óxido de ferro, considerando também o baixo custo para a produção em larga escala (BUTUN et al., 2011).

Já a quitosana é um polímero de polissacarídeo catiônico natural encontrado no exoesqueleto de crustáceos, alcalino, atóxico, hidrofílico, biocompatível e biodegradável. Atualmente tem sido relatada a preparação de NPMs encapsuladas em quitosana para aplicações biomédicas (BHATTARAI et al., 2007), (SIPOS, 2003), como por exemplo, NPs superparamagnéticas de óxido de ferro encapsuladas e estabilizadas por repulsão estérica pelo método de co-precipitação. Essas NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por quitosana em várias concentrações apresentaram diâmetro hidrodinâmico inferior a 130 nm e puderam ser utilizadas como agentes de contraste para IRM (SANJAI et al., 2014).

Outro polímero que merece destaque é o PEG (polietilenoglicol), um polímero hidrofílico, solúvel em água, biocompatível e cujo uso relatado tem sido o de aumentar a biocompatibilidade das dispersões de óxido de ferro e o tempo de circulação no sangue (QIAO et al., 2009), (LAURENT, S. et al., 2008), (YOFFE et al., 2013). Um estudo

desenvolvido por Estelrich (GARCÍA-JIMENO; ESTELRICH, 2013) mostrou que PEG pode interagir com a magnetita por meio de ligações dipolares do cátion de ferro entre o grupo éter do polímero e a carga positiva das NPs superparamagnéticas de magnetita.

PVA (álcool polivinílico) é um polímero hidrofílico, biocompatível, e seu revestimento para a superfície da partícula impede sua aglomeração, dando origem a NPs monodispersas (SCHÖPF et al., 2005), e outros estudos mostraram ser possível modificar a superfície das NPMs por precipitação de sais de ferro em solução aquosa de PVA para formar dispersão estável (LEE, J.; ISOBE; SENNA, 1996).

Porém, apesar de os polímeros destacados anteriormente possuírem forte apelo como material de recobrimento para NPs de óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) para aplicações biomédicas, a literatura destaca que os dispersantes dos polímeros são geralmente volumosos, e aumentam consideravelmente o tamanho hidrodinâmicos da nanopartículas, deixando as mesmas incompatíveis para as aplicações biomédicas que necessitam de diâmetros pequenos (KORPANY et al., 2013).

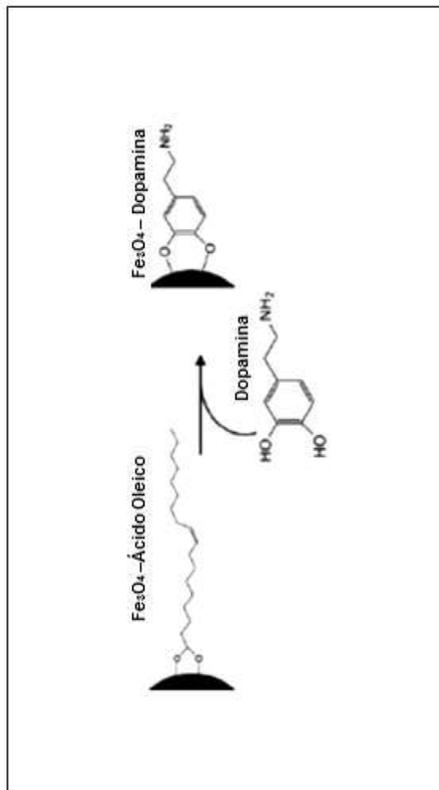
Por fim, nota-se que há um crescente e forte interesse na área de nanotecnologia envolvendo a síntese de nanopartículas superparamagnéticas com a utilização de biomateriais alternativos a fim de que possam atender às condições apresentadas como recobrimento de óxido de ferro para aplicações biomédicas e biotecnológicas, incluindo as áreas de “*drug-delivery*” (MALLICK et al., 2015), realçamento de contrastes em IRM (LEE, N.; HYEON, 2012), magneto hipertermia e bioseparação (HAYASHI et al., 2013) (SHEN et al., 2013).

## 2.6 DERIVADOS DE CATECÓIS COMO ESTABILIZANTES DE NPS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO

Em relação à preparação de NPM's de magnetita alguns trabalhos merecem destaque principalmente no que se refere aos estudos de ancoramento com derivados de grupos catecolatos, tais como dopamina e seus grupos terminais (amino, carboxilato etc.) que apresentaram diâmetro do “core” na faixa de 10 a 20 nm e que puderam ser dispersos em meio aquoso (YUEN et al., 2012). Além disso, foi descrito uma síntese de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (diâmetro médio de 19,2 nm) recobertas por dopamina em que, sob condições com *pH* baixo, uma carga efetiva positiva poderia ser induzida nos grupos amino gerando repulsões eletrostáticas, as quais puderam fazer com que as NPMs fossem

estavelmente dispersas em água a fim de serem utilizadas em aplicações biomédicas (YUEN et al., 2012). Outros pesquisadores vêm estudando estabilizantes alternativos para as NPs superparamagnéticas de magnetita, tais como, grupos de polímeros. Um exemplo na literatura é dado com o polímero poli(etileno glicol) (PEG) com o peso molecular de 5 kDa ancorado com oito diferentes grupos derivados de catecóis, sendo que destes, os ligantes PEG5-nitroDOPA e PEG-5-nitrodopamina em seus dispersantes apresentaram elevada estabilidade coloidal e sem alteração no diâmetro hidrodinâmico (na média de 26 nm) determinado por DLS (AMSTAD et al., 2009). Além disso, eles evidenciaram que dopaminas e DOPA possuem elevada afinidade como grupo de ancoramento *via* ligação eletrostática ou eletroestérica com o grupo catecol para estabilização de  $Fe_3O_4$  e resultaram em boa estabilidade coloidal em meio fisiológico.

Um estudo que merece destaque desenvolvido em 2009 por Nagesha e colaboradores (NAGESHA et al., 2009). Nele, foram preparadas NPMs de óxido de ferro por método de decomposição térmica *via* troca de ligante do surfactante ácido oleico por dopamina (Figura 15).

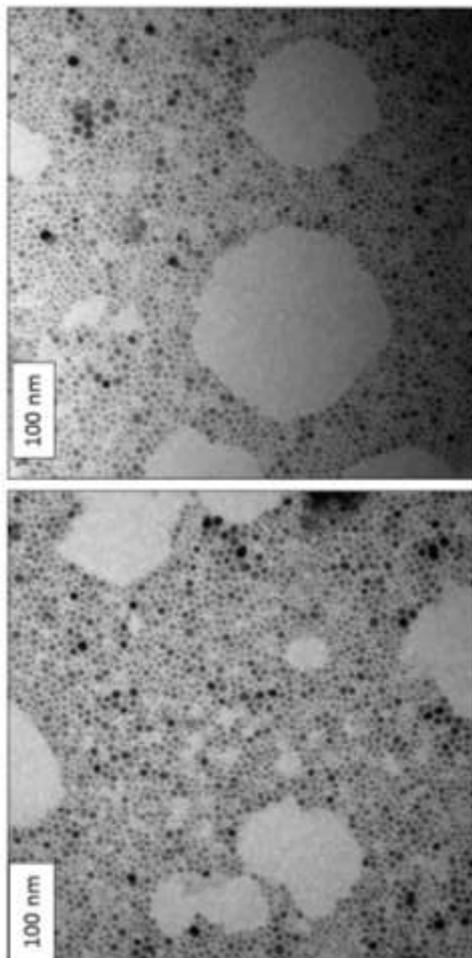


**Figura 15** - Esquema apresentado para preparação de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas com surfactante e troca de ligante com dopamina. (Adaptado de Nagesha e colaboradores (NAGESHA et al., 2009)).

Foi possível evidenciar que não houve alteração do tamanho das NPs superparamagnéticas de óxido de ferro após a troca do ligante hidrofóbico para hidrofílico, conforme mostrado nas imagens de MET (NAGESHA et al., 2009) (Figura 16). Um outro derivado de catecol, o 4,5-dihidroxi-1,3-ácido benzenodissulfônico (Tiron), foi estudado para estabilização de NPMs de óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) por meio de repulsão eletrostática usando método de co-precipitação com troca de ligante de ácido oleico para dopamina e dopamina/Tiron em nanopartículas superparamagnéticas dispersas em meio aquoso (KORPANY et al.,

2013). Foi observado que a estabilidade coloidal das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por dopamina/Tiron foi fortemente dependente do pH alcalino com valores elevados de potencial zeta negativos, indicando que as partículas possam ser úteis para aplicações biomédicas em condições fisiológicas (KORPANY et al., 2013).

Por outro lado, outros bio-oligômeros presentes na natureza, tais como os ácidos húmicos (AHs), apresentam elevada afinidade com NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de modo que Liu e colaboradores (LIU, J. F.; ZHAO; JIANG, 2008) produziram NPMs para serem aplicadas como removedores de íons de metais pesados. Evidencia-se que a *pheomelanina* e os AHs também são constituídos de grupos funcionais fenólicos (catecol), hidroxilas, carboxilas e quinonas que podem permitir a estabilização com  $\text{Fe}^{3+}$  (ILLES; TOMBACZ, 2006).



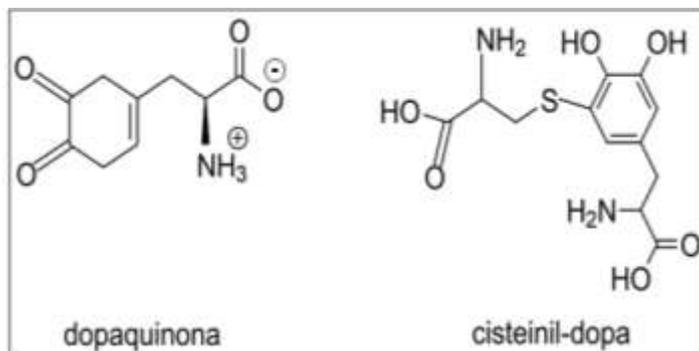
**Figura 16** - Micrografias de NPs de óxido de ferro estabilizadas por (a) ácido oleico e após (b) troca de ligante NPs estabilizadas por dopamina. (Retirado de estudo de Nagesha (NAGESHA et al., 2009)).

Há décadas, registram-se os estudos desenvolvidos pelo grupo do Prof. Bruno Szpoganicz, a respeito da interação de metais bivalentes (Cu(II) e Zn(II)) e trivalentes (Fe(III)), com biopolímeros ou bio-oligômeros conhecidos como melaninas e ácidos húmicos (SZPOGANICZ et al., 2002), (STAINSACK et al., 2003) que permitiram grandes avanços na área de Química Inorgânica de biomateriais. Em um

estudo proposto por Thiago e colaboradores (COSTA et al., 2012); (COSTA et al., 2014), comprovou-se a similaridade estrutural entre as melaninas e substâncias húmicas, através de caracterização por SAXS, complementadas com novas informações morfológicas dadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) elucidada por microscopia eletrônica de varredura (THIAGO G. COSTAA, 2015).

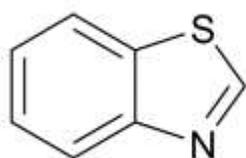
Em particular, atualmente, a melanina se apresenta como um bioligômero ou um biopolímero, agregando-se entre três a dez unidades monoméricas contendo três grupamentos funcionais distintos e majoritários: ácidos carboxílicos, quinona-iminas e difenóis (em sua maioria catecol) (THIAGO G. COSTAA, 2015). Mais ainda, esses oligômeros constituídos por macromoléculas que em sua estrutura, apresentam grupos catecóis, que puderam ser determinados por métodos associados ao equilíbrio de metais em soluções aquosas, revelaram valores de  $pK_a$  associados aos seus respectivos grupos majoritários que podem interagir melhor com metais (THIAGO G. COSTAA, 2015), (COSTA et al., 2012). Além disso, esses estudos com a melanina conduzidos pelo grupo do Prof. Bruno Szpoganicz possibilitaram um melhor entendimento e também confirmaram os resultados apresentados por Sarna e colaboradores (SARNA et al., 1976) que os íons Fe(III) parecem mostrar mais especificidade que outros metais ( $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ) na ligação com a melanina.

Em particular, a literatura apresenta que a melanina é amplamente existente em animais e plantas (XIN et al., 2015), (BILIŃSKA, 2001), (CHEDEKEL et al., 1987), sendo composta principalmente de duas classes, a *eumelanina* (marrom-escuro) e *pheomelanina* (vermelha-amarelada) que são derivadas da dopaquinona e da cisteinil-dopa (TONG YE, 2008), respectivamente conforme mostra a Figura 17.

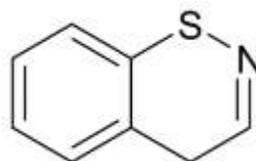


**Figura 17** - Ilustração mostrando a dopaquinona e a cisteinil-dopa como precursores dos bio-oligômeros *eumelanina* e da *pheomelanina* (Adaptado da referência (TONG YE, 2008)).

O principal grupo de monômeros da *eumelanina* são 5,6-dihidroindol (DHI) e 5,6-dihidroindol-2-ácido carboxílico (DHICA), enquanto que para a *pheomelanina*, (Cys-DOPA), observa-se a adição do aminoácido cisteína após a formação da L-dopaquinona e para o sucesso desta reação necessita-se de moléculas de baixo peso molecular contendo grupamentos tíois ou hidroxílicos, originando possíveis grupos de compostos intermediários, tais como benzotiazina e benzotiazóis (THIAGO G. COSTAA, 2015), (BILIŃSKA, 2001), (WILCZOK et al., 1987), (TESEMA; PHAM; FRANZ, 2008) como mostra a Figura 18.



benzotiazol



benzotiazina

**Figura 18** - Unidades dos principais monômeros que contribuem para a formação do biopolímero *pheomelanina* (Adaptado da referência (TESEMA et al., 2008)).

Deziderio e colaboradores (DEZIDÉRIO et al., 2004) destacam que melaninas estão presentes em muitos diferentes lugares no corpo

humano, tais como na pele, cabelos, no ouvido interno, no cérebro e por isso têm tido bastante destaque na literatura por exibir várias propriedades físicas, biológicas e químicas importantes tecnologicamente. Entre as propriedades encontradas estão a fotoproteção (DEZIDÉRIO et al., 2004), proteção radiológica (SCHWEITZER et al., 2010), (HOWELL et al., 2008), antioxidante e no sequestro de radicais livres (SAVA et al., 2002), (YAN LIU; CLIFFORD R. BOWERS, 2005), atividade antitumoral (CHARKOUDIAN; FRANZ, 2006).

Dentro desse contexto, principalmente biomateriais para aplicações biomédicas que apresentem baixos custos de produção, que não sejam citotóxicos, que sejam acessíveis e permitam modificações com grupos químicos, para estabilização com NPMs de óxido de ferro, constitui uma das linhas de pesquisa do grupo do prof. Szpoganicz, há cerca de cinco anos.

Por essa razão, é importante destacar que o uso da *pheomelanina* como biopolímero ou bio-oligômero apresentando propriedades físicas, químicas e biológicas interessantes e que ainda não havia sido relatada nenhuma publicação em nível internacional como material de recobrimento, culminou na inspiração para preparação das NPs superparamagnéticas de óxido de  $Fe_3O_4$  para o uso como um potencial agente de contraste por IRM.

Para isso, é necessário compreender quais as principais técnicas envolvidas no processo de caracterizações físico-químicas associadas às nanopartículas magnéticas estabilizadas por *pheomelanina*, o que por si só, torna-se um grande desafio uma vez que este bio-oligômero não apresenta estrutura definida na literatura.

## 2.7 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE $Fe_3O_4$ PARA APLICAÇÕES MÉDICAS

Dependendo do método de preparação das NPMs de  $Fe_3O_4$  é necessário estabelecer várias técnicas de caracterizações físico-químicas que permitirão inferir a respeito dos valores de seus tamanhos médios, fase, cristalinidade, diâmetro total em solução, carga superficial após recobrimento com maior precisão do que simplesmente levando em consideração os resultados apresentados por uma única técnica. Dentre esses parâmetros, dá-se destaque ao tamanho e a forma das partículas, pois, estão relacionados com os momentos dipolares magnéticos  $\mu$  e com sua resposta frente ao campo magnético aplicado  $H$ . Uma vez que o

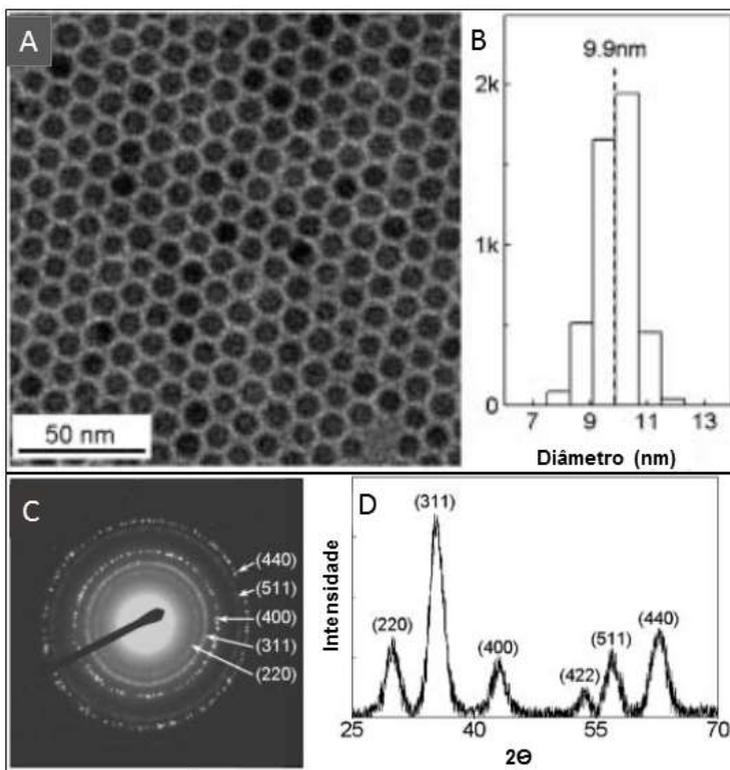
diâmetro do “core” das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  também pode influenciar no valor obtido da magnetização efetiva ( $M_0$ ) e consequentemente na taxa de relaxação  $T_2$  e  $T_1$ , respectivamente, transversal e longitudinal para o sinal de IRM, implicando na qualidade do agente de contraste (AC) (ULMAN, 1996). A carga presente na superfície das NPMs e a natureza do ligante influencia indiretamente na sua estabilidade coloidal em meio biológico, e se relaciona com o tipo de funcionalização da superfície do biopolímero e como esse irá influenciar no perfil de toxicidade biológica das NPMs (REDDY et al., 2012a).

### **2.7.1 Morfologia, fase e determinação do diâmetro de “core” de NPMs (MET, MET-AR, DE, MAV, DRX)**

A microscopia eletrônica se utiliza de feixe de elétrons, que devido a suas propriedades ondulatórias, um fino feixe dessas partículas interage com uma amostra em condições apropriadas e define um alto poder de resolução espacial, justificando seu uso na identificação de estruturas que envolvam dimensões com cerca de 1000 bilionésimos de um metro (10 nm), sendo que o feixe de elétrons é gerado por uma aceleração de elétrons através de uma diferença de potencial (tensão). Assim, os elétrons migram da região catódica, constituída por um filamento de tungstênio (W) ou hexaboreto de lantânio ( $\text{LaB}_6$ ), e chegam na região anódica, sendo aquecido por uma corrente elétrica, pelo efeito termiônico. Após incidir a amostra, o feixe primário interage com os átomos do material e provoca espalhamento e emissão de vários tipos de radiação, que incluem elétrons secundários, elétrons retroespalhados e raios X característicos (WILLIAMS.; CARTER., 2009). Para as análises das amostras no microscópio eletrônico por transmissão (MERT et al., 2013), a tensão de aceleração aplicada vai determinar a velocidade dos elétrons no feixe que será colimado pelas lentes condensadoras, da mesma forma que ocorre no MEV. Em se tratando de NPMs com estrutura espinélio (caso das fases magnetita e maghemita), o uso de MET possibilita inferir a respeito do tamanho médio do “core” das NPMs de óxido de ferro, e também permite determinar a distribuição de tamanho e morfologia das nanopartículas, apontando seu caráter de mono ou polidispersidade conforme pode ser visto nas Figuras 19a e 19b. Além disso, é possível realizar a investigação a respeito da estrutura cristalina, bem como identificar os seus planos de difração e compará-los com os padrões cristalográficos já existentes da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) usando o MET para a

análise de difração de elétrons (SAED) (Figura 19c) a fim de comparar com os resultados de difração de raios X de pó (DRX) das amostras conforme os planos de difração associados à fase de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Figuras 19c e 19d) que serão melhor explicados no decorrer dessa seção.

A preparação das amostras das nanopartículas magnéticas, na maioria das vezes, é relativamente simples, porém, a maneira ou o modo de preparação pode interferir nos resultados pelo fato de que podem induzir agregação das NPMs e conseqüentemente levar a erros de interpretação dos dados. Para nanopartículas magnéticas hidrofílicas em pó, o material é disperso em um solvente, água, álcool etílico ou álcool isopropílico e a suspensão formada de ser sonicada por alguns minutos. Uma ou mais gotas dessa suspensão são depositadas em um suporte, denominado grade e, após evaporação, do solvente, as amostras estão prontas para análise. Já para as NPMs hidrofóbicas os solventes utilizados são todos apolares e devem ser de caráter voláteis a ponto de ficarem no mínimo 24 horas em estufa a vácuo para secagem das amostras.



**Figura 19** - Micrografia por MET (A) histograma de nanocristais de magnetita com diâmetro médio de 9,9 nm (B). Padrão de difração de elétrons (C) e de DRX de pó de nanocristais de magnetita (D). (Adaptado da referência (YU et al., 2004)).

Uma das técnicas mais utilizadas para caracterização da estrutura cristalina e fase das nanopartículas magnéticas constitui a difração de raios X de pó (DRX ou PDRX) em ambas as fontes de radiação (convencionais ou em sincrotron). A análise por DRX é recomendada e apresenta elevada precisão para NPMs que tenham diâmetro de “core” no mínimo entre 4-5 nm, onde o cristal deverá ter tamanho suficiente para que os raios X possam difratar e revelar a estrutura cristalina da célula unitária do nanocristal (THANH; GREEN, 2010). Então, a técnica visa plotar um gráfico (Figura 19d) com a intensidade dos raios X *versus* o ângulo de Bragg, que representa o ângulo no qual os raios X se chocam no cristal. Onde é detectada a máxima interferência identificada pelos

picos de relexão associados aos planos de difração com o seus índices de Miller ( $h,k,l$ ). Esse perfil da amostra obtido através de um difratograma é então comparado com um padrão de DRX de fase cristalina referente aos seus planos de difração catalogados em um banco de dados cristalográfico internacional e constitui uma impressão digital por meio de um cartão JCPDS. Assim, os resultados obtidos de um difratograma permitem obter várias informações importantes associadas às características das NPMs de óxido de ferro. Por exemplo, a quantidade e proporção do óxido de ferro formado na amostra pode ser estimada comparando com as intensidades dos picos experimentais e do padrão da amostra. Além disso, a equação de Bragg (Equação 9) permite estimar o valor do parâmetro de rede associado a uma célula unitária tipo cúbica, geralmente apresentada em óxidos metálicos (ferritas de Fe, Co, Mn etc.) e podem ser comparadas com os seus padrões de DRX.

$$d_{hkl} = \lambda / 2 \operatorname{sen} \theta \quad (9)$$

$$\text{Com } a = d_{hkl} \sqrt{h^2 + k^2 + l^2}$$

Onde,  $\lambda$  é o comprimento de onda,  $a$  é o parâmetro de rede cúbica e  $hkl$  são os índices de Miller. Além disso é possível identificar incorporações estruturais que podem ser estimadas pelos desvios na posição dos picos de DRX, tais como, o grau de substituição de  $\text{Fe}^{3+}$  por outros cátions trivalentes (Figura 20). Porém, a principal informação a ser obtida do perfil das intensidades dos picos de DRX é o diâmetro médio do cristal que é calculado geralmente através do alargamento das linhas do difratograma usando a fórmula de Scherrer (Equação 10), o qual descreve a largura corrigida de uma linha de DRX em um ângulo  $\theta$  como uma função do tamanho médio do espalhamento no cristal perpendicular ao plano  $hkl$ .

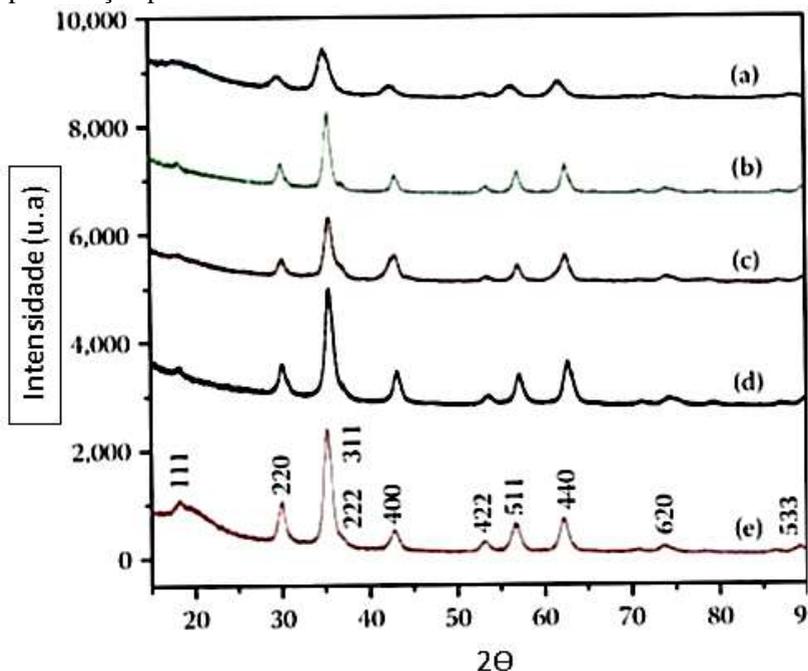
$$D = K\lambda / \beta \cos \theta \quad (10)$$

$$\text{Com } \beta = \sqrt{B^2 + b^2} \quad (11)$$

Onde  $\beta$  é a largura real do pico de raios X na sua meia-altura, e  $K$  é o fator de forma (igual a 0,89 para uma forma esférica).

A largura verdadeira pode ser corrigida da largura experimental pela Equação (11), onde  $B$  e  $b$  são as larguras à meia altura do pico mais intenso da amostra e de uma amostra de referência bem cristalizada.

Geralmente as NPMs utilizadas para aplicações biomédicas devem ser monocristalinas, e o tamanho do cristalito  $D$  corresponderá à primeira aproximação para o tamanho das NPs.



**Figura 20** - Padrões de DRX de pó de nanopartículas de  $MFe_2O_4$  preparadas em solução de estabilizantes de cadeias longas: M = Mn (a), Fe (b), Co (c), Ni (d) e Zn (e). (Adaptado da referência (THANH; GREEN, 2010)).

Entretanto, a fórmula de Schererr apresenta certa limitação com relação à informação mais precisa a respeito do diâmetro médio das nanopartículas para ser complementada com as análises por MET, visto que o seu resultado pode ser subestimado, já que a Equação (10) não leva em conta a presença do material de recobrimento ou também dos possíveis defeitos estruturais da superfície da magnetita ou maghemita devido a processos oxidativos envolvendo o tipo de rota sintética escolhida. A diferença no resultado se dá em função do alargamento dos picos devido à presença desses defeitos estruturais na amostra.

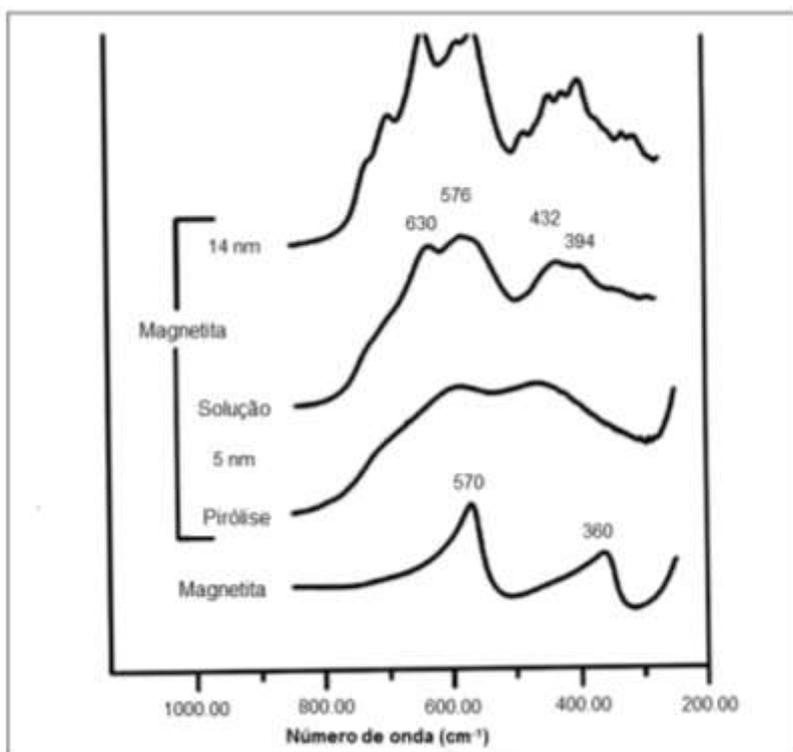
Assim, a determinação do grau de cristalinidade, a fase do óxido de ferro, bem como o diâmetro do “core” deve ser complementada com

as técnicas de Espectroscopia Mossbauer (DI MARCO et al., 2007), MET e VSM para amostras em pó. Além disso, caso seja desejado determinar o estado de oxidação do ferro nas nanopartículas a literatura recomenda a técnica de XPS pelas medidas das linhas de emissão das camadas eletrônicas dos íons ferrosos e férricos detectados nos espectro (K.THANH, 2012).

### 2.7.2 Caracterização da estrutura química

Quando se deseja investigar a estrutura das NPs de óxido de ferro recobertas por moléculas orgânicas agindo como ligantes (polímeros, macromoléculas etc.) bem como, além disso, a natureza de interações entre os núcleos de óxido de ferro e as estruturas moleculares associadas dentro do compósito (isto é, associação química e/ou adsorção física) as técnicas sugeridas são a Análise Termogravimétrica (TGA) e a Calorimetria Diferencial por Varredura (DSC) onde a temperatura de decomposição do ligante está associada ao grau de recobrimento do mesmo nas NPs de óxido de ferro (REDDY et al., 2012b). É possível também correlacionar esses dados com outra técnica envolvendo uma identificação dos grupos químicos, como a espectroscopia por infravermelho (IV), (LAURENT, SOPHIE et al., 2008) bem como o tipo de interação existente na molécula (interações fracas, como ligações de hidrogênio ou fortes, como covalentes). A região do infravermelho do espectro eletromagnético é a região onde está localizada a maior parte da energia das vibrações moleculares, e assim grupos funcionais ou átomos presentes nas NPs recobertas por polímeros ou diferentes ligantes (LEFEBURE et al., 1998) podem apresentar frequências características ( $4000$  a  $400$   $\text{cm}^{-1}$ ), associadas aos diferentes modos vibracionais. Polímeros e monômeros usados como estabilizadores de NPs de óxido de ferro apresentam grupos funcionais com suas respectivas bandas de absorção, tais como,  $\nu(\text{O} - \text{H})$ , entre  $3200$  e  $3600$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{N} - \text{H})$ , entre  $3300$  e  $3500$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C} = \text{O})$ , entre  $1640$  e  $1870$   $\text{cm}^{-1}$ , entre outros. Sendo assim, os espectros de infravermelho (FT-IR) podem dar informação a respeito das bandas de absorção características associadas às NPMs de magnetita e de maghemita e até mesmo pode ser possível por essa análise apontar diferenças entre tamanho e fases do óxido de ferro presentes dependendo da rota sintética, conforme ilustra a Figura 21. Observa-se que os espectros apontam diferentes formas de acordo com o tamanho das NPMs de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (5 e 14 nm) preparadas por co-precipitação, onde se nota que as que apresentam diâmetro de “core” maior estão parcialmente

ordenadas, o que é revelado pelas múltiplas bandas de absorção da rede cristalina ( $800\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ ) (TARTAJ et al., 2003), enquanto que as mesmas com 5 nm apresentam significativa redução no número de bandas de absorção na rede, explicada pelo maior grau de desordem dos momentos dipolares magnéticos dos átomos de ferro (MORALES et al., 1994). Além disso, o espectro comum apresentado na literatura para NPMs de óxido de ferro aponta que as principais bandas de absorção são os dois modos de vibração das ligações Fe-O em  $630$  e  $576\text{ cm}^{-1}$  revelando a estrutura do espinélio desordenado. Já as bandas na faixa de  $820\text{-}830\text{ cm}^{-1}$  revelam a existência de grupos hidroxil e correspondem ao modo de deformação axial simétrica  $v_s$  (Fe-OH) (K.THANH, 2012).



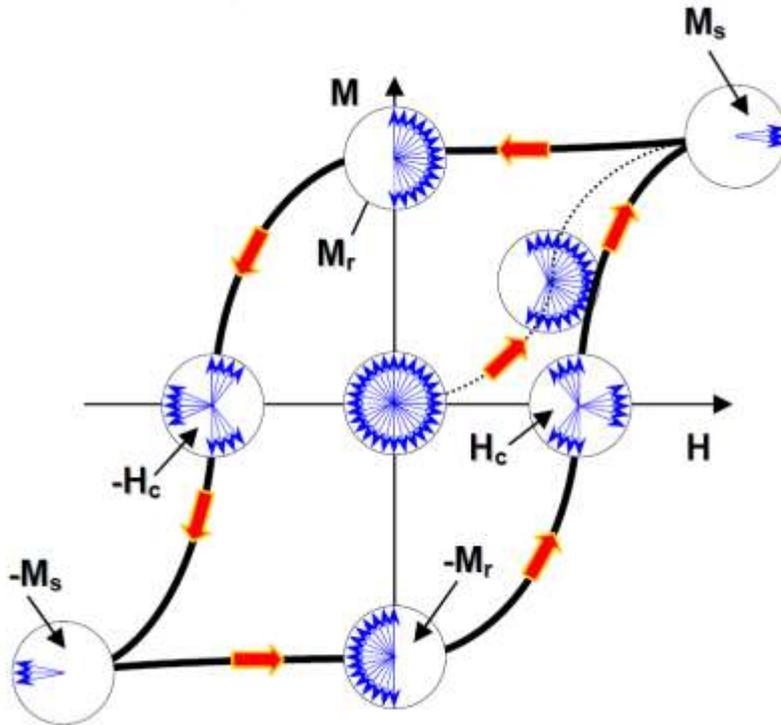
**Figura 21** - Espectros de infravermelho para NPs de magnetita e maghemita preparada por diferentes métodos de co-precipitação e em diversos tamanhos. (Adaptado da referência (K.THANH, 2012)).

Por outro lado, a técnica de XPS possibilita ainda investigar a composição dos grupos orgânicos pertencentes ao biopolímero *pheomelanina* associado a seus átomos e comprovar que os resultados apresentados são coerentes com os dados experimentais de espectroscopia por infravermelho (FT-IR).

Com relação às informações que podem ser retiradas do espectro de XPS, a primeira é a sua configuração eletrônica, apresentado pelos dois estados de coordenação do ferro, constituídos pelos cátions com suas duplas valências ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) e orbitais atômicos ( $3d^6$  e  $3d^5$ ), respectivamente. Uma vez que de acordo com a Teoria de Campo Cristalino, os compostos de ferro podem ser descritos como tendo um “*spin*” alto ou “*spin*” baixo, podem representar diferenças sutis entre o estado eletrônico desses cátions após interagirem com um feixe de raios X e resultar em efeito fotoelétrico, sendo que  $\text{Fe}^{3+}$  tem sempre um *spin* alto, pela presença de elétrons desemparelhados nos orbitais *d*, o que se reflete na identificação de um multiplete dividido, o qual obedece nas tabelas uma notação espectroscópica dada por:  $\text{Fe}(2p_{3/2})$  e  $\text{Fe}(2p_{1/2})$  (Jian Lu et al., 2009), que é associado a sua configuração eletrônica e estrutura atômica. Por outro lado, os compostos com  $\text{Fe}^{2+}$  podem apresentar configuração de “*spin*” alto ou “*spin*” baixo, dependendo da natureza do ligante associado ao seu composto (SHRIVER, 1999). Sendo assim, aqui reside o segundo parâmetro importante, o qual está relacionado com sua configuração eletrônica e seu estado de oxidação, sendo a forma ou a característica do pico no espectro de XPS, a literatura demonstra que esses compostos podem ser discriminados através da presença ou ausência de picos “satélites” indicando que os diferentes óxidos de ferro na forma pura ou mista podem apresentar perfis distintos em seu espectro (BIESINGER et al., 2011). A terceira informação retirada do espectro de XPS a respeito do estado de oxidação dos compostos de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  é a sua energia de ligação. Pois, quando os raios X interagem com a amostra de NPMs, um elétron do átomo de ferro (II e III) acaba absorvendo essa energia proveniente de fótons X ( $h\nu$ ), e se caso a energia dos fótons incidentes for maior que a energia de ligação ( $E_l$ ) dos átomos de ferro, o elétron acaba sendo ejetado da superfície da amostra com uma energia cinética  $E_c$ . Essa energia cinética é medida pelo espectrômetro através da contagem dos elétrons que são ejetados constituindo um pico fotoelétrico, em função do intervalo da  $E_l$ , associado a cada orbital atômico particular presente na amostra (CUNHA, 2014).

### 2.7.3 Caracterização das propriedades Magnéticas das NPs de óxido de ferro

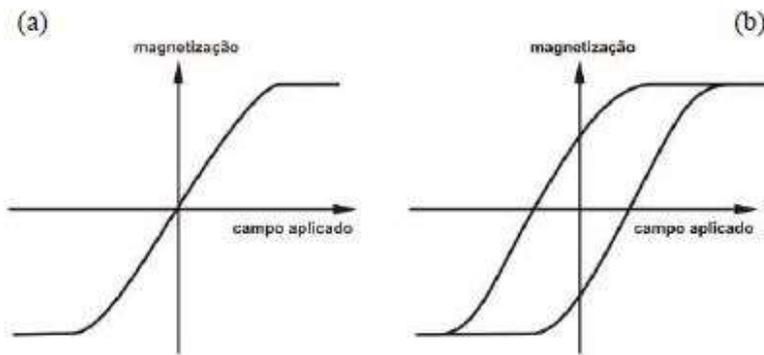
As propriedades magnéticas de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  podem ser determinadas pela curva de magnetização ou, também, por algo conhecido por muitos pesquisadores como o ciclo de histerese. Essa curva é uma somatória de todos os processos reversíveis e irreversíveis de magnetização total ( $M$ ) da amostra fruto das variações positivas e negativas dos valores do campo magnético aplicado ( $H$ ) conforme é indicado na Figura 22, onde a caracterização do ciclo da histerese de partículas magnéticas é usada por muitos pesquisadores para definir seu magnetismo (ferrimagnetismo, ferromagnetismo, superparamagnetismo) e resposta magnética, isto é, magnetização intrínseca (os momentos dipolares magnéticos atômicos) e remanescência, conforme Figura 22 (YANG et al., 2008). Além disso, as curvas da magnetização são propostas para investigar o tamanho de cristal do óxido do ferro e a largura da distribuição de tamanho de cristal.



**Figura 22** - Principais parâmetros associados ao ciclo de histerese de materiais magnéticos e o acompanhamento da variação do campo magnético aplicado ( $H$ ), retirado da referência (COELHO, T. C., 2011)

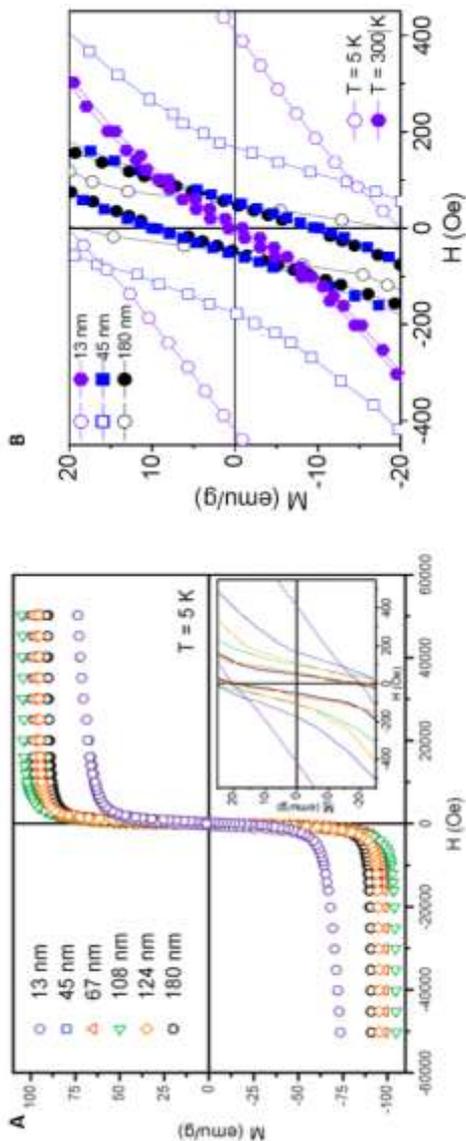
Aplicando-se um campo magnético ( $H$ ) no sentido direto (valor positivo de  $H$ ), na amostra inicialmente desmagnetizada, em que se tem a primeira resposta, denominada de curva *virgem* (linha pontilhada) da Figura 22. Este seguirá a curva até atingir um patamar constante chamado magnetização de saturação ( $M_s$ ), quando todos os *spins* dos íons de ferro se encontram alinhados com o campo externo. Então,  $M_s$  constitui um parâmetro importante a respeito do comportamento magnético do material, e quanto maior for o valor de  $M_s$ , maior será o sinal de IRM apresentado pelas nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (LEE, N.; HYEON, 2012). Essa grandeza geralmente é medida em unidades eletromagnéticas por grama de material ( $\text{emu g}^{-1}$ ) de ferro. A fase magnetita apresenta maior interesse para aplicações biomédicas, por

possuir um valor de  $M_s$  superior á maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Com relação à Figura 22, a curva no sentido inverso (valores negativos de campo  $H$ ), se a amostra apresentar um valor de magnetização residual e não conseguir recuperar o seu estado de desmagnetização, após a retirada do campo  $H$  ela apresentará uma *magnetização remanente* ou *remanência* ( $M_r$ ), onde o material permanece magnetizado quando a curva atinge  $H=0$  (quando a curva de magnetização passa pela ordenada). Seguindo a curva no sentido inverso (valores negativos de  $H$ ), até passar pelo eixo das abscissas, onde se tem o estado de desmagnetização do material ( $M = 0$ ) em que se tem um valor de campo  $H$  que deve ser aplicado, denominado de *campo coercivo* ( $-H_c$ ). Ainda com a continuação da variação do módulo do campo se obtém novamente uma região de saturação. E repetindo o ciclo no sentido inverso, ocorre uma curva fechada que é o chamada ciclo de histerese (RIFFLE et al., 2002),(RIBEIRO, 2008). A curva de histerese de fato representa perdas energéticas durante o processo de magnetização após a aplicação de um campo magnético  $H$ , e a área da curva de histerese está associada com essas perdas. Por isso, materiais com “pouca ou nenhuma histerese” exibirão menores valores de campo coercivo ( $H_c$ ), e de remanência ( $M_r$ ), e representam perdas mínimas na magnetização. É nesta categoria que se encontram as partículas superparamagnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , pois, elas representam perdas mínimas da  $M$  associadas aos processos reversíveis, indicando curva de magnetização com histerese nula, conforme pode ser visto na Figura 23. Os valores desprezíveis de  $M_r$  e  $H_c$  das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  evidencia seu efeito de superparamagnetismo, e representa uma propriedade nova e interessante, uma vez que evita a agregação das partículas na solução coloidal, em ambas as situações, quando em armazenamento e após administração intravenosa (NEUBERGER et al., 2005), já que, após supressão do campo magnético aplicado ( $H$ ), as partículas deixam de apresentar a interação magnética, e se comportam como materiais paramagnéticos.



**Figura 23** - Curvas de magnetização associados a (a) processos reversíveis presentes em NPs superparamagnéticas com  $H_c$  nulo e (b) processos irreversíveis caracterizando a formação de uma histerese, presente em materiais ferromagnéticos. (Adaptado da referência (COELHO, T. C., 2011))

Por fim, as curvas de magnetização podem ainda revelar resultados associados ao diâmetro médio do “core” das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e serem complementadas com as análises obtidas por DRX e MET e além de dar informações sobre estruturas magnéticas das amostras. Uma vez que a literatura apresenta que seja possível realizar uma estimativa do tamanho do “core” que nanopartículas de magnetita e maghemita podem exibir o efeito de superparamagnetismo a partir de 12 nm e 17,5 nm, respectivamente (K.THANH, 2012). Conforme é apresentada pela Figura 23a, um estudo envolvendo NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por ácido decanóico, onde de acordo com a temperatura de aquecimento de síntese, foram preparadas NPs com tamanhos distintos (13-180 nm), e concluiu-se que somente as que tiveram diâmetro de 13 nm apresentaram comportamento de superparamagneto, uma vez que apresentaram histeresse nula, dado pelo seu valor de campo coercivo ( $H_c=0$ ) e de remanência ( $M_r=0$ ) em temperatura ambiente ( $T = 300$  K) conforme é apresentado na Figura 24.



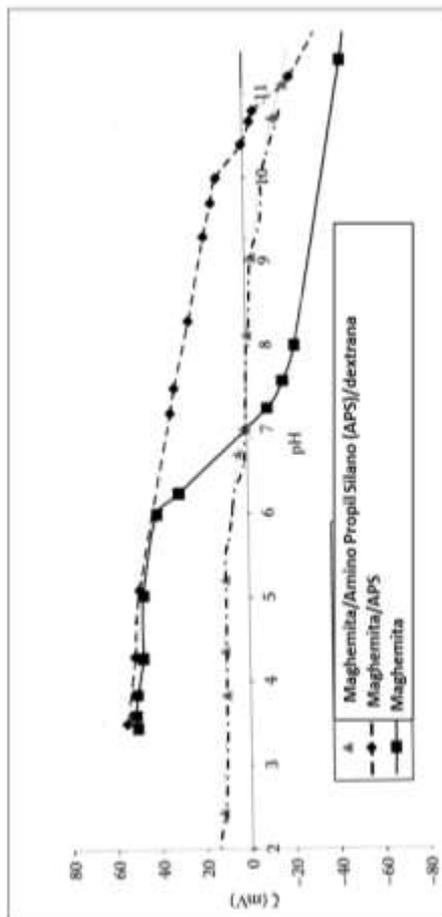
**Figura 24** - Curvas de magnetização associadas a tamanhos médios das NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> com (a) processos a baixíssimas temperaturas (5 K) em (b) medidas de  $H_c$  e  $M_r$  em  $T = 300$  K. Figura retirada de referência (GUARDIA et al., 2010).

#### 2.7.4 Caracterização da Carga da Superfície (potencial zeta) e diâmetro hidrodinâmico

Quando se planejam NPMs funcionalizadas para serem utilizadas como agentes de contraste para IRM, a administração por via intravenosa é desejada, nesse caso as NPMs encontram um ambiente fisiológico ligeiramente alcalino ( $pH$  7,4) e uma força iônica relativamente elevada (acima de 100 mM). Nessas condições, o problema de agregação das partículas pela presença de seus dipolos magnéticos, pode ocorrer (devido às interações atrativas dipolo-dipolo magnético ou de van der Waals) (REDDY et al., 2012a). Para compensar esses efeitos, quando se pensa em estabilidade das NPMs *in vivo* e *in vitro*, é necessário que a solução coloidal apresente: i) repulsão eletrostática entre as superfícies adequadamente carregadas; (ii) interações partícula-partícula hidrofílicas e (iii) existência de uma camada adequada (barreira estérica) sob a superfície da partícula de óxido de ferro (II e III) (REDDY et al., 2012a).

Geralmente, partículas sólidas adquirem uma carga na superfície quando entram em contato com uma solução do eletrólito aquoso e para compensar a existência dessa carga, condições de eletroneutralidade permitem que ocorra a distribuição de um íon na área em torno das NPs, resultando na dupla camada elétrica (XU, R., 1998). Desse modo, o potencial no plano/superfície que separa a região da dupla camada elétrica aderida à superfície da partícula magnética (camada de cisalhamento) é geralmente denominado potencial zeta ( $\zeta$ ) (REDDY et al., 2012a).

Então, medidas experimentais para determinação do potencial  $\zeta$  podem permitir que se saiba a respeito da densidade de carga da superfície das NPMs, e a localização do plano de cisalhamento. De modo que a natureza da estrutura da superfície pode influenciar sua estabilidade *in vitro* e *in vivo* das NPs em solução fisiológica (XU, R., 1998). As curvas de potencial  $\zeta$  (mV) *versus pH* das NPMs de óxido de ferro podem ser apresentadas conforme é ilustrada na Figura 25, pois o estudo da evolução do potencial zeta pode ser usado para comparar o PIE (ponto isoelétrico) de nanopartículas de  $Fe_3O_4$  sintetizadas em relação às NPMs com a superfície modificada por diferentes materiais de recobrimento, tais como APS (3-aminopropiltrimetoxisilano) permitem inferir a respeito de sua estabilidade em meio líquido (com potencial zeta apresentando valores na faixa de +60 ou -60 mV).



**Figura 25** - Curvas de potencial zeta *versus* pH de NPs de maghemita sem recobrimento, com NPs de maghemita com superfície aminada (APS: 3-aminopropiltrimetoxissilano) e NPs de maghemita encapsuladas em ligação cruzada com coroa de dextrana. (Adaptado da referência (K.THANH, 2012)).

## 2.8 TÉCNICA DE IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

A imagem por ressonância magnética (APTE et al., 2013) se mostra como uma ferramenta associada ao radiodiagnóstico rotineiro nas clínicas médicas hoje e os primeiros exames realizados por essa modalidade surgiram no país, no final da década de 1980 (MAZZOLA, 2009). A IRM possui certas vantagens em relação às outras modalidades (tomografia computadorizada (TC), cintilografia) uma vez que essa técnica de aquisição de imagem é não-invasiva, pois, não usa radiação ionizante e apresenta excelente resolução espacial (capacidade de identificar objetos com tamanhos da ordem inferior a 0,5 mm). Além disso, a resolução de baixo contraste (habilidade de identificar diferenças na imagem nos tecidos que possuem densidades muito próximas) dos tecidos moles é bastante elevada e resulta em perfeitas informações anatômicas (CARAVAN, 2006). A técnica se constitui no uso do vetor indução magnético estático ( $\mathbf{B}_0$ ) aos prótons de  $H^1$  da água presentes nos tecidos que estão precessando com uma frequência ( $10^6$  Hz) e que se alinham na mesma direção do de  $\mathbf{B}_0$ . Em seguida, aplica-se um pulso de radiofrequência (RF), que apresentará uma frequência de Larmor ou de ressonância (64 a 128 mHz para 1,5 a 3,0 T, respectivamente) e os hidrogênios móveis (prótons de  $H^1$  presentes nos líquidos) dos diferentes tecidos irão ser excitados de acordo com sua absorção ressonante específica<sup>(VOGEL)</sup>, constituindo um sinal de ressonância magnética (RM)<sup>(YOFFE et al., 2013)</sup>. Sendo assim, quando o pulso de RF é desligado, os vetores de magnetização efetiva (VME) ou  $M_0$  dos prótons de  $H^1$  que estavam em precessão, retornam aos seus estados de equilíbrio (em alinhamento paralelo ao eixo de  $\mathbf{B}_0$ ). Assim, o tempo que leva para os prótons de  $H^1$  alcançarem esse estado, denomina-se *tempo de relaxamento*, que se baseia na (taxa de absorção específica) SAR de cada tecido sendo examinado, e da intensidade de  $\mathbf{B}_0$ . Esses tempos são constituídos por dois componentes do VME: *tempo de relaxamento longitudinal*,  $T_1$  e *tempo de relaxamento transversal*,  $T_2$ . Logo, se forem executadas sequências de pulsos com determinadas ponderações, é possível obter os diferentes contrastes na IRM (em uma mesma região anatômica) associados aos tempos de relaxamento  $T_1$  e  $T_2$  em função da intensidade do sinal tecido-dependente apresentado pelas diferentes densidades de prótons.

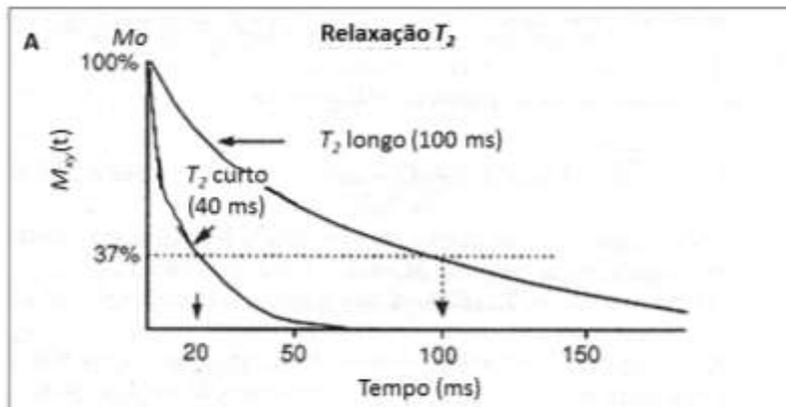
### 2.8.1 Tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ) dos prótons (gadólíno)

Os valores  $T_1$  e  $T_2$  fazem as diferenças de contraste nas imagens de RM compostas e estão associados ao fenômeno de relaxação dos hidrogênios livres resultantes das características dos tecidos após a retirada do pulso de  $90^\circ$ .

O tempo  $T_2$  matematicamente é definido pela constante de decaimento exponencial, pelo qual a intensidade do sinal decai a 37% da magnetização transversal ( $M_{xy}$ ) (após a aplicação do pulso de  $90^\circ$ ) conforme pode ser visto na Equação (12). Por outro lado, o modo de relaxação  $T_2$  representa a troca de energia entre os prótons de  $H^1$  e a interação entre os seus vizinhos, dita como *relaxação spin-spin*. E as interações *spin-spin* provavelmente ocorrem quando as moléculas estão se movimentando lentamente em comparação com a frequência de Larmor ( $\omega_L$ ). A estrutura molecular da amostra magnetizada e características da molécula de água ligadas fortemente afetam seu valor de decaimento  $T_2$ . Fisicamente a perda de coerência (defasagem) reduz a magnetização transversa, sendo bastante influenciada por alterações locais do campo magnético associado a seus *spins*.

$$M_{xy}(t) = M_0 \cdot e^{-(t/T_2)} \quad (12)$$

Onde  $M_{xy}(t)$  é a magnetização transversal no tempo  $t$  para qualquer amostra, e no tempo inicial ( $t=0$ ), o sinal é máximo tal que  $M_{xy}(t=0)=M_0$ . E quando o tempo  $t=T_2$ , então tem-se  $e^{-1} = 0,37$ , logo,  $M_{xy} = 0,37M_0$ . Desse modo, os tecidos com tempo  $T_2$  curto representam relaxação rápida, no caso de moléculas que se movem lentamente, tais como, proteínas e lipídios comumente encontrados em tecidos da gordura, resultando em perda de sinal de IRM. Enquanto que em  $T_2$  mais longos, a relaxação é mais lenta, e para moléculas com elevada taxa de decaimento molecular, no caso de moléculas com água livre, implica em maior sinal de IRM, e a curva de  $M_{xy}$  versus tempo é dada pela Figura 26.



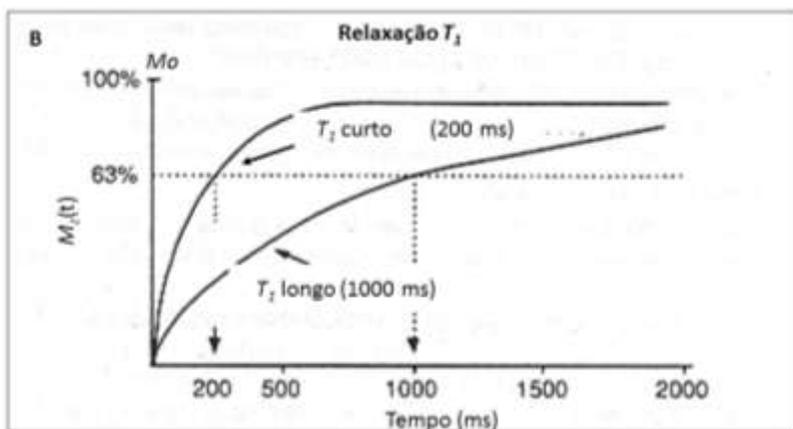
**Figura 26** - Curva representando decaimento exponencial da magnetização transversal ( $M_{xy}(t)$ ) e sua relação com a relaxação transversal  $T_2$  em diferentes tecidos em função da densidade de prótons. Adaptado da referência (LEE, C. H.; WEINREB, 2004).

Por outro lado, o tempo de relaxação  $T_1$  matematicamente é definido como o aumento da magnetização longitudinal  $M_z$ , do vetor de magnetização  $M_0$  pelo qual a intensidade do sinal é recuperada a 63% da magnetização longitudinal ( $M_z$ ) (após a aplicação do pulso de  $90^\circ$ ) no eixo z (na direção de  $\mathbf{B}_0$ ) conforme pode ser visto na Equação (13). Mais ainda, o modo de relaxação  $T_1$  representa a relaxação *longitudinal* ou *spin-rede (lattice)* e indica a liberação de energia entre os prótons de  $H^1$  e a rede (correspondendo ao arranjo molecular e à estrutura da camada de hidratação). Por isso, essas trocas de energia pelas interações *spin-rede* provavelmente ocorrem quando os campos magnéticos flutuam em frequência próximas em comparação com a frequência de Larmor ( $\omega L$ ), de modo que no caso geral, os diferentes tecidos terão  $T_1$  aumentados com o aumento do teor de água e  $T_1$  mais curtos com teor macromolecular (isto é, proteínas, lipídios etc.). Fisicamente, a perda de coerência (defasagem) reduz a magnetização transversa, sendo bastante influenciada por alterações locais do campo magnético, conforme pode ser visto na Figura 27.

$$M_z(t) = M_0 \cdot (1 - e^{-(t/T_1)}) \quad (13)$$

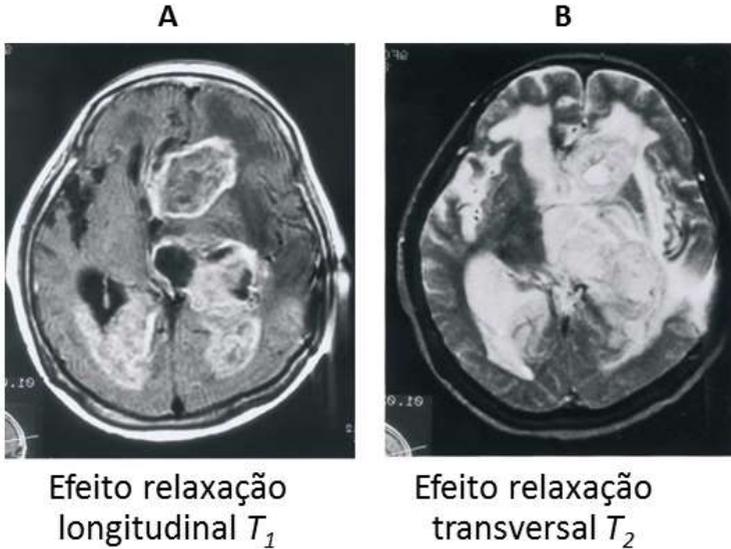
Aí temos que  $M_z(t)$  é a magnetização longitudinal no tempo  $t$  para qualquer amostra, e no tempo inicial ( $t=0$ ), o sinal é máximo tal que

$M_z(t=0)=M_0$ . E quando o tempo  $t=T_1$ , então tem-se  $1-e^{-1} = 0,63$ , logo,  $M_z = 0,63M_0$ . De modo que tecidos com tempo  $T_1$  curto, representam relaxação rápida, em que as moléculas de água estão parcialmente ligadas a moléculas maiores tais como proteínas, onde essas moléculas estão rotacionando em uma taxa próxima à da frequência de Larmor ( $\omega_L$ ). Já para  $T_1$  longo, a relaxação dos prótons de  $H^1$  é mais lenta, para ambos os sólidos e líquidos onde moléculas estão provavelmente rotacionando em taxas tanto inferiores ou superiores à frequência de Larmor ( $\omega_L$ ).



**Figura 27** - Curva representando recuperação da magnetização longitudinal ( $M_z(t)$ ) e sua relação com a relaxação longitudinal  $T_1$  em diferentes tecidos em função da densidade de prótons (Adaptado de (LEE, C. H.; WEINREB, 2004)).

Nesse caso a Figura 28 ilustra um exemplo dos efeitos no contraste da imagem de RM associados a tecidos de crânio com ponderação em  $T_1$  e  $T_2$ . De modo que os tecidos (Figura 28a) com  $T_1$  curto apresentam hipersinal ou elevado brilho e  $T_1$  longo possuem hiposinal ou área escura. Enquanto que os tecidos (Figura 28b) com  $T_2$  curto apresentam hiposinal ou baixo brilho resultando em área escura, e  $T_2$  longo possuem hipersinal ou elevado brilho nas imagens de RM.



**Figura 28** - Efeitos da relaxação  $T_1$  e  $T_2$  nos tecidos presentes no crânio associados às diferentes alterações nos contrastes da imagem por IRM, exibindo hipersinal em A)  $T_1$  curto (gordura, tecido muscular) e em B)  $T_2$  longo (fluido cérebro espinhal, substância cinzenta e branca) (LEE, C. H.; WEINREB, 2004).

### 2.8.2 Uso dos agentes de contrastes positivos e negativos em IRM

Embora a IRM possa trabalhar efetivamente sem quaisquer acessórios, na prática é muitas vezes preferível para melhorar a capacidade de geração de imagens fazer uso de um agente de contraste (AC), que age alterando momentos de relaxamento de prótons de  $H^1$  nos tecidos (SHAPIRO et al., 2004) e aumentando a intensidade de sinal da RM. Além disso, o AC auxilia na melhoria da sensibilidade da IRM pois, realça o contraste da região de interesse (ROI) ao alterar os tempos de relaxação dos prótons de  $H^1$  (SHAPIRO et al., 2004). Eles podem ser compostos paramagnéticos, superparamagnéticos ou ferromagnéticos e geralmente são divididos em duas categorias associadas aos seus efeitos nas relaxações longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ), sendo classificados em: positivos e negativos. Se a água está presente em uma concentração muito superior que a do AC, o mesmo deve agir cataliticamente para relaxar os prótons da água, de modo a observar um efeito no contraste da imagem

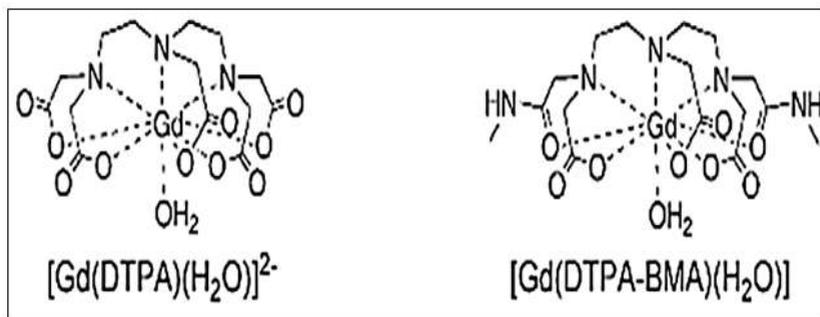
(PETER CARAVAN, 1999). Assim a habilidade de um AC em alterar a taxa de relaxação após a introdução do AC é representada quantitativamente pela sua relaxividade,  $r_1$  ou  $r_2$  (Equação 14), onde o subscrito se refere também à taxa de relaxação longitudinal ( $1/T_1$ ) ou transversal ( $1/T_2$ ), respectivamente.

$$r_{1,2} = \Delta(1/T_{1,2}) / [M] \quad (14)$$

Aí temos que  $[M]$  é a concentração do íon metálico.

De modo que os ACs que reduzem o tempo de relaxação  $T_1$  e consequentemente aumentam o brilho da imagem (hiperintenso ou hipersinal) nos hidrogênios móveis, são conhecidos como contrastes positivos. Os compostos paramagnéticos com elevado número de elétrons desemparelhados incluindo o  $Gd^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ , e o  $Fe^{3+}$  são projetados para responder como ACs tipo  $T_1$  ou positivos por causa do efeito ter sido induzido pelas interações entre os prótons de  $H^1$  das moléculas de água e os *spins* dos elétrons dos ACs (LEE, N.; HYEON, 2012), (KIM, B. H. et al., 2011). Em particular, os complexos de gadolínio tais como, Gd-DOTA, tendo sete elétrons desemparelhados em seu “core” de  $Gd^{3+}$  que consequentemente irão perturbar a relaxação dos prótons ligados na água, e conseguem encurtar o tempo de relaxação longitudinal  $T_1$ , e aumentam a intensidade do sinal na IRM, realçando as imagens com ponderação  $T_1$  e são amplamente usados como ACs positivos, e são ilustrados na Figura 21 (CARAVAN, 2006). Entretanto, os complexos de  $Gd^{3+}$  apresentam várias desvantagens para seu uso clínico. Pois, eles geralmente possuem curto tempo de circulação devido a sua rápida excreção através da urina, o qual prejudica a aquisição de imagem de alta resolução pois, requer um maior tempo no exame de IRM (PENFIELD; REILLY, 2007). Além disso, eles não podem facilmente ser funcionalizados com vários materiais funcionais (anticorpos, biomoléculas etc.). Outro ponto negativo é que, os íons livres de gadolínio, quando são liberados dos seus quelatos e passam a ser transportados na corrente sanguínea, são conhecidos por apresentarem muita toxicidade no organismo. Causando reações adversas, tais como, dor, edema de glote, eritema na pele acompanhado com prurido (coceira excessiva), alopecia (perda de pelo) bem como sintomas de náusea gastrointestinal, vômitos, diarreia e dor abdominal severa de acordo. A longo prazo, também se apresenta um quadro mais severo em que progressivamente tem-se o endurecimento das juntas, dor e enfraquecimento muscular, dores ósseas severas etc

(BROOME, 2008). E em relação a isso, o FDA emitiu um alerta à comunidade médica referente aos ACs de IRM à base de gadolínio que eram responsáveis pela síndrome nefrogênica sistêmica (FSN), a qual é uma síndrome muito grave e foi conhecida por ter sido causada por um processo associado à toxicidade desse lantanídeo em pacientes que apresentam a função renal diminuída ou debilitada, devido ao comprometimento em sua excreção (PENFIELD; REILLY, 2007). Dentre os casos relatados ao FDA em 2007, destacam-se os 21 casos com  $[\text{Gd}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$  seu quelato (gadopentetato dimeglumina) e 85 casos com (Gd-DTPA-BMA) seu quelato (gadodiamida) em que todos pacientes com insuficiência renal crônica ao serem administrados intravenosamente com um desses dois ACs, desenvolveram a síndrome FSN (PENFIELD; REILLY, 2007).



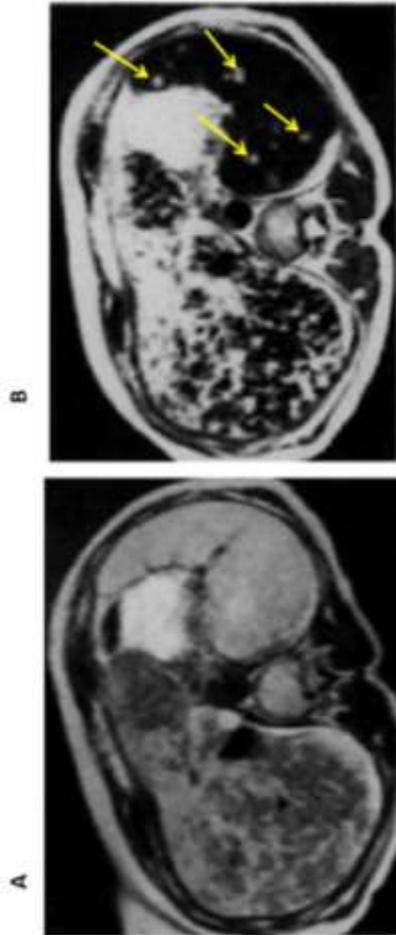
**Figura 29** - ACs positivos que apresentaram a síndrome nefrogênica sistêmica (FSN) devido às complicações decorrentes da toxicidade do  $\text{Gd}^{3+}$  (Adaptada da referência (PETER CARAVAN, 1999)).

Por outro lado, os óxidos de ferro são inerentemente paramagnéticos e produzem seus efeitos predominantemente pelo encurtamento do tempo de relaxação transversal  $T_2$ , e consequentemente irá aumentar a relaxividade  $r_2$ , conforme é apresentado na Equação (15) de acordo com a literatura (LAURENT, S. et al., 2008).

$$Ri(\text{obs}) = 1 / Ti(\text{obs}) = 1 / Ti(\text{diam}) + ri.C; \quad i = 1,2 \quad (15)$$

Aí temos que  $Ri(\text{obs})$  é a taxa de relaxação global do sistema aquoso ( $\text{s}^{-1}$ ),  $Ti(\text{diam})$  é o tempo de relaxação do sistema antes da adição do agente de contraste,  $C$  é a concentração do centro paramagnético ( $\text{mmol L}^{-1}$ ), e  $ri$  é a relaxividade ( $\text{s}^{-1} \text{mmol}^{-1} \text{L}$ ).

Agentes de contrastes (ACs) de óxido de ferro têm adicionado vantagens ao possuírem um caminho bem reconhecido de seu metabolismo e excreção, diferentemente do gadolínio que na forma livre acaba sendo prejudicial ao organismo, sendo que sua distribuição no meio fisiológico depende do tamanho das partículas e das propriedades físicas do recobrimento (SERGE YOFFE, 2013). Além disso, o risco de superdosagens de ferro pode ser descartado, uma vez que sua degradação é feita com entrada no plasma, esse elemento químico será processado pelo corpo (BARRETT et al., 2006). Em particular, nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) foram pela primeira vez estudadas como ACs em humanos (HOGEMANN-SAVELLANO et al., 2003). E essas SPIONs são compostas geralmente por um “core” de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  policristalino com dextrana (comercialmente conhecido Feridex), como de silício (nome comercial ferumoxil), originando partículas com um diâmetro de 50 a 300 nm. Após administração intravenosa, as SPIONs recobertas por dextrana, são capturadas por células fagocíticas dentro do RES (sistema endotelial reticular), aproximadamente 82,6% migram para o fígado e os outros 6,2-7,6% vão para o baço e o restante é eliminado pelo sistema de excreção (ROSEN et al., 2012). De fato, os tumores contêm células fagocíticas em menor número ou apresentam quase nenhuma atividade fagocitária, então irão brilhar mais intensamente (hipersinal) que os tecidos adjacentes, os quais são capturados pelo AC (LAURENT, S. et al., 2008). Nesse caso, estudos clínicos demonstraram que nanopartículas tipo SPIONs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por dextrana (Feridex AMI-25) podem detectar tumores hepáticos e de baço com elevada acurácia de acordo com estudo apontado na literatura (ROSEN et al., 2012), de forma que as partículas AMI-25 quando injetadas intravenosamente facilitaram muito a detecção de tumores com tamanho reduzido em imagens com ponderação  $T_2$  em comparação a imagens adquiridas sem qualquer AC. Pois, levou à redução no sinal em  $T_2$  e consequentemente apresentou após um certo tempo de administração do AC, um escurecimento do parênquima saudável do fígado conforme é ilustrado na Figura 30.



**Figura 30** - Detecção de metastase em baço (A) antes e (B) após 60 minutos de injeção de partículas superparamagnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por dextrana (AMI-25 SPIONs). É possível notar que a grande maioria do tecido do baço (lado direito da imagem em (B)) ficou escurecido ou “reduziu sinal da IRM na relaxação transversal  $T_2$ ) devido ao acúmulo de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, enquanto que as metástases estão claramente visíveis como os pontos claros (hipersinal) indicado pelas setas amarelas. (Adaptado de (ROSEN et al., 2012)).

O estudo clínico também revelou que as partículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  permitiram que fosse aumentado o número de lesões identificáveis em cada paciente quando comparado com outros métodos de diagnóstico por imagem, tais como, ultrassonografia, tomografia computadorizada com realce por contraste iodado e IRM sem uso de contraste. Uma vez que as NPMs melhoram o contraste por reduzir o tempo de relaxação de  $T_2$ , para que elas sejam AC negativos eficientes, as SPIONs devem evadir do sistema imune do corpo humano (serem invisíveis) tal que não sejam eliminadas da corrente sanguínea. Então, a literatura destaca que existem dois mecanismos principais em que as nanopartículas superparamagnéticas podem ser prematuramente removidas da circulação, tanto *via* captação pelo RES ou através dos mecanismos de eliminação pelos rins. O Sistema Reticular-Endotelial é um sistema de defesa composto pela combinação de células como monócitos; macrófagos circulantes e macrófagos fixos presentes em tecidos como as células de Kupffer que são encontrados no fígado, como os macrófagos presentes nos alvéolos pulmonares, os osteoclastos (macrófagos presentes nos ossos) e os macrófagos existentes em glânglios linfáticos; também fazem parte deste sistema de captação não específica as células endoteliais especializadas que estão presentes na medula óssea, no baço e nos glânglios linfáticos (CHAMP; HARVEY; FERRIER, 2006).

Logo, a literatura apresenta que quanto aos ACs para IRM específicos de tumores hepáticos e baços exige-se que as SPIONs sejam prontamente opsonizadas pelo plasma (quando são reconhecidas pelas células que estão no sistema RES) e assim, possuam elevado tamanho hidrodinâmico, tenham superfície carregada positivamente e hidrofóbica (COROT et al., 2006). Porém, também é possível adquirir imagens de outros tecidos cancerosos do RES tais como aqueles localizados nos linfonodos e na medula óssea ao usar pequenas SPIONs tais como Ferumoxtran-10 (AMI-227) (COROT et al., 2006), (LAURENT, S. et al., 2008). Isso representa que o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas é um dos fatores primordiais com relação ao caminho em que essas serão eliminadas, sendo que partículas com tamanho maiores que 200 nm rapidamente serão eliminadas *via* RES (LAURENT, S. et al., 2008), enquanto que partículas com diâmetro hidrodinâmico entre 10 e 150 nm terão o maior tempo de circulação, sua área superficial reduzida, e abaixo de 10 nm serão rapidamente eliminadas pelo sistema renal. Por fim, a literatura destaca que um tamanho limite de 150 nm é uma condição que irá estabelecer a capacidade das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro serem extravasadas da corrente sanguínea por transcitose

(macromoléculas sendo transportadas através das células endoteliais). Assim, o método escolhido para a preparação das NPMs pode influenciar muito nos seus resultados para aplicações médicas como ACs negativos na identificação de tumores primários.

Outro parâmetro associado à eficiência das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como ACs negativos, é a magnetização de saturação ( $M_s$ ), pois, pode ser considerado proporcional ao nível de realce do contraste, uma vez que valores mais altos de  $M_s$  produziram melhoria de contraste na imagem formada por IRM (YOFFE et al., 2013), significando redução acentuada nos tempos de relaxamento  $T_2$ . Para comparação, os valores de  $M_s$  específicos para maghemita e magnetita em grande volume em 300 K são 76 e 92 emu/g, respectivamente (HONG et al., 2007).

No entanto, o valor de  $M_s$  das NPs superparamagnéticas de óxido de ferro depende de muitas variáveis durante a síntese de partículas, incluindo a temperatura de reação, alcalinidade, concentração do reagente, tamanho e morfologia das partículas (MURBE et al., 2008). Mesmo sabendo que o óxido de ferro é um material não tóxico, que geralmente é liberado no corpo para formar a hemoglobina do sangue (LAURENT, S. et al., 2008), elevadas doses de ferro são indesejáveis porque elas aumentam a probabilidade de toxicidade no organismo (DURÁN et al., 2008). Assim, é preferível minimizar a administração de óxido de ferro usando partículas com valores elevados de  $M_s$  para alcançar o contraste eficiente para aplicações de IRM, o que dependerá do método de síntese empregado para preparação das NPs superparamagnéticas, o qual pode influenciar no tamanho das NPs, cristalinidade e suas propriedades magnéticas.

## 2.9 ENSAIOS *IN VITRO* DAS NPMS DE $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Um aspecto importantíssimo que deve ser considerado para a preparação de NPMs de óxido de ferro se refere ao efeito de captação não específica. Este tipo de captação ocorre em virtude do tamanho das partículas que são removidas de circulação por fagocitose realizada por células do Sistema Reticular-Endotelial (JULIANO; STAMP, 1975). De modo geral, a remoção da metade da dose de nanopartículas injetadas em vasos sanguíneos ocorre nos primeiros trinta minutos e esta remoção ocorre pela ação do sistema fagocitário mononuclear e durante os cinco dias seguintes as nanopartículas vão sendo incorporadas pelos macrófagos e pelas células vermelhas do sangue (POULIQUEN et al., 1991). Conforme visto, as NPMs de maior tamanho são removidas da

circulação sanguínea mais rapidamente. O recobrimento polimérico de nanopartículas com dimensões em torno de 100 nm contribuiu de maneira significativa para garantir que elas fossem mantidas em circulação por mais tempo comparativamente às aquelas com maiores dimensões em modelo *in vivo* (SRIVASTAVA et al., 2011) (YADAV et al., 2011). Uma forma de avaliar ou prever os efeitos tóxicos das NPMs a fim de elucidar seus mecanismos de ação envolvidos na captação é através da realização de ensaios *in vitro* sendo que um dos mais conhecidos e utilizados na literatura (K.THANH, 2012) é denominado MTT. Nesse teste, o ensaio objetiva a avaliação da citotoxicidade das NPMs estabilizadas pelos diferentes materiais de recobrimento (polímeros, monômeros, materiais inorgânicos etc.) através do ensaio MTT que corresponde a uma reação de redução enzimática do sal de tetrazólio ou brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) por enzimas mitocondriais (MOSMANN, 1983). A toxicidade, metabolismo e farmacocinética de NPMs de óxido de ferro injetadas intravenosamente tem sido bem estudadas (ROSEN et al., 2012), (K.THANH, 2012). Nesse caso, em modelos animais nenhum efeito adverso foi observado em concentrações de Fe de até 100 mg Kg<sup>-1</sup>, e mesmo uma injeção de 600 mg Kg<sup>-1</sup> não foi fatal, de modo que as nanopartículas foram eliminadas pelos macrófagos no sistema retículo endotelial (RES) (LEE, N.; HYEON, 2012). Pois, os íons Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> são incorporados na ferritina (responsável pelo armazenamento) e/ou hemossiderina como um “pool” de ferro e finalmente se apresenta com funções biológicas tais como, na produção de células sanguíneas vermelhas. Em estudos desenvolvidos por Hyeon (KIM, B. H. et al., 2011; LEE, N.; HYEON, 2012) estabeleceu-se pelo ensaio *in vitro*, de MTT na proliferação de MCF-7 (células para câncer de mama humano), que não foi observado resposta citotóxica das NPMs de óxido de ferro recobertas com PO-PEG (PEG derivatizada com óxido de fosfina) com concentração de Fe até 100 µg mL<sup>-1</sup> para aplicação como AC positivo, o qual exibiu um elevado valor de relaxividade longitudinal  $r_1$  de 4,78mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (KIM, B. H. et al., 2011).

Por outro lado, outro teste *in vitro* importante é o da captação ou “uptake” das NPMs de óxido de ferro método de “Prussian blue”, de um ensaio biológico onde estruturas celulares contendo ferro podem ser evidenciadas e visualizadas utilizando pigmentos inorgânicos como o azul da Prússia. Este pigmento se combina com ferro ou com NPMs de óxido de ferro permitindo sua visualização em amostras de tecidos ou em culturas celulares (MAGNITSKY et al., 2011). Em estudo realizado com células de glioma (C6), a maioria de células (96%) apresentou citoplasma

corado de azul pelo método de “Prussian blue” após 4 h de incubação com nanopartículas magnéticas (100 µg/ml de Fe) enquanto que células neurais normais não apresentaram esta coloração no citoplasma nas mesmas condições de tratamento e tempo de incubação (WAN et al., 2007).

Por fim, esses testes biológicos com ensaio *in vitro* estão associados com esta proposta de trabalho a fim de avaliar a potencialidade das NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recobertas por biopolímero *pheomelanina* como um AC negativo para evidenciar localização por IRM em células MCF-7.

### 3 OBJETIVOS

3.1 GERAL: Preparar, caracterizar e realizar testes *in vitro* de nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas pelo biopolímero *pheomelanina* a fim de verificar sua citotoxicidade e captação em células MCF-7 como potencial agente de contraste para imagem por ressonância magnética em tumores de mama.

#### 3.1 ESPECÍFICOS

- Sintetizar usando método de co-precipitação das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas com o biopolímero *pheomelanina*;

- Caracterizar as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas por *pheomelanina*, pelas técnicas de difração de raios X de pó (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica por transmissão (MET-100 kV), difração de elétrons (SAED), espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (FAAS), espectroscopia por dispersão de energia dispersiva de raios X (EDX), análise elementar, espectrofotometria por fotoelétrons de raios X (XPS), magnetização por amostra vibrante (VSM), espalhamento de luz dinâmico (DLS);

- Realizar medidas de sinal usando IRM a fim de determinar os tempos de relaxamento longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ) em NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas por *pheomelanina* para verificar seu potencial como sondas tumorais;

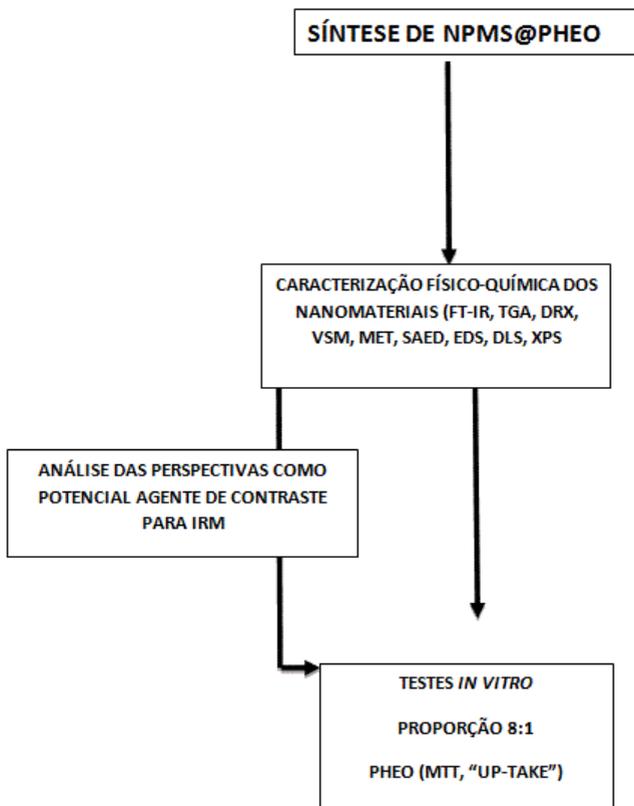
- Realizar testes de citotoxicidade potencial das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas por *pheomelanina* através do método do sal de tetrazólio (MTT) *in vitro* empregando células tumorais da linhagem MCF-7, expostas a diferentes concentrações de Fe das nanopartículas magnéticas;

- Realizar testes de captação ou “uptake” das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas por *pheomelanina* através do método de identificação colorimétrico de azul da Prússia *in vitro* empregando células tumorais da linhagem MCF-7, expostas a diferentes concentrações de Fe.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma da Figura 31 abaixo descreve de uma forma simplificada a metodologia a ser aplicada durante o desenvolvimento deste trabalho.

### DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



**Figura 31** - Fluxograma da metodologia a ser aplicada.

## 4.1 REAGENTES

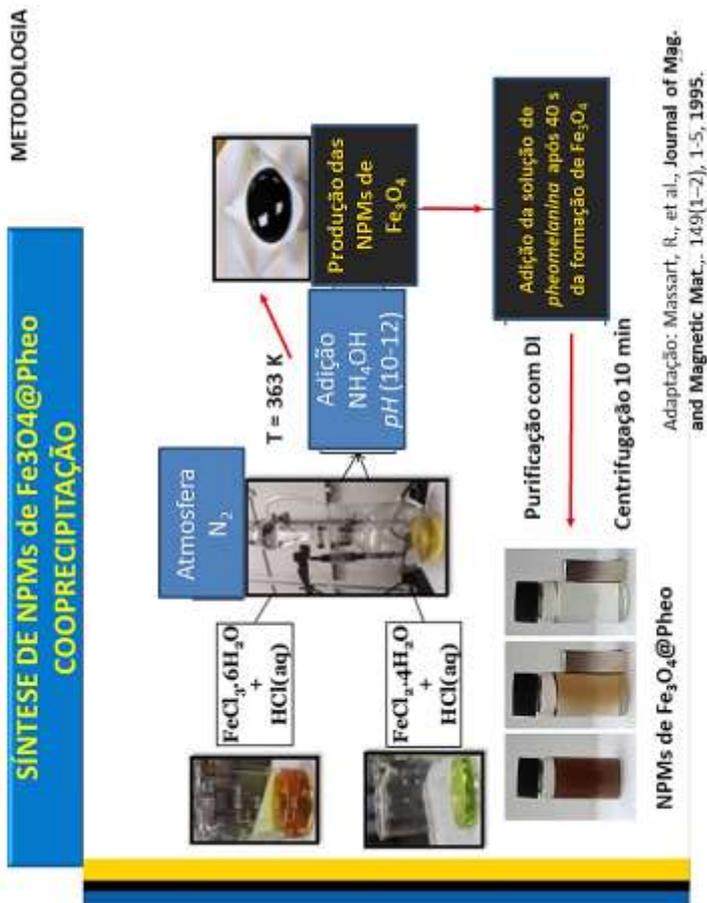
Os reagentes utilizados no desenvolvimento desta tese adquiridos comercialmente foram utilizados sem purificação prévia e não necessitaram de outros procedimentos especiais: EHEC = etil hidroxietil celulose (Bermocol, Azonobel), cloreto de ferro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  97% (Dinâmica)), cloreto de ferro (II) ( $\text{FeCl}_2$ , 98%) (Aldrich), dimetil sulfoxido (DMSO) (Aldrich) hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) (Aldrich), 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-Dopa) (Aldrich), ácido fólico (Aldrich), N-Hidroxisucinimida (NHS) (Aldrich), N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC), acetona (Vetec), etanol 99,5% (Aldrich), trietilamina (Et3N) (Aldrich) enzima tirosinase em pó liofilizado extraída de fungos na concentração maior que 1000 unidades por mg de sólido, L-cisteína (Aldrich), ácido hidrocloreto (HCl) (Vetec), hidróxido de potássio (TEJA; KOH) (Vetec), DMEM (Meio de cultura das células) (Dubecoo), hidrogênio fosfato de sódio mono/di básico (VETEC), diciclohexil carbodiimida (Aldrich). A *pheomelanina* foi preparada em colaboração pelo Químico, Dr. Thiago Guimarães Costa e foi gentilmente cedida para a realização dos procedimentos experimentais envolvendo as sínteses inorgânicas para a execução do recobrimento das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

## 4.2 SÍNTESE DA *PHEOMELANINA*

A preparação da *pheomelanina* foi baseada em metodologia de Chedekel e colaboradores (CHEDEKEL et al., 1987), e envolveu a reação de L-Dopa com o aminoácido L-cisteína na presença da tirosinase agindo como catalista. Brevemente, a preparação envolveu a solubilização de L-Dopa (0,36 mmol) em solução aquosa de tampão fosfato (PBS) (0,1 mol L<sup>-1</sup>),  $\text{pH} = 7.4$  a 310 K. Após a completa dissolução do reagente precursor, adição da tirosinase e do aminoácido, o meio de reação foi mantido sob agitação magnética por 48 horas e então, 5,0 mL de HCl (1,0 mol L<sup>-1</sup>) foi adicionado para precipitar o produto final marrom. Então, o produto foi centrifugado a fim de se obter um sólido, o qual foi purificado para recristalização em meio quente usando água destilada / acetona para eliminação de resíduos de L-DOPA e cisteína não polimerizada. Finalmente, o solvente que permaneceu no produto e na solução, foi lavada duas vezes em água deionizada, e mantida em congelamento durante a noite, para a liofilização.

### 4.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) RECOBERTAS POR *PHEOMELANINA*

Em primeiro lugar, a solução de *pheomelanina* foi preparada em um béquer (80 mL), contendo 100 mg de *pheomelanina* (correspondendo 0,5 mmol em relação ao precursor L-Dopa ou L-3,4-dihidroxi-fenilalanina) solubilizada em 30 mL de água deionizada com agitação magnética e um volume de 10 mL da solução alcalina (0,1 mol L<sup>-1</sup> de KOH) foi gotejado lentamente até atingir o *pH* 9.0. Então, o sistema de reação foi mantido sob agitação durante 24 horas. As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPMs) recobertas por *pheomelanina* (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo) foram sintetizadas pelo método de co-precipitação com modificações (MASSART, 1981), (MASSART et al., 1995) e estão ilustradas na Figura 32.



**Figura 32** - Descrição esquemática da metodologia empregada para a preparação de NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo.

Foram preparadas soluções de 4,0 mmol (1,233 g) de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O e 2,0 mmol (0,253 g) de FeCl<sub>2</sub> diluído em 500 μL de solução HCl (1 M) (pH 4,0) e mantidos fechados em frascos previamente purgados com N<sub>2</sub> por dois minutos para evitar oxidação. Em seguida, as duas soluções ácidas de Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> foram transferidas a um balão de fundo chato com três saídas (250 mL) com 100 mL de água deionizada e aquecidas a 90

°C. Na sequência, 10 mL de solução de hidróxido de amônio (vol. 25%) foram injetados rapidamente no balão de reação e imediatamente após 40 segundos, a solução de *pheomelanina* foi adicionada ao sistema de reação, sendo este mantido sob agitação vigorosa por 30 min, em atmosfera inerte de N<sub>2</sub>. Foi observada uma imediata alteração na coloração da solução (marrom escuro/preto) indicando a formação das NPMs de óxido de ferro estabilizadas pela *pheomelanina* (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo). O meio de reação foi então resfriado até atingir temperatura ambiente e as nanopartículas foram rapidamente separadas por decantação magnética com imã de neodímio e lavadas por várias vezes (mínimo de quatro) com água deionizada até atingir a neutralização da solução (*pH* = 7.0). Finalmente, as NPMs foram mantidas sob condições de congelamento (- 20 °C) a fim de serem liofilizadas para as caracterizações físico-químicas futuras.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

### 4.2.1 Análise Elementar

A análise elementar constitui um método de análise qualitativa dos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre e foram realizadas em um analisador elementar modelo Flash EA 1112 series CHNS Marca: Thermo Electron Corporation no Laboratório de Análise e Caracterização Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

### 4.2.2 Análise de Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

As análises espectroscópicas de infravermelho foram realizadas na região de 4000-400 cm<sup>-1</sup> utilizando um espectrofotômetro JASCO FT/IR 4100 no Laboratório de Materiais do Ateliê de Conservação-Restauração de Bens Culturais Móveis – ATECOR da Fundação Catarinense de Cultura com 64 varreduras para cada amostra, com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup> da linha base. Para a obtenção dos espectros de infravermelho (FTIR) das amostras no espectrômetro de infravermelho (IV), uma quantidade de 100 mg de KBr foi triturada em gral de ágata e pastilhas desse pó foram obtidas por compressão de até 7 Kgf e, após, foi feita a leitura de *background* para obtenção da linha base. Em seguida, 2mg da amostra foram adicionados a 200 mg de KBr e novamente esta mistura foi triturada em gral de ágata, onde se repetiu o processo para obtenção

de uma pastilha colorida (marrom claro) e procedeu-se à leitura do espectro.

#### **4.2.3 Análise Termogravimétrica (TGA)**

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas em um equipamento TGA-50 Shimadzu da Cental de Análises do Departamento de Química da UFSC no intervalo de temperatura entre 25 e 900 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C/ min. Amostras de 5-10 mg foram inseridas em cadinho de platina sob atmosfera inerte de N<sub>2</sub> (50 mL min<sup>-1</sup>).

#### **4.2.4 Espectrometria de energia dispersiva de Raios-X**

Também chamada de microanálise por energia dispersiva – EDS, consiste na incidência de um feixe de elétrons sobre o complexo metálico, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida que é emitida em comprimento de onda no espectro de raios-x. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron (LIDE, 2006). O experimento foi realizado no equipamento de microscopia eletrônica de varredura modelo JEOL JSM-6390LV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC. As amostras foram preparadas seguindo a metodologia e procedimentos adequados para a análise por microscopia eletrônica por varredura (MEV).

#### **4.2.5 Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Difração de Elétrons de Área Seleccionada (SAED)**

As imagens das amostras pelas análises por microscopia eletrônica por transmissão e de difração de elétrons de área seleccionada (SAED) foram coletadas em um microscópio JEM-1011 (100 kV) no Laboratório Multiusuário do Centro de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME-UFSC). A preparação das amostras para análise envolveu uma concentração de NPMs com cerca de 200 ppm sendo dispersas em CH<sub>3</sub>OH e sendo posta em sonicação por 2 minutos. Posteriormente, foi coletada uma alíquota de 4 µL, de cada amostra, e esta foi gotejada por 4 vezes em um grid de cobre (FCF200-Cu). Os *grids* de cobre de todas as alíquotas foram colocados em um dessecador de vidro sob vácuo por 24

hs e submetidos a análise em um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (100 Kv).

#### 4.2.6 Difração de Raios X de Pó (DRX)

Para as análises de difração de raios X de pó (DRX) das amostras foi utilizado um Difratorômetro de raios-x modelo X'Pert PRO Multi-Purpose, PanAnalytical do Laboratório Multiusuários de Difração de Raios X do Departamento de Física da UFSC onde há a fonte de raios X de radiação  $K\alpha$  de Cu ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), e com tensão e corrente máxima, respectivamente de 45 kV e 40 mA com uma taxa de varredura de  $^\circ/\text{min}$  de  $2\theta$  na faixa de 10 a  $90^\circ$  com passos de  $0,05^\circ$ . Para a análise de fases das amostras em reflexão e transmissão, Rietveld, incluindo detector proporcional X'Celerator, com monocromador curvo de feixe difratado para radiação de Cu e detector proporcional de Xe com auxílio de software da Philips X'Pert Plus e método de Rietveld, utilizados para cálculo de tamanho médio do cristalito. Para outras amostras, as medidas foram obtidas em um difratômetro Siemens D500 do Instituto de Física (UFRGS) usando radiação de Cu  $K\alpha$  ( $\lambda_{CuK\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$ ) em uma taxa de varredura de  $^\circ \text{ min}^{-1}$  do ângulo  $2\theta$  na faixa de 20 a  $80^\circ$  com passos de  $0,05^\circ$  (40 kV, 40 mA).

#### 4.2.7 Medidas de Magnetização por Amostra Vibrante (VSM)

As medidas de magnetização de saturação ( $M_s$ ) das amostras (5 mg) foram obtidas de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pheo}$  secas, na forma de pó, pressionadas e mantidas em um suporte cilíndrico, em um magnetômetro de amostra vibrante (VSM) Modelo Microsense EV9) do Laboratório Multiusuário de Magnetização do Departamento de Física da UFSC. A faixa de varredura dos momentos magnéticos foi executada pela alteração do campo magnético de 20,000 Oe (2T) to -20,000 Oe (-2 T) em 300 K, sendo que as análises foram realizadas em duplicata. A leitura das amostras foi feita por meio da interpretação da curva de histerese visando obter valores de magnetização de saturação ( $M_s$ ) em emu/g em função do campo magnético aplicado ( $H$ ).

#### **4.2.8 Medidas de concentração de ferro por FASS**

A concentração de ferro presente nas amostras foi determinada usando um espectrômetro por absorção atômica com atomização por chama (FASS) modelo PinAAcle 900T, PTAS11120701 Perkin Elmer, EUA da Cental de Análises do Departamento de Química da UFSC. A quantidade utilizada na preparação das amostras variou entre 10 a 20 mg de amostra. As amostras foram dissolvidas em solução de ácido perclórico concentrado para leitura no FAAS de acordo com metodologia adaptada (FARAJI et al., 2012).

#### **4.2.9 Técnica de Espectroscopia por Fotoelétrons de Raios X (XPS)**

Os espectros de XPS foram coletados em espectrometro de raios X modelo Thermo Scientific™ ESCALAB™ 250Xi do Laboratório Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense e o instrumento foi equipado com uma fonte de raios X monocromáticos de Al K $\alpha$  (1486.6 eV). As amostras foram analisadas na forma de pó seco e a fonte de radiação foi focalizada em ponto focal de 900  $\mu$ m por um canhão de elétron. Os espectros foram adquiridos com um passo de energia de 1 eV enquanto que os picos Fe2p, O1s e C1s foram adquiridos com um passo de energia de 0.05 eV.

#### **4.2.10 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta**

As medidas de diâmetro hidrodinâmico, estabilidade dos ferrofluidos e carga superficial foram realizadas em um analisador Zetasizer 3000HSA Malvern do LaCBIO do Departamento de Química da UFSC, equipado com laser He/Ne de comprimento de onda de 633 nm. As amostras em pó foram dispersas em diferentes soluções tampão (PBS  $pH = 7,4$ ; ácido cítrico  $pH = 4,0$ ; TRIS  $pH = 8,0$ ) de modo que foram centrifugadas (4000 x 10 min), filtradas usando filtro (0,2  $\mu$ m) nas concentrações finais de 50 e 100 ppm, e mantidos por 10 min em banho de ultrassom. Sendo que todas análises foram realizadas em triplicata e concomitantemente foram obtidas o valor do diâmetro hidrodinâmico ( $d_H$ ) e do potencial zeta ( $\zeta$ ) das NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo. O teste de estabilidade coloidal foi realizado considerando que as medidas por DLS nas amostras foram repetidas levando em conta os seguintes períodos, 1º dia, 3º dia e 7º dia) em solução tampão PBS  $pH 7,4$  nas concentrações de

50 e 100 ppm, sendo que antes de cada leitura, todas as soluções foram sonicadas por 10 min.

#### **4.2.11 Preparação do “phantom” de gel ágar para análises por IRM**

A preparação de suspensões de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pheo}$  no “phantom” de gel ágar foi realizada até 48 h após a aquisição das imagens por IRM e seguiu o método previamente descrito (JAIN et al., 2008) com pequenas modificações. Brevemente, suspensões de NPMs em diferentes concentrações (0, 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ou em  $\text{mmol L}^{-1}$ ) foram analisadas por FASS para obtenção das concentrações de ferro em cada suspensão. Sendo que estas suspensões foram mantidas em PBS (tampão fosfato pH = 7,2). Uma solução de gel ágar de 2,5% p/v foi preparada pelo aquecimento de 250 mg de ágar em 10 mL de PBS em 80°C por 20 min. Para preparar os géis, 160  $\mu\text{L}$  da solução foram misturadas com 840  $\mu\text{L}$  da suspensão das NPMs em cada concentração, e esta solução foi pré-aquecida a 60°C para prevenir a gelificação enquanto a mistura ocorresse. Posteriormente, o gel ágar e as suspensões de NPMs foram misturadas sob aquecimento dentro de tubos de microcentrífugas (1,5 mL) sendo esses tubos eram virados de cabeça para baixo por várias vezes seguidas. Uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  da mistura foi então rapidamente transferida para outro tubo microcentrífuga e permitido resfriar à temperatura ambiente, sendo em seguida, purgado em  $\text{N}_2$  e deixado em descanso para análise posterior por IRM.

#### **4.2.12 Medidas das características de aquisição de imagem das NPMs em “phantom” gel ágar por IRM**

Após a preparação, os tubos contendo suspensões de NPMs de óxido de ferro em gel ágar (250  $\mu\text{L}$ ) foram posicionados próximos ao isocentro em um “scanner” de IRM modelo Sigma Excite 1.5 T - General Electric em uma clínica da Grande Florianópolis dentro de uma bobina transmissora-receptora de cabeça com quadratura com um vetor indução magnético aplicado  $B_1$  homogêneo para obtenção das imagens por IRM. Para a manipulação, visualização e análise das imagens de IRM foi usado um software livre (Weasis DICOM viewer, Eclipse Public License - v 1.0). Para estimar o tempo de relaxação no plano transversal ( $T_2$ ) para cada amostra, imagens coronais ( $TH = 2$  mm) foram adquiridas em vários tempos de eco na faixa de 10 até 240 ms com um tempo de repetição ( $T_R$ ) de 10000 ms. Similarmente, o tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) para

cada amostra foi medido ao variar  $T_R$  entre 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 e 10000 ms enquanto que se manteve constante o  $T_E$  em 10 ms. Após a aquisição das imagens por IRM, a intensidade da imagem em uma mesma área circular (pixel) para cada uma das amostras foi medida dentro de regiões manualmente desenhadas (ROIs) pelo programa “Weasis”. E em seguida, as taxas de relaxação longitudinal e transversal, respectivamente,  $R_1$  ( $1/T_1$ ) e  $R_2$  ( $1/T_2$ ) foram calculadas por uma curva de correlação com uma função mono-exponencial para estimar a curva entre a Intensidade de sinal *versus* tempo ( $T_E$  ou  $T_R$ ) com dados coletados por um programa de gráficos (Origin 8.0 software). A Equação (16) apresenta a função que permitiu estimar a curva da taxa de relaxação transversal  $R_2$  ( $1/T_2$ ) para a intensidade do sinal ( $I(t)$ ) *versus* a concentração de ferro [Fe].

$$I(t) = I(t=0) * \exp(-T_E/T_2) \quad (16)$$

Onde  $I(t=0)$  é medida pela magnetização transversal ( $M_{x,y}$ ) pelas análises por VSM.

As estimativas da curva para dependência linear, o gráfico das taxas de relaxação longitudinal e transversal, respectivamente,  $1/T_1$  e  $1/T_2$  como uma função da concentração de ferro das NPMs, foi obtido usando as seguintes equações para relaxividade longitudinal e transversal ( $r_1$  e  $r_2$ , respectivamente) como uma função da concentração de ferro.

$$1/T_1 = 1/T_{1,0} + r_1[\text{Fe}] \quad (17)$$

Onde:

$1/T_1$  é a taxa de relaxação longitudinal da amostra.

$1/T_{1,0}$  é a taxa de relaxação longitudinal do controle.

Já, para a equação que relaciona a intensidade do sinal ( $I(t)$ ) com o tempo de relaxamento longitudinal ( $T_1$ ) é dada pela seguinte expressão:

$$I(t) = I(t=0) * (1 - \exp(-T_R/T_1)) \quad (18)$$

Onde:  $I(t=0)$  é a magnetização longitudinal ( $M_o$ ) das NPMs.

Por outro lado, é possível determinar a taxa de relaxação transversal  $R_2$  usando a seguinte expressão:

$$1/T_2 = 1/T_{2,0} + r_2[\text{Fe}] \quad (19)$$

Onde  $1/T_2$  é a taxa de relaxação transversal da amostra e  $1/T_{2,0}$  é a taxa de relaxação transversal do controle.

#### 4.2.13 Ensaio MTT (teste *in vitro*) para citotoxicidade contra células MCF-7

Para a execução do estudo foram utilizadas células da linhagem tumoral MCF-7 (carcinoma de mama humano) procedentes do banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas e mantidas a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> (5%) com 95% de umidade em meio DMEM suplementado com solução PBS (10%), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). A citotoxicidade potencial *in vitro* das nanopartículas foi avaliada no Laboratório de Bioquímica Experimental do Departamento de Bioquímica da UFSC usando o método do sal de tetrazólio (MTT) (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MOSMANN, 1983), empregando células tumorais da linhagem MCF-7, expostas a diferentes concentrações das NPMs. Estas concentrações foram preparadas em meio de cultivo em condições assépticas dentro de cabine de proteção biológica (VECO, modelo Bioprotector VLFS-12M). Inicialmente no ensaio foram utilizadas placas multipoços (96 poços) onde foram semeadas as células da referida linhagem na densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço. Após incubação por 24 h, em confluência, o meio contendo as células foi removido e substituído por uma suspensão preparada com o meio de cultivo DMEM fresco e NPMs em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50, 75 e 100 ppm), sendo expostas por 24 h. Todas as suspensões, tanto das NPMs de óxido de ferro quanto das suspensões preparadas com meio de cultivo DMEM foram submetidas à agitação em vortex (Biomixer, modelo QL 901) por 1 min antes de serem utilizadas. Como controle negativo as células foram incubadas em meio de cultura no qual foi adicionada uma quantidade equivalente do veículo tampão fosfato salina 100 mmol L<sup>-1</sup> NaCl (*Phosphate Buffered Saline - PBS*), empregado no preparo da suspensão de NPMs. Em seguida, as células foram então lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 2 h com MTT (0.5 mg mL<sup>-1</sup>). Na sequência, o meio contendo o MTT foi removido, sendo imediatamente adicionados 100 µl de DMSO (0,25%), e os cristais de formazan foram solubilizados após agitação por 10 minutos em agitador de placas multipoços (CIENETEC,

modelo Kline CT 150), foi efetuada a leitura com auxílio de um leitor de placas (540 nm, 27 °C) (TECAN, Infini M 200), seguida da avaliação espectrofotométrica das placas para determinar a viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Os ensaios foram realizados em três experimentos distintos, sendo que cada concentração foi testada em triplicata. Esses três experimentos independentes foram conduzidos, e os resultados foram apresentados por um gráfico representando a viabilidade celular em função da concentração de ferro das NPMs.

#### **4.2.14 Ensaio de “uptake” das NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo com células MCF-7**

Células em cultura captam nanopartículas dispersas ou em suspensão no meio de cultivo. Isto pode ocorrer por diferentes mecanismos em virtude das dimensões nanométricas das nanopartículas. Partículas maiores podem ser incorporadas por fagocitose (ZIMMER et al., 1995) ou pode haver endocitose mediada por receptor (KUMAR et al., 2012). Estruturas celulares podem ser evidenciadas utilizando o pigmento inorgânico ferrocianeto férrico (azul da Prússia). Esse pigmento se combina com nanopartículas de ferro como as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas permitindo sua visualização em amostras de tecidos (MAGNITSKY et al., 2011).

O ensaio *in vitro* utilizado constitui o denominado “uptake” onde se pretende avaliar a captação das NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pelas células MCF-7. De modo que as nanopartículas empregadas foram suspensas em PBS (pH 7,4) na concentração inicial de 200 ppm e mantidas por 2 a 4 h em banho ultrassônico mantido aquecido a 37 °C. Este procedimento foi efetuado até obter-se a suspensão completa das nanopartículas (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo) sem formação de precipitado. As suspensões obtidas foram submetidas à atmosfera inerte (gás nitrogênio) e mantidas congeladas (-20° C) até o momento de sua utilização. Para o tratamento das células, as suspensões contendo as nanopartículas foram descongeladas e mantidas por 1 h em banho ultrassônico sem aquecimento. Uma alíquota da suspensão foi adicionada ao meio de cultura para obterem-se as concentrações testadas.

Em seguida, seguiu-se a preparação dos corantes empregados nas suspensões das nanopartículas e para isso, foram dissolvidos 2 g de orceína em uma solução contendo 55 ml de água destilada utilizando agitador magnético sob aquecimento (fervido por 10 min). Após resfriado, acrescentou-se 45 ml de ácido acético glacial e esse foi misturado bem e mantido sob temperatura ambiente. A próxima etapa

envolveu a adição das quantidades de células ( $5 \times 10^4$  para placas de 12 poços) contendo o meio completo empregando 100 mL da suspensão celular, 100 ml de tripan e 800 ml de meio, sendo posteriormente, transferidos para os poços (12) contendo as células. Após, as mesmas foram incubadas por 24h ou tempo suficiente para atingir 80% de confluência (KUMAR et al., 2014). As imagens obtidas de células MCF-7 empregando microscopia de campo claro em aumento de 40 vezes puderam ser visualizadas. As células foram mantidas em meio DMEM contendo concentrações crescentes de ferro das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Pheo$  preparadas em DMEM por um período de 4 h, sendo o controle negativo, o meio de cultura com PBS (YOU et al., 2007). A coloração com “Prussian blue” permitiu uma boa visualização das nanopartículas (em azul) enquanto que a orceína acética corou o núcleo e citoplasma de tons de vermelho.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE DAS NPMS DE $Fe_3O_4$ ESTABILIZADAS POR *PHEOMELANINA* ( $Fe_3O_4@PHEO$ )

Estudos de interação entre melaninas e o íon ferro(III) foram realizados em trabalhos anteriores, por técnicas de titulação potenciométrica em que as melaninas (*eumelanina* e *pheomelanina*) puderam ser caracterizadas elucidando seus grupos majoritários que apresentaram, respectivamente os seguintes valores de  $pK_a$  3,3; 6,83; 8,29, 10,99 e 14,28 correspondentes aos acetatos, quinonas-iminas, tióis e aos catecóis com duas constantes de desprotonação (COSTA et al., 2012), (THIAGO G. COSTAA, 2015). Esses grupos existentes neste biopolímero também foram evidenciados por estudos envolvendo análises espectroscópicas associadas a estudos de degradação química realizados por Liu e colaboradores (LIU, Y. et al., 2005), e têm sido utilizados para investigação direta a respeito da estrutura da *pheomelanina* e *eumelanina*.

Conforme destacado na revisão teórica, na literatura são descritos vários métodos de síntese de NPMS envolvendo processos “*bottom-up*”, em que ocorre a formação de NPMS de óxidos metálicos na presença de sais inorgânicos ( $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) sob a ação de redutores orgânicos (oleatos, carboxilatos, acetatos, sulfatos) (LAURENT, S. et al., 2008). De modo que se buscou neste trabalho produzir nanopartículas que possam ser mantidas em meio hidrofílico (estabilizadas em solução aquosa ou em meios biológicos).

Um estabilizante foi utilizado, a *pheomelanina*, que atua como agente de recobrimento para as NPMS de  $Fe_3O_4$  e também serve para evitar que essas NPs se aglomerem e causem consequentemente um microembolismo das células no organismo quando administradas intravenosamente (LAURENT, S. et al., 2008).

Foi possível produzir essas NPMS de  $Fe_3O_4$  recobertas por *pheomelanina* ( $Fe_3O_4@Pheo$ ) usando um método de síntese por coprecipitação que se mostrou, dentre as outras opções existentes, uma forma mais segura, com um custo muito baixo e principalmente ambientalmente mais favorável ao dispensar rotas que pudessem exigir solventes orgânicos mais perigosos e que consumissem um tempo maior de preparação ou que envolvesse mais de uma etapa na produção dessas NPMS para atuarem como agente de contraste (AC) em imagem por ressonância magnética (APTE et al., 2013).

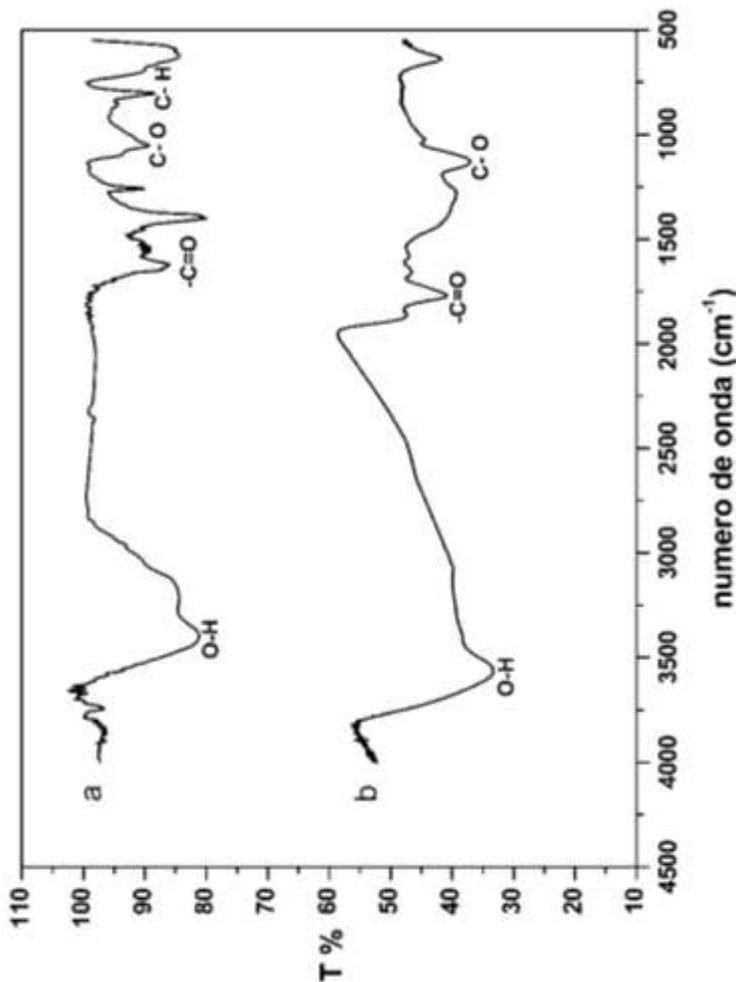
Com relação à síntese das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* a proporção estequiométrica utilizada neste trabalho foi de 8:1 correspondendo respectivamente, 8,0 mmol de  $\text{Fe}^{3+}$  para 1,0 mmol de L-Dopa (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina). A razão de ter sido utilizada a concentração molar do seu precursor é dada pelo fato de que segundo argumentado anteriormente (TESEMA et al., 2008), (LIU, Y. et al., 2005), a *pheomelanina* atualmente não possui um modelo definitivo de sua estrutura química. Isso faz com que consequentemente, não seja possível se assegurar de forma precisa do valor de seu peso molecular ou informação mais precisa a respeito de sua composição molecular. Alguns autores (THIAGO G. COSTAA, 2015), (TESEMA et al., 2008) destacam que há vários tipos de métodos empregados, e dependendo do tipo, estes podem influenciar na estrutura final desse biopolímero.

Uma vez que a síntese de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Pheo$  foi realizada em meio alcalino, onde a *pheomelanina* foi solubilizada e mantida em condições em que o *pH* se encontrasse acima de 9,0, é possível inferir então que os grupos majoritários associados à desprotonação para estabilização com  $\text{Fe}^{3+}$  podem ser caracterizados pelos catecolatos e com  $\text{Fe}^{2+}$  pelos tióis. Logo, neste trabalho, as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* foram produzidas de forma bem sucedida por meio da estabilização de óxido de Fe (Fe-O) com os grupos catecolatos e hidroxilas presentes neste bio-oligômero, por meio de interações covalentes ou eletrostáticas, associadas às condições de *pH* do meio de reação em solução alcalina, mostrando que independentemente de haver uma segunda desprotonação do catecolato (conforme evidenciado em estudos anteriores (THIAGO G. COSTAA, 2015), (SZPOGANICZ et al., 2002) presente na *pheomelanina* em *pH* acima de 10), é importante notar que houve estabilização com a superfície do “core” das NPMs evidenciando o recobrimento e este foi apontado pelos resultados envolvendo as caracterizações físico-químicas (FT-IR, XPS, DLS).

## 5.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DAS NPMS RECOBERTAS POR *PHEOMELANINA* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@PHEO$ )

De acordo com o que foi apresentado anteriormente, os compostos formadores do biopolímero *pheomelanina* (Cys-Dopa) são constituídos pelas unidades benzotiazina e benzotiazóis mostrados na Figura 18, bem como grupamentos majoritários como catecol, quinonas-iminas e ácidos carboxílicos. De modo que a Figura 33 ilustra o espectro de infravermelho com suas frequências de vibração associadas às bandas características

atribuída aos modos vibracionais das ligações entre os átomos que constituem, respectivamente as NPMs recobertas por *pheomelanina* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Pheo}$ , na Figura 33a) em comparação com o espectro de infravermelho da *pheomelanina* pura (Figura 33b).



**Figura 33** - Espectro de infravermelho referente às principais frequências de absorção correspondentes às amostras em pó de (A) NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas pela *pheomelanina* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Pheo}$ ) e de (B) bio oligômero *pheomelanina* pura.

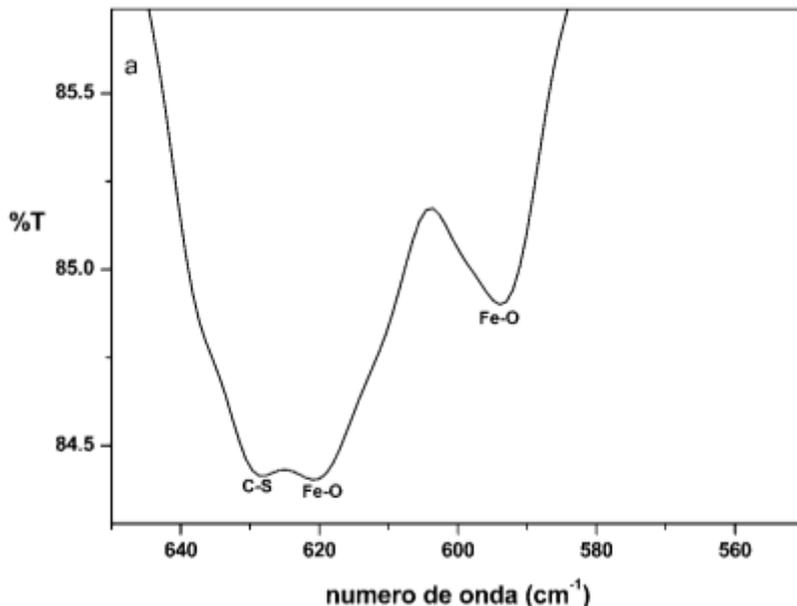
De modo que a Tabela 1 apresenta as principais frequências de absorção atribuídas aos vários modos vibracionais (BILINSKA, 1996), (COSTA et al., 2012), (MAITY; AGRAWAL, 2007), das ligações entre os átomos presentes no espectro das Figuras 33a e 33b.

**Tabela 1** - Frequências de absorção na região do infravermelho de amostras em pó de *pheomelanina* pura e NPMs recobertas por *pheomelanina* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@Pheo$ ).

<i>Pheomelanina</i>	NPMs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Pheo$	Bandas de absorção ( $\nu$ : estiramento; $\delta$ : deformação angular)
3500 $\text{cm}^{-1}$ (BILINSKA, 1996)	3438 $\text{cm}^{-1}$ (THIAGO G. COSTAA, 2015)	$\nu(\text{O} - \text{H})$ para H ligados a grupos OH
1800-1700 $\text{cm}^{-1}$ (COSTA et al., 2012)	1633 $\text{cm}^{-1}$ (MAITY; AGRAWAL, 2007)	$\nu(\text{C} = \text{O})$ para grupos COOH (livre) ou $\nu(\text{O} - \text{H})$ para $\text{H}_2\text{O}$
1100 $\text{cm}^{-1}$ (BILINSKA, 1996)(Bilinska et al., 1992; (THIAGO G. COSTAA, 2015)	1045 $\text{cm}^{-1}$ (MAITY; AGRAWAL, 2007)	$\nu(\text{C} - \text{O})$ e $\delta(\text{O}-\text{H})$ para grupos COOH (livre)
840 $\text{cm}^{-1}$ (PIERCE; RAST, 1995)	792 $\text{cm}^{-1}$	$\nu(\text{C} - \text{H})$ para grupos aromáticos
700-641 $\text{cm}^{-1}$ (BILINSKA, 1996)	628 $\text{cm}^{-1}$	$\nu(\text{C} - \text{S})$ para grupos benzotiazóis
-	594 $\text{cm}^{-1}$ ; 620 $\text{cm}^{-1}$ (MAITY; AGRAWAL, 2007)	$\nu(\text{Fe}-\text{O})$ (vibração de estiramento no sítio tetraédrico)

De acordo com as frequências de absorção características da Tabela 1 é possível inferir que os grupos majoritários da *pheomelanina* (Figura 33b), tais como, ácidos carboxílicos, catecóis protonados e quinona-iminas protonados (BILINSKA, 1996), (COSTA et al., 2012); (THIAGO G. COSTAA, 2015) constituem o material de recobrimento das nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Figura 33a). Uma vez que a tabela apresentou as frequências de absorção associadas, respectivamente aos estiramentos  $\nu(\text{O} - \text{H})$  em  $3438\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C} = \text{O})$  em  $1633\text{cm}^{-1}$ , aqui nesta região, também pode ser associado a identificação de estiramento  $\nu(\text{O} - \text{H})$  pela presença de  $\text{H}_2\text{O}$  ligada (MAITY; AGRAWAL, 2007). Além disso, evidencia-se a presença de grupos benzotiazóis, pelo aparecimento de uma banda deslocada abaixo com um pico inferior a  $700\text{cm}^{-1}$  (Figura 34) associado ao estiramento  $\nu(\text{C-S})$  em  $628\text{cm}^{-1}$  presentes em grupos benzotiazóis, que constituem os precursores da *pheomelanina* (Bilinska, et al, 1992). Além disso, notou-se presença no espectro da Figura 33b de um pico com uma banda forte em  $1400\text{cm}^{-1}$ , e que pode ser atribuída aos modos vibracionais correspondentes aos estiramentos  $\nu(\text{C-O})$  pela presença de  $\text{CO}_2$  (do ar) ou também em  $\nu(\text{NH}_4^+)$  para resíduo de hidróxido de amônio (MAITY; AGRAWAL, 2007) nas amostras das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina*.

Já, para as bandas de absorção características das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , observou-se os picos no espectro (Figura 34) em  $\nu(\text{Fe-O})$  (vibração de estiramento no sítio tetraédrico) em  $593\text{cm}^{-1}$  e em  $620\text{cm}^{-1}$ , correspondentes ao  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  do espinélio inverso da estrutura relativo á magnetita, e esses resultados estão em concordância com a literatura (MAITY; AGRAWAL, 2007).



**Figura 34** - Espectro de infravermelho referente aos modos vibracionais atribuídos ao estiramento da ligação C-S e Fe-O respectivamente, associados aos grupos benzotiazóis e de magnetita estabilizados com NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo).

### 5.3 ANÁLISE ELEMENTAR (C, H, N, S)

As quantidades de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio presentes na *pheomelanina* (cys-DOPA) e nas NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo estão apresentadas na Tabela 2. Observou-se que a presença do biopolímero cys-DOPA recobrindo as NPMs é evidenciada pela presença do percentual nas concentrações de enxofre e dos átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Uma vez que foi comprovada a presença dos grupos majoritários benzotiazóis e quinona-iminas e catecóis com a determinação de átomos de S, onde o índice percentual de material orgânico na amostra foi de aproximadamente 6,6%.

**Tabela 2** - Índice de componentes atômicos determinados por análise elementar.

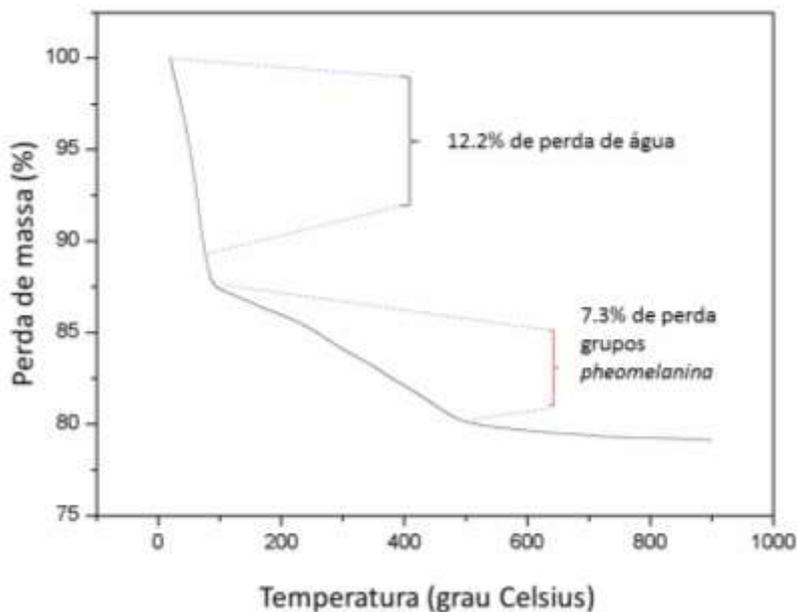
<b>Amostra</b>		<b>% C</b>	<b>% N</b>	<b>% H</b>	<b>% S</b>	<b>% O*</b>
	ref					
Cys-Dopa	Este trabalho	41,8	16,26	4,7	18,6	18,64
<i>Pheomelanina</i>	1	45,8	7,7	4,3	16,0	26,2
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Pheo	Este trabalho	3,86	1,25	0,87	0,60	-

1- (THIAGO G. COSTAA, 2015)

#### 5.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A curva de TGA permite determinar o grau de recobrimento da *pheomelanina*, uma vez que dados da literatura indicam que a cys-DOPA apresenta uma perda de massa maior que outras melaninas sintetizadas e modificadas apresentadas em estudos anteriores (THIAGO G. COSTAA, 2015), de modo que a análise termogravimétrica pode auxiliar e complementar a caracterização de alguns grupamentos presentes no biopolímero. A Figura 35 ilustra a curva termogravimétrica bem como sua associação às perdas de massas correspondentes às suas temperaturas específicas permitindo uma estimativa do grau de recobrimento das NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pelo material orgânico (VOGEL, 1981). Pode então ser observado que na temperatura próximo a 100°C uma perda de massa de até 12,2% (1,325 mg) é correspondente à massa de água adsorvida na superfície das NPMs de óxido de ferro (SIMONOVIC et al., 1990) indicado por um pico endotérmico na curva de TGA (GÓMEZ-MARÍN; SÁNCHEZ, 2010)10). Além disso, a Figura 35 aponta que há um pico exotérmico correspondendo á máxima perda de massa (em 500° C) de 7,3 % (0,810 mg), que foi atribuído ao grau de recobrimento da *pheomelanina* sobre a superfície das NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Esse resultado apresentou concordância com a literatura (XIN et al., 2015); (THIAGO G. COSTAA, 2015), (GUARDIA et al., 2010). Uma vez que esse bio-oligômero apresenta ao menos três fases distintas de perdas de massa (6-62,5%) termicamente entre 280 e 500 °C, os quais estão associados com os seguintes grupos químicos: indol-quinonas, benzotiazóis e benzotiazinas (GÓMEZ-MARÍN; SÁNCHEZ, 2010), (DEZIDÉRIO et al., 2004), (XIN et al., 2015).

Conclui-se então que a análise termogravimétrica (7,3%) e os dados experimentais obtidos pela análise de CHN (Tabela 2) que apontaram ser de 6,4 %, (correspondendo a soma total dos índices de composição atômica de C, H, N e S, excluindo o percentual de O na amostra) apresentaram relativa consistência pela presença de material orgânico do biopolímero *pheomelanina* na amostra comprovando que a preparação das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Pheo$  foi bem sucedida neste trabalho.



**Figura 35** - Curva termogravimétrica relacionando o percentual de perda de massa com o grau de recobrimento do biopolímero *pheomelanina* sob as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

## 5.5 ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDX)

Os resultados de EDX apresentados na Tabela 3 apontam os valores encontrados para o percentual de átomos de carbono, oxigênio, enxofre e ferro, respectivamente com 12,04%, 55,53%, 0,54% e 31,88%. Sendo possível inferir qualitativamente de que os percentuais presentes de material orgânico podem corresponder aos grupos químicos dos compostos presentes no bio-oligômero *pheomelanina*, como material de recobrimento das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Além disso, os resultados indicam também que o percentual de enxofre está em concordância com os dados experimentais obtidos pela análise elementar (CHN, com 0,60% de S) relatados a Tabela 2.

**Tabela 3** - Valores encontrados por espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDX) de NPMs recobertas por *pheomelanina*.

	<b>C-K</b>	<b>O-K</b>	<b>S-K</b>	<b>Fe-K</b>
Contagens	299	12590	532	15324
peso (%)	5.11	31.39	0.62	62.89
átomo (%)	12.04	55.53	0.54	31.88
Erro (%)	+/- 1.69	+/- 0.79	+/- 0.11	+/- 0.47

## 5.6 ESPECTROMETRIA POR ABSORÇÃO ATÔMICA (FASS)

Os dados de espectrometria por absorção atômica por atomização por chama (FASS) seguiram adaptação de metodologia descrita por Shariati e colaboradores (FARAJI et al., 2012) que envolveu a digestão das amostras brutas (valor médio de massa 20,4423 mg) das NPMs de óxido de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  em meio de ácido perclórico concentrado sob aquecimento. As análises foram realizadas em triplicata na Central de Análises (Departamento de Química – UFSC), sendo que os valores encontrados para o índice de Fe presente nas NPMs serviram para os valores corrigidos na determinação dos valores de  $M_s$  obtidas por VSM e das taxas de relaxividade longitudinal ( $1/T_1$ ) e transversal ( $1/T_2$ ) por IRM que estão apresentados nas seções seguintes. O percentual de quantidade de Fe presente nas NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas pelo biopolímero pode ser visto conforme Tabela 4.

**Tabela 4** - Percentual de quantidade de Fe presente nas NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Amostra	% Fe
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo <sup>1</sup>	59,8
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ <sup>2</sup>	50,5

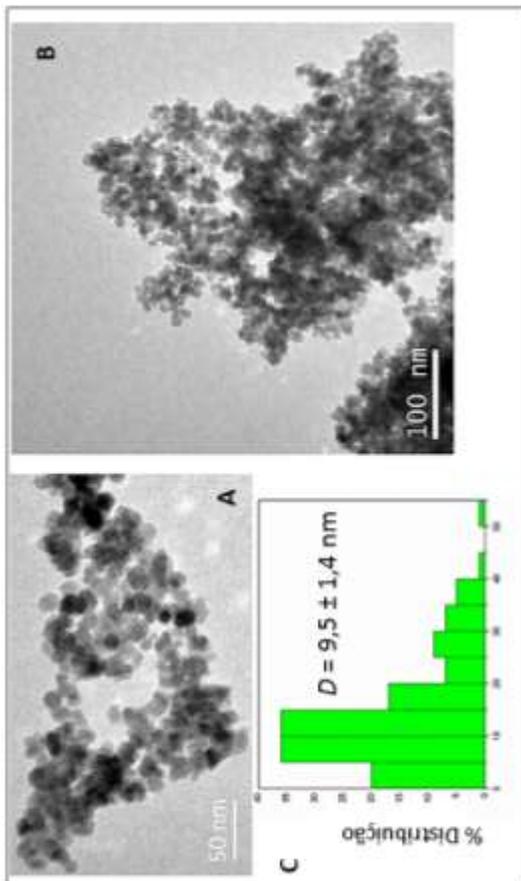
1- Proporção estequiométrica de  $\text{Fe}^{3+}$ / L-DOPA de 8:1 em 4,0 mmol (1,223 g) de  $\text{Fe}_3\text{Cl}_3.6(\text{H}_2\text{O})$   
 2 – síntese de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sem recobrimento (1,8 mmol de  $\text{Fe}_3\text{Cl}_3.6(\text{H}_2\text{O})$ )

Nota-se que o valor de índice de Fe das NPMs sem recobrimento foi cerca de 10% inferior às NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizadas por *pheomelanina*. Esse dado experimental é facilmente explicado pelo fato de que as nanopartículas magnéticas não seguiram um padrão rigoroso durante a preparação na síntese em meio aquoso, o que resultou em NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Fe}_2\text{O}_3$ , justificando o valor inferior de Fe em comparação com as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina*. Porém, vale destacar também que o percentual de massa de Fe presente nas amostras de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo obtido por FASS (59,8%, Tabela 4) foi próximo aos valores estimados com os dados de TGA (58,2%, considerando a soma das quantidades de oxigênio estas resultaram em cerca de 80,36% de perda em massa), atribuída aos constituintes da magnetita cuja fórmula é composta por átomos de oxigênio e ferro (LIDE, 2006). Os valores de  $M_s$  obtidas por VSM e as taxas de relaxividade longitudinal ( $1/T_1$ ) e transversal ( $1/T_2$ ) foram corrigidas com os valores encontrados para o índice de Fe presente nas NPMs.

## 5.7 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM) E DIFRAÇÃO DE ELÉTRONS DE ÁREA SELECIONADA (SAED)

As análises por microscopia eletrônica de transmissão (TEM-100 keV) mostraram ser muito úteis, pois, apresentaram duas informações importantes associadas à síntese e preparação das nanopartículas magnéticas (NPMs) de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina*. A primeira delas é a característica morfológica, que é considerado um fator importante envolvendo o crescimento dessas NPs uma vez que pode acabar influenciando em suas propriedades magnéticas, tais como, magnetização de saturação e anisotropia (K.THANH, 2012). O segundo

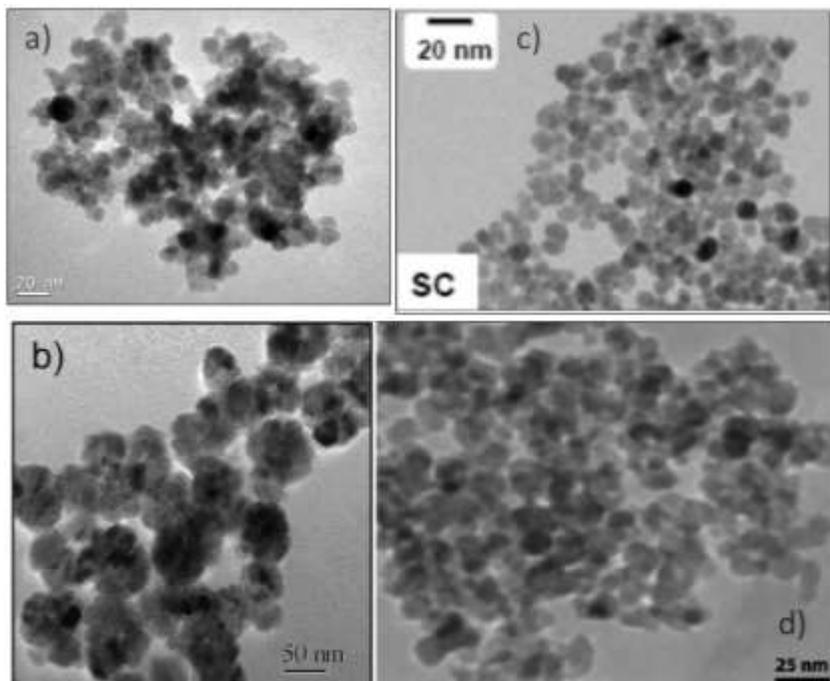
fator crucial associado ao crescimento das partículas é a distribuição de tamanho ou monodispersividade, o que implica consequentemente na estabilização dos ferrofluidos. Uma vez que a estabilização de NPMs em meio aquoso é uma condição necessária quando se busca aplicações biomédicas, os resultados da análise de TEM-110 keV mostrados nas Figuras 36a e 36b representam que as NPMs estabilizadas por *pheomelanina* possuem certo grau de monodispersividade dentro do esperado e diâmetro do “core” médio de 10 m (Figura 36c). Consequência do processo de estabilização estérica do tipo iônica (K.THANH, 2012), proveniente dos grupos catecolatos (CHARKOUDIAN; FRANZ, 2006) do biopolímero da *pheomelanina* mediada pela desprotonação em meio alcalino ( $pH > 9,0$ ) permitindo a estabilização com a superfície de óxido de ferro (Fe-O) por meio de ligação covalente atuando como uma barreira estérica e servindo para prevenir agregação excessiva das NPs em meio aquoso. Esses resultados apresentaram complementaridade com outros estudos relatados anteriormente onde NPMs de  $Fe_3O_4$  com diâmetro de “core” entre 2 a 8 nm com geometrias esféricas estabilizadas por ânions orgânicos (carboxilatos e íons hidroxí carboxilatos) em que o controle de tamanho foi obtido pela formação de coroas hidrofílicas orgânicas (PANKHURST et al., 2009).



**Figura 36** - Micrografias das NPMs de óxido de ferro recobertas por pheomelanina ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pheo}$ ) em (A e B) mostrando relativa monodispersividade e elevada cristalinidade e em (C) histograma da distribuição de tamanho para o diâmetro médio do “core” de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Esses resultados apontaram ser muito parecidos comparativamente com outros trabalhos envolvendo a preparação de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por dopamina para serem utilizadas em aplicações biomédicas (KORPANY et al., 2013). Porém, encontrou-se de forma já esperada pela própria característica do método de co-precipitação, um certo grau de polidispersividade uma vez que o processo de estabilização dessas NPs está associado a uma aglomeração espontânea. Sendo assim, a

estabilidade dessas partículas é fortemente dependente de forças atrativas (de curto alcance constituindo as forças de van der Waals, e de longo alcance, as forças dipolares magnéticas) e repulsivas (eletrostática devido à carga na superfície das NPs e estérica entre as superfícies recobertas por polímeros PEG, dextrana etc (K.THANH, 2012). Mais ainda, a aglomeração dessas partículas nos resultados por TEM é também explicada pela própria dificuldade envolvendo a etapa de preparação das amostras. Quando colocadas em meio aquoso sob os *grids* de cobre (200 mesh), durante o processo de preparo, com um excesso na concentração das soluções em que as NPMs estão diluídas, pode levar a certa precipitação ou acúmulo em uma região do *grid* que recebeu uma área com um maior número de partículas devido a problemas na distribuição da gota sob a superfície do *grid*. Além disso, os resultados neste trabalho apontaram que morfologicamente as NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recobertas por *pheomelanina* rotuladas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo apresentaram esfericidade, monodispersividade e distribuição de tamanho com qualidade igual ou superior em relação a outros estudos relatados na literatura envolvendo polímeros (Figura 36). Em destaque, Habib e colaboradores (HABIBI, 2014) prepararam NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> estabilizadas por carboximetil celulose (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@CMC) utilizando como método de síntese, a co-precipitação modificada onde envolveu a estabilização do biopolímero CMC pós-síntese das NPMs e seguida de ultrassonicação durante 1 hora. A Figura 37d revelou que essas NPMs apresentaram diâmetro médio do “core” de 35 nm. Além disso, outros estudos com sínteses de NPMs estabilizadas por biopolímero carboximetil dextrana (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@CMD) pelo método de co-precipitação modificada mostraram que diâmetro superior a 20 nm de “core” de nm implica em sedimentação. A fim de evitar esse problema, foram produzidas NPMs de óxido de ferro “multi-core” de modo que se usou solução de NaHCO<sub>3</sub> (1,0 mol L<sup>-1</sup>) para precipitação alcalina e, após a formação de NPMs de óxido de ferro, as mesmas foram lavadas e mantidas estabilizadas em solução ácida (pH entre 2,0 e 3,0) para a estabilização com CMD. A Figura 37b mostra que houve a produção de “clusters” com diâmetro das partículas entre 40 a 80 nm, conforme relatado (DUTZ et al., 2009). Por outro lado, considerando outros métodos de síntese, apresentando a mesma morfologia em comparação com o desenvolvido neste estudo, Florence e colaboradores (LARTIGUE et al., 2012) realizaram estudos com a preparação de NPMs de γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> estabilizadas por citrato usando método de poli-ol em que o diâmetro de “single-core” dessas partículas foi de aproximadamente 10 nm, conforme é apresentado na Figura 37c.



**Figura 37** - Imagens de TEM de baixa resolução de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por (A) *pheomelanina*, (B) carboxi metil dextrana (CMD) (DUTZ et al., 2009), (C) dietilenoglicol (DEG) e citrato (LARTIGUE et al., 2012) e (D) carboximetil celulose (CMC) (HABIBI, 2014).

Com relação aos dados experimentais anteriormente destacados, observa-se que é possível inferir que a síntese por meio do método de coprecipitação para a preparação de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* (Figura 37a) se mostrou eficaz, já que, foi possível gerar NPMs com tamanho médio abaixo de 15 nm, o que permite que essas partículas possam exibir efeitos de superparamagnetismo (LEE, N.; HYEON, 2012), propriedade importante quando se deseja que essas possam ser utilizadas como ACs em IRM na investigação de tumores, conforme é destacado na Tabela 5.

**Tabela 5** - Diâmetro médio dos “cores” de NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por diferentes métodos de co-precipitação.

Nanopartículas magnéticas	Diâmetro médio do “core”	Referência
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Pheo	10 nm	Este trabalho
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @CMD	(“clusters ou multi-core”) 60 nm	DUTZ et al., 2009
γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @DEG-citrato	10 nm	LARTIGUE et al., 2012
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @CMC	35 nm	(HABIBI, 2014)

CMD – carboximetil dextrana

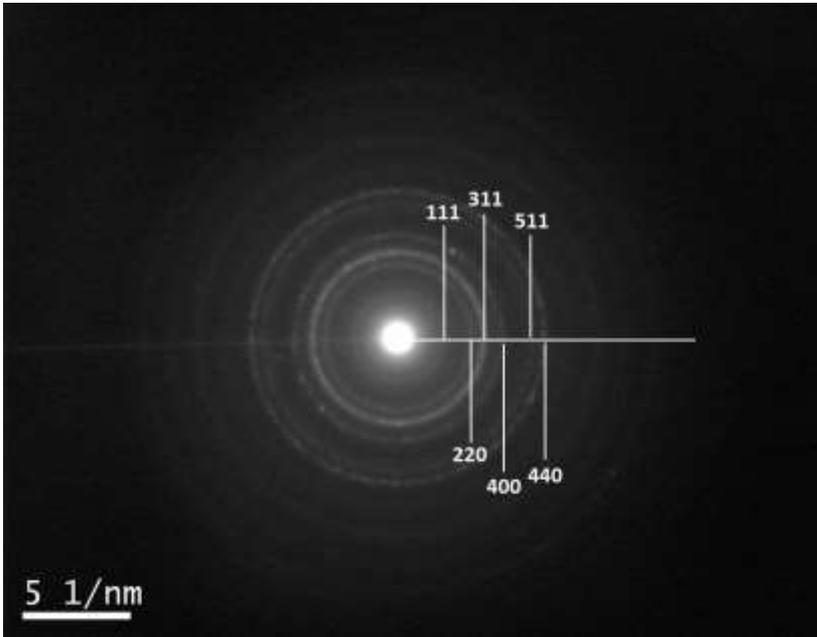
DEG – dietilenoglicol

CMC – carboximetil celulose

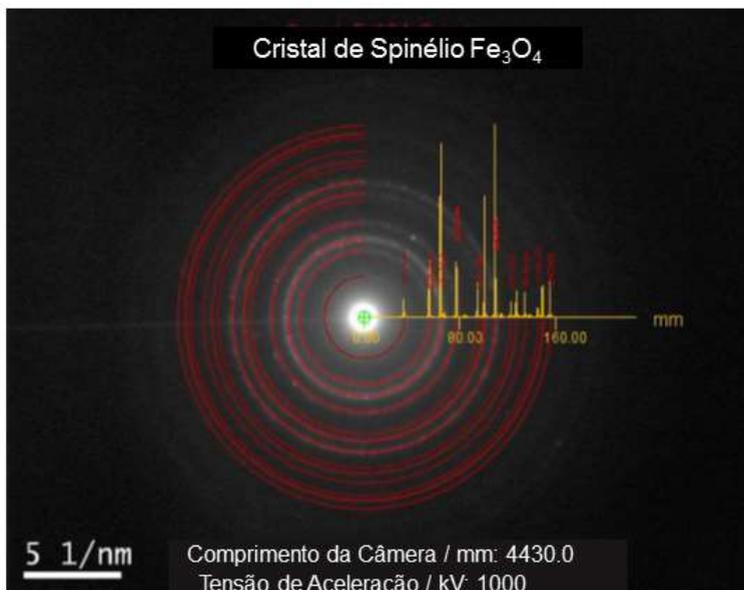
## 5.8 DIFRAÇÃO DE ELÉTRONS DE ÁREA SELECIONADA (SAED)

A identificação da estrutura cristalina das fases das NPMs de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) e maghemita (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) pode ser feita através da determinação dos planos de difração, revelando os arranjos atômicos presentes nas amostras de NPMs. Para as medidas do espaçamento *d*, um perfil de integração correspondente aos picos de difração foi realizado usando um “software” Digital Micrograph junto com a ferramenta denominada PASAD que serve para a caracterização de amostras nanocristalinas.

A Figura 38 apresenta os picos identificados associados aos planos de difração de elétrons das NPMs recobertas pela *pheomelanina* determinados por SAED. Um modelo matemático (PASAD) foi empregado a fim de comparar esses valores experimentais por meio de uma superposição de pontos em comparação com os padrões dos planos de difração da ferrita de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Figura 39).



**Figura 38** - Padrões indexados da amostra de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo e os principais planos foram identificados.



**Figura 39** - Superposição de padrão de ferritas e os valores experimentais obtidos por SAED.

**Tabela 6** - Valores do espaçamento interplanar-*d* de SAED para as NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo obtidas através de TEM (100kV) em relação ao padrão da magnetita.

Plano <i>hkl</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Pheo*	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (padrão)**
(111)	-	4,85
(220)	2,965	2,967
(311)	2,508	2,532
(400)	2,079	2,099
(511)	1,606	1,616
(440)	1,464	1,485

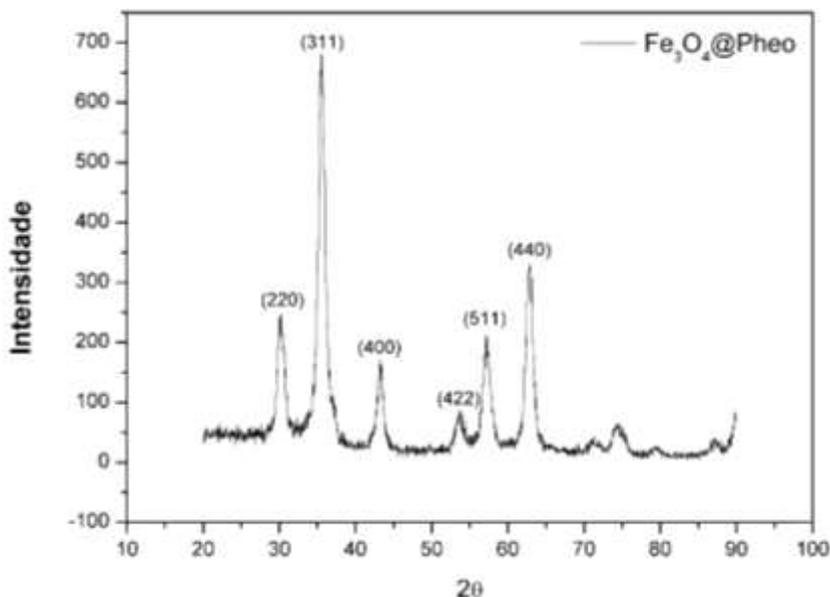
\* resultados de TEM-100kV de acordo com a Figura 37a.

\*\* (ZHU et al., 2011)

Observando os resultados apresentados pela medida por SAED, e analisando os valores experimentais, comparativamente com outras NPMs na literatura, nota-se que os planos (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (5 1 1) e (4 4 0) em cada amostra, refletiram uma fase em que há estrutura de spinélio inverso correspondendo à célula unitária tipo cúbica (Masciocchi et al., 2013). Esses valores apontaram que as estruturas nanocristalinas das NPMs são difíceis de serem estabelecidas com precisão, pois, os planos de difração de elétrons das NPs de óxido de ferro, na fase maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ou magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) são muito sensíveis ao estado de oxidação e ao tamanho das NPs, o que torna esses picos muito coincidentes com uma mínima diferença (cerca de 1%) entre os seus parâmetros de rede cristalina (K.THANH, 2012). De modo que foi possível obter essa informação através das análises de difração de raios X de pó das amostras, que serão apresentados na próxima seção.

## 5.9 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓ (DRX)

A caracterização das estruturas cristalinas das NPMs de óxido de ferro recobertas pelo biopolímero *pheomelanina* foram obtidas pela análise usando difratometria de raios X de pó (DRX) em que o alargamento dos picos de reflexão de difração de raios X representa a característica de nanocristalinidade das amostras. A Figura 40 representa o perfil de cristalinidade das NPMs de óxido de ferro, associado aos picos de difração correspondente à estrutura de spinélio com a célula unitária cúbica, característica de ferritas magnéticas, tais como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (VAIDYANATHAN; SENDHILNATHAN; ARULMURUGAN, 2007),  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  (K.THANH, 2012).



**Figura 40** - Planos de difração correspondendo a perfil de magnetita nas amostras obtidas pelas análises de DRX pelo pico mais intenso (311).

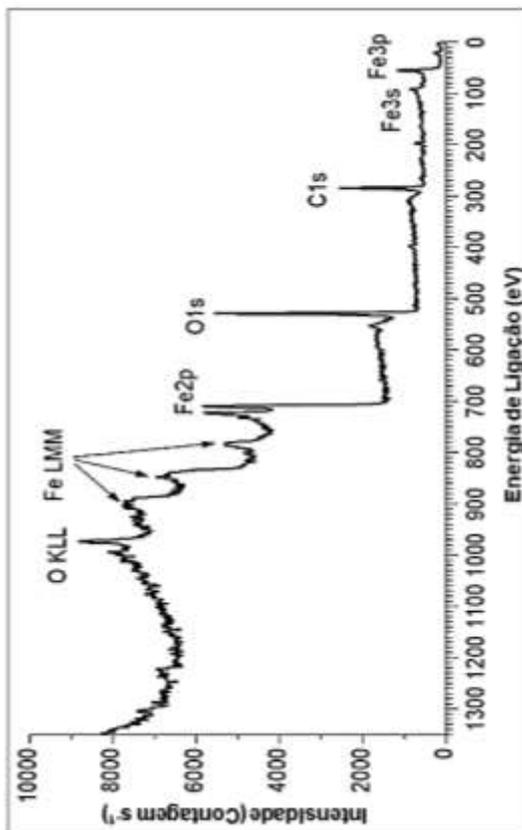
Os picos de reflexão que aparecem na Figura 40 identificados pela base internacional de dados de padrões de DRX (JCPDS), são dados pelos valores de  $2\theta = 30,2^\circ; 35,5^\circ; 43,3^\circ; 53,7^\circ; 57,2^\circ$  e  $62,7^\circ$ , que são indexados aos planos de difração de raios X, correspondendo aos índices de Miller ( $hkl$ ), respectivamente (220), (311), (400), (422), (511) e (440). Esses dados estão em concordância com os resultados da literatura (Dodi et al., 2015; Masciocchi et al., 2013) onde foram registrados os referidos ângulos:  $18,6^\circ; 30,4^\circ; 35,7^\circ; 43,2^\circ; 53,7^\circ; 57,3^\circ$  e  $62,8^\circ$  e os planos (111), (220), (311), (400), (422), (511) e (440) respectivamente correspondendo à característica de uma rede unitária cúbica de face centrada da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Além disso, a Figura 39 mostra que todos os picos das NPMs recobertas por *pheomelanina* estão em boa concordância com a estrutura cúbica [espaço de grupo:  $\text{Fd-}3\text{mS}$ ] (LIDE, 2006) conhecido como o padrão do cristal de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (JCPDS: 88-0315) (ZOTTIS et al., 2015) indicando que as amostras apresentaram elevado grau de cristalinidade com uma fase de 100% de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  presente no núcleo das NPs. Mais ainda, o parâmetro de rede cristalino ( $a$ ) correspondente à célula unitária cúbica de face centrada (cfc) dada por uma estrutura de spinélio inverso, relativo

às ferritas magnéticas foi calculado. O pico mais alargado e intenso corresponde ao plano de difração (311) e é esse que foi considerado para calcular o valor do parâmetro de rede da célula unitária. De modo que o valor calculado para o parâmetro  $a = 8.3632 \text{ \AA}$  foi estimado *via* método de Rietveld aplicado aos dados de DRX (0.2522 nm para (311)) e este dado se mostrou consistente com o valor de 8,3181  $\text{\AA}$  levando em consideração o espaçamento do plano (311) de 0.2508 nm obtidas empregando as análises por SAED (Tabela 5). De acordo com a largura à meia altura das reflexões de (311), o diâmetro médio das partículas nanocristalinas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi calculado em 12,7 nm pelas análises quantitativas do método de Rietveld e o “software” TOPAS (COELHO, A. A., 2003). Esses resultados estão em concordância com o que foi evidenciado a respeito do diâmetro médio das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  calculado pelas análises de TEM-100 kV, que apresentou valor próximo a 10 nm.

Uma técnica não convencional, mas muito útil foi a análise por XPS, que permitiu investigar a composição química presente sobre a superfície das NPMs, para confirmar a fase dos óxidos de ferro uma vez que estados de oxidação podem influenciar nos sinais do difratograma e consequentemente podem implicar em certas dúvidas, porém, os resultados de DRX foram convincentes ao apontar que as amostras apresentaram estrutura cúbica de espinélio.

## 5.10 ESPECTROSCOPIA POR FOTOELÉTRONS DE RAIOS X (XPS)

A análise do espectro obtido pela técnica de XPS, figura 41, permite trazer basicamente três informações importantes, comentadas posteriormente, a respeito da composição química da superfície em uma amostra constituída por óxidos de ferro (II e III).



**Figura 41** - Análise por XPS para as NPMs recobertas por *pheomelanina*.

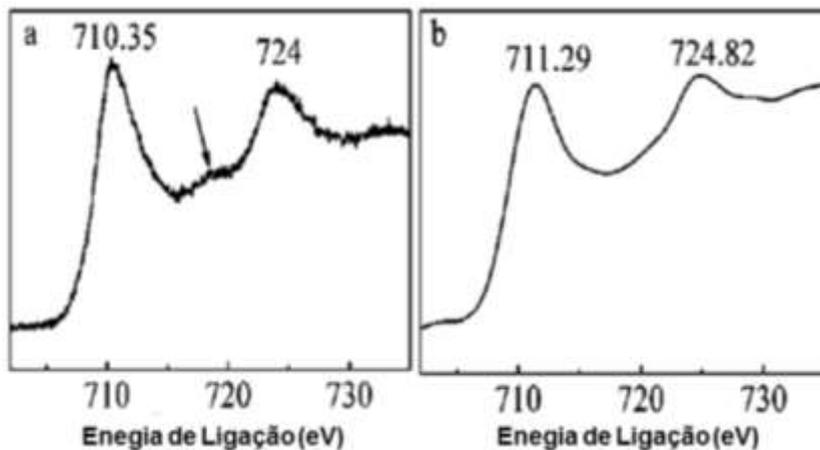
Analisando com bastante cuidado, o espectro de XPS no gráfico da figura 41, é possível observar que a amostra é constituída principalmente dos elementos químicos Fe e O com uma pequena

quantidade de N, correspondendo aos resultados anteriormente apresentados pelas análises de CHN (Tabela 1) e EDX (Tabela 2).

Além disso, essa técnica possibilitou ainda investigar a composição dos grupos orgânicos pertencentes ao biopolímero *pheomelanina* associado a seus átomos e comprovar que os resultados apresentados são coerentes com os dados experimentais de espectroscopia por infravermelho (FT-IR) mostrado na Figura 32.

Então, de maneira geral é possível inferir que seja possível determinar qualitativamente a composição e o estado de oxidação dos átomos de ferro, obtendo informação de sua *El*, resultando em uma impressão digital das NPMs.

Sendo assim, a Figura 42a mostra o espectro de XPS padrão de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e na Figura 42b, o espectro da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), com alta resolução revelando os picos de  $\text{Fe}(2p_{3/2})$  e  $\text{Fe}(2p_{1/2})$  associados à estrutura espinélio inverso, apresentados na literatura (GU, H. et al., 2005), (LU, J. et al., 2009). Os níveis de  $\text{Fe}(2p_{3/2})$  e  $\text{Fe}(2p_{1/2})$  são respectivamente correspondentes aos valores de energia de ligação, 710.35 e 724.0 eV para  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e 711.29 e 724.82 eV para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (LU, J. et al., 2009).



**Figura 42** - Espectros de XPS de alta resolução de padrões para  $\text{Fe}2p$  de NPMs nas fases  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (a) e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (b) por estudos de Jian e colaboradores. (LU, J. et al., 2009).

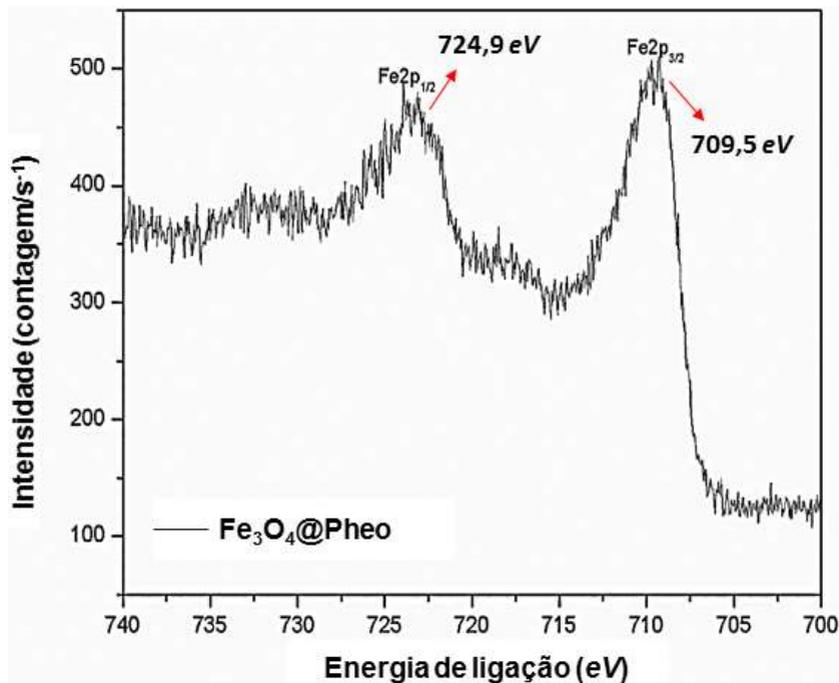
Por outro lado, observa-se que nos estudos desenvolvidos por Biesinger e colaboradores (BIESINGER et al., 2011) ao efetuarem

cálculos teóricos para resolver estruturas de bandas em um conjunto de óxidos de metais de transição de valência (II) e (III) demonstraram que esses picos presentes nas configurações  $Fe(2p_{3/2})$  apresentam valores muito próximos de  $E_l$  para a magnetita e maghemita e são dependentes do grau estequiométrico do composto, e acabam influenciando no formato dos picos no espectro de XPS, acarretando em algumas mudanças nos valores das energias de ligação em comparação com os relatados por Jian e colaboradores (LU, J. et al., 2009), sendo esses reportados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Estimativas de parâmetros cálculos teóricos para espectro XPS de  $Fe2p_{3/2}$  em óxidos de ferro.

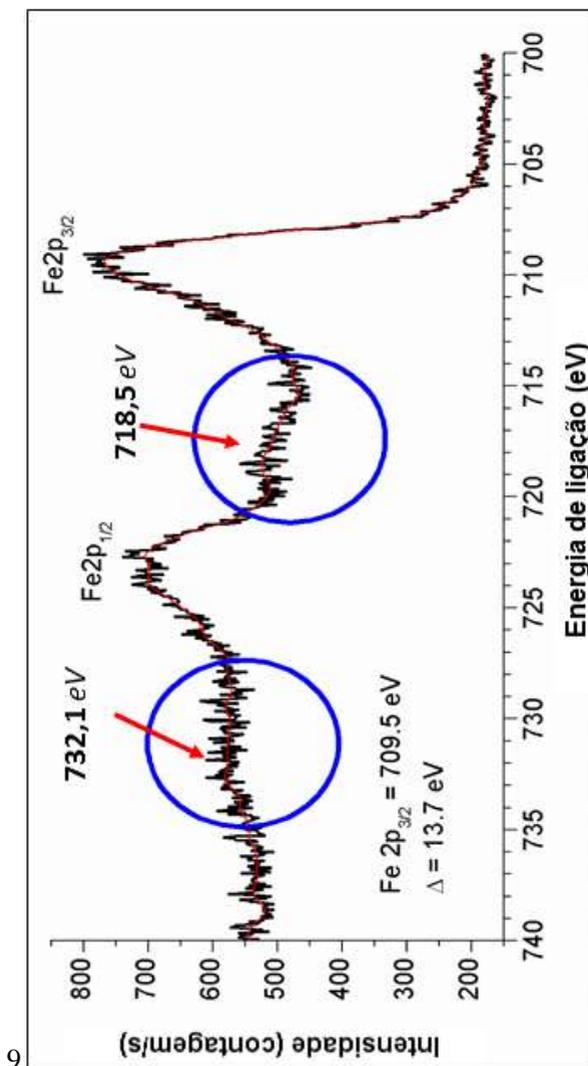
<b>Composto</b>	<b>(eV) – valor teórico</b> (Biesinger et al., 2011).	<b>(eV)- valor</b> <b>experimental</b> (Sherwood., 2002)
$\gamma$ - $Fe_2O_3$	711,35	710,8
$Fe_3O_4$	709,75	710,4

As análises por XPS apresentadas pela Figura 42 das partículas mostraram dois picos a mais em 709.5 e 724.9 eV, atribuída a  $Fe^{2+}_{2p_{3/2}}$  e  $Fe^{2+}_{2p_{1/2}}$ , respectivamente, os quais estão relacionados com a fase de magnetita ( $Fe_3O_4$ ), o que está em concordância com a literatura onde, aponta que os picos desviam para valores de energia de ligação mais altos e ficam mais alargados para  $Fe_3O_4$  devido à aparência de  $Fe^{2+}_{(2p_{3/2})}$  e  $Fe^{2+}_{(2p_{1/2})}$  associado a um desdobramento por multipletos (TIAN et al., 2011).



**Figura 43** - Espectro de XPS para as NPMs recobertas por *pheomelanina*.

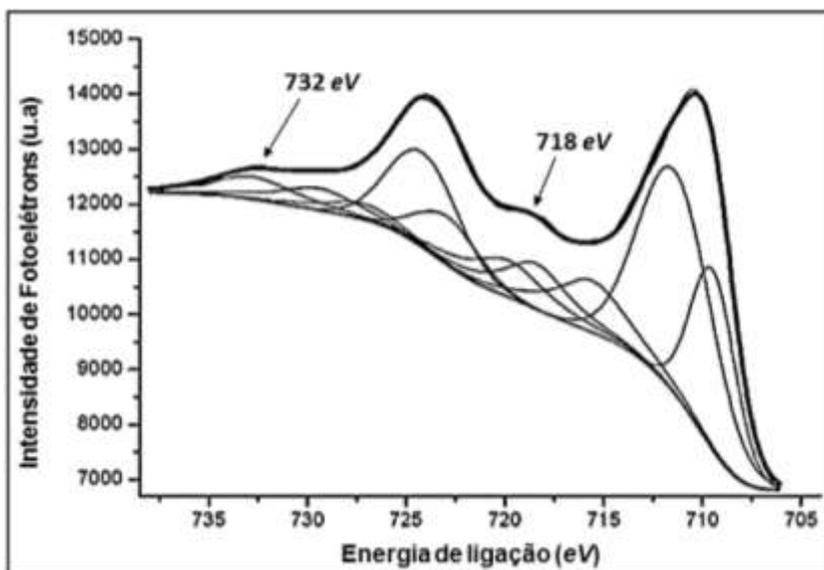
Adicionalmente, inspecionando mais cuidadosamente com uma melhor ampliação (Figura 44) os dados extraídos do gráfico do espectro pela análise por XPS, pode-se notar a aparência de dois suaves picos satélites (círculos azuis) identificados respectivamente na região de 718,5 e 732,1 eV.



**Figura 44** - Espectro de XPS apontando a existência de dois picos satélites em 718,5 e 732,1 eV.

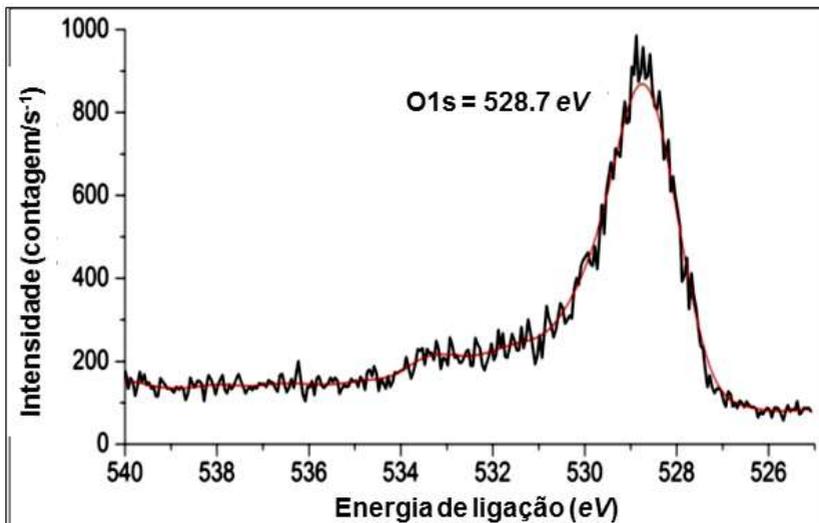
Esse comportamento dos picos característicos das regiões do Fe<sub>2p</sub> no espectro de XPS ilustrado na Figura 44, está em coerência com estudos anteriores relatados onde foram preparadas NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> tipo “*core-shell*” com SiO<sub>2</sub> sob tratamento com ultrassonicação (GU, H. et al., 2005). Nesse estudo, os resultados dos espectros de XPS para Fe<sub>2p</sub> reportados

mostraram principalmente compostos de Fe pelos picos de  $Fe_{2p_{1/2}}$  em torno de 724 eV e de  $Fe_{2p_{3/2}}$  em torno de 710 eV e foram acompanhados pela existência de denominados satélites “*shake-up*” (Figura 45) pelas setas em dois picos em torno de 718 eV e 732 eV. Além disso, esses resultados apontaram que as posições exatas dos picos para o espectro de XPS para  $Fe_{2p}$  foram de  $Fe^{3+}2p_{3/2}$  para 711,4 eV e  $Fe^{2+}2p_{3/2}$  para 709.3, indicando que a fase presente das NPMs era  $Fe_3O_4$ . Porém, o aparecimento dos satélites “*shake-up*” (círculos azuis na Figura 44) revela a existência de uma fase oxidada de ferro, presentes na superfície das NPMs de  $Fe_3O_4$  uma camada de maghemita ( $\gamma$ - $Fe_2O_3$ ), o que correspondeu com os dados experimentais de XPS obtidos neste trabalho, anteriormente mostrados na Figura 44.



**Figura 45** - Espectro de XPS de  $Fe_{2p}$  de NPMs revestidas por  $SiO_2$  sob tratamento por ultrassom (Adaptado da referência (GU, H. et al., 2005)).

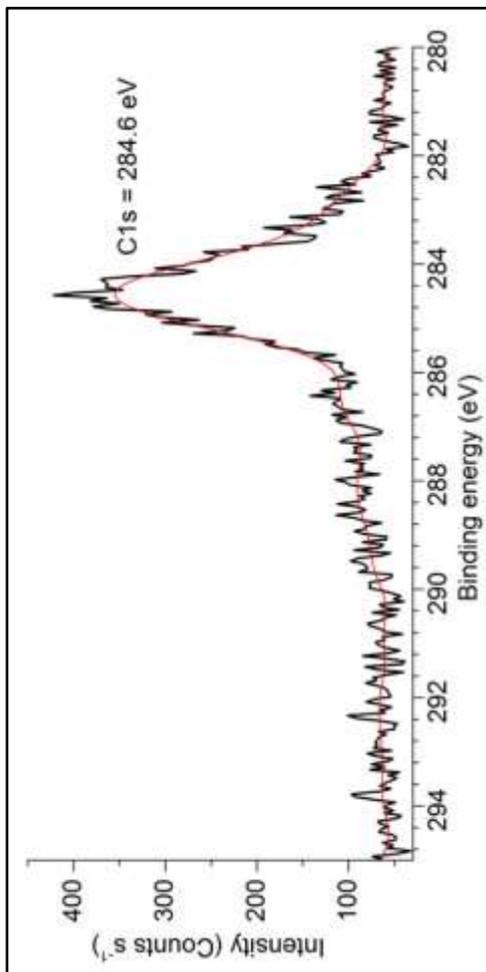
O gráfico apresentado na Figura 45 indica o espectro por XPS do pico de  $O_{1s}$  da energia de ligação próxima a 529 eV, atribuído à ligação de Fe-O associado a  $Fe_3O_4$ . Esses resultados estão de acordo com dados experimentais anteriormente relatados na literatura (GU, H. et al., 2005), (TIAN et al., 2011).



**Figura 46** - O espectro de XPS para as ligações de Fe-O.

Na sequência, com relação às posições do pico do carbono ( $C_{1s}$ ) no espectro de XPS, observa-se que a energia de ligação de 284.6 eV é atribuída à ligação Fe-C (TIAN et al., 2011) apresentada na Figura 47. Mais ainda, este dado também está associado com o valor relatado na literatura a uma estrutura gráfitica (anel aromático), possivelmente devido à estrutura do biopolímero *melanina* (DEZIDÉRIO et al., 2004), (XIN et al., 2015). Além disso, este resultado reflete também informações a respeito do recobrimento da superfície orgânica sobre as NPMs de  $Fe_3O_4$ , sendo indicada pelos anéis aromáticos no pico  $C_{1s}$  do espectro de XPS, o qual variou entre 286 e 288 eV devido à ligação de C-O e a energia de ligação do fenol e carboxilato presentes no biopolímero *pheomelanina*, observado em NPMs de óxido de ferro recobertas por dopamina (ZHANG, M. et al., 2010). Esses dados experimentais também estão em concordância com o espectro de XPS de alta resolução para estudo da superfície da dopamina-*melanina* (BERNSMANN et al., 2009), que mostraram picos de  $C_{1s}$  (286 eV),  $O_{1s}$  (532,5 eV) correspondendo aos grupos orgânicos.

Sendo assim, é possível inferir que a estabilização das NPMs possivelmente ocorra *via* ligação covalente tipo coordenada com o centro metálico do ferro e os grupos majoritários da *pheomelanina*, sendo que os átomos de oxigênio, compõem os vértices da rede cúbica cristalina da magnetita, principalmente entre a ligações do catecolato e o  $Fe^{3+}$ .



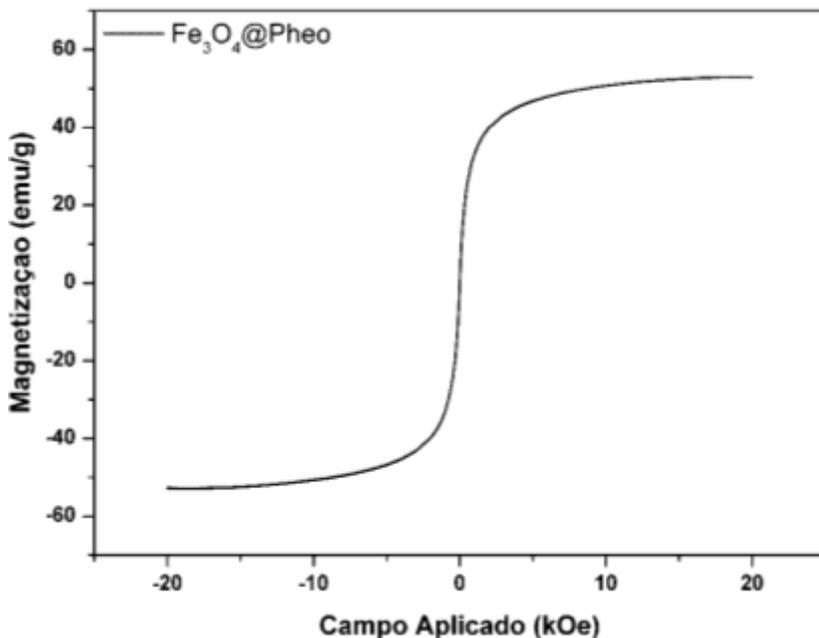
**Figura 47** - Espectro de XPS para energia de ligação C1s.

Conclui-se, então, que a partir dos resultados apresentados pelas análises de XPS nos espectros das energias de ligação de Fe2p (Figuras 43 e 44), O<sub>1s</sub> (Figura 46) e C<sub>1s</sub> (Figura 47) foi possível observar que o perfil apresentado para as NPMs de óxido de ferro recobertas por *pheomelanina* revelaram que o “core” das NPs é constituído de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, e a presença de picos satélites revelou que a superfície apresenta ferro no estado oxidado ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) devido à metodologia de síntese. Porém, evidenciou-se que o biopolímero *pheomelanina* se apresenta como

recobrimento orgânico dessas NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  pode apresentar diferenças nos valores de magnetização de saturação ( $M_s$ ) da amostra, o que será destacado a seguir.

### 5.11 MEDIDAS DE MAGNETIZAÇÃO POR AMOSTRA VIBRANTE (VSM)

Nas medidas por VSM, as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram deixadas sob oscilação em uma dada frequência (80 Hz) e a bobina de detecção mediu a tensão induzida, fornecendo então uma curva denominada de histerese, apontando valores negativos e positivos do campo magnético aplicado ( $H$ ) (NIAZI A, 2000). Um parâmetro importante que permite obter informações associadas ao comportamento magnético da amostra pela curva obtida na Figura 48 é a magnetização de saturação ( $M_s$ ), sendo que a  $M_s$  é essencialmente o valor limite no qual a curva de magnetização reverte na região onde o valor de campo magnético é elevado, e essa situação é alcançada quando todos os momentos magnéticos no material estão alinhados com o campo aplicado  $H$ .



**Figura 48** - Análise por VSM de NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recobertas por *pheomelanina*.

Se o volume do material for reduzido, como no caso das NPMs, uma situação no qual ocorre uma mudança de multidomínio para monodomínio magnético, as propriedades magnéticas deixam de apresentar as que ocorrem na forma de materiais “bulk”, e apresentam o efeito chamado de superparamagnetismo. O valor padrão para partículas magnéticas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> não recobertas está registrado na literatura em uma faixa entre 92-100 emu g<sup>-1</sup> a 300K (LEE, N.; HYEON, 2012); (ROSEN et al., 2012) e para outros materiais magnéticos os valores estão mostrados na Tabela 8. De modo que a literatura (K.THANH, 2012); (LEE, N.; HYEON, 2012) destaca que as nanopartículas com perfil superparamagnético apresentam curva de histerese nula, valor de *M<sub>s</sub>* elevado, *M<sub>r</sub>* e *H<sub>c</sub>* com valores baixos ou desprezíveis.

**Tabela 8** - Magnetização de saturação ( $M_s$ ) de NPMs de alguns materiais ferrimagnéticos medidos a 300 K. (Adaptação da referência de (COLOMBO et al., 2012)).

NPMs	$M_s$ ( $\text{Am}^2 \text{Kg}^{-1}$ )
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	98
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	82
$\text{MgFe}_2\text{O}_4$	31
$\text{MnFe}_2\text{O}_4$	110
$\text{CoFe}_2\text{O}_4$	94
$\text{NiFe}_2\text{O}_4$	56

Com as análises por VSM apresentadas na Figura 47, foi possível estimar o diâmetro do “core” das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* sendo abaixo de 15 nm, o que demonstrou que essas NPMs possuem baixo valor de  $H_c$  e  $M_r$  e principalmente a curva de magnetização com histerese nula, revelando assim um comportamento superparamagnético (LEE, N.; HYEON, 2012). Fazendo a comparação dos valores obtidos de  $M_s$  em relação a outros publicados em estudos recentes foi possível observar que as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* apresentaram valores muito próximos aos obtidos por outros autores, sendo destacados na Tabela 9.

Todos os valores destacados na Tabela 9 obtidos para  $M_s$  envolveram a preparação de NPMs de óxido de ferro, com fase magnetita com diferentes estabilizantes, envolvendo, por exemplo, materiais tais como dopamina (SMOLKOVA et al., 2015), ácido húmico (GHOSH et al., 2011) e sintetizados por método de co-precipitação com adaptações muito semelhantes aos desenvolvidos neste trabalho.

**Tabela 9** - Magnetização de saturação ( $M_s$ ) de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas com diferentes estabilizantes em função do diâmetro de “core”.

NPM	Diâmetro do “core”	$M_s$ (emu/g)	Referência
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo	10-12	52,5	Este trabalho
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Oleato	8,9-12,2	65,39	(MENG et al., 2013)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @ácido húmico	10	70	(GHOSH et al., 2011)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @dopamina	9-10	56	(SMOLKOVA et al., 2015)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @alginate	5-10	52	(MA, H. L. et al., 2007)
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	12,2	98	(K.THANH, 2012)
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	17,5	82	(K.THANH, 2012)

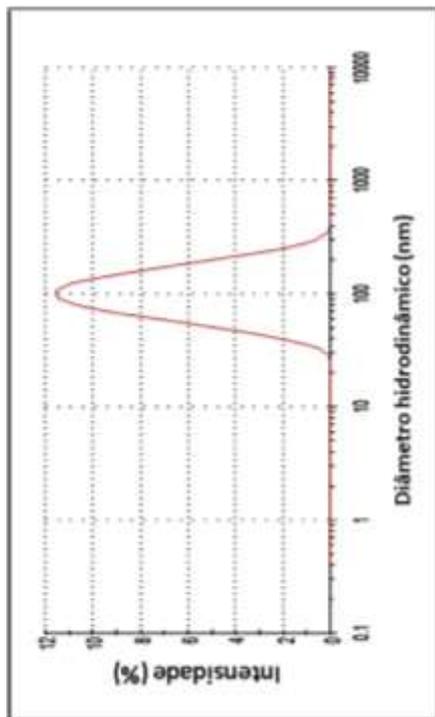
Nota-se, então, que o estabilizante contribuiu para a redução do valor de  $M_s$ , e mesmo assim, o valor encontrado neste estudo foi considerado razoável e dentro do esperado. Por isso, o sucesso do realce de contraste negativo é atribuído ao recobrimento da *pheomelanina*, envolvendo este biopolímero hidrossolúvel, o qual será mostrado nas próximas seções.

## 5.12 ANÁLISE DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA (Z)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês Dynamic Light Scattering) foi empregada para a obtenção do diâmetro médio hidrodinâmico ( $d_H$ ) das nanopartículas, em um espectrômetro Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) mantendo-se a temperatura constante em 25° C com variação de  $\pm 1$  °C. As medidas foram feitas todas em triplicata e as concentrações das nanopartículas magnéticas das soluções tampão ( $pH$  7,2 e 8,0) variando de 50 a 100 ppm

foram filtradas e por uma seringa com filtro de acetato de celulose 0,20  $\mu\text{m}$  foram realizadas de acordo com as características técnicas do equipamento (Laser He-Ne de  $\lambda = 633 \text{ nm}$  e a detecção é feita em um único ângulo de  $173^\circ$ ). Os resultados complementaram as caracterizações físico-químicas das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pheo}$ ) a respeito da biodistribuição a fim de que sejam preparadas para aplicações biomédicas, particularmente como agentes de contrastes para diagnóstico por IRM. O diâmetro hidrodinâmico médio é dado pelo tamanho total das nanopartículas em solução, isto é, considerando o diâmetro do “*core*” das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  adicionando-se a espessura da camada do material de recobrimento, no caso do biopolímero *pheomelanina*. A literatura destaca que a biodistribuição das nanopartículas depende fortemente dos seus diâmetros hidrodinâmicos levando em consideração os surfactantes ou polímeros estabilizantes (K.THANH, 2012). Por exemplo, as nanopartículas com um diâmetro hidrodinâmico superior a 100 nm são rapidamente removidas da circulação pelo processo de fagocitose ativa através do RES (sistema endotelial de eliminação). Porém, NPs extremamente pequenas com um diâmetro hidrodinâmico inferior a 5 nm podem passar pela filtração renal e podem ser excretadas pela urina. Consequentemente, as nanopartículas deveriam apresentar um tamanho hidrodinâmico ótimo na faixa de 50 a 150 nm, significando que essas NPMs apresentarão tempos de circulação no sistema circulatório longo, dando tempo o suficiente para que seja realizada a aquisição de imagem por IRM (COLOMBO et al., 2012).

Sendo assim, a técnica forneceu o diâmetro hidrodinâmico aparente ( $d_H$ ) das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pheo}$  conforme é apresentado na Figura 49.



**Figura 49** - Análise por DLS de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* com o diâmetro hidrodinâmico médio (90,75 nm) e o índice de polidispersividade (PDI) (0,179) em solução tampão ( $\text{pH} = 8,0$ ).

As medidas por DLS indicaram que as NPMs recobertas por *pheomelanina* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@Pheo$ ) puderam ser mantidas em meio aquoso, sendo que estabilizadas em solução tampão  $\text{pH} 8,0$  próximo às condições fisiológicas. Além disso, as mesmas apresentaram boa monodispersividade (PDI = 0,179), pois, o  $d_H$  médio de 90,75 nm apresentou valores compatíveis com a faixa desejada (20 a 100 nm) das NPMs para as aplicações biomédicas (REDDY et al., 2012a). Todas amostras possuem boa estabilidade coloidal e distribuição de tamanho aceitável (PDI < 0,2), com exceção daquelas que foram dispersas em tampão ácido cítrico ( $\text{pH} = 4,0$ ). E dessa forma, não foi possível determinar o  $d_H$  médio dessas amostras devido à sedimentação das NPMs

e impossibilidade de determinar a curva de correlação de Stokes-Einstein. De modo que o valor obtido para as NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo estabilizados em tampão alcalino (*pH* 8,0) foi de 0,179, e apresentou-se dentro do esperado em comparação com outros estudos envolvendo distintos tipos de recobrimentos poliméricos associados ao método de síntese de NPMs de óxido de ferro por co-precipitação, dados pela Tabela 10.

**Tabela 10** - Valores de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta de vários tipos de NPMs.

NPM	Diâmetro hidrodinâmico ( <i>dH</i> )	Potencial Zeta (mV)	Referência
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Pheo	90,75 nm	-38,1 ± 0,6 ( <i>pH</i> ≈ 8,0)	Este trabalho
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @AH	100 nm	-40,0	(ILLES; TOMBACZ, 2006)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Q	130 nm	+35,83 ± 0,4 ( <i>pH</i> ≈ 6,0)	(SANJAI et al., 2014)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @AC	150 nm	-39,5 ± 6,8 ( <i>pH</i> ≈ 7,0)	(JEDLOVSZKY-HAJDÚ et al., 2012)
Feridex	140 nm	-31,30 ± 0,8 (PBS)	(JAIN et al., 2008)

AH – ácido húmico

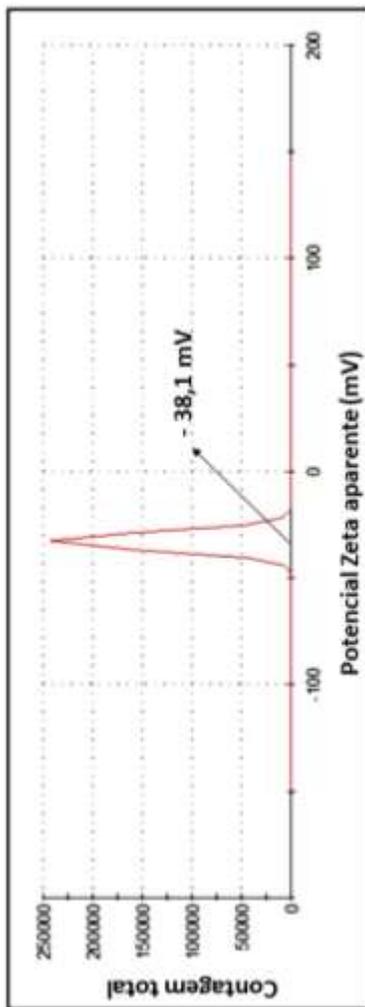
.Q - quitosana

AC – ácido cítrico

O potencial zeta é uma função da densidade de carga superficial e apresenta muitas informações importantes a respeito da natureza das partículas dispersas no meio e também sua condição de estabilização entre o biopolímero de *pheomelanina* e as NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Pois, em solução havendo a presença de uma carga líquida das NPs de óxido de ferro, esta pode dar indicativo a respeito de que forma os íons na sua vizinhança podem ser afetados em função de seu valor de *pH* e seu ponto isoelétrico ((PIE), em que a carga na superfície é nula em determinado valor de *pH*). Indicativos desta estabilização associados ao potencial zeta são dados na literatura, destacando-se que os valores associados à estabilização das NPMs com seus materiais poliméricos de recobrimento pelo processo de

repulsão estérica devem estar nos valores limites de + 60 mV ou – 60 mV (K.THANH, 2012).

As análises envolvendo o potencial Zeta permitiram determinar a carga da superfície e a natureza dos biopolímeros como *pheomelanina*, e o valor obtido para as soluções de suspensão de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas com esse biopolímero, em solução tampão ( $pH = 8,0$ ) sendo de – 38,1 mV corresponde ao resultado que indicou a estabilização das suspensões coloidais, conforme é mostrada na Figura 50 e na Tabela 10 onde aponta os valores calculados para o potencial Zeta envolvendo dados na literatura, em comparação com o obtido neste resultado.



**Figura 50** - Análise da superfície Potencial zeta das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@Pheo$ ) (potencial  $\zeta$  de -38,1 mV) estabilizadas em solução tampão em  $pH = 8,0$ .

O potencial  $\zeta$  pode indicar que os catecolatos desprotonados presentes no biopolímero *pheomelanina* constituem grupos majoritários que participam na estabilização das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , cuja presença desses grupos, foi comprovado anteriormente com as caracterizações físico-

químicas (infravermelho, XPS e TGA). Outros estudos (ILLES; TOMBACZ, 2006) com biopolímeros ácidos húmicos foram usados como modelo de investigação a respeito da influência do  $pH$  do meio no processo de adsorção em NPMs de magnetita. Sendo que, as mesmas são positivamente carregadas abaixo de  $pH \sim 8$ , e possuem cargas negativas na superfície para valores acima desse  $pH$ . De modo que para baixos valores de  $pH$ , a protonação dos sítios da superfície ( $Fe-OH$ ) dá lugar agora para a formação dos sítios  $Fe-OH^{+2}$ . Sendo assim, a mobilidade dos valores associado ao potencial  $\zeta$  diminui com o aumento do  $pH$  e seus sinais se invertem a valores negativos, como mostrado na Tabela 10. Além disso, em  $pH \sim 8$ , o qual pode ser identificado como ponto isoelétrico (PIE) da magnetita, acima desse ponto, a desprotonação de  $Fe-OH$  tem lugar para a formação na superfície, os sítios  $Fe-O^-$ . Em suma, observou-se que a camada polianiônica de ácido húmico (AH) com um excesso de cargas negativas pode contribuir para prevenir a adesão de partículas de magnetita (instabilidade dos ferrofluidos devido à atração eletrostática) e melhora a estabilização combinada envolvendo repulsão eletrostática e estérica das NPMs de óxido de ferro, como foi evidenciado um aumento do  $d_H$  em partículas de hematita (VERRALL; WARWICK; FAIRHURST, 1999) e de magnetita (LEE, N.; HYEON, 2012 (ILLES; TOMBACZ, 2006) em mais de 10 vezes, quando essas estavam sem a presença de AH como recobrimento.

Será visto na seção a seguir, como o  $d_H$  e outros fatores podem influenciar nas características envolvendo os processos de realce dos agentes de contrastes positivo (redução da relaxividade longitudinal  $T_1$ ) e de contrastes negativos (redução da relaxividade transversal  $T_2$ ) nas NPMs de  $Fe_3O_4$  recobertas pelo biopolímero *pheomelanina*.

### 5.13 MEDIDAS DO EFEITO DE REDUÇÃO DO SINAL $T_1$ E $T_2$ POR IRM DAS NPMS DE $Fe_3O_4@PHEO$ EM “PHANTOM” GEL ÁGAR

De modo a avaliar os efeitos do realçamento no sinal de IRM, as soluções aquosas das NPMs recobertas por *pheomelanina* em diferentes concentrações de Fe (determinadas por espectroscopia atômica por chama (FASS)) foram mantidas em um “phantom” constituído de gel ágar para evitar agregação das NPMs de  $Fe_3O_4$  recobertas por *pheomelanina*. Esse “phantom” serviu para permitir a localização do sinal de IRM, e foi preparado de acordo com os procedimentos apresentados nos **Materiais**

**e Métodos**, no Capítulo 4. Sendo assim, as taxas de relaxação foram então medidas em um “scanner” clínico de IRM de 1,5 T de acordo com certas seqüências de pulsos recomendadas na literatura (LEE, N.; HYEON, 2012) de modo que os procedimentos estão descritos a seguir.

Após a preparação do “phantom” e das suspensões de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo, mantidas em gel-ágar e em PBS ( $pH$  7,2), os tubos contendo cerca de 250 $\mu\text{L}$  foram posicionados próximo ao isocentro em um “scanner” de IRM Sigma Excite 1.5 T - General Electric 1.5 T MRI dentro de uma bobina transmissora-receptora de quadratura de cabeça com um campo homogêneo  $B_1$  a fim de serem adquiridas as imagens por IRM. O “software” hospedeiro (Weasis DICOM “viewer”, Eclipse Public License - v 1.0) foi usado para as visualizações/análise das imagens adquiridas.

Para estimar o tempo de relaxação transversa ( $T_2$ ) para cada amostra, imagens coronais com espessura de corte ( $T_H = 2$  mm) foram adquiridas em vários tempos de eco ( $T_E$ ) de 10 a 240 ms com um tempo de repetição ( $T_R$ ) de 10000 ms de acordo com procedimentos anteriormente relatados na literatura (LEE, N.; HYEON, 2012).

De forma similar, o tempo de relaxação  $T_1$  para cada amostra foi medido variando o  $T_R$  entre os seguintes valores: 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 e 10000 ms enquanto foi mantido o valor de  $T_E$  constante em 10 ms. Após a aquisição das imagens, as magnitudes das intensidades das imagens foram medidas dentro das regiões de interesse (ROIs) manualmente desenhadas pelo “software” Weasis para cada uma das amostras de NPMs@Pheo.

As taxas de relaxação longitudinal e transversa, respectivamente,  $R_1$  ( $1/T_1$ ) e  $R_2$  ( $1/T_2$ ) foram calculadas considerando uma estimativa para uma curva mono-exponencial de dados da intensidade de sinal *versus* tempo (usando o “software” Origin 8.0). De modo que a estimativa da curva para as taxas de relaxação longitudinal e transversal  $R_1$  ( $1/T_1$ ) e  $R_2$  ( $1/T_2$ ), respectivamente, pela intensidade ( $I(t)$ ) em função de  $T_R$  e  $T_E$  para cada concentração de ferro [Fe] das amostras (LEE, N.; HYEON, 2012) são dadas pelas seguintes equações:

$$I(t) = I(t=0) * (1 - \exp(-T_R/T_1)) \quad (20)$$

Onde:  $I(t=0)$  é a magnetização longitudinal ( $M_0$ ) das NPMs.

$$I(t) = I(t=0) * \exp(-T_E/T_2) \quad (21)$$

Onde:  $I(t=0)$  é a magnetização transversal ( $M_{x,y}$ ).

A Figura 51 mostra a estimativa da curva da taxa de relaxação transversal  $R_2$  ( $1/T_2$ ) dos prótons da água nas suspensões de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ Pheo pela intensidade ( $I(t)$ ) em função de  $T_E$  para as cinco concentrações de ferro [Fe], correspondendo respectivamente a 0,02; 0,04; 0,10 e 0,20 mmol L<sup>-1</sup>. Nota-se que a curva representou um decaimento exponencial associado à redução de sinal  $T_2$  de IRM. Essa redução da taxa de relaxação  $T_2$  é observada na Figura 51 e quando as concentrações das NPMs aumentam nas suspensões do “phantom” gel ágar, a intensidade do sinal ( $I(t)$ ) (média da intensidade dos sinais obtidos dos ROIs) diminui cada vez mais, deixando a curva  $I(t) \times T_E$  mais acentuada indicada por uma queda mais brusca para valores mais elevados de concentração de ferro [Fe].

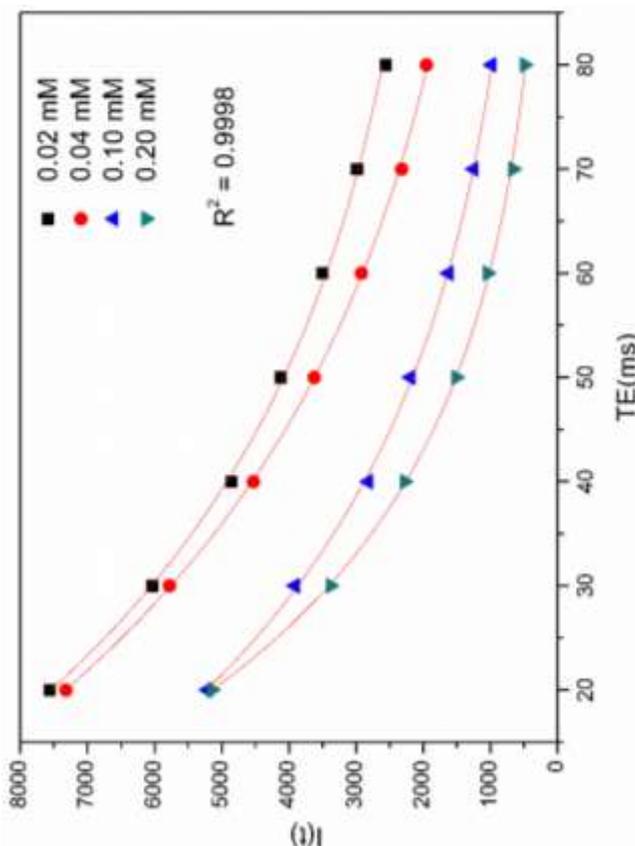
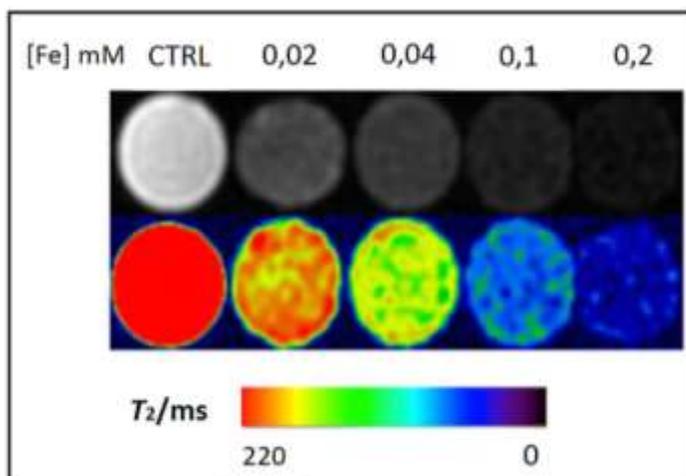


Figura 51 – Ajuste da curva associada à taxa de relaxação  $T_2$  pela intensidade do sinal ( $I(t)$ ) versus (TE) para cada valor de concentração de ferro [Fe] obtido das análises de FASS.

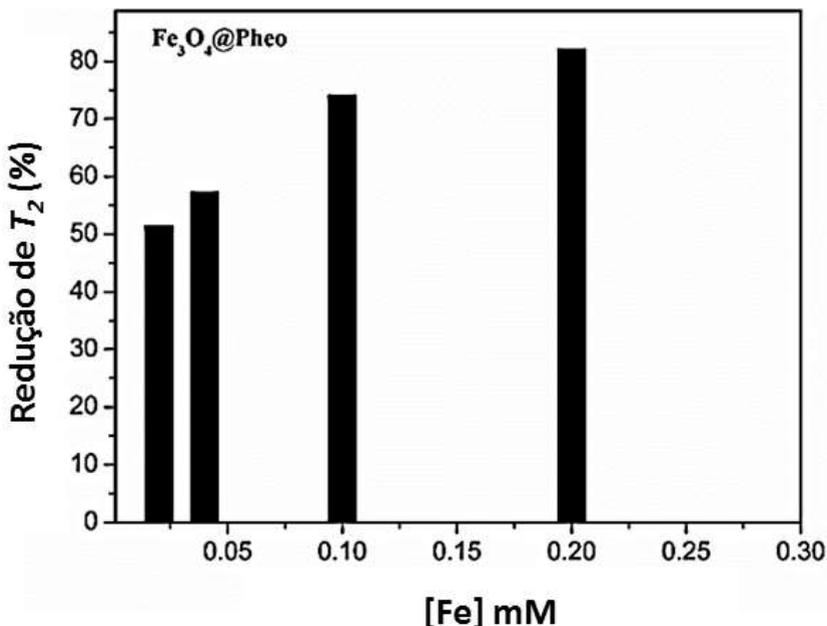
Este comportamento da curva de relaxação  $T_2$  também foi encontrado quando Labhasetwar e colaboradores (JAIN et al., 2008) sintetizaram por co-precipitação NPMs de  $Fe_3O_4$  estabilizadas por ácido oleico e estudaram as propriedades de relaxação em IRM e de “*drug-delivery*” encapsulando o quimioterápico doxorubicina. Nesse caso eles evidenciaram que quanto maior a inclinação da curva de relaxação  $T_2$ , maior é a redução do sinal e conseqüentemente melhor se apresenta o efeito de realce como agente de contraste negativo  $T_2$  (propriedade importante para investigação de tumores primários). Esse efeito foi bem destacado na literatura por Hyeon e colaboradores (LEE, N.; HYEON,

2012), quando mostraram que NPMs sob a ação de um campo magnético externo podem induzir não homogeneidades no campo magnético local, o qual conseqüentemente pode acelerar a taxa de defasagem da frequência de precessão de Larmor dos prótons da água em seu entorno. Esse efeito físico pode explicar por que o aumento da concentração de Fe presente pode afetar o aumento da redução de sinal na relaxação transversal  $T_2$ , uma vez que esse processo reflete na perda de energia devido à interação de *spin-spin* no meio aquoso (LEE, N.; HYEON, 2012). Isto pode ser notado na Figura 52 onde se observa que a intensidade do sinal das imagens ponderadas em  $T_2$  alteraram consideravelmente o contraste das amostras, associado à redução do sinal seguindo o aumento com a concentração de ferro [Fe].



**Figura 52** - Intensidade do sinal de IRM ponderada em  $T_2$  versus concentração de Fe.

Além disso, o efeito da redução do sinal em  $T_2$  (51.5, 57.3, 74.1 e 82.2%) em comparação com o controle (solução de gel ágar) correspondendo a 0,02; 0,04; 0,10 e 0,20 mM da concentração de [Fe], respectivamente, é observado na Figura 53.



**Figura 53** - Realce do efeito de redução de  $T_2$  das NPMs recobertas por *pheomelanina*.

Observou-se que essa redução no sinal no tempo de relaxação transversal  $T_2$  nesse trabalho obtida com as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@Pheo$ ) apresentou um resultado superior ao obtido em outros trabalhos desenvolvidos por Tilley e colaboradores (HERMAN et al., 2011) envolvendo NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nas concentrações correspondentes a 2,0; 5,0 e 10,0  $\mu\text{g}$  (Fe)  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, os quais reduziram o sinal de  $T_2$  ponderada por 12, 27 e 41% em relação ao controle. Além disso, evidenciou-se que as taxas de relaxação  $1/T_1$  ( $R_1$ ) e  $1/T_2$  ( $R_2$ ) possuem uma relação de linearidade proporcional com a concentração de ferro [Fe]. Sendo assim, foi possível esboçar um gráfico que mostra a relação entre as taxas de relaxação  $1/T_1$  (Figura 53a) e  $1/T_2$  (Figura 53b) obedecendo as Equações (22) e (23) de uma reta em função da concentração de ferro [Fe], sendo a inclinação da reta como a relaxividade longitudinal e transversal ( $r_1$  e  $r_2$ ), respectivamente, dadas pelas equações a seguir:

Para a taxa de relaxação longitudinal  $R_1$  ( $1/T_1$ ), obtem-se:

$$1/T_1 = 1/T_{1,0} + r_1[\text{Fe}] \quad (22)$$

Onde:

$1/T_1$  é a taxa de relaxação longitudinal das amostras;

$1/T_{1,0}$  é a taxa de relaxação longitudinal do controle.

Similarmente da mesma forma para a taxa de relaxação transversal  $R_2$  ( $1/T_2$ ):

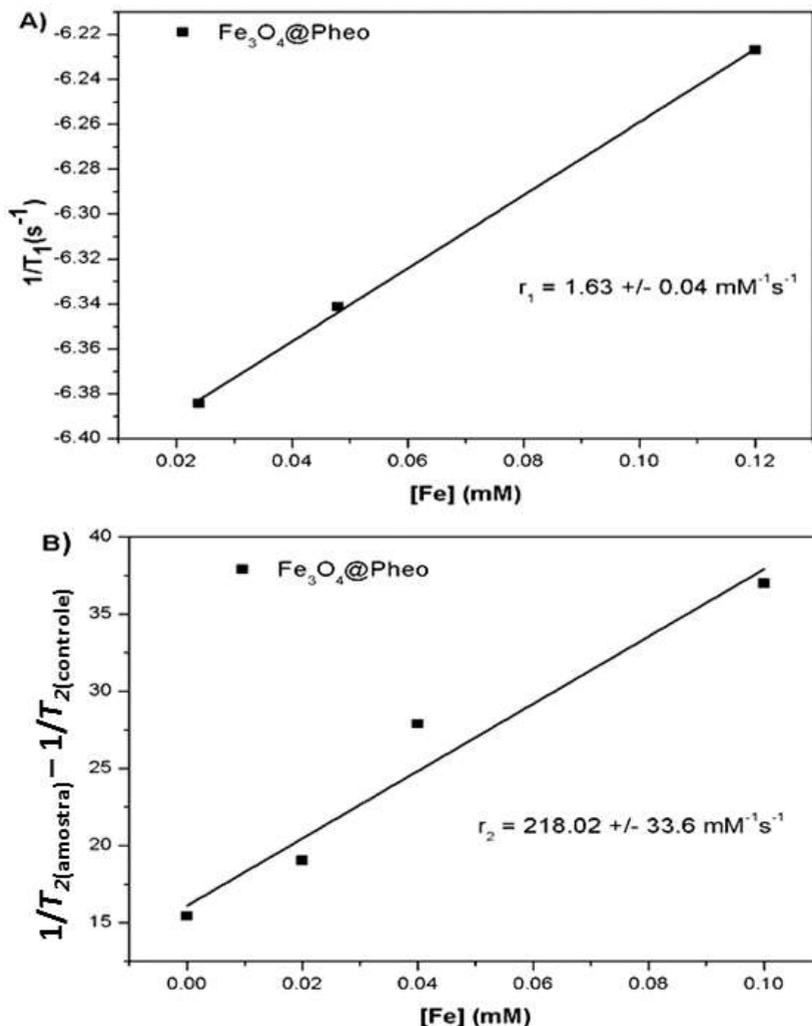
$$1/T_2 = 1/T_{2,0} + r_2[\text{Fe}] \quad (23)$$

Onde:

$1/T_2$  é a taxa de relaxação da amostra

$1/T_{2,0}$  é a taxa de relaxação do controle.

As Figuras 54a e 54b mostram uma dependência linear e o ajuste da curva forneceu boas correlações ( $R^2 = 0,9989$  para  $r_1$  e  $0,9473$  para  $r_2$ , respectivamente). Os resultados em que a relaxividade transversal  $r_2$  ( $218 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) foi muito superior à relaxividade longitudinal  $r_1$  ( $1,6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), indicou que as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* apresentaram característica como realce de agente de contraste  $T_2$  negativo ( $R_2 = 136$ ) para IRM. Mais ainda, neste estudo o valor de  $R_2$  foi cerca de 20 vezes maior que as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por quitosana, e também pode ser notado que o valor de  $r_2$  foi três vezes superior ao obtido com NPMs recobertas por quitosana, como é mostrado na Tabela 11. Por outro lado, os valores de  $r_2$  neste estudo foram cerca de três vezes superior comparado com outros resultados para NPMs@POA (um copolímero constituído pelo surfactante não-iônico PF127/ácido oleico) com uma superfície hidrofóbica, enquanto os valores de  $R_2$  foram os mesmos com relação a este trabalho (QIN et al., 2007).



**Figura 54** - (A) taxas de relaxação  $T_1$  ( $1/T_1$ ) e (B) taxas de relaxação  $T_2$  (amostra) -  $T_2$  (controle) plotadas contra concentração de ferro para as nanopartículas de magnetita em solução aquosa para obter as relaxividades longitudinal ( $r_1$ ) e transversal ( $r_2$ ), respectivamente.

Neste trabalho destaca-se que as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* puderam combinar alta performance e hidrofiliçidade, verificando que elas podem ser promissores candidatos como realçador

de contraste negativo  $T_2$  para IRM. É válido notar que o  $M_s$  (Tabela 9) possui os valores muito próximos ao apresentado neste trabalho em comparação com outros estudos envolvendo as NPMs de  $Fe_3O_4$  usando o mesmo método de síntese que foi empregado neste trabalho. Então, o sucesso do realce do contraste negativo em  $T_2$  pode ser atribuído ao recobrimento do biopolímero *pheomelanina*. Mais ainda, como uma função do diâmetro do “core” de óxido de ferro e do recobrimento (espessura e composição química), o efeito do encurtamento  $T_2$  das NPMs de  $Fe_3O_4$  pode ser estimado fundamentado pela teoria de esfera externa da mecânica quântica (TONG et al., 2010) que será visto na próxima seção deste capítulo.

#### 5.14 TEORIA SOBRE O EFEITO DE REDUÇÃO DO SINAL DE $T_2$ NAS NPMS DE $Fe_3O_4@PHEO$

A literatura destaca que o efeito de encurtamento de tempo de relaxação  $T_2$  das nanopartículas magnéticas pode ser explicado basicamente por dois importantes fatores, tais como a difusão translacional das moléculas de água e o gradiente de campo magnético gerado pelas nanopartículas magnéticas. Pois, esse gradiente de campo magnético induzido pelas NPMs acelera a taxa de defasagem da frequência de precessão de Larmor dos “spins” dos prótons próximos à água, favorecendo então uma perda mais rápida da energia de interação “*spin-spin*” (LEE, N.; HYEON, 2012); (TONG et al., 2010). Então, considerando que a relaxividade transversal  $T_2$  de NPMs de óxido de ferro seja dada por:

$$R_2 (1/T_2) = (256\pi^2\gamma^2/405)V^*Ms^2 a^2 / D (1 + L / a) \quad (24)$$

$$V^* = (4\pi a^3 / 3) N_o M$$

Onde :

$\gamma$  é a razão giromagnética do proton;

$V^*$  é a fração de volume do “core” do óxido de ferro;

$M_s$  é a magnetização de saturação do “core” do óxido de ferro;

$a$  é o raio do “core” do óxido de ferro;

$D$  é a difusibilidade das moléculas de água no meio;

$L$  é a espessura da camada de recobrimento do polímero.

Então, é possível inferir que nessa teoria o efeito da redução do sinal da relaxação  $T_2$  é dado por duas situações muito particulares, sendo no primeiro caso, em que as NPMs são recobertas por matriz polimérica impermeável, impedindo a difusão da água em seu interior, e assim, a Equação (24) pode ser expressa de forma mais simples, a qual é dada por:

$$R_2(1/T_2) \approx 1 / (1 + L/a) \quad (25)$$

Lembrando que  $L$  é a espessura da camada de recobrimento do polímero, e  $a$  é o diâmetro do “core” das NPMs de óxido de ferro. Onde  $L = d_H - a$ .

Por outro lado, considerando o segundo caso em que as NPMs de óxido de ferro estiverem recobertas por uma matriz polimérica que se espalha por toda solução e então permite que água se difunda nela, então, obtem-se para a Equação (24) uma expressão mais simples dada por:

$$R_2(1/T_2) \approx 1 / D^* \quad (26)$$

Onde  $D^*$  representa o coeficiente de difusão efetivo das moléculas de água.

Essa situação não se reflete ao caso da *pheomelanina* por constituir um biopolímero como uma macromolécula estável que não constitui uma matriz polimérica que irá se espalhar uma vez que ela acaba formada uma “capa” de hidratação onde os prótons da molécula de água estão em contato direto com a segunda esfera de coordenação, enquanto que os grupos catecolatos estão ligados diretamente com as NPMs na primeira esfera de coordenação.

Da Equação (25) nota-se que o aumento da espessura do recobrimento do polímero favorecerá a diminuição da relaxividade  $T_2$ , demonstrando que o resultado se reflete nos valores apresentados na Tabela 11.

Logo, é possível analisar esse efeito se considerarmos uma comparação entre as NPMs de  $Fe_3O_4$  recobertas por *pheomelanina* e outras recobertas com o biopolímero quitosana de acordo com a Tabela 11. De modo que substituindo na Equação (25) o diâmetro do “core” do

óxido de ferro das NPMs recobertas por quitosana (11 nm) obtidas por Sajonsamg e colaboradores (Sajonsamg et al., 2014), e o diâmetro hidrodinâmico ( $d_H$ ) de 130 nm de acordo com a Tabela 11, resultando em um  $L = 119$  nm. Sendo assim, o valor estimado para a relaxividade ( $1/T_2$ ) para essas nanopartículas seguindo a Equação (25) foi de 0,0846. Enquanto que para este estudo, considerando o diâmetro médio do “core” ( $a = 10$  nm) e a espessura da camada de recobrimento da *pheomelanina* ( $L = 80$  nm) então, obtem-se para o valor de  $1/T_2$  cerca de 0,111, o que comparativamente representa um resultado quase duas vezes superior a relaxividade  $R_2$  em relação às partículas de  $Fe_3O_4$  estabilizadas por quitosana.

**Tabela 11** - Comparativo com diferentes diâmetros hidrodinâmicos e relaxividade de NPMs.

Recobrim.	Diâm. <sup>c</sup> (YANG et al.)	$r_2$	$r_1$	$R_2$ ( $r_2/r_1$ )	Referência
Pheo	90	218,02	1,60	136	Este trabalho (JEDLOVSZKY- HAJDÚ et al., 2012)
AC <sup>a</sup>	150	155,7	3,5	44,5	
APA <sup>a</sup>	172	232,4	3,9	59,6	(JEDLOVSZKY- HAJDÚ et al., 2012)
Quitosana	130	64,31	9,44	6,8	(SANJAI et al., 2014)
Plurônico <sup>b</sup> F127/AO	71	63,4	1,33	47,7	(QIN et al., 2007)
Lactoferrina	75	75,6	-	-	(XIE et al., 2011)

<sup>a</sup>Ácido cítrico e ácido poliacrílico. <sup>b</sup>Copolímero F127/Ácido oleico (medido à 37°C).

<sup>c</sup>Diâmetro hidrodinâmico médio.

Conforme visto anteriormente o  $d_H$  das NPMs em solução é sempre maior que o do “core” de óxido de ferro, devido à presença da camada da *pheomelanina* hidratada. Um aumento no diâmetro hidrodinâmico também pode ser explicado pelo efeito de aglomeração das NPMs de óxido de ferro, constituindo assim uma instabilidade coloidal. E essa instabilidade associa-se às forças atrativas eletrostáticas,

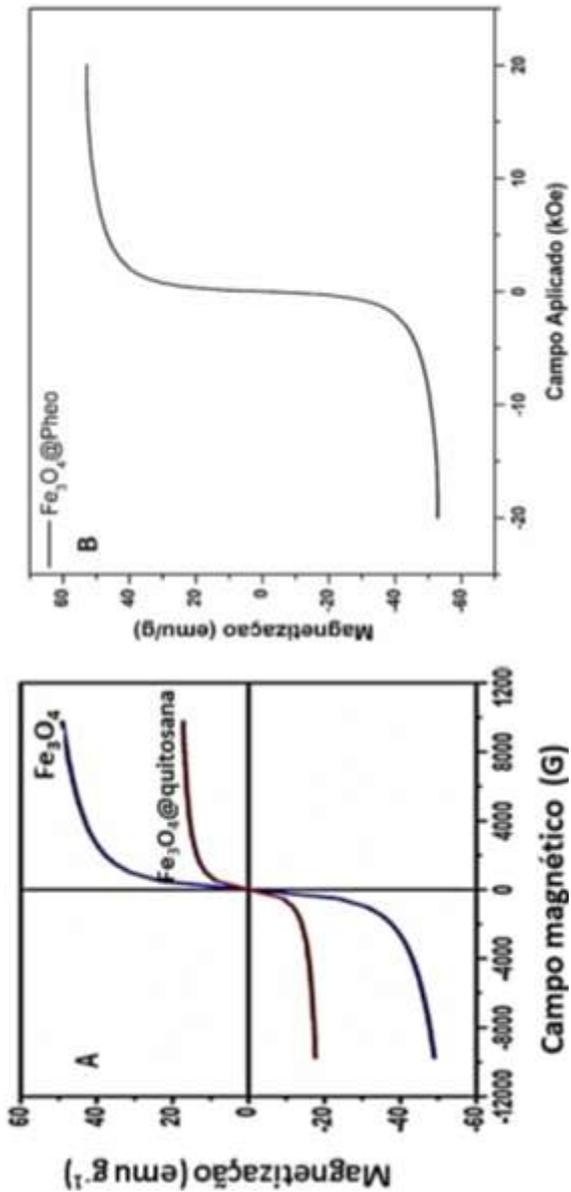
principalmente devido à natureza magnética das partículas de óxido de ferro. Isto é evidenciado quando em medidas de DLS, geralmente determina-se que o  $d_H$  de NPMs de  $Fe_3O_4$  não recobertas pode chegar até 1500 nm em solução aquosa devido a esse efeito de aglomeração das partículas magnéticas principalmente em  $pH$  próximos ao fisiológico, mais uma vez associada à sua carga elétrica na superfície.

Por fim, a Equação (7) representa que a relaxividade  $R_2$  é bastante influenciada pelo acoplamento dipolar, que é dada por uma interação de curto alcance “*spin-spin*” entre as moléculas de água e as NPMs. Isto significa que dizer que quanto menor for a camada polimérica de revestimento revestindo as NPMs de  $Fe_3O_4$ , maior será a defasagem da frequência de precessão de Larmor dos “*spins*” dos prótons próximos à água, favorecendo então uma perda mais rápida da energia de interação “*spin-spin*”, e conseqüentemente maior será a redução do sinal em  $T_2$ , favorecendo então o aumento do efeito de contraste negativo do agente de contraste nos tecidos.

Assim, é importante notar que a Equação (5) apresenta informações importantes que podem tornar possível uma análise para inferir a respeito dos parâmetros associados às propriedades físicas envolvendo a relaxividade  $1/T_2$ , tais como a magnetização de saturação ( $M_s$ ) do diâmetro do “core” do óxido de ferro, morfologia, etc.

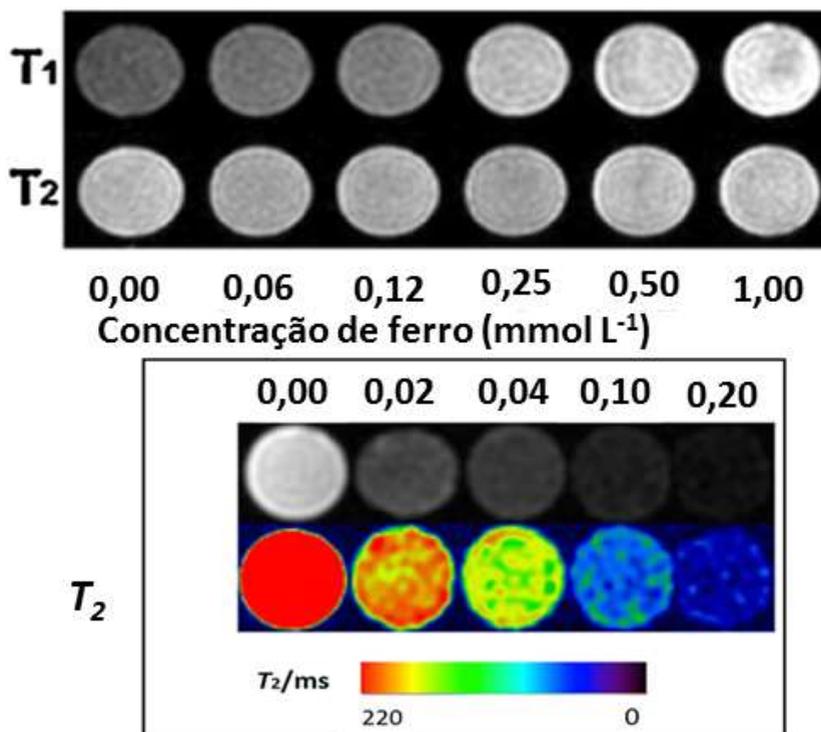
De modo que é possível traçar um paralelo entre a expressão teórica (5) para o aumento de relaxividade  $R_2$  com os dados experimentais envolvendo estudos associados e já relatados na literatura para reforçar que as NPMs de  $Fe_3O_4$  recobertas por *pheomelanina* foram bem sucedidas exibindo as propriedades como agente de contraste negativo, característica fundamental quando se deseja realizar investigação de tumores.

A Figura 55 aponta dois gráficos associados às medidas por VSM para a magnetização versus o campo magnético aplicado ( $H$ ) em que o valor de magnetização de saturação ( $M_s$ ) para NPMs de  $Fe_3O_4$  sem revestimento (curva azul Figura 55A) encontrado foi de 49 emu  $g^{-1}$  e após encapsulação do “core” de NPMs de  $Fe_3O_4$  com quitosana (curva vermelha, Figura 55A), o valor de  $M_s$  diminuiu para 17 emu  $g^{-1}$ . De modo que em comparação com o valor encontrado para  $M_s$  (52,5 emu  $g^{-1}$ ) das NPMs de  $Fe_3O_4@Pheo$  (Figura 55B), as mesmas apresentaram um valor cerca de três vezes superior ao destacado anteriormente, refletindo em um aumento da relaxividade  $R_2$  teoricamente nove vezes maior, se desconsiderarmos os outros parâmetros envolvidos na Equação (5).



**Figura 55** - Curvas de Magnetização de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nuas (vermelho) e recobertas (azul) por quitosana (SANJAI et al., 2014) (A) e de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por *pheomelanina* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo).

As concentrações de ferro utilizadas nas NPMs@quitosana (Figura 56a) nos estudos desenvolvidos por Sajonsamg e colaboradores (SANJAI et al., 2014) foram ligeiramente diferentes para o teste de efeito de redução sinal  $T_1$  e  $T_2$  em IRM (0; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50 e 1,0 mmol L<sup>-1</sup>), porém, notou-se que para as concentrações de ferro das NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo (0; 0,02; 0,04; 0,1 e 0,2 mmol L<sup>-1</sup>) houve considerável efeito de realce na redução do tempo de relaxação transversal  $T_2$  (Figura 56b).

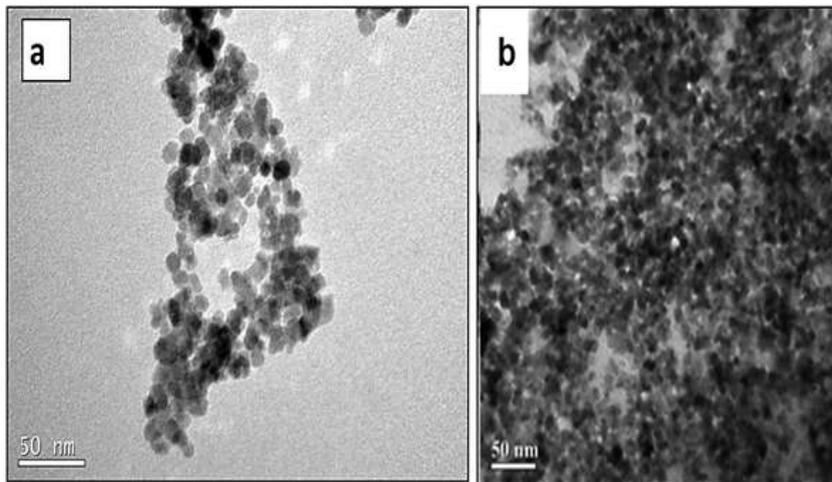


**Figura 56** - (A) Resultados de IRM de ponderação  $T_1$  e  $T_2$  em solução gel agar 3% com suspensão de NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@quitosana (Adaptado de (SANJAI et al., 2014)) e em (B) Resultados de IRM de ponderação  $T_2$  em solução gel ágar 2,5% com suspensão de NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo.

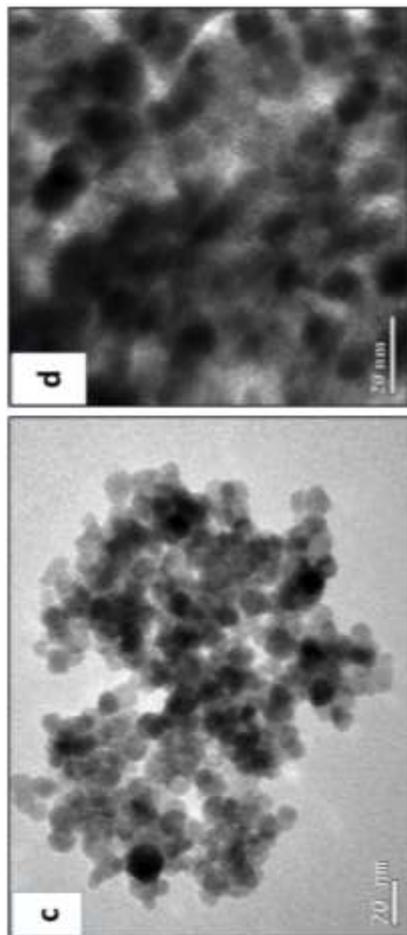
Por outro lado, quanto ao diâmetro do “core” tanto as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo quanto as preparadas com recobrimento por quitosana apresentaram o mesmo valor aproximadamente (10 nm) e, então, isso não influenciaria diretamente no efeito de redução do sinal em  $T_2$  conforme é apresentado na Equação (5).

Assim, lembrando que a teoria de esfera externa da Mecânica Quântica afirma que um gradiente de campo magnético local induzido pelo “core” das NPMs de óxido de ferro acelera a taxa de defasagem da frequência de precessão de Larmor dos “spins” dos prótons próximos a água, é possível inferir que para o recobrimento com o biopolímero feomelanina há uma perda mais rápida da energia de interação “*spin-spin*” favorecendo um valor mais elevado para  $R_2$ , e confirmando o efeito de redução do sinal em  $T_2$ .

Mais ainda, a literatura apresenta que características morfológicas associadas à má qualidade na distribuição de tamanho do “core”, e não uniformidade das NPMs, além de presença de aglomerados pode gerar alteração na relaxividade  $1/T_2$  (Cheon et al., 2012) e isso pode ser evidenciado pelos resultados de MET. Uma vez que quando se tem NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  para aplicações biomédicas, a estabilização coloidal é um dos fatores cruciais, e está associada com o diâmetro hidrodinâmico das NPs. Enquanto que as NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas por quitosana (Sajonsamg et al., 2014) apresentaram um  $d_H$  (130 nm) maior, em que sua estabilização por meio dos seus grupos amino sobre a superfície do “core” de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , via ligação de hidrogênio e formação de ligação covalente coordenada, deixou também a formação de sítios de coordenação Fe-OH ou até possível estabilização com certa presença de “clusters” e aglomerados, conforme é mostrado nas Figuras 58b e 59d. Por outro lado, o “core” das NPMs é constituído pela primeira esfera de coordenação onde em sua superfície há a presença dos sítios de coordenação das ligações de Fe-OH e de Fe-O, interagindo por ligação covalente com os grupos químicos catecolatos de forma bidentada ou monodentada (associado a condições de  $pK_a$ ) do biopolímero *pheomelanina*, sendo que a segunda esfera de coordenação constitui ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas da *pheomelanina*, e nela irão predominar moléculas de água interagindo por meio de forças dipolares e de ligações de hidrogênio com a primeira esfera de coordenação destacada anteriormente e conseqüentemente gerando NPMs com monodispersividade superior, conforme é visto nas Figuras 57a e 58c.



**Figura 57** - Resultados de MET de NPMs preparadas por co-precipitação de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@p\text{heomelanina}$  estabilizadas em  $p\text{H}$  8,0 (a) e de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@q\text{uitosana}$  estabilizadas em  $p\text{H}$  6,0 (retirado de referência (SANJAI et al., 2014)) (b).



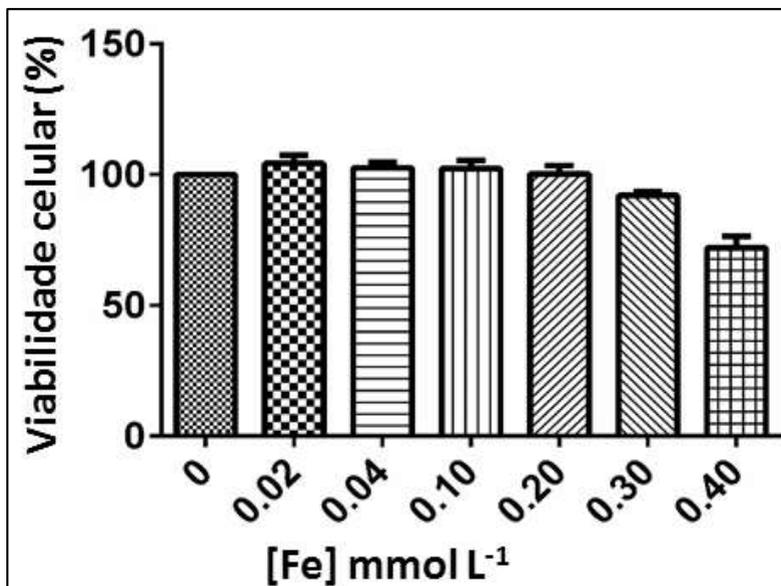
**Figura 58** - Resultados de MET de NPMs preparadas por co-precipitação apontando melhor distribuição de tamanho das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @*pheomelanina* estabilizadas em *pH* 8,0 (c) em comparação com NPMs preparadas por co-precipitação de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @*quitosana* estabilizadas em *pH* 6,0 (retirado de referência (SANJAI et al., 2014)) (d).

Recordando agora da teoria de esfera externa da Mecânica Quântica que afirma que um gradiente de campo magnético induzido pelo “core” das NPMs de óxido de ferro acelera a taxa de defasagem da frequência de precessão de Larmor dos “*spins*” dos prótons próximos à

água, levando em conta que haja uma perda mais rápida da energia de interação “*spin-spin*”(TONG et al., 2010).

#### 5.15 TESTE *IN VITRO* DE CITOTOXICIDADE POR MTT DAS NPMs DE Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> RECOBERTAS PELO BIO-OLIGÔMERO *PHEOMELANINA*

As NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recobertas por *pheomelanina* (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo) foram estabilizadas em meio aquoso, então as recém-sintetizadas nanopartículas foram postas à análise de citotoxicidade para células MCF-7 usando o ensaio de MTT (MOSMANN, 1983). Os resultados indicaram viabilidade celular de 100% na presença das NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Pheo até a concentração de 0,2 mmol L<sup>-1</sup> [Fe] e viabilidade celular em torno de 75% para concentração superior a 0,4 mmol L<sup>-1</sup> [Fe] (Figura 59). De modo que a Fig. 60 aponta os resultados do ensaio *in vitro* de MTT nas amostras associadas ao controle (sem solução de NPMs) e nas amostras com diferentes concentrações molares (0,02; 0,04; 0,10; 0,20; 0,30 e 0,40 mmol L<sup>-1</sup>) correspondendo respectivamente a 5, 10, 25, 50, 75 e 100 ppm às concentrações de Fe das suspensões de NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Então, pode se inferir que as NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recobertas por *pheomelanina* exibiram baixa citotoxicidade e boa biocompatibilidade sugerindo que são seguras para posteriores estudos *in vitro* e *in vivo*, os quais já estão em andamento pelo nosso grupo de pesquisa. Esses resultados com o biopolímero *pheomelanina* também demonstraram ser consistentes com os dados encontrados na literatura envolvendo outros tipos de recobrimento para atender a esta proposta de trabalho, tais como no recobrimento das NPMs de óxido de ferro por carboximetil celulose (CMC) (PAUL et al., 2004), polietileno glicol (PEG)(SUN, C.; SZE; ZHANG, 2006), glutathione reduzida (GSH), (XU, Y. et al., 2011) e dextrana (DEX) (EASO; MOHANAN, 2013a).



**Figura 59** - Ensaio por MTT das NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recobertas por pheomelanina mostrando viabilidade celular em MCF-7 em função da concentração de ferro.

Por fim, os resultados encontrados com essas nanopartículas magnéticas recobertas pelo biopolímero *pheomelanina* puderam ser comparados com outros tipos de polímeros que geralmente são utilizados como estabilizantes, mostrando que a *pheomelanina* não apresenta citotoxicidade celular e pode ser utilizada como material de recobrimento. Por fim, uma importante observação a ser feita, é que se utilizou as células MCF-7 em função de que as células tumorais possuem muitos transportadores de ferro e se as NPMs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> apresentaram baixa citotoxicidade para esse tipo de células, seriam menos tóxicas para as células normais (MCF-10), dispensando o ensaio por MTT para essas.

#### 5.16 TESTE *IN VITRO* DE “UPTAKE” DAS NPMS DE Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> RECOBERTAS PELO BIO-OLIGÔMERO *PHEOMELANINA*

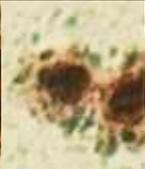
Cabe destacar que a carga residual devida ao revestimento das nanopartículas pode ser um ponto crítico a ser considerado quando se

busca aumentar a absorção das mesmas. As nanopartículas magnéticas revestidas com *pheomelanina* apresentaram cargas negativas na superfície e, tais cargas podem ter interagido com domínios catiônicos presentes na membrana plasmática das células tumorais MCF-7. Estudos demonstraram que nanopartículas aniônicas de óxido de ferro apresentaram elevados níveis de internalização através de fortes interações inespecíficas com poucos domínios catiônicos presentes na membrana plasmática (SHI et al., 2007);(VERMA; STELLACCI, 2010). Com relação ao posicionamento de nanopartículas estas podem permanecer aderidas à superfície externa da célula; ou quando interiorizadas as nanopartículas podem permanecer no citoplasma, na região perinuclear ou no núcleo ou em ambos (VERMA; STELLACCI, 2010); (WILLS et al., 2013).

No caso das nanopartículas revestidas com *pheomelanina* observou-se que estas apresentaram distribuição heterogênea, tendo sido encontradas tanto no citoplasma quanto na região perinuclear e no núcleo (Tabela 12). De fato, as nanopartículas superparamagnéticas podem se concentrar no citoplasma de células MCF-7, mas também podem ser observadas na região nuclear, conforme estudo de Kumar e colaboradores (KUMAR et al., 2014). Estes autores empregaram a coloração com “Prussian blue” para demonstrar a captação das nanopartículas. Esta captação foi comprovada através de microscopia confocal de fluorescência empregando o fluoróforo DAPI (2-(4-Amidinofenil)-6-indolecarbamidina diidrocloreto) que se liga fortemente às regiões do DNA que aparecem na cor azul nas imagens obtidas das células MCF-7, em cultura.

Adicionalmente, as NPMs de óxido de ferro podem ser internalizadas através de endocitose mediada por receptor, ou seja, a internalização ocorre através de mecanismos de transporte ativo realizados por proteínas transportadoras presentes na membrana celular como no caso dos receptores de transferrina (TFR1 e TRF2) e da proteína transportadora de metais (DMT1) (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004). Portanto, no caso das nanopartículas de ferro revestidas com feomelanina a internalização destas também pode estar ocorrendo por endocitose mediada por receptores, pois as células MCF-7 possuem quantidades maiores de receptores de transferrina (TRF) comparativamente às células normais (HOGEMANN-SAVELLANO et al., 2003). Desta forma, estudos bioquímicos complementares devem ser conduzidos de maneira a elucidar os mecanismos de transporte envolvidos.

**Tabela 12** - Células MCF-7 mantidas (4h) em meio DMEM contendo concentrações crescentes de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pheo}$  (1 – 50 ppm) (coradas de azul pelo “Prussian blue”). O núcleo e citoplasma (em vermelho). Imagens adquiridas em microscopia de campo claro (40X).

Controle negativo	Concentração das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pheo}$ no meio DEMEN [ppm]				
	1	6,2	12,5	25,0	50
					

As imagens obtidas de células MCF-7 empregando microscopia de campo claro em aumento de 40 vezes podem ser visualizadas (Tabela 12). As células foram mantidas em meio DMEM contendo concentrações crescentes de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pheo}$  preparadas em DMEM por um período de 4 h. A coloração com “Prussian blue” permitiu uma boa visualização das nanopartículas (em azul) enquanto que a orceína acética corou o núcleo e citoplasma de tons de vermelho (observada na imagem com concentração de 6,25 ppm das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pheo}$ ). Nas concentrações de 12,5 e 25 ppm pode-se perceber que as nanopartículas preencheram praticamente todo o citoplasma das células. No entanto, na concentração de 50 ppm não foi mais possível distinguir os limites do citoplasma das células pois as nanopartículas se acumularam na matriz extracelular (Tabela 11). Por outro lado, (KUMAR et al., 2012), (KUMAR et al., 2014) observaram a captação de nanopartículas de ferro após 8 h de exposição das células, enquanto na presente pesquisa bastaram apenas 4 horas para observar-se a captação efetiva de nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas com o biopolímero *pheomelanina* ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Pheo}$ ).

Portanto, os estudos preliminares para a determinação da captação (*up-take*) revelaram que para a visualização as melhores concentrações foram em 1 e 3 ppm, as demais concentrações utilizadas apresentaram excesso de nanopartículas que interagiram inclusive com a matriz celular dificultando a visualização da captação.

Por fim, pode ser concluído que após o tempo de exposição (4 h) durante o qual as células foram expostas às nanopartículas; as imagens

obtidas revelaram que houve captação e também acúmulo de nanopartículas no citoplasma e no espaço extracelular (matriz extracelular) após metade do tempo reportado na literatura (KUMAR et al., 2014) para ensaios de captação com MCF-7.

## 6 CONCLUSÕES

Este estudo apresentou o desenvolvimento de um potencial nanomaterial constituído por nanopartículas superparamagnéticas formado por um “core” de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e recoberto pelo biopolímero *pheomelanina* de forma que pode atender aos objetivos propostos no trabalho e os resultados apresentados estiveram em concordância com os tipos de materiais de recobrimento já destacados na literatura.

Com relação à preparação das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo, conclui-se que foi possível obter essas usando um método de síntese por co-precipitação que se mostrou dentre as outras opções existentes (decomposição térmica, solvotérmica, microemulsão), uma forma mais segura, com um custo muito baixo e principalmente ambientalmente mais favorável ao dispensar rotas que pudessem exigir solventes orgânicos mais tóxicos e que consumissem um tempo maior de preparação ou que envolvesse mais de uma etapa na produção dessas NPs. Apesar de que as NPMs preparadas pelo método de co-precipitação apresentaram baixa monodispersividade em comparação com o de decomposição térmica (PARK et al., 2004), mesmo assim, as NPMs de óxido de ferro recobertas por *pheomelanina* se apresentaram dentro do esperado ao exibir índice de polidispersividade abaixo do limite (PDI inferior a 0,2). Além disso, foi comprovado que o tamanho do “core” (10-13 nm) permitiu inferir que as nanopartículas exibissem comportamento superparamagnético e que as mesmas foram estabilizadas *via* ligação de coordenação com o óxido de ferro (Fe-O) com os grupos catecolatos e tióis associados a uma desprotonação em *pH* alcalino (9,0-10) durante a síntese em meio aquoso.

Em relação às características como AC negativo para IRM envolvendo as suspensões das NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo, comprovou-se que as nanopartículas apresentaram o efeito de redução de sinal no tempo de relaxamento transversal ( $T_2$ ) além de apresentarem relaxividade transversal ( $r_2 = 218 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) com valor superior ou igual em relação às outras NPMs preparadas (JEDLOVSZKY-HAJDÚ et al., 2012) pelo mesmo método desenvolvido neste trabalho.

Por fim, o método proposto nesta tese para obtenção de nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo que atendessem ao propósito de poderem ser utilizadas para aplicações biomédicas foi plenamente bem-sucedido ( $d_H < 150 \text{ nm}$ ). Uma vez que os resultados associados aos testes *in vitro* das nanopartículas se mostraram promissores e atenderam às condições de baixa citotoxicidade em células MCF-7. Além disso, as

características de biocompatibilidade também foram atingidas e comprovadas pelos resultados apresentados nos ensaios *in vitro* de “uptake”, onde se concluiu que o tempo de exposição (4 h) durante o qual as células foram expostas às nanopartículas, e as imagens obtidas revelaram que houve captação e também acúmulo das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo no citoplasma e no espaço extracelular (matriz extracelular) após metade do tempo reportado na literatura (KUMAR et al., 2014) para ensaios de captação com MCF-7.

## 6.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visto que as nanopartículas superparamagnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recobertas pelo biopolímero *pheomelanina* foram obtidas por um método de síntese por co-precipitação onde foi bem sucedido dentro de sua limitação, como perspectivas futuras destacam-se os estudos envolvendo preparação de nanopartículas com diferentes proporções estequiométricas entre o  $\text{Fe}^{3+}$  e o precursor da *pheomelanina* (L-DOPA) a fim de verificar possíveis influências nos diâmetros hidrodinâmicos, magnetização de saturação, e valores de relaxividade transversal e longitudinal.

Além de que como trabalhos futuros e perspectivas futuras podem apontar estudos envolvendo os testes *in vitro* com as células MCF-7 envolvendo a localização do sinal de imagem por ressonância magnética e subsequentes testes *in vivo* com modelos animais.

É válido considerar também que seja interessante realizar a preparação das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @Pheo através do método de decomposição térmica seguida de troca de ligante para melhorar as condições de controle de tamanho, parâmetro fundamental quando se deseja NPMs para aplicações biomédicas.

Por fim, este biopolímero *pheomelanina* demonstra apresentar forte potencial para realização de modificações e funcionalizações na área de Química Orgânica empregando métodos de ativação com biomoléculas ancoradas em NPMs e tornando-as mais específicas para aplicações biomédicas. Uma vez que o mesmo apresenta grupos químicos diversos mediados por condições de desprotonação (ácidos carboxílicos, catecolatos, tióis, quinona-imina) para reação com outros grupos terminais (amido, amino, carboxílico etc.).

## REFERÊNCIAS

ALIBEIGI, S.; VAEZI, M. R. Phase Transformation of Iron Oxide Nanoparticles by Varying the Molar Ratio of Fe(2+):Fe(3+). **Chemical Engineering & Technology**, v. 31, n. 11, p. 1591-1596, Nov 2008.

AMSTAD, E. et al. Ultrastable Iron Oxide Nanoparticle Colloidal Suspensions Using Dispersants with Catechol-Derived Anchor Groups. **Nano Letters**, v. 9, n. 12, p. 4042-4048, 2009/12/09 2009.

APTE, M. et al. Melanin mediated synthesis of gold nanoparticles by *Yarrowia lipolytica*. **Materials Letters**, v. 95, p. 149-152, Mar 1 2013.

BACRI, J.-C. et al. Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 85, n. 1–3, p. 27-32, 4/1/ 1990.

BARRERA, C. et al. Surface modification of magnetite nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 10, p. 1397-1399, 5// 2009.

BARRETT, T. et al. Macromolecular MRI contrast agents for imaging tumor angiogenesis. **Eur J Radiol**, v. 60, n. 3, p. 353-66, Dec 2006.

BATEER, B. et al. Facile synthesis of stable magnetic fluid using size-controlled Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Materials Research Bulletin**, v. 56, p. 34-38, 2014.

BERNSMANN, F. et al. Characterization of Dopamine–Melanin Growth on Silicon Oxide. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 19, p. 8234-8242, 2009/05/14 2009.

BHANDARY, V. S.; CULLITY, B. D. Texture and Mechanical Properties of Iron Wire Recrystallized in a Magnetic Field. **Transactions of the Metallurgical Society of Aime**, v. 224, n. 6, p. 1194-&, 1962.

BHATTARAI, S. R. et al. N-Acylated chitosan stabilized iron oxide nanoparticles as a novel nano-matrix and ceramic modification. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 467-477, 6/25/ 2007.

BIESINGER, M. C. et al. Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 7, p. 2717-2730, Jan 15 2011.

BILINSKA, B. Progress of infrared investigations of melanin structures. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 52, n. 9, p. 1157-1162, Aug 1996.

BILIŃSKA, B. On the structure of human hair melanins from an infrared spectroscopy analysis of their interactions with Cu<sup>2+</sup> ions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 2525-2533, 10// 2001.

BROOME, D. R. Nephrogenic systemic fibrosis associated with gadolinium based contrast agents: a summary of the medical literature reporting. **Eur J Radiol**, v. 66, n. 2, p. 230-4, May 2008.

BUTUN, S. et al. One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 636-643, 2011.

CARAVAN, P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 6, p. 512-523, 2006.

CHARKOUDIAN, L. K.; FRANZ, K. J. Fe(III)-Coordination Properties of Neuromelanin Components: 5,6-Dihydroxyindole and 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic Acid. **Inorganic Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3657-3664, 2006/05/01 2006.

CHEDEKEL, M. R. et al. Biosynthetic and structural studies on pheomelanin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 912, n. 2, p. 239-243, 4/8/1987.

CHUBUKOV, A. V.; FRENKEL, D. M. Resonant 2-Magnon Raman-Scattering in Parent Compounds of High-T-C Superconductors. **Physical Review B**, v. 52, n. 13, p. 9760-9783, Oct 1 1995.

COELHO, A. A. Indexing of powder diffraction patterns by iterative use of singular value decomposition. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, p. 86-95, Feb 2003.

COELHO, T. C. **Desenvolvimento de fluidos e filmes magnéticos a partir de óxidos de ferro para aplicações biomédicas**. 2011. 145 (Doctorate). Programa de Pós-Graduação em Química., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COLEMAN, M. P. et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). **Lancet Oncology**, v. 9, n. 8, p. 730-756, Aug 2008.

COLOMBO, M. et al. Biological applications of magnetic nanoparticles. **Chem Soc Rev**, v. 41, n. 11, p. 4306-34, Jun 7 2012.

COROT, C. et al. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 58, n. 14, p. 1471-504, Dec 1 2006.

COSTA, T. G. et al. Spectroscopy and theoretical studies of natural melanin (eumelanin) and its complexation by iron(III). **Journal of Coordination Chemistry**, v. 67, n. 6, p. 986-1001, Mar 19 2014.

COSTA, T. G. et al. Studies on Synthetic and Natural Melanin and Its Affinity for Fe(III) Ion. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 2012.

CULLITY, B. D. G., C. D. **Introduction to magnetic materials** 2nd. New Jersey Wiley John 2002. ISBN 9780470386323.

CUNHA, S. D. S. **Aplicação de Nanopartículas Magnéticas em Hipertermia**. 2014. Escola Superior de Tecnologia e Gestão

Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

DEZIDÉRIO, S. N. et al. Thin films of synthetic melanin. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 338-340, p. 634-638, 2004.

DI MARCO, M. et al. Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (USPIO) for biomedical application as MRI contrast agents. **Int J Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 609-22, 2007.

DURÁN, J. D. G. et al. Magnetic colloids as drug vehicles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2948-2983, 2008.

DUTZ, S. et al. Ferrofluids of magnetic multicore nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 10, p. 1501-1504, 2009.

EASO, S. L.; MOHANAN, P. V. Dextran stabilized iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vitro studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 726-732, Jan 30 2013a.

EFFENBERGER, F. B. **Nanomateriais magnéticos para aplicações em terapia e imagem**. 2012. 153 Programa de Pós Graduação em Química, Universidade de São Paulo

FARAJI, M. et al. Preconcentration of trace amounts of lead in water samples with cetyltrimethylammonium bromide coated magnetite nanoparticles and its determination by flame atomic absorption spectrometry. **Arabian Journal of Chemistry**, 2012.

FERREIRA, R. V. **Nanopartículas Magnéticas para Nanomedicina**. 2009. 93 (Master). Departamento de Química -ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

FEYMANN, R. P. There's a Plenty of Room at the Bottom. **Caltech Engineering and Science**, v. 23, n. 5, p. 15, 22/05/2013 1960.

FLÁVIA DOS SANTOS COELHO, P. R. D. C. C., ANA LÚCIA LOPES E JOSÉ DOMINGOS FABRIS. Óxidos de Ferro e Monazita de Areias de Praias do Espírito Santo. **Quim. Nova**, v. 28, n. 2, p. 233-237, 28/01/2005 2005.

FRIÁK, M.; SCHINDLMAYR, A.; SCHEFFLER, M. Ab initio study of the half-metal to metal transition in strained magnetite. **New Journal of Physics**, v. 9, n. 1, p. 5-5, 2007.

GALLO, J.; LONG, N. J.; ABOAGYE, E. O. Magnetic nanoparticles as contrast agents in the diagnosis and treatment of cancer. **Chem Soc Rev**, v. 42, n. 19, p. 7816-33, Oct 7 2013.

GARCÍA-JIMENO, S.; ESTELRICH, J. Ferrofluid based on polyethylene glycol-coated iron oxide nanoparticles: Characterization and properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 420, p. 74-81, 2013.

GHOSH, S. et al. Colloidal stability of magnetic iron oxide nanoparticles: influence of natural organic matter and synthetic polyelectrolytes. **Langmuir**, v. 27, n. 13, p. 8036-43, Jul 5 2011.

GÓMEZ-MARÍN, A. M.; SÁNCHEZ, C. I. Thermal and mass spectroscopic characterization of a sulphur-containing bacterial melanin from *Bacillus subtilis*. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, n. 31-32, p. 1576-1580, 2010.

GROTTO, H. Z. W. Anaemia of cancer: an overview of mechanisms involved in its pathogenesis. **Medical Oncology**, v. 25, n. 1, p. 12-21, Mar 2008.

GU, H. et al. Synthesis and cellular uptake of porphyrin decorated iron oxide nanoparticles-a potential candidate for bimodal anticancer therapy. **Chem Commun (Camb)**, n. 34, p. 4270-2, Sep 14 2005.

GU, L. et al. In Vivo Clearance and Toxicity of Monodisperse Iron Oxide Nanocrystals. **ACS Nano**, v. 6, n. 6, p. 4947-4954, 2012/06/26 2012.

GUARDIA, P. et al. Heating rate influence on the synthesis of iron oxide nanoparticles: the case of decanoic acid. **Chem Commun (Camb)**, v. 46, n. 33, p. 6108-10, Sep 7 2010.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, Jun 2005.

HABIBI, N. Preparation of biocompatible magnetite-carboxymethyl cellulose nanocomposite: characterization of nanocomposite by FTIR, XRD, FESEM and TEM. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 131, p. 55-8, Oct 15 2014.

HAYASHI, K. et al. Superparamagnetic Nanoparticle Clusters for Cancer Theranostics Combining Magnetic Resonance Imaging and Hyperthermia Treatment. **Theranostics**, v. 3, n. 6, p. 366-376, 2013.

HEE KIM, E. et al. Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, n. 0, p. 328-330, 3// 2005.

HERMAN, D. A. et al. Hot-injection synthesis of iron/iron oxide core/shell nanoparticles for T2 contrast enhancement in magnetic resonance imaging. **Chem Commun (Camb)**, v. 47, n. 32, p. 9221-3, Aug 28 2011.

HIERREZUELO, J. et al. Electrostatic Stabilization of Charged Colloidal Particles with Adsorbed Polyelectrolytes of Opposite Charge. **Langmuir**, v. 26, n. 19, p. 15109-15111, Oct 5 2010.

HO, C.-H. et al. Shape-Controlled Growth and Shape-Dependent Cation Site Occupancy of Monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 23, n. 7, p. 1753-1760, 2011/04/12 2011.

HOGEMANN-SAVELLANO, D. et al. The transferrin receptor: A potential molecular Imaging marker for human cancer. **Neoplasia**, v. 5, n. 6, p. 495-506, Nov-Dec 2003.

HONG, J. et al. Facile synthesis of polymer-enveloped ultrasmall superparamagnetic iron oxide for magnetic resonance imaging. **Nanotechnology**, v. 18, n. 13, Apr 4 2007.

HOWELL, R. C. et al. Chemosorption of radiometals of interest to nuclear medicine by synthetic melanins. **Nucl Med Biol**, v. 35, n. 3, p. 353-7, Apr 2008.

ILLES, E.; TOMBACZ, E. The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles. **J Colloid Interface Sci**, v. 295, n. 1, p. 115-23, Mar 1 2006.

JAIN, T. K. et al. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: drug delivery and magnetic resonance imaging. **Biomaterials**, v. 29, n. 29, p. 4012-21, Oct 2008.

JEDLOVSZKY-HAJDÚ, A. et al. Carboxylated magnetic nanoparticles as MRI contrast agents: Relaxation measurements at different field

strengths. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 19, p. 3173-3180, 2012.

JOLIVET, J. P. et al. Influence of Fe(II) on the Formation of the Spinel Iron-Oxide in Alkaline-Medium. **Clays and Clay Minerals**, v. 40, n. 5, p. 531-539, Oct 1992.

JULIANO, R. L.; STAMP, D. Effect of Particle-Size and Charge on Clearance Rates of Liposomes and Liposome Encapsulated Drugs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 63, n. 3, p. 651-658, 1975.

K.THANH, N. T. **Magnetic Nanoparticles from Fabrication to Clinical Applications**. Taylor & Francis Group, 2012. ISBN 978-1-4398-6932-1.

KEKKONEN, V. et al. Synthesis and characterization of biocompatible magnetic glyconanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 10, p. 1393-1396, 5// 2009.

KHARISOV, B. I. et al. Solubilization, dispersion and stabilization of magnetic nanoparticles in water and non-aqueous solvents: recent trends. **RSC Adv.**, v. 4, n. 85, p. 45354-45381, 2014.

KIM, B. H. et al. Large-scale synthesis of uniform and extremely small-sized iron oxide nanoparticles for high-resolution T1 magnetic resonance imaging contrast agents. **J Am Chem Soc**, v. 133, n. 32, p. 12624-31, Aug 17 2011.

KIM, J. Y.; HARISINGHANI, M. G. MR imaging staging of pelvic lymph nodes. **Magn Reson Imaging Clin N Am**, v. 12, n. 3, p. 581-6, Aug 2004.

KITTEL, C. **Introdução a física do estado sólido**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978.

KORPANY, K. V. et al. Stable water-soluble iron oxide nanoparticles using Tiron. **Materials Chemistry and Physics**, v. 138, n. 1, p. 29-37, 2013.

KUMAR, M. et al. Cellular interaction of folic acid conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and its use as contrast agent for targeted magnetic imaging of tumor cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3503-3516, 2012.

KUMAR, M. et al. Intracellular delivery of peptide cargos using iron oxide based nanoparticles: studies on antitumor efficacy of a BCL-2 converting peptide, NuBCP-9. **Nanoscale**, v. 6, n. 23, p. 14473-14483, 2014.

LARA, L. R. S. et al. The catalytic evaluation of in situ grown Pd nanoparticles on the surface of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@dextran particles in the p-nitrophenol reduction reaction. **RSC Advances**, v. 5, n. 11, p. 8289-8296, 2015.

LARTIGUE, L. et al. Cooperative organization in iron oxide multi-core nanoparticles potentiates their efficiency as heating mediators and MRI contrast agents. **ACS Nano**, v. 6, n. 12, p. 10935-49, Dec 21 2012.

LAURENT, S. et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064-2110, 2008/06/01 2008.

LEE, C. H.; WEINREB, J. C. The use of magnetic resonance imaging in breast cancer screening. **J Am Coll Radiol**, v. 1, n. 3, p. 176-82, Mar 2004.

LEE, J.; ISOBE, T.; SENNA, M. Preparation of Ultrafine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Particles by Precipitation in the Presence of PVA at High pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 177, n. 2, p. 490-494, 2/10/ 1996.

LEE, N.; HYEON, T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2575-2589, 2012.

LEFEBURE, S. et al. Monodisperse magnetic nanoparticles: Preparation and dispersion in water and oils. **Journal of Materials Research**, v. 13, n. 10, p. 2975-2981, 1998.

LEHNINGER, A. L. **Fundamentos de bioquímica**. 2nd. 1995.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 58, n. 2, p. 327-41, Sep 2004.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. FRANCIS, T. A. Boca Raton, FL, USA 2006.

LIU, J. F.; ZHAO, Z. S.; JIANG, G. B. Coating Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles with humic acid for high efficient removal of heavy metals in water. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 18, p. 6949-6954, Sep 15 2008.

LIU, X. et al. Surfactant-free fabrication of  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> structures with flower-like morphology in aqueous solution. **Journal of Crystal Growth**, v. 311, n. 1, p. 147-151, 12/15/ 2008.

LIU, Y. et al. Comparison of Structural and Chemical Properties of Black and Red Human Hair Melanosomes¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 1, p. 135-144, 2005.

LÓPEZ-CRUZ, A. et al. Water dispersible iron oxide nanoparticles coated with covalently linked chitosan. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 37, p. 6870, 2009.

LORD, S. J. et al. A systematic review of the effectiveness of magnetic resonance imaging (MRI) as an addition to mammography and ultrasound in screening young women at high risk of breast cancer. **Eur J Cancer**, v. 43, n. 13, p. 1905-17, Sep 2007.

LORRAIN, P.; KOUTCHMY, S. Chromospheric heating by electric currents induced by fluctuating magnetic elements. **Solar Physics**, v. 178, n. 1, p. 39-42, Feb 1998.

LU, A.-H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, 2007.

LU, J. et al. Solvothermal Synthesis and Characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoplates. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 10, p. 4012-4017, 2009.

LUIZ C. A. OLIVEIRA, J. D. F., MÁRCIO C. PEREIRA. IRON OXIDES AND THEIR APPLICATIONS IN CATALYTIC PROCESSES: A REVIEW. **Quimica Nova**, v. 36, n. 1, p. 8, 23/6/12 2013.

MA, H. L. et al. Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate. **Int J Pharm**, v. 333, n. 1-2, p. 177-86, Mar 21 2007.

MA, M. et al. Preparation of high-magnetization Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>-Pd (0) catalyst for Heck reaction. **Catalysis Communications**, v. 17, n. 0, p. 168-172, 1/5/ 2012.

MAGNITSKY, S. et al. In Vivo and Ex Vivo MR Imaging of Slowly Cycling Melanoma Cells. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 66, n. 5, p. 1362-1373, Nov 2011.

MAITY, D.; AGRAWAL, D. C. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 308, n. 1, p. 46-55, Jan 2007.

MALLICK, N. et al. Rhodamine-loaded, cross-linked, carboxymethyl cellulose sodium-coated super-paramagnetic iron oxide nanoparticles: Development and in vitro localization study for magnetic drug-targeting applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 51-62, 2015.

MASSART, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 17, n. 2, p. 1247-1248, 1981.

MASSART, R. et al. Preparation and properties of monodisperse magnetic fluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 149, n. 1-2, p. 1-5, 8// 1995.

MAZZOLA, A. A. **Magnetic resonance: principles of image formation and applications in functional imaging**. Revista Brasileira de Física Médica. 3: 117-29 p. 2009.

MENG, H. et al. Orthogonal optimization design for preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles via chemical coprecipitation. **Applied Surface Science**, v. 280, p. 679-685, 2013.

MERT, E. H. et al. Synthesis and characterization of magnetic polyHIPEs with humic acid surface modified magnetic iron oxide nanoparticles. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 1, p. 175-181, 1// 2013.

MORALES, M. P. et al. Structural Characteristics of Uniform  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Particles with Different Axial (Length/Width) Ratios. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 158-163, 1// 1994.

MORRISH, A. H. **The physical principles of magnetism**. New York: J. Wiley, 1965. ISBN 0471615900.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURBE, J.; RECHTENBACH, A.; TOPFER, J. Synthesis and physical characterization of magnetite nanoparticles for biomedical applications. **Materials Chemistry and Physics**, v. 110, n. 2-3, p. 426-433, Aug 15 2008.

NAGESHA, D. K. et al. Functionalization-induced improvement in magnetic properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Applied Physics**, v. 105, n. 7, p. 07B317, 2009.

NEUBERGER, T. et al. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 483-496, May 1 2005.

NIAZI A, P., P. AND RASTOGI, A.K. A precision, low-cost vibrating sample magnetometer. **Current Science**, v. 79, n. 1, p. 12, 07/10/2000 2000.

PANKHURST, Q. A. et al. **Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine**. 2009. (42). Journal of Physics D-Applied Physics,

PARK, J. et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. **Nat Mater**, v. 3, n. 12, p. 891-895, 12//print 2004.

PAUL, K. G. et al. Synthesis of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides Using Reduced Polysaccharides. **Bioconjugate Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 394-401, 2004/03/01 2004.

PENFIELD, J. G.; REILLY, R. F., JR. What nephrologists need to know about gadolinium. **Nat Clin Pract Nephrol**, v. 3, n. 12, p. 654-68, Dec 2007.

PÉREZ-MIRABET, L. et al. One-pot synthesis of stable colloidal solutions of MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles using oleylamine as solvent and stabilizer. **Materials Research Bulletin**, v. 48, n. 3, p. 966-972, 3// 2013.

PETER CARAVAN, J. J. E., THOMAS J. MCMURRY, AND RANDALL B. LAUFFER. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2293-2352, 1999.

PIERCE, J. A.; RAST, D. M. A Comparison of Native and Synthetic Mushroom Melanins by Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy. **Phytochemistry**, v. 39, n. 1, p. 49-55, May 1995.

POULIQUEN, D. et al. Iron-Oxide Nanoparticles for Use as an Mri Contrast Agent - Pharmacokinetics and Metabolism. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 9, n. 3, p. 275-283, 1991.

QIAO, R.; YANG, C.; GAO, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 35, p. 6274-6293, 2009.

QIN, J. et al. A High-Performance Magnetic Resonance Imaging T2 Contrast Agent. **Advanced Materials**, v. 19, n. 14, p. 1874-1878, 2007.

QU, S. C. et al. Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 215, n. 1, p. 190-192, Jul 1 1999.

REDDY, L. H. et al. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 11, p. 5818-5878, Nov 2012a.

RIBEIRO, T. G. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas de Óxidos Mistos de MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Recobertas com Quitosana. Estudos da influência da dopagem com Gd<sup>3+</sup> nas propriedades estruturais e magnéticas.** 2008. 106 Dissertation (Master). Departamento de Tecnologia Nuclear, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

RIFFLE, J. S. et al. Magnetic nanostructured fluids. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 223, p. D38-D39, Apr 7 2002.

ROSEN, J. E. et al. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 275-290, 4// 2012.

RUIZ-HERNÁNDEZ, E. et al. Mesoporous magnetic microspheres for drug targeting. **Solid State Sciences**, v. 10, n. 4, p. 421-426, 2008.

SANJAI, C. et al. Chitosan-triphosphate nanoparticles for encapsulation of super-paramagnetic iron oxide as an MRI contrast agent. **Carbohydr Polym**, v. 104, p. 231-7, Apr 15 2014.

SARNA, T. et al. Electron-Nuclear Double-Resonance in Melanins. **Biophysical Journal**, v. 16, n. 10, p. 1165-1170, 1976.

SAVA, V. M. et al. Protective activity of melanin-like pigment derived from tea on *Drosophila melanogaster* against the toxic effects of benzidine. **Food Research International**, v. 35, n. 7, p. 619-626, 2002.

SCHAIBLE, M. E.; KAUFMANN, S. H. E. Iron and microbial infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 12, p. 946-953, Dec 2004.

SCHÖPF, B. et al. Methodology description for detection of cellular uptake of PVA coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) in synovial cells of sheep. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 411-418, 5// 2005.

SCHWEITZER, A. D. et al. Melanin-covered nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 78, n. 5, p. 1494-502, Dec 1 2010.

SERGE YOFFE, T. L., PERRY EVERETT, FRANK GU. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): Synthesis and Surface

Modification Techniques for use with MRI and Other Biomedical Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, p. 493-509, 2013.

SESTIER, C. et al. In vitro toxicity of magnetic fluids evaluated for macrophage cell lines. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, n. 1-3, p. 403-405, Nov 2002.

SHAPIRO, E. M. et al. MRI detection of single particles for cellular imaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 10901-10906, Jul 27 2004.

SHEN, L. H. et al. One-step synthesis of monodisperse, water-soluble ultra-small Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for potential bio-application. **Nanoscale**, v. 5, n. 5, p. 2133-2141, 2013.

SHI, X. Y. et al. Synthesis, characterization, and intracellular uptake of carboxyl-terminated poly(amidoamine) dendrimer-stabilized iron oxide nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 42, p. 5712-5720, 2007.

SHRIVER, D. F. D. F. In: PRESS, O. U. (Ed.). **Inorganic chemistry**. 3thd 1999. p.763. ISBN 019850330X

SILVA, I.-I. N. D. C. J. A. G. D. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. In: SAÚDE, M. D. (Ed.). **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil 2014**. p.124. ISBN 978-85-7318-237-8.

SIMONOVIC, B. et al. Thermogravimetry and differential scanning calorimetry of natural and synthetic melanins. **Journal of thermal analysis**, v. 36, n. 7-8, p. 2475-2482, 1990/11/01 1990.

SINNECKER, J. P. et al. Giant magnetoimpedance in CoP electrodeposited microtubes. **Journal of Materials Research**, v. 15, n. 3, p. 751-755, Mar 2000.

SIPOS, P. Formation of spherical iron(III) oxyhydroxide nanoparticles sterically stabilized by chitosan in aqueous solutions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 95, n. 1, p. 55-63, 2003.

SMOLKOVA, I. S. et al. Alternating magnetic field energy absorption in the dispersion of iron oxide nanoparticles in a viscous medium. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 374, p. 508-515, 2015.

SRIVASTAVA, S. et al. Innovative synthesis of citrate-coated superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and its preliminary applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 359, n. 1, p. 104-111, Jul 1 2011.

STAINSACK, J. et al. Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin. **Inorganica Chimica Acta**, v. 356, p. 243-248, 2003.

SUN, C.; SZE, R.; ZHANG, M. Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 78A, n. 3, p. 550-557, 2006.

SUN, S.; ZENG, H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 28, p. 8204-8205, 2002/07/01 2002.

SUN, S. et al. Monodisperse MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 1, p. 273-279, 2004/01/01 2003.

SUN, S. N. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. **Chinese Physics B**, v. 23, n. 3, Mar 2014.

SZPOGANICZ, B. et al. Metal binding by melanins: studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu(II) and Zn(H) ions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 89, n. 1-2, p. 45-53, Apr 10 2002.

TARTAJ, P. et al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R182-R197, Jul 7 2003.

TEJA, A. S.; KOH, P. Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 55, n. 1-2, p. 22-45, 2009.

TESEMA, Y. T.; PHAM, D. M.; FRANZ, K. J. Counterions influence reactivity of metal ions with cysteinyl-dopa model compounds. **Inorg Chem**, v. 47, n. 3, p. 1087-95, Feb 4 2008.

THANH, N. T. K.; GREEN, L. A. W. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. **Nano Today**, v. 5, n. 3, p. 213-230, Jun 2010.

THIAGO G. COSTAA, M. J. F., FELIPE S. VILHENAA, MELINA HELLERB, GUSTAVO A. MICKEB, ALDO S. OLIVEIRAC, INÊS M. C. BRIGHENTEC, FABIOLA B. F. MONTEIROD, TÂNIA B. CRECZYNSKI-PASAD, BRUNO SZPOGANICZ. Preparation, characterization, cytotoxicity and antioxidant activity of DOPA melanin modified by amino acids: melaninlike compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 273-281, 2015.

TIAN, Y. et al. Facile solvothermal synthesis of monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocrystals with precise size control of one nanometre as potential MRI contrast agents. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 8, p. 2476-2481, 2011.

TONG, S. et al. Coating optimization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for high T<sub>2</sub> relaxivity. **Nano Lett**, v. 10, n. 11, p. 4607-13, Nov 10 2010.

TONG YE, A. P., TADEUSZ SARNA AND JOHN D. SIMON. Different Molecular Constituents in Pheomelanin are Responsible for Emission, Transient Absorption and Oxygen Photoconsumption. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, p. 437-443, 2008.

ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996/01/01 1996.

VAIDYANATHAN, G.; SENDHILNATHAN, S.; ARULMURUGAN, R. Structural and magnetic properties of Co<sub>1-x</sub>Zn<sub>x</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles by co-precipitation method. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 313, n. 2, p. 293-299, 2007.

VEISEH, O. et al. Chlorotoxin bound magnetic nanovector tailored for cancer cell targeting, imaging, and siRNA delivery. **Biomaterials**, v. 31, n. 31, p. 8032-8042, Nov 2010.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. **Small**, v. 6, n. 1, p. 12-21, Jan 4 2010.

VERRALL, K. E.; WARWICK, P.; FAIRHURST, A. J. Application of the Schulze–Hardy rule to haematite and haematite/humate colloid stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 150, n. 1–3, p. 261-273, 5/1/ 1999.

VOGEL, A. I. **Analise inorganica quantitativa**. 4. ed. 1981. ISBN 8570301146.

WILCZOK, T. et al. Modern Trends in the Analysis of Melanin Structure and Function. **Studia Biophysica**, v. 122, n. 1-3, p. 11-21, 1987.

WILLIAMS., D. B.; CARTER., C. B. **Transmission Electron**

**Microscopy A Textbook for Materials Science**. Washington: Springer, 2009. 779

WILLS, J. et al. Protein Corona Dependent Agglomeration Defines Cell Uptake and Toxicity of Size-Differentiated Nanoparticles. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 54, p. S45-S45, Sep 2013.

XIE, H. et al. Lactoferrin-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a specific MRI contrast agent for detection of brain glioma in vivo. **Biomaterials**, v. 32, n. 2, p. 495-502, Jan 2011.

XIN, C. et al. Preparation of melanin from *Catharsius molossus* L. and preliminary study on its chemical structure. **J Biosci Bioeng**, v. 119, n. 4, p. 446-54, Apr 2015.

XU, H. et al. Preparation of hydrophilic magnetic nanospheres with high saturation magnetization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, n. 1, p. 125-130, 2007.

XU, R. Shear Plane and Hydrodynamic Diameter of Microspheres in Suspension. **Langmuir**, v. 14, n. 10, p. 2593-2597, 1998/05/01 1998.

XU, Y. et al. Water-soluble iron oxide nanoparticles with high stability and selective surface functionality. **Langmuir**, v. 27, n. 14, p. 8990-7, Jul 19 2011.

YAN, A. et al. A simple solvothermal synthesis and characterization of round-biscuit-like Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with adjustable sizes. **Solid State Communications**, v. 144, n. 7–8, p. 315-318, 11// 2007.

YAN LIU, L. H., KAZUMASA WAKAMATSU, SHOSUKE LTO, BHAVIN ADHYARU, CHI-YUAN CHENG,; CLIFFORD R. BOWERS, J. D. S. Comparison of Structural and Chemical Properties of Black and Red Human Hair Melanosomes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 135-144, Received 29 July 2004; accepted 13 October 2004 2005.

YANG, C. et al. Surface Functionalization and Characterization of Magnetic Polystyrene Microbeads. **Langmuir**, v. 24, n. 16, p. 9006-9010, 2008/08/01 2008.

YOFFE, S. et al. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): Synthesis and Surface Modification Techniques for use with MRI and Other Biomedical Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 3, p. 493-509, Jan 2013.

YOU, J. et al. Preparation and characteristic of vinorelbine bitartrate-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, n. 1-2, p. 270-276, Oct 1 2007.

YU, W. W. et al. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. **Chem Commun (Camb)**, n. 20, p. 2306-7, Oct 21 2004.

YUEN, A. K. et al. The interplay of catechol ligands with nanoparticulate iron oxides. **Dalton Trans**, v. 41, n. 9, p. 2545-59, Mar 7 2012.

YUN TACK, L.; KYOUNGJA, W.; KYU-SIL, C. Preparation of Water-Dispersible and Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for MRI Agent. **Nanotechnology, IEEE Transactions on**, v. 7, n. 2, p. 111-114, 2008.

ZARBIN, J. G. A. QUÍMICA DE (NANO)MATERIAIS. **Quim. Nova**, v. Vol. 30, n. No. 6, p. 1469-1479, 2007.

ZHANG, B. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles prepared by using an improved polyol method. **Applied Surface Science**, v. 266, n. 0, p. 375-379, 2/1/ 2013.

ZHANG, L. et al. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. **Clin Pharmacol Ther**, v. 83, n. 5, p. 761-769, 10/24/online 2007.

ZHANG, M. et al. Preparation of IDA-Cu functionalized core–satellite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/polydopamine/Au magnetic nanocomposites and their application for depletion of abundant protein in bovine blood. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 47, p. 10696, 2010.

ZHOU, Z. G. et al. Iron/iron oxide core/shell nanoparticles for magnetic targeting MRI and near-infrared photothermal therapy. **Biomaterials**, v. 35, n. 26, p. 7470-7478, Aug 2014.

ZHU, Y. et al. Size-controlled synthesis of monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 509, n. 34, p. 8549-8553, 2011.

ZIMMER, C. et al. Mr-Imaging of Phagocytosis in Experimental Gliomas. **Radiology**, v. 197, n. 2, p. 533-538, Nov 1995.

ZOTTIS, A. D. et al. Pheomelanin-coated iron oxide magnetic nanoparticles: a promising candidate for negative T2 contrast enhancement in magnetic resonance imaging. **Chem Commun (Camb)**, v. 51, n. 56, p. 11194-7, Jun 30 2015.