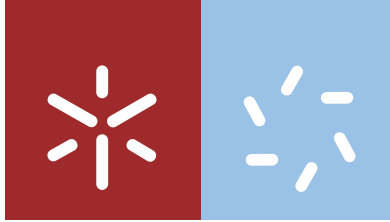


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Liliana Sofia Correia Fernandes

**Desenvolvimento de estruturas compósitas
de nanopartículas magnéticas encapsuladas
em polímero para aplicações biomédicas**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Liliana Sofia Correia Fernandes

**Desenvolvimento de estruturas compósitas
de nanopartículas magnéticas encapsuladas
em polímero para aplicações biomédicas**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho realizado sob orientação do
Doutor Senentxu Lanceros-Méndez
e da
Doutora Vanessa Cardoso

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer aos meus pais e irmãos, uma vez que sem o seu apoio incondicional e sem os seus valores nunca me teria tornado na pessoa que tornei, nem atingido este ponto na minha vida académica.

Também gostaria de agradecer todos os meus amigos, colegas do Departamento de Física e namorado que me apoiaram ao longo deste percurso, nos dias bons, mas sobretudo nos dias maus.

Uma palavra à Dra. Vanessa Cardoso, que sempre se mostrou disponível e disposta a motivar e a colaborar em tudo o que eu precisasse e fosse necessário. Foi um prazer trabalhar com uma pessoa assim.

É necessário agradecer também ao grupo *Electroactive Smart Materials* da Universidade do Minho, em especial à Clárisse Ribeiro, Pedro Libânio, Pedro Martins e Sylvie Ribeiro por terem sido ponte entre o grupo e os departamentos responsáveis pelas medições.

Um agradecimento especial ao Dr. Senentxu Lanceros-Méndez por todo o seu apoio e orientação ao longo deste tempo, possibilitando o desenvolvimento das minhas competências científicas e sociais.

Finalmente, um agradecimento sincero a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho e cujo nome não é necessário mencionar.

Resumo

Nos últimos anos, importantes avanços têm sido realizados no desenvolvimento de nanoestruturas para um grande leque de aplicações. Um exemplo passa pela crescente aplicação de nanopartículas magnéticas na área da biomedicina. O sucesso no uso destas nanopartículas depende de vários fatores, como é o caso do tamanho e das suas propriedades magnéticas, que podem ser controlados durante a sua síntese. No entanto, um problema inevitável das nanopartículas magnéticas é a sua baixa estabilidade em solução aquosa em longos períodos de tempo, podendo aglomerar ou mesmo oxidar. Esta barreira pode ser solucionada através do revestimento com diferentes materiais, incluindo surfactantes, polímeros ou materiais inorgânicos.

Com o enquadramento acima descrito, nesta dissertação foi estudado o comportamento de diferentes estruturas compósitas de nanopartículas magnéticas encapsuladas para aplicação na biomedicina. Para o núcleo magnético foram utilizadas nanopartículas de ferrite de cobalto (CoFe_2O_4) e nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4), não só por possuírem elevada magnetização, mas também por apresentarem propriedades interessantes como a magnetostritividade e o superparamagnetismo, respetivamente. As nanopartículas de CoFe_2O_4 foram adquiridas comercialmente e as nanopartículas de Fe_3O_4 foram sintetizadas pelo método de coprecipitação. Em ambos os casos, as nanopartículas magnéticas sofreram um pós-processamento com ácido oleico de modo a aumentar a sua estabilidade em solução. De seguida, as nanopartículas magnéticas foram revestidas com dois materiais distintos, a sílica (SiO_2), por uma adaptação do método de Stöber, e um polímero biocompatível e biodegradável, o poli (l-ácido láctico) (PLLA), pelo método de microemulsão. Optou-se por estudar a viabilidade do revestimento com SiO_2 por apresentar uma diversidade de vantagens para aplicações biomédicas. Os compósitos obtidos foram sujeitos a várias técnicas de caracterização de forma a determinar a morfologia, estrutura, propriedades magnéticas e estabilidade em solução. Por último, foram realizados ensaios de citotoxicidade para avaliar a viabilidade celular das partículas.

O revestimento com SiO_2 verificou-se apropriado tanto para as nanopartículas de CoFe_2O_4 como Fe_3O_4 . Já para o revestimento com PLLA, este foi mais uniforme e eficiente para as nanopartículas de Fe_3O_4 . De forma resumida, os resultados mostraram que as partículas produzidas apresentam um grande potencial para aplicação na biomedicina tendo em conta a sua fácil produção e de baixo custo.

Abstract

In recent years, important advances have been achieved in the development of nanostructures for a wide range of applications. An example is the increasing application of magnetic nanoparticles in the biomedical field. The successful use of these nanoparticles depends on several factors, such as their size and magnetic properties, which can be controlled during their synthesis. However, an unavoidable problem of magnetic nanoparticles is their low stability in aqueous solution over long periods of time, which may agglomerate or even oxidize. This problem can be overcome by coating with different materials, including surfactants, polymers or inorganic materials.

Within the framework described above, this dissertation focussed on the study of the behaviour of different composite structures of encapsulated nanoparticles for application in biomedicine. Nanoparticles of cobalt ferrite (CoFe_2O_4) and iron oxide (Fe_3O_4) were used for the magnetic core, not only because of their high magnetization but also due to their interesting properties such as magnetostrictive response and superparamagnetism, respectively. CoFe_2O_4 nanoparticles were commercially acquired and Fe_3O_4 nanoparticles were synthesized by the coprecipitation method. In both cases, the magnetic nanoparticles were post processed with oleic acid in order to increase their stability in solution. Then, the magnetic nanoparticles were coated using two materials, porous and non-porous silica (SiO_2) prepared by and adaptation of the Stöber method, and a biocompatible and biodegradable polymer, poly (L-lactic acid) (PLLA), prepared by the microemulsion method. In particular, coatings with SiO_2 were studied as they present a variety of advantages for biomedical applications. The composites obtained were subjected to several characterization techniques in order to determine the morphology, structure, magnetic properties and stability in solution. Finally, cytotoxicity assays were performed.

SiO_2 was found to be suitable for coating both the CoFe_2O_4 and Fe_3O_4 nanoparticles. As for the PLLA coating, it was more uniform and efficient for the Fe_3O_4 nanoparticles. As a conclusion, results showed that the produced particles show a large potential for application in biomedicine, considering their easy production and low cost.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
<i>Abstract</i>	vii
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tabelas.....	xvii
Lista de Acrónimos e símbolos.....	xix
1. Introdução.....	xxi
1.1. Enquadramento.....	3
1.2. Objetivos e metodologia.....	4
1.3. Organização da dissertação.....	6
2. Micro- e nanoestruturas magnéticas.....	3
2.1. Introdução.....	9
2.2. Nanopartículas magnéticas.....	9
2.2.1. Propriedades magnéticas.....	9
2.2.2. Síntese de nanopartículas magnéticas.....	12
2.2.3. Ferrite de cobalto.....	13
2.2.4. Óxido de ferro.....	15
2.3. Revestimento/funcionalização.....	16
2.3.1. Sílica.....	17
2.3.2. Poli (l-ácido láctico).....	18
2.4. Aplicações.....	20
2.4.1. Agente de contraste em imagiologia.....	20

2.4.2.	Libertação controlada e direcionada de fármacos	21
2.4.3.	Biossensores	22
2.4.4.	Bioseparação.....	22
2.4.5.	Hipertermia	23
3.	Materiais e métodos.....	25
3.1.	Materiais.....	27
3.2.	Preparação de nanopartículas e revestimentos	27
3.2.1.	Nanopartículas de ferrite de cobalto	27
3.2.2.	Nanopartículas de óxido de ferro	27
3.2.3.	Estabilização com ácido oleico	28
3.2.4.	Revestimento com sílica.....	28
3.2.5.	Revestimento com poli (l-ácido lático).....	29
3.2.6.	Resumo das amostras processadas	30
3.3.	Técnicas de caracterização.....	31
3.3.1.	Caracterização morfológica	31
	<i>Microscopia eletrônica de varrimento</i>	31
	<i>Microscopia Eletrônica de transmissão</i>	32
3.3.2.	Caracterização estrutural	33
	<i>Difração de raios-X</i>	33
3.3.3.	Caracterização magnética	34
	<i>Magnetometria de amostra vibrante</i>	34
3.3.4.	Medição da estabilidade em soluções aquosas.....	35
	<i>Potencial zeta (ζ)</i>	35
3.3.5.	Ensaio de citotoxicidade	36
4.	Apresentação e discussão de resultados.....	39
4.1.	Esferas de sílica	41

4.2.	Esferas de poli (l-ácido láctico)	42
4.3.	Revestimento de nanopartículas magnéticas de ferrite de cobalto.....	44
4.3.1.	Nanopartículas magnéticas de ferrite de cobalto.....	44
4.3.2.	Revestimento de nanopartículas magnéticas de ferrite de cobalto com sílica.....	45
4.3.3.	Revestimento de nanopartículas magnéticas de ferrite de cobalto com poli (l-ácido láctico)	47
4.4.	Revestimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	50
4.4.1.	Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	50
4.4.2.	Revestimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com sílica.....	52
4.4.3.	Revestimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com poli (l-ácido láctico)	54
4.5.	Ensaio de citotoxicidade.....	57
4.6.	Sumário das propriedades dos materiais processados	58
5.	Conclusões e trabalhos futuros	61
	Bibliografia	65

Índice de figuras

Figura 1.1 – Exemplos de aplicações de micro- e nanoestruturas funcionalizadas [5].....	3
Figura 1.2 - Representação esquemática das esferas obtidas no âmbito deste trabalho.	5
Figura 2.1 - Alinhamento de momentos magnéticos individuais em diferentes tipos de materiais: a) paramagnéticos; b) ferromagnéticos; c) antiferromagnéticos e d) ferrimagnéticos.	9
Figura 2.2 – Representação esquemática da magnetização teórica para nanopartículas superparamagnéticas (SPM) e ferromagnéticas (FM), com os parâmetros do campo coercivo (H_c), saturação de magnetização (M_s) e magnetização remanescente (M_r). Adaptado de [14].	11
Figura 2.3 - Variação da coercividade (H_c) das nanopartículas com o tamanho. Adaptado de [14].	12
Figura 2.4 – Estrutura cristalina de CoFe_2O_4 [26].....	14
Figura 2.5 – Estrutura molecular do PLLA [54].	19
Figura 2.6 – Imagem de RMI do rim antes e após a injeção de nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com SiO_2 [85].	21
Figura 2.7 – Imagem TEM de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com PLLA [83].	22
Figura 2.8 – Representação esquemática do método de bioseparação magnética. A) as nanopartículas magnéticas e a solução com diferentes componentes são misturadas; B) Captura de biomoléculas e C) Separação da entidade em causa com recurso a um campo magnético externo [84].	23
Figura 2.9 – Representação esquemática do tratamento por hipertermia. Adaptado de [93]. ...	24
Figura 3.1 - Representação esquemática dos componentes de um microscópio SEM. Adaptado de [97].	32

Figura 3.2 – Esquematização da aquisição de imagem feita por um microscópio TEM. Adaptado de [97].	33
Figura 3.3 – Difração de Raios-X, com ângulo de Bragg numa rede cristalina. Adaptado de [99].	33
Figura 3.4 - Representação esquemática de um magnetómetro de amostra vibrante. Adaptado de [100].	35
Figura 3.5 - Esquema representativo das diferentes camadas associadas a uma partícula em suspensão. Adaptado de [102].	36
Figura 4.1 – Imagens TEM das esferas de SiO ₂ D (a); SiO ₂ M(b) e respetivos padrões XRD (c) e curvas de potencial ζ (d).	41
Figura 4.2 - Imagens SEM das esferas de PLLA com uma fração volmétrica de (a) 5 %; (b) 10 %; (c) 15 %; (d) respetivo diâmetro.	43
Figura 4.3 – (a) Padrão XRD das esferas de PLLA representativa de todas as amostras e (b) curvas do potencial ζ em diferentes condições de pH das esferas de PLLA com frações volumétricas de 5 %,10 % e 15 %.	43
Figura 4.4 – (a) Imagem TEM das nanopartículas de CoFe ₂ O ₄ ; (b), (c) e (d) Padrão XRD, curvas de magnetização e potencial ζ, respetivamente, das nanopartículas de CoFe ₂ O ₄ e CoFe ₂ O ₄ @AO; ...	44
Figura 4.5 – (a) Imagem SEM representativa das esferas de CoFe ₂ O ₄ @AO@SiO ₂ D; (b) Padrões XRD, (c) curvas de magnetização (d) potencial ζ das nanopartículas das esferas CoFe ₂ O ₄ @AO@SiO ₂ D e nanopartículas CoFe ₂ O ₄ @AO.	46
Figura 4.6 - Imagens SEM das esferas de CoFe ₂ O ₄ @AO@PLLA com uma fração volumétrica de PLLA de (a) 5 %; (b) 10 %; (c) 15 %; (d) respetivo diâmetro das esferas obtidas.	48
Figura 4.7 – (a) Padrão XRD das esferas de CoFe ₂ O ₄ @AO@PLLA e nanopartículas de CoFe ₂ O ₄ @AO e (b) Curvas de magnetização das esferas de CoFe ₂ O ₄ @AO@PLLA com frações volumétricas de PLLA de 5 %, 10 % e 15 %.	49
Figura 4.8 – Curvas de potencial ζ das nanopartículas de CoFe ₂ O ₄ @AO revestidas com PLLA com frações volumétricas de 5 % e 15 %.	50

Figura 4.9 - (a) Imagem TEM das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$; (b), (c) e (d) Padrão XRD, curva de magnetização e potencial ζ , respetivamente, das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$	51
Figura 4.10 – Imagem das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ sintetizadas em que mostra também o seu comportamento magnético.....	52
Figura 4.11 - Imagens TEM representativas das esferas de (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}@\text{SiO}_2\text{D}$ e (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}@\text{SiO}_2\text{M}$; (c) e (d) Padrões XRD e curvas de magnetização das esferas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}@\text{SiO}_2\text{D}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}@\text{SiO}_2\text{M}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ respectivamente.	53
Figura 4.12 – Curvas de potencial ζ das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ e das esferas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}@\text{SiO}_2\text{D}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}@\text{SiO}_2\text{M}$	54
Figura 4.13 - Imagens SEM das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ revestidas com PLLA com uma fração volumétrica de (a) 5 %; (b) 10 %; (c) 15 %; (d) respetivo diâmetro das esferas obtidas.	55
Figura 4.14 – (a) Padrão XRD das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ revestidas com PLLA e (b) Curvas de magnetização das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ revestidas com PLLA com uma fração volumétrica de 5 %, 10 % e 15 %.	55
Figura 4.15 – Curvas de potencial ζ das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ revestidas com PLLA com uma fração volumétrica de 5 %, 10 % e 15 %.....	56
Figura 4.16 – Viabilidade celular de células fibroblastos 3T3 em contacto com o meio exposto às diferentes amostras até 72h.	57

Índice de tabelas

Tabela 2.1 – Exemplos de métodos de síntese de nanopartículas magnéticas físicos e químicos.	12
Tabela 2.2 - Propriedades físicas e magnéticas dos óxidos de ferro [44, 53]. (*Quando não se apresentam no regime superparamagnético).....	16
Tabela 3.1 – Resumo das amostras processadas e respetiva nomenclatura.	30
Tabela 4.1 - Resumo de parâmetros obtidos para cada uma das amostras em estudo. (*estabilidade em solução considerada para valores superiores a 25 mV).....	60

Lista de Acrónimos e símbolos

Acrónimo/símbolo	Designação
AO	Ácido Oleico
FM	Ferromagnético
H _c	Coercividade
K _u	Constante de anisotropia magnética
M _s	Magnetização de Saturação
M _R	Magnetização Remanescente
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> , Ressonância Magnética por Imagem
PLLA	Poli (L-Ácido Láctico)
Potencial ζ	Potencial Zeta
r _{SP}	Raio superparamagnético
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> , Microscopia Eletrónica de Varrimento
SPM	Superparamagnético
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> , Microscopia Eletrónica de Transmissão
TEOS	Tetraetilortosilicato
VSM	<i>Vibrating Sample Magnetometry</i> , Magnetometria de Amostra Vibrante
XRD	<i>X-ray Diffraction</i> , Difração de raios-X

1. Introdução

Neste capítulo descreve-se sumariamente o enquadramento do problema em estudo no âmbito deste trabalho, assim como a metodologia e objetivos do mesmo. Por último, é apresentada a estrutura da tese.

1.1. Enquadramento

Nos últimos anos, esforços consideráveis têm sido feitos no desenvolvimento de micro- e nanoestruturas funcionalizadas, no conhecimento do seu comportamento e no aperfeiçoamento das suas propriedades de forma a serem adaptadas e otimizadas para vários campos da investigação biomédica, incluindo biossensores [1], bioseparação [2], libertação controlada de fármacos [3], agentes de contraste em ressonância magnética (MRI do inglês *Magnetic Resonance Imaging*) [4], hipertermia, entre outras (Figura 1.1) [5, 6].

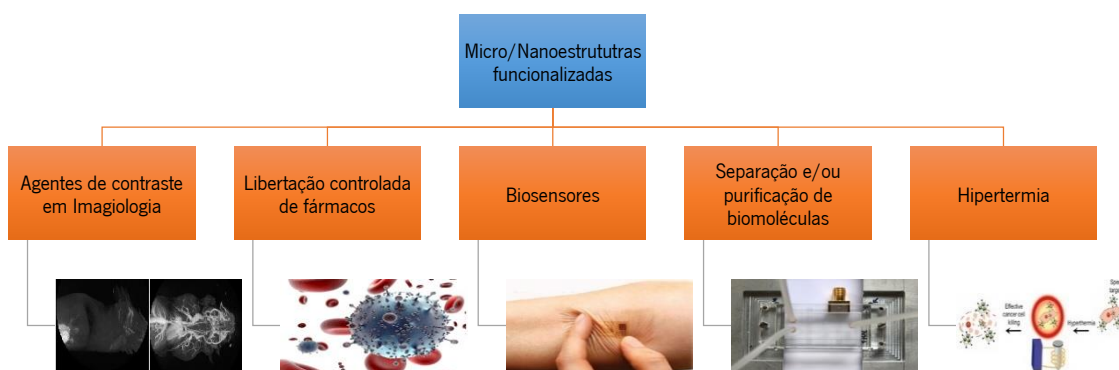


Figura 1.1 – Exemplos de aplicações de micro- e nanoestruturas funcionalizadas [5].

Em particular, estruturas magnéticas à escala nanométrica têm inúmeras vantagens que providenciam muitas oportunidades em biomedicina não só por apresentarem uma elevada área superficial que lhe confere uma capacidade superior de funcionalização e/ou de adsorver proteínas ou transportar fármacos, mas também devido as suas inerentes propriedades magnéticas. De facto, a manipulação destas nanoestruturas através de um campo magnético externo permite a sua utilização em aplicações que envolvem por exemplo a captura e separação de determinados compostos biológicos de uma mistura complexa ou a sua acumulação numa zona específica do corpo de forma a entregar genes e fármacos com precisão. Além disso, a utilização de campos magnéticos de alta frequência permite que estas nanoestruturas magnéticas sejam aplicadas em libertação de fármacos ativada por calor ou em hipertermia [7].

Nanopartículas magnéticas podem ser divididas em três categorias: metais óxidos, metais puros e nanocompósitos magnéticos. As mais estudadas no ramo da biomedicina são as ligas metálicas,

como o ferro (Fe), cobre (Co), titânio (Ti) e níquel (Ni), óxidos de ferro (Fe_2O_3 e Fe_3O_4) e ferrites (como $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$, MnFe_2O_4 e CoFe_2O_4). Estas são tipicamente preparadas a elevadas temperaturas ou em condições aquosas. Por serem geralmente quimicamente ativas em contacto com o ar, resultando numa perda de magnetismo e dispersabilidade, e por apresentarem uma baixa estabilidade em solução, revestimentos são geralmente realizados de forma a evitar aglomerações e reduzir a energia associada à razão volume/área de superfície [6]. Para alguns casos específicos, podem também desempenhar a função de proteção de materiais magnéticos que apresentam toxicidade. O revestimento pode ser feito recorrendo a diferentes materiais, como materiais orgânicos (surfactantes ou polímeros) e materiais inorgânicos (como a sílica, carbono e metais preciosos) criando desta forma estruturas núcleo-coroa [8].

Dito isto, estes revestimentos permitem em muitos casos acrescentar funcionalidade às nanopartículas magnéticas como biocompatibilidade e afinidade específica a determinadas entidades biológicas para sua posterior captura e separação magnética. A título de exemplo, nanopartículas magnéticas funcionalizadas ligadas a moléculas específicas, como anticorpos, DNA ou RNA, podem ser aplicadas em bioseparação [9].

1.2. Objetivos e metodologia

No âmbito do descrito na secção anterior, o objetivo principal da presente dissertação consistiu no desenvolvimento de compósitos com núcleo magnético e revestimento biocompatível para aplicação na área biomédica. Procedeu-se a uma otimização dos métodos de processamento dos mesmos de forma a controlar o tamanho, morfologia, magnetização e estabilidade em solução.

Para o núcleo magnético os materiais selecionados foram nanopartículas de ferrite de cobalto, CoFe_2O_4 e nanopartículas de óxido de ferro, Fe_3O_4 . Estes materiais apresentam várias vantagens, sendo a principal a elevada magnetização, comum a ambos. Para além disso possuem características individuais, como a magnetostritividade e o superparamagnetismo no caso das nanopartículas de CoFe_2O_4 e Fe_3O_4 , respetivamente. Enquanto as nanopartículas de CoFe_2O_4 foram adquiridas comercialmente, as nanopartículas de Fe_3O_4 foram sintetizadas e otimizadas pelo método de coprecipitação. Em ambos os casos, um pós-processamento com um surfactante,

nomeadamente o ácido oleico (AO), foi realizado de modo a aumentar a estabilidade das nanopartículas magnéticas em solução.

De seguida, as nanopartículas foram revestidas com dois tipos de materiais, a sílica (SiO_2), tanto na forma porosa como não porosa, e o poli (l-ácido lático) (PLLA). A viabilidade do revestimento com SiO_2 foi estudada por apresentar uma diversidade de vantagens para aplicações biomédicas, assim como por ser um material extremamente procurado. Este revestimento tem não só uma função protetora dos núcleos magnéticos tóxicos (como é o caso das nanopartículas de CoFe_2O_4) mas também tem variadas vantagens como a sua elevada estabilidade em soluções aquosas, fácil modificação de superfície e fácil controlo de interações interpartícula [8]. O método utilizado para o revestimento com este material foi o de Stöber, sendo de baixo custo e de fácil controlo [10]. O PLLA, por sua vez, é um polímero biocompatível e biodegradável, apresentando assim uma função não só protetora, mas também de libertação controlada de entidades encapsuladas. Neste caso, o método de síntese selecionado foi o de microemulsão, método este de fácil implementação, não sendo necessário temperaturas elevadas ou agentes de separação. Devido à variada gama de tamanhos obtidos nas amostras sintetizadas, as partículas magnéticas “puras” serão denominadas de nanopartículas (uma vez que se inserem na escala nanométrica) e as partículas de SiO_2 , PLLA e nanopartículas magnéticas encapsuladas serão denominadas de esferas.

A **Figura 1.2** mostra uma representação esquemática das esferas obtidas no âmbito deste trabalho.

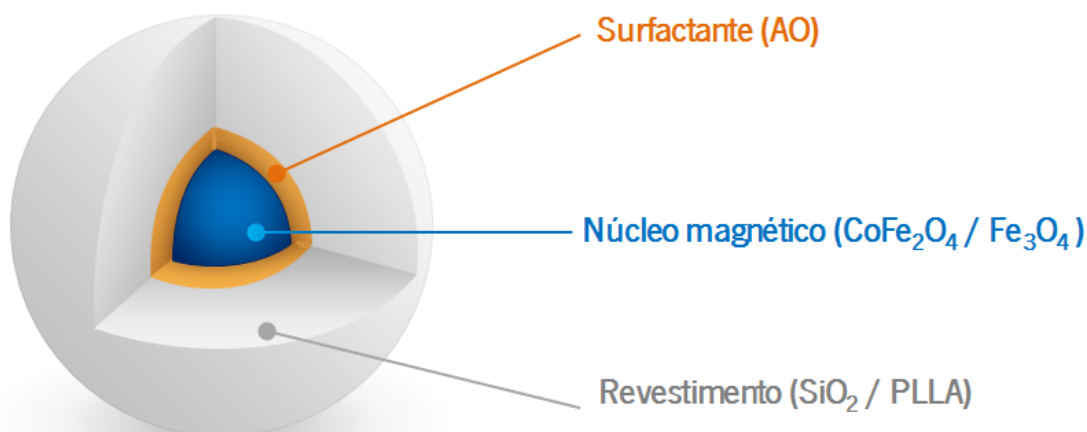


Figura 1.2 - Representação esquemática das esferas obtidas no âmbito deste trabalho.

As propriedades físico-químicas e magnéticas das mesmas foram caracterizadas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), microscopia eletrónica de transmissão (TEM), difração de raios-X (XRD), magnetometria de amostra vibrante (VSM) e potencial zeta (ζ). Além disso, foram realizados ensaios de citotoxicidade de forma a estudar a viabilidade celular e conseqüentemente a sua aplicabilidade na biomedicina.

Deste modo, este trabalho incidiu na produção de nanopartículas magnéticas revestidas com SiO₂ e PLLA, de modo a otimizar e controlar as suas características. Assim, a síntese, caracterização e viabilidade para aplicações biomédicas são os aspetos focados neste trabalho.

1.3. Organização da dissertação

O presente documento está dividido em cinco capítulos. No presente capítulo contextualizou-se o trabalho. Descreveu-se genericamente o problema em estudo, os contributos, os objetivos pretendidos e as metodologias empregues.

No capítulo 2 são abordadas as diferentes propriedades de cada material assim como uma descrição teórica dos métodos de síntese e revestimento usados. Finalmente é feito um estudo sobre a investigação realizada nas diferentes áreas biomédicas em que as amostras obtidas podem ser aplicadas.

No capítulo 3 está explicitado os materiais e métodos que foram utilizados para o processamento dos materiais e as respetivas técnicas de caracterização utilizadas.

O capítulo 4 documenta e discute os resultados práticos obtidos com base nas técnicas descritas no capítulo 3. Numa fase inicial é feita uma análise da morfologia, estrutura, magnetismo e estabilidade em solução das partículas sintetizadas e de seguida é feito um estudo citotóxico das mesmas. No final é feito um estudo comparativo entre as diferentes amostras.

Finalmente no capítulo 5 são apresentadas algumas conclusões e considerações deste trabalho e sugestões futuras de forma a melhorar o trabalho já realizado.

2. Micro- e nanoestruturas magnéticas

Neste capítulo é realizada uma introdução aos materiais utilizados, desde as suas propriedades aos métodos de síntese. Começando pelas nanopartículas magnéticas, é realizada uma descrição geral das suas propriedades, sendo de seguida apresentada uma abordagem mais específica sobre o CoFe_2O_4 e o Fe_3O_4 . De seguida, é realizada uma introdução ao revestimento de nanopartículas magnéticas, especificando com SiO_2 e PLLA. Por fim, são apresentadas aplicações biomédicas em que estes tipos de compósitos podem ser utilizados sendo também fornecidos exemplos específicos com os materiais em questão.

2.1. Introdução

A aplicação de nanoestruturas magnéticas na biomedicina requer um controlo preciso das condições de síntese e funcionalização das mesmas de forma a adaptar e otimizar as suas propriedades físico-químicas, estabilidade coloidal e o seu comportamento biológico. Estas plataformas magnéticas devem possuir tamanhos reduzidos, pequena distribuição de tamanhos e valores de magnetização elevados. O tamanho é um fator de elevada importância, uma vez que pode levar a acumulação indesejada em zonas específicas do corpo (como por exemplo, o baço, parênquima hepático ou pulmões), mas também porque pode ter influência na sua eficácia [11].

Para propósitos práticos, um revestimento de superfície de nanopartículas magnéticas é então desejado para conferir biocompatibilidade, maior área superficial, maior estabilidade em solução e funcionalidade. Isto pode ser atingido revestindo as nanopartículas com estabilizadores poliméricos/surfactantes, materiais inorgânicos, óxidos ou camadas lipídicas [11, 12].

2.2. Nanopartículas magnéticas

2.2.1. Propriedades magnéticas

Os materiais magnéticos são caracterizados pela presença de dipolos magnéticos gerados pela orientação do spin de alguns dos seus eletrões. Cada um destes eletrões polarizados pode ser alinhado de forma paralela ou antiparalela relativamente aos eletrões vizinhos na rede cristalina. Este tipo de interação origina um efeito magnético macroscópico que permite a sua medição. A resposta magnética do material pode ser classificada em paramagnético, ferrimagnético, ferromagnético e antiferromagnético, como é ilustrado na **Figura 2.1** [13].

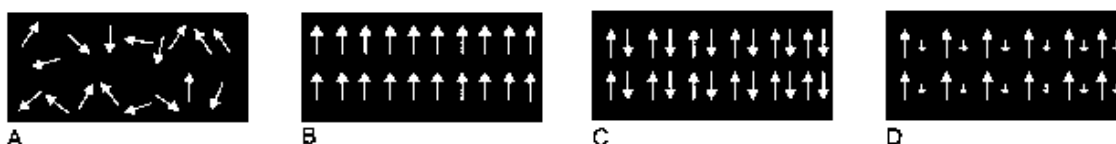


Figura 2.1 - Alinhamento de momentos magnéticos individuais em diferentes tipos de materiais: a) paramagnéticos; b) ferromagnéticos; c) antiferromagnéticos e d) ferrimagnéticos.

No estado paramagnético (**Figura 2.1 a**), os momentos magnéticos individuais dos átomos apresentam orientações aleatórias fazendo com que o momento magnético total seja nulo, esta situação pode sofrer alteração através da ação de um campo magnético externo. Neste tipo de material, não existe coercividade ou remanescência o que significa que quando o campo externo é desligado os dipolos magnéticos internos voltam ao estado aleatórios. Não é necessária energia extra para desmagnetizar este tipo de material, e como tal, o momento magnético inicial nulo é recuperado de forma espontânea. Quando um material apresenta estas características é chamado de material superparamagnético (SPM) [14].

De forma alternativa, os dipolos magnéticos individuais num cristal podem alinhar-se de forma paralela, exibindo assim uma resposta coletiva reforçada mesmo com a ausência de um campo magnético externo (**Figura 2.1 b**). Isto é conhecido como o ferromagnetismo (FM). Neste caso três parâmetros principais podem descrever a força e a magnetização do material. Estes parâmetros são: a coercividade (H_c), e o campo externo necessário de sinal oposto para reduzir a magnetização de volta para zero. Este último parâmetro representa também a energia mínima necessária para o retorno da magnetização do material. H_c permite a determinação da energia a superar de modo a inverter os dipolos magnéticos do material. K_u pode ter diferentes contribuições que surgem da simetria da rede cristalina e da contribuição da superfície com respeito ao núcleo da nanopartícula. O segundo parâmetro é a saturação de magnetização, M_s , que é o valor máximo de magnetização que o material consegue atingir sob o efeito de um campo magnético suficientemente alto. E o terceiro, é a magnetização remanescente, M_r , que indica a magnetização residual sem campo magnético aplicado.

Estes três parâmetros podem ser facilmente identificados no ciclo de histerese gerado em medidas dependentes do campo de magnetização, como se pode observar na **Figura 2.2**. Metais maciços, como Fe, Co ou Ni, e algumas ligas, como FePt e FeCo, são considerados materiais ferromagnéticos. Ao contrário do ferromagnetismo, dipolos magnéticos vizinhos podem alinhar-se de forma antiparalela na rede, o que significa que se vão cancelar uns aos outros (repulsão de dipolos magnéticos). Este tipo de permuta magnética pode levar a duas situações diferentes: o antiferromagnetismo (**Figura 2.1 c**) em que os dipolos magnéticos têm o mesmo valor e como tal o material mostra uma magnetização nula e o ferrimagnetismo (**Figura 2.1 d**), quando os dois spins acoplados têm valores diferentes, e neste caso o material exibirá magnetização diferente de zero sem a ação de um campo externo.

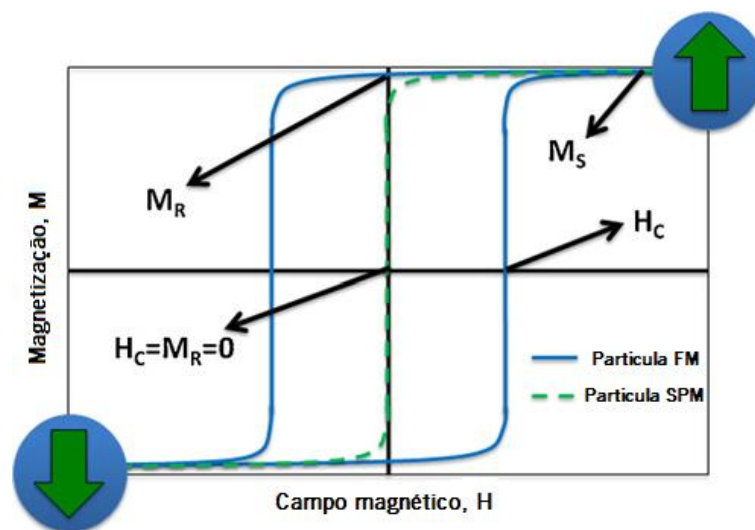


Figura 2.2 – Representação esquemática da magnetização teórica para nanopartículas superparamagnéticas (SPM) e ferromagnéticas (FM), com os parâmetros do campo coercivo (H_c), saturação de magnetização (M_s) e magnetização remanescente (M_R). Adaptado de [14].

A redução de tamanho dos diferentes materiais mostra vantagens interessantes que os torna mais adequados para terapêutica e técnicas de diagnóstico. Parâmetros magnéticos, tais como, a coercividade das nanopartículas pode ser facilmente adaptado. Como consequência, o desempenho da amostra pode ser otimizado conforme o requisito prático. Para além disso, uma redução abaixo de um valor específico de raio, chamado de raio superparamagnético (r_{sp}), induz uma transição magnética em partículas ferro- e ferrimagnéticas que os tornam superparamagnéticas e, como previamente dito, momentos magnéticos elevados são observados, mas o momento magnético remanescente é nulo. Isto transmite-se numa vantagem significativa, especialmente em experiências *in vivo*: a ausência de coercividade, ou em outras palavras, o momento magnético nulo das nanopartículas quando é concluído o diagnóstico ou terapia previne a potencial agregação das partículas que podem facilmente formar embolismos nos vasos sanguíneos. O superparamagnetismo é uma propriedade associada a materiais magnéticos nanoestruturados que surge quando a energia térmica é alta o suficiente para ultrapassar a energia de estabilização magnética da partícula. A **Figura 2.3** explica como a coercividade das nanopartículas varia quando o tamanho diminui até o estado superparamagnético ser atingido.

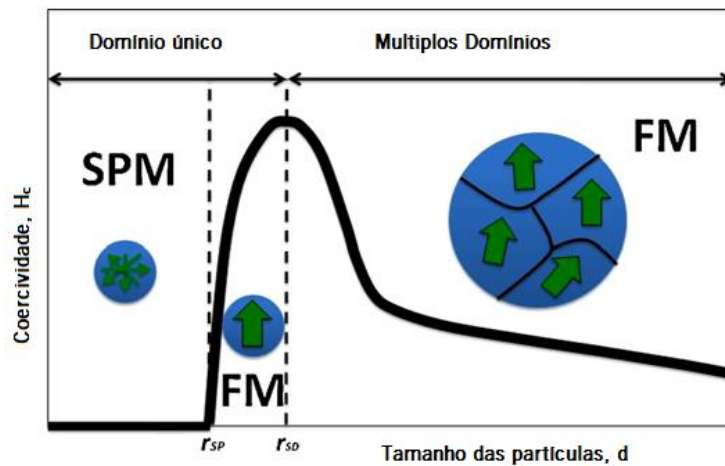


Figura 2.3 - Variação da coercividade (H_c) das nanopartículas com o tamanho. Adaptado de [14].

2.2.2. Síntese de nanopartículas magnéticas

Várias vias têm vindo a ser desenvolvidas para síntese de nanopartículas magnéticas. Os métodos físicos são procedimentos complexos e não permitem o controlo preciso do tamanho das partículas à escala nanométrica. Por outro lado, os métodos químicos são mais simples, mais flexíveis e possibilitam um melhor controlo do tamanho, composição química e, até mesmo, da forma [13]. Na Tabela 2.1 estão apresentados alguns exemplos de métodos de síntese físicos e químicos.

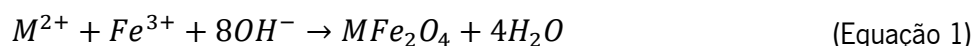
Tabela 2.1 – Exemplos de métodos de síntese de nanopartículas magnéticas físicos e químicos.

Métodos Físicos	Métodos químicos
Decomposição de fase gasosa [15]	Coprecipitação [16]
Litografia por feixe de eletrões[17]	Decomposição térmica [18]
	Reação sol-gel [19]
	Síntese hidrotermal [20]
	Síntese em microemulsão [21]

O princípio dos métodos químicos consiste no controlo da nucleação e crescimentos dos produtos de reação. Isto pode ser feito através de reações em ambientes controlados ou controlando o processo de reação mediante a ligação de ligandos à superfície das nanopartículas magnéticas [22].

Enquanto as nanopartículas de ferrites de cobalto foram adquiridas comercialmente, o método químico de coprecipitação foi utilizado para a síntese de nanopartículas de óxido de ferro.

A coprecipitação é uma técnica fácil e conveniente para sintetizar nanopartículas magnéticas de soluções aquosas de sais. É feito pela adição de bases sob uma atmosfera inerte à temperatura ambiente ou a temperaturas elevadas. Usualmente nanopartículas de óxido de ferro são preparadas num meio aquoso em que a reação química pode ser descrita pela equação 1 [23].



Em que M pode ser Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} . O tamanho, forma e composição das nanopartículas magnéticas depende dos sais usados, da proporção de M^{2+} e Fe^{3+} , do pH e da força iônica do meio [5].

Neste processo estão envolvidas duas fases. A primeira, nucleação, ocorre quando a concentração dos sais atinge uma supersaturação crítica. A segunda, o crescimento do núcleo, ocorre por difusão dos solutos para a superfície dos cristais. As duas fases devem ocorrer separadamente de modo a obter-se monodispersões de nanopartículas magnéticas [13].

De forma a aumentar a estabilidade em solução, as nanopartículas magnéticas foram sujeitas a um pós-tratamento com um surfactante, tal como o ácido gordo mono-insaturado - ácido oleico (AO), cuja fórmula química é $C_{18}H_{34}O_2$ [24].

Neste pós-tratamento as nanopartículas são colocadas numa solução básica sob agitação e é procedido a um aumento da temperatura. De seguida é adicionado o surfactante mantendo a agitação durante algum tempo. Este aumento da temperatura garante que as partículas ficam revestidas com uma camada fina de surfactante.

2.2.3. Ferrite de cobalto

Nanopartículas de ferrite de cobalto ($CoFe_2O_4$) são facilmente sintetizadas em laboratório, no entanto, já existem várias empresas que as comercializam. A combinação das suas propriedades magnéticas e elétricas faz delas um material atrativo para variadas aplicações tecnológicas. Para além disso, estas propriedades podem ser alteradas durante o processo de síntese conforme a aplicação em vista [25].

Pertencendo à família das ferrites, sendo assim um material ferrimagnético. A estrutura cristalina é espinela como é possível observar na **Figura 2.4**.

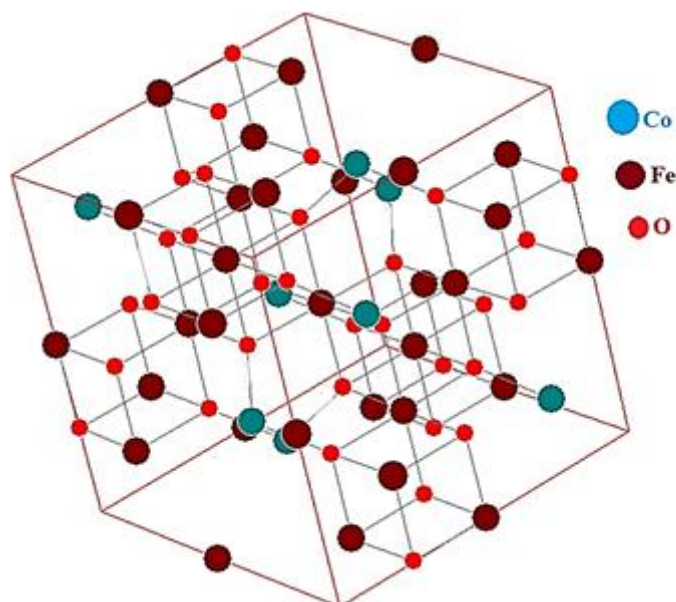


Figura 2.4 – Estrutura cristalina de CoFe_2O_4 [26].

Nos últimos anos, a investigação em ferrites com estrutura espinela com tamanho nanométrico tem sofrido um aumento significativo devido às suas propriedades elétricas, magnéticas e estruturais [27, 28].

No caso da ferrite de cobalto, este é um material promissor devido ao facto de ter características como uma saturação de magnetização elevada (entre os 50 e os 90 emu.g^{-1}), elevada resistência elétrica, anisotropia magneto-cristalina alta, dureza mecânica, estabilidade química e técnicas de produção de baixo custo [29-31]. No entanto, ao contrário das nanopartículas de Fe_3O_4 , as nanopartículas de CoFe_2O_4 são citotóxicas, sendo então necessário o revestimento com um material biocompatível com a função de proteger o meio envolvente do núcleo magnético.

Todas estas propriedades em conjunto com mais características excepcionais, como a magnetoestrição [32] e elevada temperatura de Curie [33], fazem com que a ferrite de cobalto seja extremamente atraente para ser aplicada em diferentes campos tecnológicos incluindo a hipertermia [34, 35], imagiologia molecular [36], eletrónica [25, 37], spintrónica [38], supercondensadores [39] e catálise [40].

A magnetostricção é vista como uma característica de extrema importância, que consiste na expansão ou contração do material em função do campo magnético aplicado [41]. Esta característica pode trazer vantagens interessantes uma vez que pode aumentar, por exemplo, a eficiência na libertação controlada de fármacos ou em hipertermia com o auxílio de um campo magnético externo [42, 43].

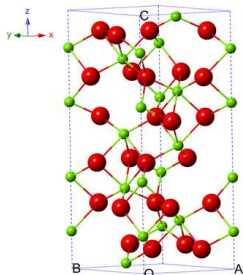
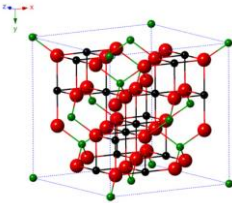
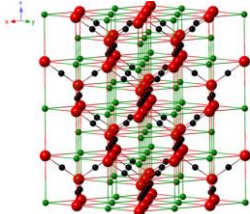
2.2.4. Óxido de ferro

Os óxidos de ferro são compostos comuns que podem, de forma similar às ferrites de cobalto, ser facilmente sintetizados em laboratório. Apesar de no total serem conhecidos dezasseis, os três mais comuns são maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), magnetite (Fe_3O_4) e hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Estes são tecnologicamente importantes devido às suas características físicas e mecânicas [44]. Algumas das características destes materiais estão apresentadas na **Tabela 2.2**.

Dos óxidos de ferro referidos, apenas a magnetite e a maghemite são estáveis à temperatura ambiente. A magnetite exposta ao ambiente será gradualmente oxidada em maghemite. No entanto, para aplicações biomédicas estes dois não são, geralmente, distinguidos. Estes materiais têm sido utilizados numa grande variedade de aplicações como agentes de contraste em imagiologia [45-48], bioseparação [49, 50] e libertação de fármacos [51, 52].

As nanopartículas de óxido de ferro são as mais usadas na biomedicina, devido às suas propriedades. Sendo menos sensíveis à oxidação providenciam uma resposta magnética mais estável, biocompatíveis e facilmente funcionalizáveis. Para além disso, nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas podem ser facilmente sintetizadas [12].

Tabela 2.2 - Propriedades físicas e magnéticas dos óxidos de ferro [44, 53]. (*Quando não se apresentam no regime superparamagnético)

Óxido / Propriedade	Hematite	Magnetite	Maghemite
Densidade (g.cm ⁻³)	5.26	5.18	4.87
Ponto de Fusão (°C)	1350	1583-1597	-
Dureza	6.5	5.5	5
Tipo de Magnetismo*	Ferromagnético ou antiferromagnético	Ferrimagnético	Ferrimagnético
Magnetização de saturação a 300K (A.m ² .kg ⁻¹)	0.3	60-100	60-68
Forma cristalográfica	Romboédrico ou hexagonal 	Cúbico 	Cúbico ou tetraédrico 

2.3. Revestimento/funcionalização

Apesar de terem havido desenvolvimentos significativos na síntese de nanopartículas magnéticas, dotar estas com funcionalidade adicional é um requisito crucial para praticamente qualquer aplicação biotecnológica [22].

Uma opção passa pelo revestimento destas partículas com um determinado composto que possui propriedades adicionais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, elevada área superficial, elevada estabilidade em solução, entre outras. Este revestimento pode ser dividido em duas categorias: revestimento com materiais orgânicos, incluindo surfactantes e polímeros [47, 54-56], ou revestimento com componentes inorgânicos, como a sílica [57], carbono [58] ou metais preciosos (como a prata [59] e o ouro [60]).

Cada categoria apresenta vantagens inerentes. Componentes inorgânicos, como é o caso da SiO_2 , permite proteger núcleos magnéticos citotóxicos (como é o caso das nanopartículas magnéticas de CoFe_2O_4) revestindo neste caso com sílica densa ou aumentar a área superficial para futura funcionalização revestindo com sílica mesoporosa. Além disso a sílica permite igualmente aumentar a estabilidade em solução e a espessura da camada a volta das nanopartículas é de fácil controlo. Por sua vez, um revestimento com materiais poliméricos, como o PLLA, aumentam a estabilidade física e química das nanopartículas magnéticas. Pode também providenciar grupos funcionais, tal como terminais amina e carboxilos, para uma funcionalização adicional com biomoléculas ativas ou ligandos alvo. Além disso, pode ser usado para a libertação controlada e direcionada de fármacos (graças ao núcleo magnético) devido a sua propriedade de biodegradabilidade [8, 11].

2.3.1. Sílica

A sílica (ou dióxido de silício - SiO_2) tem atraído grande atenção na biomedicina e na biotecnologia devido à sua versatilidade. Para além do mais é um material altamente biocompatível e não tóxico [61].

Para uma aplicação direta o alvo de interesse passa pelo fabrico de esferas de SiO_2 mesoporosa. Como referido anteriormente, estas têm uma elevada área superficial, com tamanhos de poro adequados, que permite hospedar biomoléculas e possibilita uma libertação controlada, propriedades dos poros de superfície bem definidas, estabilidade química, térmica e hidrotérmica, e também devido à sua fácil funcionalização [62, 63].

No entanto, o uso de esferas de SiO_2 “puras” exhibe limitações em aplicações onde a sua manipulação, direção e/ou separação é necessária. A combinação de esferas de SiO_2 com núcleo constituído por nanopartículas magnéticas para a fabricação de compósitos com uma elevada área de superfície e magnetismo, permite o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para uma grande variedade de aplicações incluindo libertação controlada e direcionada de fármacos [64], imagiologia de ressonância magnética [65], separação e purificação de biomoléculas [66], biossensores [57], entre outros [67-69].

Existem estudos de nanopartículas magnéticas revestidas com SiO₂ que demonstram a sua estabilidade numa gama de pHs entre 2 e 11, tal como elevada estabilidade coloidal em tampão fosfato-salino (PBS do inglês *Phosphate Buffered Saline*) e etanol [70].

Diferentes métodos de síntese de esferas de SiO₂ (como o método de sol-gel[71], pirólise de aerossol [72], emulsão [73], etc.) podem ser otimizados conforme a aplicação em vista, sendo o mais comum baseado no método de Stöber [74]. Neste método, a SiO₂ é formada *in situ* através da hidrólise e condensação de um precursor sol-gel. No caso de esferas de SiO₂ magnéticas e dependendo da morfologia e diâmetro final pretendido, as nanopartículas magnéticas são por exemplo dispersas em etanol com amónia, sendo depois adicionado gota a gota o silano. O silano mais comumente utilizado é o tetraetilortosilicato (TEOS), que pode facilmente unir-se à superfície das nanopartículas magnéticas através dos grupos OH [75].

Por exemplo, Xuan *et al.* [76], sintetizaram nanopartículas monodispersas de Fe₃O₄ revestidas com SiO₂ mesoporosa, em que controlaram o tamanho do núcleo magnético e a espessura do revestimento ajustando os parâmetros experimentais (120 - 250 nm). A magnetização dos compósitos sintetizados (~ 35 - 55 emu.g⁻¹) permitiu a sua aplicação como agente de contraste em imagiologia. E a sua elevada área superficial fazem delas atrativas para futura funcionalização para entrega de fármacos.

Pelo mesmo método, Cardoso *et al.* [10], sintetizam nanopartículas de Fe₃O₄ revestidas com SiO₂ com diferentes morfologias (porosa e não porosa), tamanhos variados (~ 110 – 500 nm) e magnetizações de saturação entre 3 e 23 emu.g⁻¹. Além da aplicação referida anteriormente, este compósito funcionalizado com iões metálicos são bastante promissores para a captura e separação de proteínas ricas em histidina [77].

2.3.2. Poli (l-ácido láctico)

O Poli (l-ácido láctico) (denominado por PLLA), cuja estrutura molecular está representada na **Figura 2.5**, é um dos polímeros mais utilizados para aplicações biomédicas. Este é um poliéster sintético alifático biocompatível e biodegradável. O PLLA é também um material piezoelétrico, isto é, quando sofre uma tensão mecânica este material gera uma variação elétrica e vice-versa. [42].

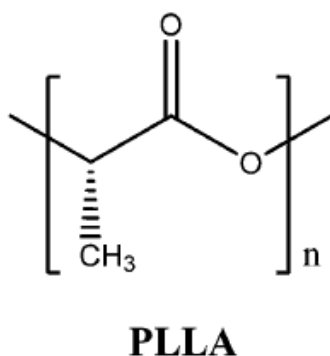


Figura 2.5 – Estrutura molecular do PLLA [54].

Esferas de PLLA podem ser sintetizadas por vários métodos físico-químicos, incluindo, evaporação/extração de solvente através do método de emulsão [42], agregação através do ajuste de pH ou calor, separação de fases, polimerização interfacial, gelificação iônica, *electrospray* [78], entre outras. Sendo que o mais comum o método de emulsão com evaporação de solvente [79-81]. Sendo assim o método utilizado para a produção de esferas de PLLA foi o de microemulsão. Este método permite a obtenção de nanopartículas com tamanho e forma controladas e com uma pequena distribuição de tamanhos. No entanto, a utilização de uma ponta de ultrassons de forma a gerar a emulsão pode dificultar o processamento e reprodutibilidade desta técnica [5, 11].

Uma das preocupações que pode haver com o revestimento das nanopartículas magnéticas é a perda de magnetização destas, no entanto, autores como, Salvador A. Gómez-Lopera, *et. al* [82], mostraram que apesar de haver uma perda significativa estas ainda podem ser usadas para aplicações biomédicas.

Rescignano *et al.* [83], desenvolveram nanopartículas de óxido de ferro encapsuladas em PLLA, recorrendo ao método de microemulsão, com tamanhos compreendidos entre os 40 e 180 nm e magnetizações de saturação até 90 Am².kg⁻¹). Também realizaram testes para testar o seu potencial no uso em hipertermia.

2.4. Aplicações

Nesta secção serão abordados alguns exemplos onde as nanopartículas magnéticas revestidas têm sido aplicadas com sucesso.

2.4.1. Agente de contraste em imagiologia

A imagiologia, mais especificamente ressonância magnética, é um método não invasivo muito utilizado na medicina e ocorre devido ao relaxamento dos prótons nos tecidos, produzindo assim imagens com elevada resolução e alto contraste da estrutura dos tecidos. Muitos esforços têm sido implementados para melhorar os agentes de contraste utilizados uma vez que os agentes mais comuns ficam durante pouco tempo na circulação sanguínea e também apresentam toxicidade nas células [84].

Já foram realizados vários estudos onde é demonstrada a capacidade que as nanopartículas magnéticas têm no aumento do tempo de relaxação dos prótons assim que estas se acumulam nos tecidos. Para além disso sendo revestidas com materiais biocompatíveis a barreira da toxicidade é ultrapassada [56, 85].

Em particular, Iqbal, *et. al* [85], realizaram um estudo intensivo sobre nanopartículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 revestidas com SiO_2 como agentes de contraste em ressonância magnética. Realizaram testes *in vivo* (**Figura 2.6**) em que foi verificada a elevada sensibilidade das nanopartículas sintetizadas e também a sua biocompatibilidade. Além disso não registaram aglomeração das mesmas ao longo do tempo. Foi assim demonstrada que a sua utilização para este tipo de aplicação é, de facto, promissora.

Para a utilização destas partículas existem algumas características que são necessárias, como o elevado tempo de meia vida na circulação sanguínea, superfície hidrofílica e tamanho reduzido [85].

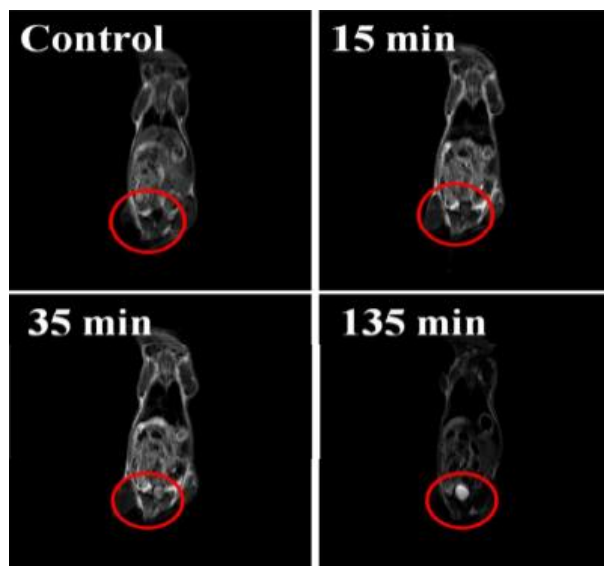


Figura 2.6 – Imagem de RMI do rim antes e após a injeção de nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com SiO_2 [85].

2.4.2. Liberação controlada e direcionada de fármacos

Outra aplicação prometedora das nanopartículas magnéticas é a liberação de fármacos, em que estes são direcionados de forma rigorosa para uma zona alvo do corpo e chegando a essa zona são libertados de forma controlada. Esta aplicação tem alguns requisitos que devem ser prontamente considerados como o tamanho, a capacidade de incorporação do fármaco, a estabilidade na corrente sanguínea ao longo do tempo, a liberação controlada do agente terapêutico, a biodegradabilidade, a não toxicidade e a possibilidade de bioconjugação com o marcador em questão. De forma a atingir estes objetivos várias estruturas com revestimentos biocompatíveis e fármacos têm sido testadas [55, 56, 61, 83, 86, 87].

Rescignano *et. al* [83], sintetizaram e fizeram um estudo intensivo de nanopartículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 com PLLA com um tamanho de aproximadamente 130 nm recorrendo ao método de microemulsão em que consideraram as nanopartículas sintetizadas adequadas para entrega de fármacos (**Figura 2.7**). Realizaram também estudos para a aplicação em hipertermia em que não foi verificada a ocorrência de aglomeração, havendo um aumento na estabilidade magnética e resposta a campos magnéticos.

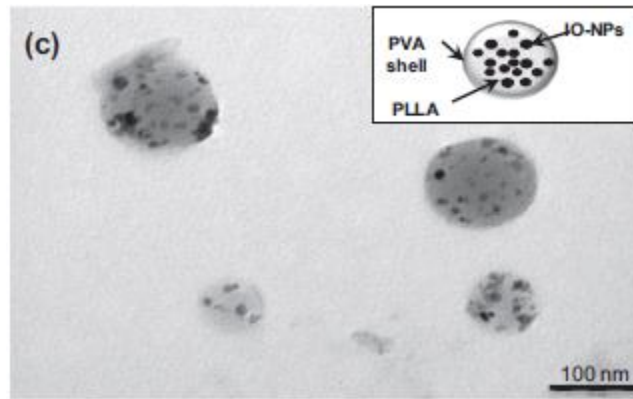


Figura 2.7 – Imagem TEM de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com PLLA [83].

2.4.3. Biossensores

As nanopartículas magnéticas têm sido alvo de interesse no desenvolvimento e fabricação de sensores e biossensores para diversas aplicações. As nanopartículas magnéticas podem ser integradas nos materiais e/ou dispersas na amostra em que são ativadas por um campo magnético externo para detecção na superfície do biossensor [88]. Comparando com métodos colorimétricos ou eletroquímicos, os sensores magnéticos apresentam vantagens superiores na detecção de biomarcadores e na sua quantificação, fornecendo assim uma maior sensibilidade, estabilidade a longo termo e a possibilidade de desenvolver sistemas biomédicos miniaturizados [61, 89].

Xiong *et al.* [90], desenvolveram um biossensor de glucose baseado em nanopartículas de Fe_3O_4 em que o biossensor determina a quantidade de glucose em amostras de plasma. Glucose oxidase foi ligada de forma covalente com os grupos hidroxilo das nanopartículas de Fe_3O_4 não reativos sendo depois adicionadas a um eléctrodo sólido de pasta de carbono e parafina recorrendo a força magnética. O sensor obtido foi de resposta rápida e altamente estável.

2.4.4. Bioseparação

No campo da biomedicina, a separação de entidades biológicas baseada em nanopartículas magnéticas é uma excelente solução para os problemas encontrados pelos métodos convencionais, como a centrifugação e a filtração, que em geral, são bastante demorados, ao contrário da separação magnética que é rápida, eficiente e pouco dispendiosa. Havendo a conjugação de biomoléculas alvo e das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com os

recetores específicos, os complexos formados podem ser facilmente atraídos por um campo magnético aplicado e extraídos da mistura, providenciando assim uma bioseparação eficiente e conveniente, representado esquematicamente na **Figura 2.8** [58, 91].

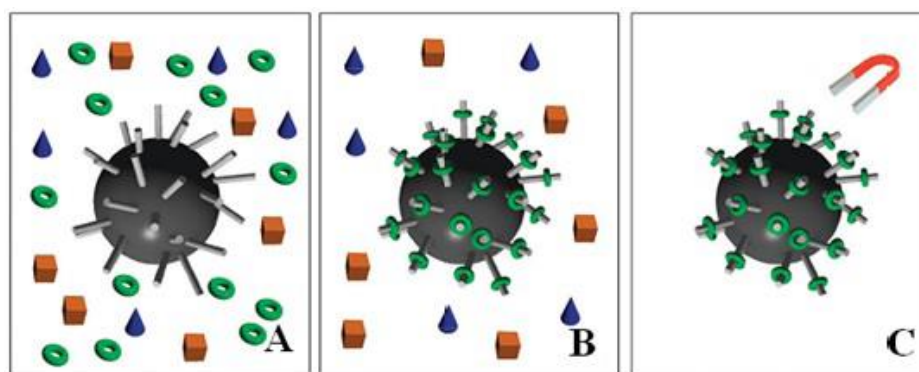


Figura 2.8 – Representação esquemática do método de bioseparação magnética. A) as nanopartículas magnéticas e a solução com diferentes componentes são misturadas; B) Captura de biomoléculas e C) Separação da entidade em causa com recurso a um campo magnético externo [84].

Yang *et. al* [92], sintetizaram nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com SiO_2 pelo método de Stöber com um tamanho médio de 53 nm e um tamanho de poro de 1.5 nm e com uma magnetização de saturação de 3.2 emu.g^{-1} em que demonstram a possibilidade de utilização com um biossensor aperfeiçoado num sistema microfluidoico ou num sistema *in vivo* para libertação controlada de fármacos.

2.4.5. Hipertermia

Com o auxílio de um campo magnético externo é possível guiar as nanopartículas magnéticas até estas atingirem tecidos específicos e, quando submetidas a um campo alternado, estas produzem calor (**Figura 2.9**). Este método pode ser usado para o tratamento de tumores através do aquecimento da zona até aos 42°C - 46°C durante 30 minutos. Deste modo, e uma vez que as células cancerígenas são mais termosensíveis que as células saudáveis, as células cancerígenas sofrem uma morte por apoptose podendo impedir assim o desenvolvimento do tumor, enquanto que as células saudáveis se mantêm vivas.

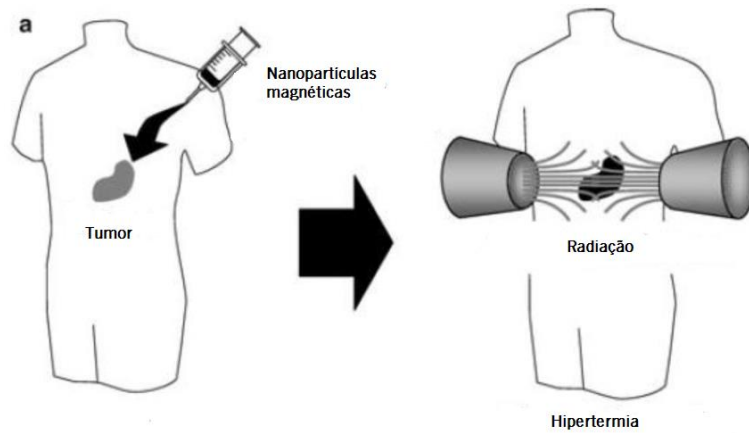


Figura 2.9 – Representação esquemática do tratamento por hipertermia. Adaptado de [93].

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* têm vindo a ser realizados neste tema [56, 94, 95].

Hu, *et. al* [94], sintetizaram nanopartículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 revestidas com PLLA e tamoxifen e realizaram teste *in vitro* em células cancerígenas mamárias onde verificaram que ao fim de 4 horas aproximadamente 80 % das células cancerígenas sofreram morte por apoptose.

3. Materiais e métodos

Neste capítulo está descrita a experimental deste trabalho, em que se aborda quais foram os materiais utilizados, as técnicas de preparação na síntese e revestimento das partículas, bem como as diversas técnicas de caracterização das diferentes amostras, apontando de forma descritiva as características de cada uma das técnicas e o porquê da sua utilização.

3.1. Materiais

As nanopartículas de CoFe_2O_4 foram comercialmente adquiridas à Nanoamor. O cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloreto de ferro (II) tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), solução concentrada de hidróxido de amónio 28-30 % (NH_4OH), brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$), hidróxido de sódio (NaOH), AO ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$), tetraetilortosilicato (TEOS, $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$), PLLA, ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$)_n, etanol absoluto, clorofórmio (CHCl_3) e acetato de polivinilo (PVA, ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$)_n) foram comercialmente adquiridos à Sigma-Aldrich®. Água ultrapura e desionizada foram preparadas no laboratório. Todos os químicos e solventes foram utilizados como recebidos sem purificação adicional.

3.2. Preparação de nanopartículas e revestimentos

3.2.1. Nanopartículas de ferrite de cobalto

Como mencionado anteriormente as nanopartículas de ferrite de cobalto utilizadas foram adquiridas à Nanoamor, e apresentam dimensões entre os 35 e 55 nm [96].

3.2.2. Nanopartículas de óxido de ferro

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foram preparadas pelo método da coprecipitação, a partir de uma mistura de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ com $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e NH_4OH foi usada como agente de precipitação. Como foi referido anteriormente, este método é de fácil implementação e permite obter grandes quantidades de nanopartículas.

7.78 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 4.06g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 20 mL de água destilada, num banho de ultrassom (*Ultrasons Selecta*). De seguida, uma solução constituída por 0.06 g de CTAB dissolvida em 3 mL de água destilada e misturada com 20 mL de NH_4OH foi adicionado gota a gota a solução inicial sob forte agitação (1500 rpm, *Heidolph RZR 2020*). Após isso, as nanopartículas foram separadas magneticamente e lavadas várias vezes com água destilada. O material foi então seco numa estufa a 60 °C.

3.2.3. Estabilização com ácido oleico

O revestimento com ácido oleico foi realizado nas nanopartículas de ferrite de cobalto e óxido de ferro de modo a aumentar a estabilidade das mesmas em solução.

Inicialmente, 0.8 g de NaOH foram dissolvidas em 40 mL de água destilada num banho de ultrassom (*Ultrasons Selecta*). De seguida foram adicionados 0.09 g de nanopartículas magnéticas e assim que foi verificada a homogeneização da mistura, esta foi colocada sobre agitação mecânica (*Heidolph RZR 2020*) e aquecida até atingir os 80 °C. Uma vez atingida esta temperatura, foram adicionados 400 µL de AO e a mistura ficou em agitação durante 1 h. Após arrefecimento a mistura foi lavada com o auxílio de um separador magnético várias vezes com acetona pura e água destilada de forma a remover excessos de surfactante. O material foi então seco numa estufa a 60 °C.

3.2.4. Revestimento com sílica

O método escolhido para revestir as nanopartículas magnéticas com SiO₂ foi o de Stöber. Como referido anteriormente, este método permite a obtenção de partículas com uma grande variedade de tamanhos e diferentes morfologias desde densa a mesoporosa. Foi procedida à otimização deste método de forma a controlar estes parâmetros. Um revestimento denso pode funcionar por exemplo como camada protetora entre a nanopartícula magnética e o meio envolvente, enquanto um revestimento mesoporoso permite aumentar a área superficial para uma posterior funcionalização com elevado rendimento.

Para um revestimento com SiO₂ densa, a 100 mL de etanol absoluto foi adicionada lentamente 8 mL de NH₄OH e misturou-se num banho de ultrassom (*Ultrasons Selecta*). Juntou-se 90 mg de nanopartículas magnéticas e a mistura foi mantida em ultrassom durante 1 h. De seguida, adicionou-se 8 mL de TEOS gota a gota e ficou sob agitação mecânica (*Heidolph RZR 2020*) durante 1 h seguida de 1 h em US. A solução resultante foi lavada com o auxílio de um separador magnético utilizando etanol e água destilada de forma a remover detritos e esferas de SiO₂ não magnéticas. De seguida a amostra foi seca numa estufa a 60 °C.

No revestimento com SiO₂ mesoporosa, 50 mg de nanopartículas magnéticas foram dispersadas em 50 mL de etanol absoluto (*Ultrasons Selecta*). A esta solução, foi adicionada uma solução de 4,5 mL de NH₄OH contendo CTAB (21.95 M, 14 mL). Após isso, 120 µL de TEOS foram acrescentados gota a gota sob agitação mecânica vigorosa (*Heidolph RZR 2020*). A agitação

mecânica foi mantida durante 2 h seguida de 12 h num agitador rotativo. O produto obtido foi separado magneticamente e lavado com etanol e água de forma a remover as esferas não magnéticas de SiO₂. Finalmente a amostra foi colocada num forno a 60 °C durante uma hora e calcinada a 500 °C (*Hobersal Mod. 10 PR/300 Serie 8B*) durante 8 h a uma taxa de aquecimento de 1 °C.min⁻¹.

A título comparativo e considerando igualmente a sua potencialidade, esferas de SiO₂ sem núcleo magnético foram sintetizadas seguindo os protocolos referidos anteriormente excluindo apenas a colocação de nanopartículas magnéticas. Além disso, neste caso as lavagens foram feitas recorrendo à técnica de centrifugação.

3.2.5. Revestimento com poli (l-ácido láctico)

Neste estudo, o processo de revestimento foi estudado na tentativa de obter esferas de PLLA magnéticas com diferentes tamanhos. A diferença entre elas passou por variar a fração volumétrica de PLLA, nomeadamente de 5 %, 10 % e 15 %. Os restantes parâmetros de processamento como o tempo de sonicação e a posterior velocidade de agitação foram mantidos constantes.

Inicialmente 12.5 mg de nanopartículas magnéticas foram dispersas em 2 mL de CHCl₃ através de ultrasonicação com uma ponta de ultrassom (*Vibracell Sonics VC750*, 40 % de amplitude) durante 30 s num banho de gelo. A esta solução foi adicionada uma solução de PLLA dissolvido em 2 mL de CHCl₃ e recorreu-se novamente à ultrasonicação durante 5s. Foi acrescentada uma solução aquosa, 4 mL com 200 mg de PVA e a mistura resultante foi emulsificada por ultrasonicação durante 30 s. A emulsificação resultante foi adicionada gota a gota a uma solução aquosa de 50 mL com 250 mg de PVA enquanto esta se encontrava sob agitação magnética (*P Selecta Agimatic-E*). A agitação foi mantida a 1500 rpm durante 1 h. A evaporação de solvente foi feita mantendo a solução em agitação a 500 rpm durante 12 h.

Finalmente procedeu-se à centrifugação da mistura resultante durante 50 min, 13500 rpm a 4 °C (*Sigma 4k15*). Além disso, de forma a remover partículas de PLLA sem núcleos magnéticos e detritos, foram feitas lavagens com água com o auxílio de um separador magnético. A solução resultante foi seca numa estufa a uma temperatura de 30°C, de modo a evitar a cristalização do PLLA.

Tal como nos revestimentos com SiO₂, no caso do PLLA, foram sintetizadas esferas sem núcleo magnético com aos mesmos métodos descrito em que as lavagens foram feitas recorrendo à técnica de centrifugação.

3.2.6. Resumo das amostras processadas

Na **Tabela 3.1** está um resumo das amostras sintetizadas assim como a nomenclatura utilizada para cada uma delas.

Tabela 3.1 – Resumo das amostras processadas e respetiva nomenclatura.

Amostra	Nomenclatura
Esferas de SiO ₂ densas	SiO ₂ D
Esferas de SiO ₂ mesoporosas	SiO ₂ M
Esferas de PLLA	PLLA
Nanopartículas de CoFe ₂ O ₄	CoFe ₂ O ₄
CoFe ₂ O ₄ estabilizadas com AO	CoFe ₂ O ₄ @AO
CoFe ₂ O ₄ revestidas com SiO ₂ densa	CoFe ₂ O ₄ @SiO ₂ D
CoFe ₂ O ₄ revestidas com PLLA	CoFe ₂ O ₄ @PLLA
Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	Fe ₃ O ₄
Fe ₃ O ₄ estabilizadas com AO	Fe ₃ O ₄ @AO
Fe ₃ O ₄ revestidas com SiO ₂ densa	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ D
Fe ₃ O ₄ revestidas com SiO ₂ mesoporosa	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ M
CoFe ₂ O ₄ revestidas com PLLA	Fe ₃ O ₄ @PLLA

Como já foi dito anteriormente, devido à variada gama de tamanhos obtidos nas amostras sintetizadas, as partículas magnéticas “puras” serão denominadas de nanopartículas (uma vez que se inserem na escala nanométrica) e as partículas de SiO₂, PLLA e nanopartículas magnéticas revestidas serão denominadas de esferas.

3.3. Técnicas de caracterização

A caracterização das amostras obtidas é indispensável para compreender o comportamento e as propriedades das mesmas, e assim adaptá-las a aplicação a que se destinam. Foram utilizados diferentes métodos de modo a caracterizar as propriedades físico-químicas e magnéticas das amostras.

3.3.1. Caracterização morfológica

Microscopia eletrônica de varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento (SEM do inglês *Scanning Electron Microscopy*) possibilita a análise morfológica e tridimensional de materiais orgânicos e inorgânicos a uma escala variada. Nesta técnica, a amostra (em estado líquido ou sólido) é irradiada por um feixe de elétrons focalizado que interage com a superfície da amostra. Desta interação é produzida uma série de radiações, tais como, elétrons secundários, elétrons retrodifundidos, raios-X característicos, e outros fótons de várias energias. A captação apropriada destas radiações permite a obtenção de informação sobre a amostra, tais como a topografia de superfície, a composição, a estrutura cristalina e a microestrutura [97].

A estrutura típica de um microscópio SEM, demonstrada na **Figura 3.1**, caracteriza-se por uma fonte de elétrons e um ânodo acelerador, lentes eletromagnéticas para focar o feixe numa determinada região da amostra, uma câmara de vácuo que abriga a amostra, e uma seleção de detetores para coletar os sinais emitidos pela amostra.

Todos os microscópios SEM têm detetores de elétrons secundários, espectrômetros de raios-X e detetores de elétrons retrodifundidos.

Os elétrons secundários resultam de uma transferência de energia entre os elétrons bombardeados e os elétrons da camada externa. Estes elétrons são provenientes de uma interação inelástica que ocorre à superfície e é influenciável pela topografia da amostra, fazendo com que os elétrons secundários sejam bastante importantes na caracterização da topografia/morfologia desta [98].

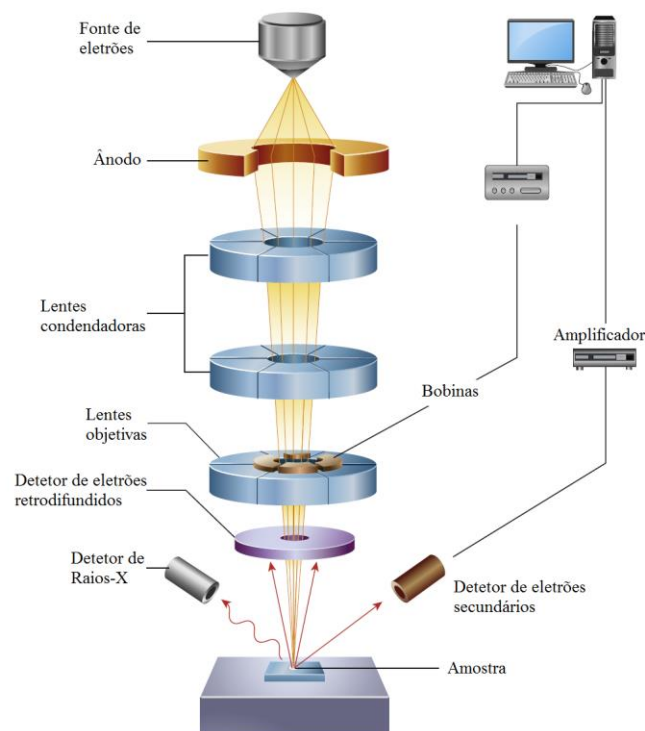


Figura 3.1 - Representação esquemática dos componentes de um microscópio SEM. Adaptado de [97].

No âmbito deste trabalho, as imagens foram obtidas com um microscópio eletrônico de varrimento FEI Quanta FEG 650, com uma voltagem de 5 kV. Uma fina camada de ouro foi previamente revestida nas amostras, recorrendo à técnica de pulverização catódica, de forma a aumentar a produção de elétrons secundários e assim melhorar a qualidade das imagens obtidas.

Microscopia Eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM do inglês *Transmission Electron Microscopy*) é uma técnica utilizada para a análise da microestrutura interna do material, incluindo partículas, fibras e filmes finos, e imagiologia de átomos. Um equipamento TEM é constituído por uma fonte de elétrons, lentes eletrostáticas utilizadas para focar o feixe de elétrons [97].

Nesta técnica um feixe de elétrons é transmitido através de uma amostra ultrafina interagindo com a amostra à medida que a atravessa. É formada uma imagem da interação dos elétrons transmitidos (**Figura 3.2**)

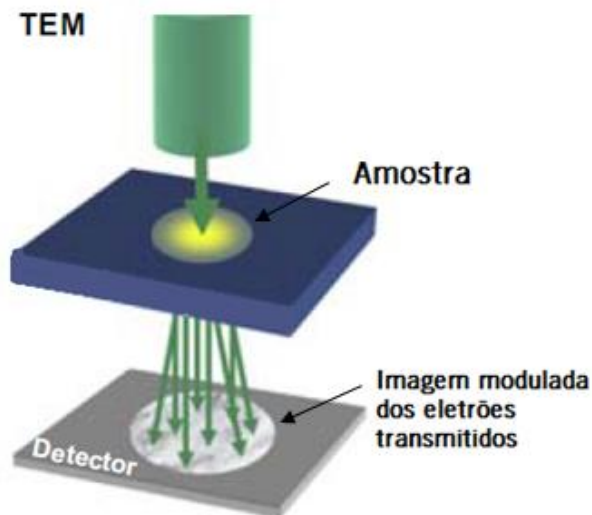


Figura 3.2 – Esquemática da aquisição de imagem feita por um microscópio TEM. Adaptado de [97].

As medições TEM foram realizadas com um microscópio *Tecnaï T20* da *FEI*. As amostras foram dispersas em etanol e secas numa grelha de cobre revestida com carbono e foram analisadas com uma voltagem de 120 kV.

3.3.2. Caracterização estrutural

Difração de raios-X

A técnica de difração de raios-X (XRD do inglês *X-Ray Diffraction*) permite obter informação acerca da estrutura cristalina das partículas. A **Figura 3.3** representa a difração de raios-X numa rede cristalina.

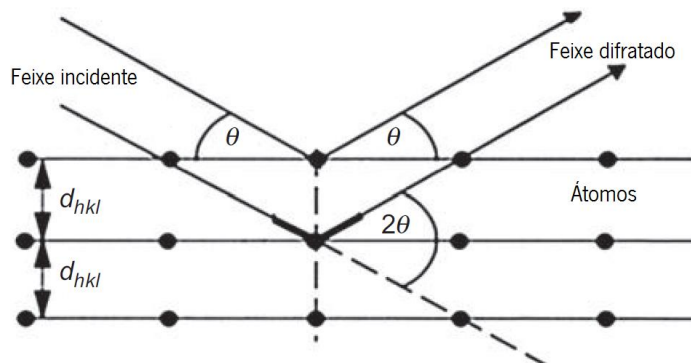


Figura 3.3 – Difração de Raios-X, com ângulo de Bragg numa rede cristalina. Adaptado de [99].

A difração de raios-X no cristal é descrita através da lei de Bragg, Equação 3.1.

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

Em que n é a ordem, λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d_{hkl} representa a distância interplanar e θ_B o ângulo de Bragg [99]. Todos os materiais cristalinos exibem um padrão de difração (raios-X difratados pelos planos hkl – índices de Miller), sendo assim possível identificar a fase do material. Assim que um material é identificado este passa a ser parte de um base de dados e a identificação do material é feita por comparação dos espectros experimentais com os espectros padrão tendo em atenção as características dos espectros, como a posição dos picos, intensidades relativas e respetivos planos hkl [5].

A caracterização por XRD das amostras foi realizada com um difratómetro *Phillips PW 1710* com uma radiação incidente Cu K α e um comprimento de onda de 1.54 Å.

3.3.3. Caracterização magnética

Magnetometria de amostra vibrante

O conhecimento do comportamento magnético das amostras processadas é feito através da técnica de magnetometria de amostra vibrante (VSM do *inglês Vibrating Sample Magnetometry*). Esta técnica baseia-se na lei de Faraday que diz que uma força eletromagnética é gerada numa bobina quando há uma alteração no fluxo da bobina. Na montagem experimental, a amostra magnética está em movimento na proximidade de duas bobinas de captação, **Figura 3.4** [100].

Os magnetómetros de amostra vibrante são usados para medir as propriedades magnéticas dos materiais em função do campo magnético, temperatura e tempo. Com esta técnica é possível analisar pós, sólidos, líquidos, cristais e filmes finos [101].

Durante a medição, o oscilador gera um sinal sinusoidal que é traduzido pelos transdutores. A amostra é fixa numa haste que vibra a uma dada frequência e amplitude. É centrada entre duas bobinas que geram um campo magnético \vec{H}_0 com elevada homogeneidade. Os detetores estão colocados nos polos das bobinas centrados nestas [100].

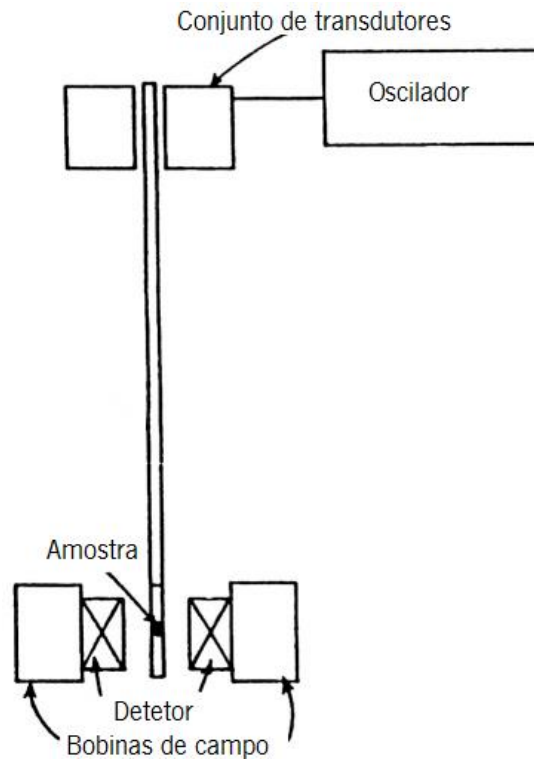


Figura 3.4 - Representação esquemática de um magnetômetro de amostra vibrante. Adaptado de [100].

O dispositivo utilizado para as medições das curvas de histerese foi o modelo ADE 3473-70 *Tecnologies*. Dependendo da amostra o campo aplicado foi de $|20|$ kOe ou $|5|$ kOe.

3.3.4. Medição da estabilidade em soluções aquosas

Potencial zeta (ζ)

O potencial Zeta (ζ) permite determinar a estabilidade das amostras em solução. Na determinação da carga superficial das partículas em meio líquido não existe ainda uma forma totalmente eficaz de o fazer. No entanto, é possível determinar o potencial elétrico de uma zona na periferia da superfície da partícula (camada difusa). Esta zona, relacionada com o movimento das partículas, é chamada de zona de deslizamento. A disposição das camadas referidas está exemplificada na **Figura 3.5**.

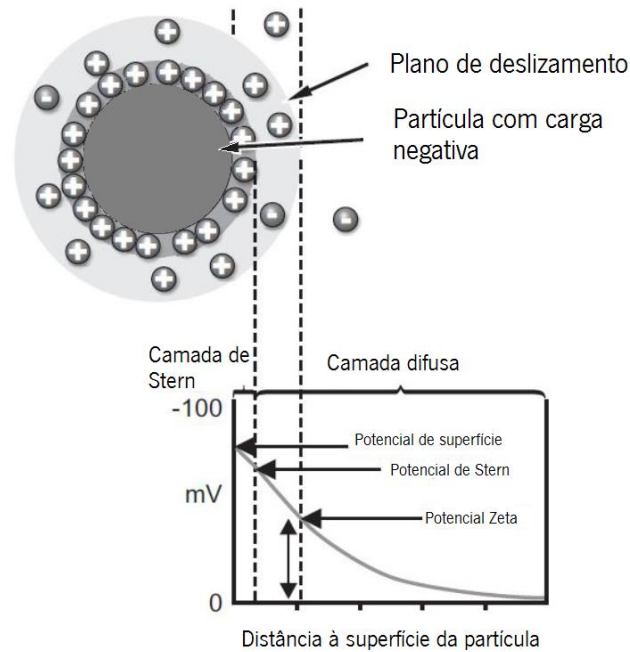


Figura 3.5 - Esquema representativo das diferentes camadas associadas a uma partícula em suspensão. Adaptado de [102].

O potencial medido no deslizamento corresponde ao potencial ζ . Este é um parâmetro fundamental para partículas em suspensão o que faz com que esta técnica seja muito usada em estudos de estabilidade de sistemas coloidais [103]. Normalmente, partículas com potencial ζ superior a $|30|$ mV são consideradas cineticamente estáveis, ou seja, não agregam devido a maiores interações repulsivas entre si [104]. Outros estudos consideram que potenciais acima dos $|25|$ mV é suficiente para a maior parte das aplicações [105].

O potencial ζ foi determinado com o Zetasizer, *NANO ZS -ZEN3600* da Malvern (Malvern Instruments Limited, UK) usando um laser He-Ne (comprimento de onda de 633 nm) e um ângulo de detecção de 173° (*backscatter detection*). Para tal, a dispersão das amostras foi introduzida numa cuvette produzida pela Malvern – *folded capillary cell*. O software usado para obtenção dos dados foi o Zetasizer 7.11, da Malvern Instruments Ltd.

3.3.5. Ensaio de citotoxicidade

Após o processamento das diferentes amostras, estudos de citotoxicidade foram realizados. Para isso, células fibroblastos (3T3) foram cultivadas com um meio específico (*Dulbecco's modified*

Eagle's médium - DMEM, Gibco) contendo 1 g.L⁻¹ de glucose e 10 % de soro fetal bovino (FBS - do inglês *Fetal Bovine Serum*, Gibco) e 1 % de antibiótico (*penicillin/streptomycin* - P/S, Biochrom) numa incubadora a 37 °C com 5 % de CO₂.

De modo a proceder à esterilização das partículas, 5 mg de cada amostra foi colocada em tubos Eppendorf de 2 mL, expostas a radiação ultravioleta (UV) por 1 h e lavadas 5 vezes numa solução tampão (PBS - do inglês *phosphate buffer saline*), tendo cada lavagem a duração de 5 min.

A avaliação da citotoxicidade indireta das amostras foi realizada de acordo com a norma ISO 10993-5. Para isso, as células 3T3 foram semeadas a uma densidade de 3x10⁴ células/mL numa placa de 96 poços e incubadas durante 24 h de forma a garantir a adesão celular. Ao mesmo tempo, cada amostra foi colocada em contato com o mesmo meio, DMEM, e incubadas durante 24 h nas mesmas condições.

Após essas 24 h, o meio da placa de 96 poços foi removido e o meio que esteve em contato com as diferentes amostras processadas ao longo deste trabalho foi adicionado a cada poço (100 µL). Uma solução de 20 % de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich) foi usada como controlo positivo e o meio de cultivo celular como controlo negativo. Após isso, as células foram incubadas durante 72 h. A viabilidade celular foi quantificada, com um ensaio colorimétrico, por 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS, CellTiter 96-Aqueous one solution reagent, Promega).

Neste ensaio, o MTS é bio-reduzido pelas células num produto formazan por enzimas desidrogenases encontradas nas células metabolicamente ativas. A absorvância do formazan foi medida a 490 nm, que é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Após 72 h, o sobrenadante foi removido e um novo meio foi adicionado contendo uma solução de MTS com uma razão de 1:5 e incubado novamente a 37 °C com 5 % de CO₂. Após 2 h de incubação, a densidade ótica foi medida a 490 nm. Todos os resultados foram obtidos a partir de 4 réplicas e analisados como a viabilidade média ± desvio padrão.

A percentagem de viabilidade celular foi calculada através da Equação 3.2.

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do controlo negativo}} \times 100 \quad (\text{Equação 3.2})$$

4. Apresentação e discussão de resultados

Neste capítulo são discutidos os resultados experimentais. Numa fase inicial é realizada uma análise da morfologia, estrutura, magnetismo e estabilidade em solução das partículas sintetizadas e de seguida é efetuado um estudo citotóxico das mesmas. No final é realizado um estudo comparativo entre as diferentes amostras.

4.1. Esferas de sílica

Como referido anteriormente a análise TEM permite uma visualização da estrutura interna do material. Na **Figura 4.1** estão apresentadas imagens TEM das esferas de SiO₂ densa (SiO₂D) (a) e de SiO₂ mesoporosa (SiO₂M) (b) obtidas. Os tamanhos foram calculados com o auxílio do software *ImageJ*. Está também representado o padrão XRD das respectivas amostras (c) e o potencial ζ em função do pH (d). O padrão XRD é responsável pela estrutura cristalina do material, enquanto o potencial ζ indica a estabilidade do material em solução, como já abordado anteriormente.

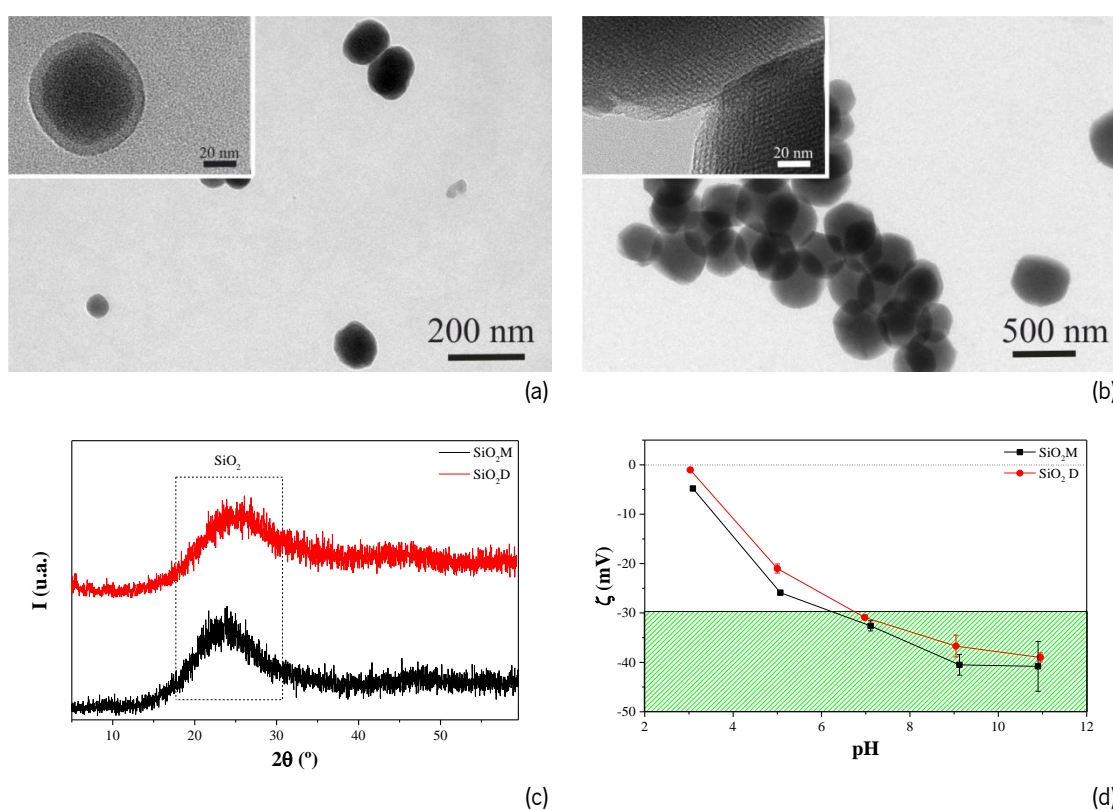


Figura 4.1 – Imagens TEM das esferas de SiO₂D (a); SiO₂M(b) e respetivos padrões XRD (c) e curvas de potencial ζ (d).

As imagens TEM das esferas de SiO₂D (**Figura 4.1 a**) revelam um tamanho nanométrico médio de 47 ± 11 nm. Já na **Figura 4.1 b** é possível verificar a porosidade das esferas de SiO₂ obtida que apresentam um tamanho médio de 76 ± 14 nm. Em ambos os casos uma morfologia esférica com uma baixa distribuição de tamanhos é obtida.

Os respetivos padrões XRD estão representados na **Figura 4.1 c**. O pico de baixa intensidade é detetado a aproximadamente 22° indicando a presença de SiO_2 não cristalina nas amostras [106, 107].

Finalmente, pela análise da **Figura 4.1 d**, é possível verificar que tanto as esferas de SiO_2D como as de SiO_2M apresentam um comportamento semelhante, demonstrando estabilidade em solução para valores de pH iguais ou superiores a 7 (-30.9 mV e -32.6 mV, respetivamente).

4.2. Esferas de poli (l-ácido láctico)

A técnica SEM permite analisar materiais a nível morfológico a escalas variadas. Na **Figura 4.2** estão representadas as imagens SEM das esferas de PLLA a diferentes frações volumétricas (5%, 10% e 15% respetivamente) assim como o respetivo diâmetro das mesmas. Tal como para a caracterização TEM, o tamanho das esferas foi calculado com o auxílio do software *ImageJ*.

É de salientar a dificuldade na obtenção destas imagens. De facto, devido a termosensibilidade do PLLA, a combinação do aquecimento gerado pelo processo de deposição de ouro necessário a análise juntamente com a tensão requerida para a obtenção das imagens levou a que algumas amostras “fundissem” ligeiramente. Exemplos são as imagens das **Figuras 4.2 b e c** onde as esferas apresentam ligação umas as outras. No entanto, esse efeito não invalida de todo a análise das mesmas, sendo necessário apenas ter em conta que o tamanho tenha diminuído ligeiramente.

Dito isto, em todos os casos é possível verificar uma morfologia esférica. Pode-se ainda observar que com o aumento da fração de PLLA de 5 % para 10 %, existe uma diminuição substancial no diâmetro das esferas de $\sim 55 \mu\text{m}$ para $\sim 490 \text{ nm}$. Já para um aumento de fração de 10 % para 15 %, nenhuma variação significativa foi verificada, tendo-se mantido o tamanho médio das amostras. Para além disso, para uma fração de 5 % é verificada a existência de poros na sua superfície levando a crer que as esferas apresentam porosidade em toda o seu interior.

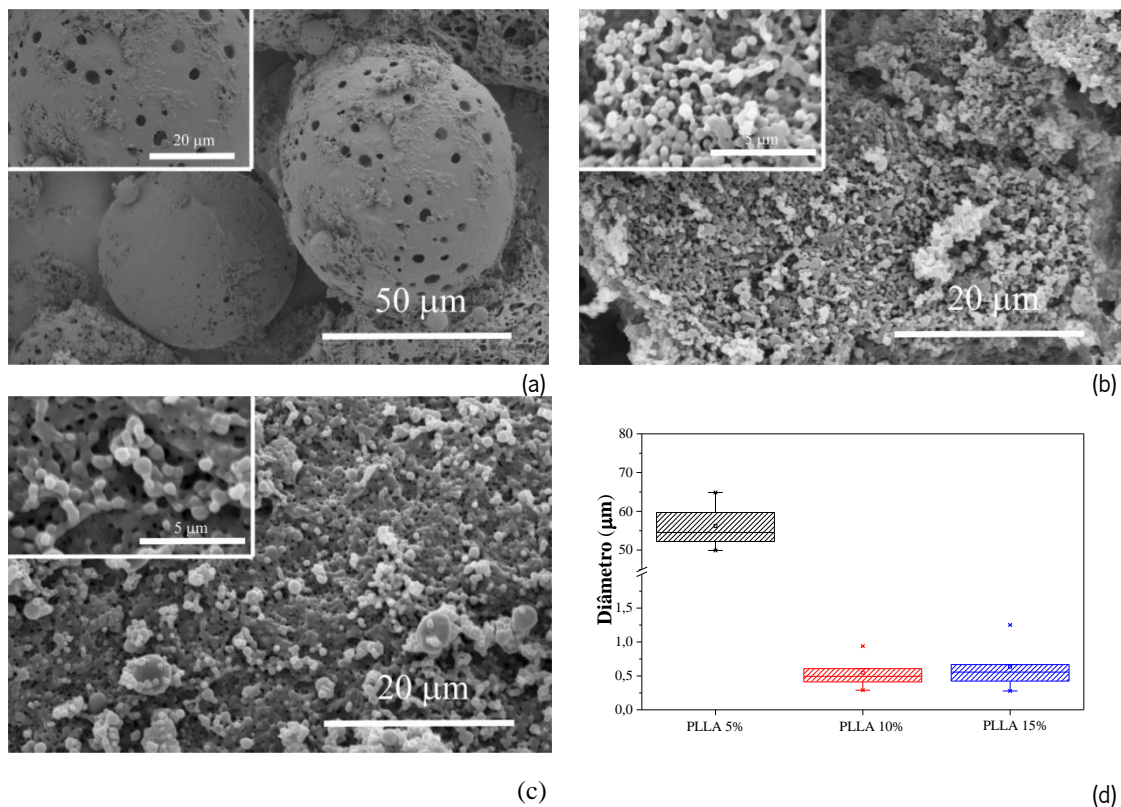


Figura 4.2 - Imagens SEM das esferas de PLLA com uma fração volumétrica de (a) 5 %; (b) 10 %; (c) 15 %; (d) respetivo diâmetro.

As **Figuras 4.3 a e b** mostram o padrão XRD das esferas de PLLA assim como a sua estabilidade em solução a diferentes valores de pH, respetivamente.

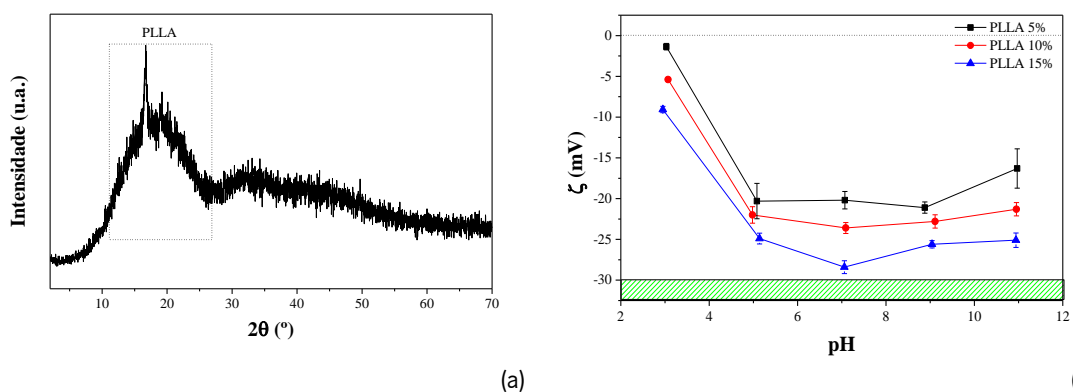


Figura 4.3 – (a) Padrão XRD das esferas de PLLA representativa de todas as amostras e (b) curvas do potencial ζ em diferentes condições de pH das esferas de PLLA com frações volumétricas de 5 %, 10 % e 15 %.

O padrão de difração de PLLA, representativa de todas as amostras de PLLA processadas, exhibe muito baixa cristalinidade e apresenta um único pico alargado a aproximadamente 16.4 °, que tal

como na SiO_2 é indicador da sua natureza amorfa [108, 109]. Os resultados de potencial ζ mostram que a estabilidade das esferas aumenta proporcionalmente a fração volumétrica de PLLA. Apesar de os valores obtidos não estarem nos ± 30 mV, alguns autores já consideram partículas estáveis a partir de ± 25 mV, o que torna as esferas com uma fração volumétrica de PLLA de 15 % estáveis para valores de pH igual ou maior que 5.

4.3. Revestimento de nanopartículas magnéticas de ferrite de cobalto

4.3.1. Nanopartículas magnéticas de ferrite de cobalto

Na **Figura 4.4 a** está representada uma imagem TEM representativa das nanopartículas de CoFe_2O_4 . Além disso são apresentados os padrões de XRD (**Figura 4.4 b**) assim como as curvas de magnetização (**Figura 4.4 c**) e potencial ζ (**Figura 4.4. d**) das nanopartículas de CoFe_2O_4 e CoFe_2O_4 estabilizadas com AO ($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$).

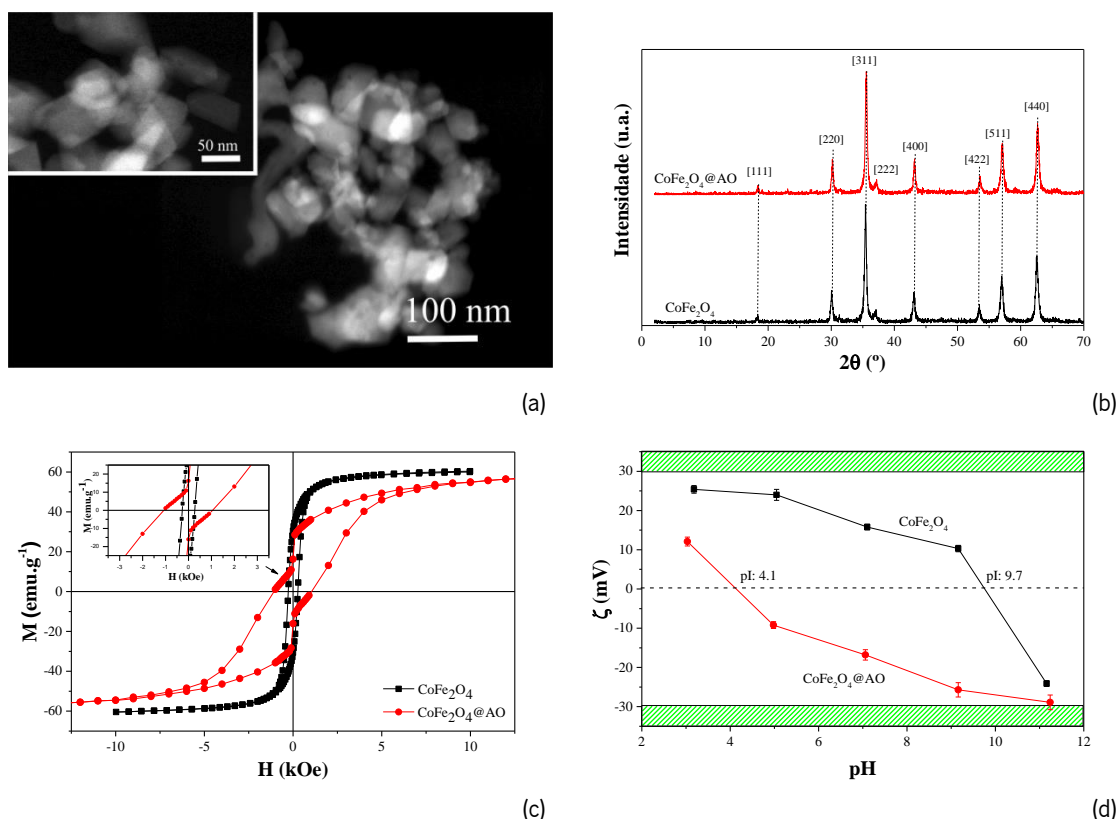


Figura 4.4 – (a) Imagem TEM das nanopartículas de CoFe_2O_4 ; (b), (c) e (d) Padrão XRD, curvas de magnetização e potencial ζ , respectivamente, das nanopartículas de CoFe_2O_4 e $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$;

As imagens TEM revelam morfologias e tamanhos heterogêneos (35-55 nm) das nanopartículas de CoFe_2O_4 . Estas imagens são igualmente representativas das nanopartículas de CoFe_2O_4 estabilizadas com AO.

No que diz respeito aos resultados de XRD, ambos os padrões são consistentes com a estrutura espinela de CoFe_2O_4 , formando os picos característicos [111], [220], [311], [222], [400], [422], [511] e [440] a aproximadamente 18° , 30° , 35° , 37° , 43° , 53° , 57° , 63° , respetivamente [26, 33]. Deste modo, não é verificada alterações no padrão com a adição de AO.

As medidas magnéticas demonstram um comportamento com uma baixa coercividade H_c de 0.55 kOe e M_s de 60 emu.g^{-1} para as nanopartículas de CoFe_2O_4 . Com a adição de AO há uma diminuição mínima de 3 emu.g^{-1} no valor de M_s . No entanto, verifica-se um aumento de H_c para 2.12 kOe, o que pode ser explicado pela anisotropia do revestimento com este surfactante [29].

A evolução do potencial ζ em função do pH das suspensões indica que em ambos os casos as nanopartículas apresentam baixa estabilidade em soluções aquosas. No entanto, é possível observar que com a adição do AO existe uma diminuição drástica do ponto isoelétrico de 9.7 para 4.1, levando a que as nanopartículas $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$ sejam consideradas estáveis a pH superior a 11. Além disso e independentemente dos resultados obtidos por ζ , observou-se igualmente a olho nu que enquanto as nanopartículas de CoFe_2O_4 em suspensão aquosa a pH neutro caíam por “gravidade” de forma quase instantânea, as revestidas com AO demonstraram uma elevada estabilidade em longos períodos de tempo, justificando mais uma vez o seu papel.

4.3.2. Revestimento de nanopartículas magnéticas de ferrite de cobalto com sílica

Devido a toxicidade conhecida das nanopartículas de CoFe_2O_4 , optou-se por revestir as mesmas apenas com SiO_2 densa, uma vez que uma morfologia mesoporosa poderia levar ao contacto entre o meio e o seu núcleo. Consequentemente, além das vantagens inerentes do SiO_2 e já abordadas anteriormente, este revestimento passa por proteger o meio aquoso com o qual as esferas entram em contacto e igualmente proteger as nanopartículas de oxidação.

Nas **Figuras 4.5 a, b, c e d** estão representados as imagens SEM, o padrão XRD, a curva de magnetização e o potencial ζ das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$ revestidas com SiO_2 densa

($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO@SiO}_2\text{D}$), respetivamente. Para efeitos comparativos os resultados das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$ foram adicionados.

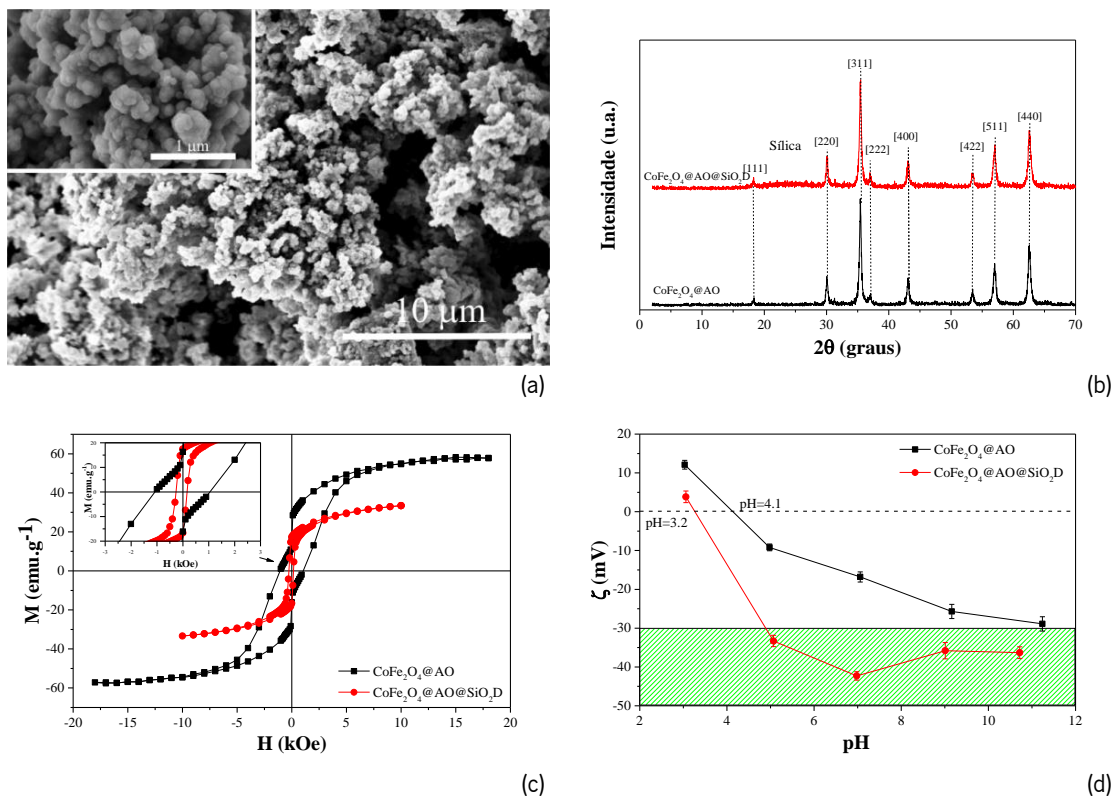


Figura 4.5 – (a) Imagem SEM representativa das esferas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO@SiO}_2\text{D}$; (b) Padrões XRD, (c) curvas de magnetização (d) potencial ζ das nanopartículas das esferas $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO@SiO}_2\text{D}$ e nanopartículas $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$.

As esferas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO@SiO}_2\text{D}$ apresentam uma morfologia esférica com um tamanho médio de 87 ± 13 nm.

Relativamente ao XRD das esferas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{D}$, este presente um padrão semelhante ao das nanopartículas não revestidas, i.e., sem qualquer variação nos picos característicos de CoFe_2O_4 à exceção da existência de um pico alargado a aproximadamente 22° , correspondendo à SiO_2 .

Os resultados apresentados pelas curvas de magnetização indicam uma diminuição no valor de M_s (de $57 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ para $33 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ com SiO_2), facilmente explicada pela natureza amorfa da SiO_2 . Além disso, verifica-se igualmente uma diminuição de H_c (2.12 kOe para 0.42 kOe com SiO_2) que poderá ser justificada pela redução do efeito superfície/interface o que consequentemente induz redução da anisotropia das nanopartículas [8].

Quanto ao comportamento das esferas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ em solução aquosa, os resultados de potencial ζ mostra que o revestimento com SiO_2 as torna viáveis para um maior leque de aplicações biomédicas visto que apresentam uma elevada estabilidade em solução aquosa para pH iguais ou superiores a 5. Isto deve-se ao desvio do ponto isoelétrico para um pH de 3.2 que comprova novamente o sucesso no revestimento das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO$ com SiO_2 [10].

A junção destes resultados comprova a viabilidade deste método de processamento no revestimento de nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO$ com SiO_2 . Contudo, apenas os ensaios de citotoxicidade apresentados no subcapítulo 4.5 poderão de facto confirmar a viabilidade do seu uso em aplicações biomédicas.

4.3.3. Revestimento de nanopartículas magnéticas de ferrite de cobalto com poli (l-ácido láctico)

As imagens SEM das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO$ revestidas com PLLA com frações volumétricas de 5 %, 10 % e 15 % estão representadas nas **Figuras 4.6 a, b e c**, respetivamente, enquanto o diâmetro das mesmas está representado na **Figura 4.6 d**.

Neste revestimento a parte experimental revelou-se de elevada complexidade, tanto a nível da formação da emulsão, como na fase de adição gota a gota na solução de PVA em que a seringa ficava constantemente bloqueada. Além disso, após a secagem da amostra foi necessário o uso de um almofariz na tentativa de separá-las uma vez que as mesmas aglomeravam durante o processo de secagem. Além da tentativa de otimização, é de salientar que o processo de emulsão foi replicado várias vezes de modo a verificar a reprodutibilidade destas dificuldades. Deste modo, os resultados apresentados tanto neste subcapítulo (como nos restantes) são representativos da realidade desta técnica.

Dito isto, as imagens SEM revelam os resultados esperados tendo em conta as dificuldades na realização deste processo, fazendo deste método não tão adequado para o revestimento de nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO$ com PLLA. A elevada heterogeneidade na morfologia das nanopartículas magnéticas pode também ter levado a uma dificuldade acrescida na eficiência desta técnica. A variação drástica na morfologia das amostras com esferas achatadas no caso de uma fração volumétrica de PLLA de 10 % e esferas “colapsadas” para uma fração de 15 % levam uma variação igualmente acentuada do diâmetro das mesmas. Embora resultados promissores foram

obtidos com SiO_2 , neste preciso caso, a heterogeneidade das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO$ (Figura 4.4 a) juntamente com a dificuldade da técnica principalmente na primeira emulsão com a ponta de ultrassom podem justificar estes resultados. É de salientar igualmente que foram realizadas tentativas de revestimento de nanopartículas de CoFe_2O_4 sem recorrer ao pós-tratamento com AO de forma a verificar a interferência com o revestimento com PLLA, no entanto sem sucesso devido a baixa estabilidade das amostras em solução. Apenas para uma fração volumétrica de PLLA de 10 % foi possível obter esferas com morfologia pretendida sendo que as mesmas apresentam uma porosidade interessante para muitas aplicações biomédicas. Contudo, as esferas exibem um tamanho relativamente elevado de aproximadamente 700 μm .

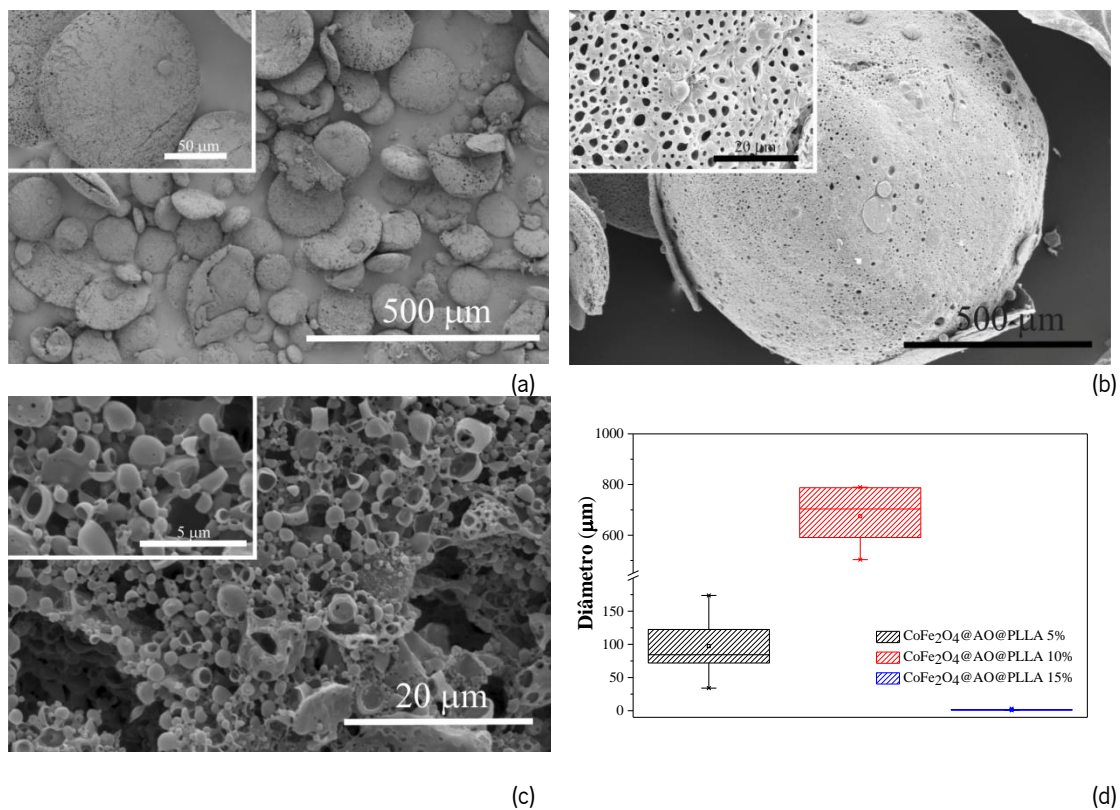


Figura 4.6 - Imagens SEM das esferas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO@PLLA$ com uma fração volumétrica de PLLA de (a) 5 %; (b) 10 %; (c) 15 %; (d) respetivo diâmetro das esferas obtidas.

A Figura 4.7 apresenta o padrão XRD representativo das esferas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO@PLLA$ (neste caso específico com fração volumétrica de 10%) e de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO$ como termo comparativo e também estão apresentadas as respetivas curvas de magnetização para as diferentes frações de PLLA.

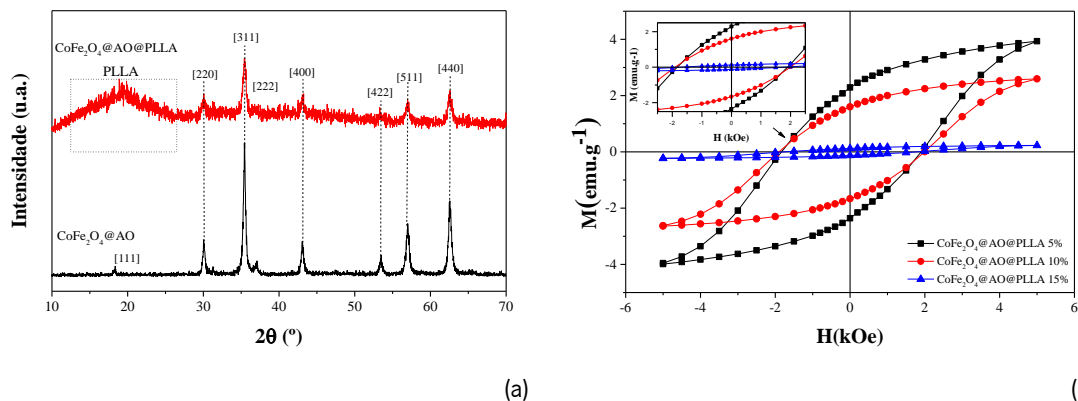


Figura 4.7 – (a) Padrão XRD das esferas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO@PLLA}$ e nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$ e (b) Curvas de magnetização das esferas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO@PLLA}$ com frações volumétricas de PLLA de 5 %, 10 % e 15 %.

Como é possível verificar, o padrão XRD das esferas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO@PLLA}$ apresenta um pico alargado nos 18.7° característico deste polímero. É de notar também a diminuição na intensidade dos picos característicos de CoFe_2O_4 justificado pela elevada camada polimérica a volta das nanopartículas magnéticas.

Verifica-se uma diminuição significativa no valor de M_s de 57 emu.g^{-1} para as nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$ para 3.99 emu.g^{-1} , 2.64 emu.g^{-1} e 0.23 emu.g^{-1} para as esferas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO@PLLA}$ com frações volumétricas de PLLA de 5 %, 10 % e 15 %, respetivamente. Estes resultados são facilmente justificados pela elevada espessura do revestimento no caso das esferas com 5 % e 10 % de PLLA. No que diz respeito as esferas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO@PLLA}$ com fração volumétrica de PLLA de 15 %, observou-se a presença de muitas nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$ não revestidas após o processo de centrifugação. Além disso, embora várias lavagens por separação magnética tenham sido realizadas posteriormente, este resultado demonstra que muitas esferas não magnéticas terão permanecido na solução.

Na **Figura 4.8** estão representadas as curvas de potencial ζ das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO}$ revestida com PLLA 5 % e 15 %. Não foi possível realizar esta medição às esferas $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@AO@PLLA}$ 10 % devido ao elevado tamanho.

Observa-se um aumento na estabilidade com o aumento da fração volumétrica sendo possível considerar as esferas com uma fração volumétrica de PLLA de 15 % estáveis para um valor de pH superior ou igual a 10. No entanto e como já referido anteriormente, esta amostra não apresenta propriedades que possam ser consideradas adequadas para aplicações biomédicas.

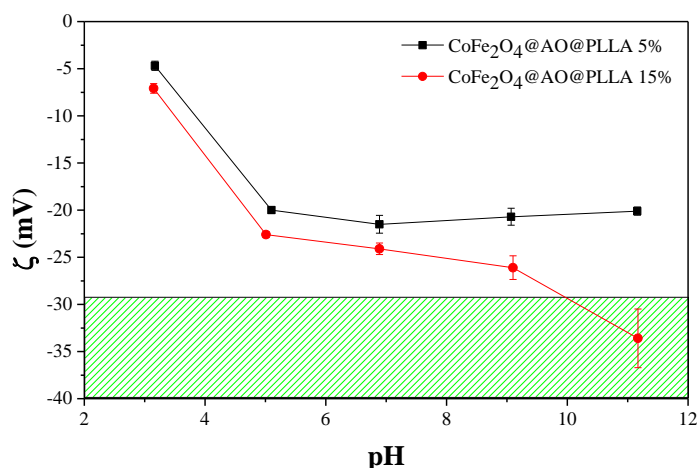


Figura 4.8 – Curvas de potencial ζ das nanopartículas de CoFe_2O_4 @AO revestidas com PLLA com frações volumétricas de 5 % e 15 %.

Deste modo, considerado todos os resultados previamente apresentados e discutidos, é possível concluir que a técnica de microemulsão apresenta severas limitações quanto ao revestimento de nanopartículas de CoFe_2O_4 com PLLA de forma eficiente e reprodutível. As únicas amostras que apresentam alguma potencialidade são as revestidas com PLLA com uma fração de 10 %. No entanto, o seu elevado tamanho deve ser considerado, podendo mesmo limitar ou mesmo impossibilitar o seu uso em muitas aplicações.

4.4. Revestimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

4.4.1. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

Como já referido anteriormente, as nanopartículas magnéticas foram sintetizadas pelo método de coprecipitação a temperatura ambiente. O processo demonstrou-se simples, rápido, reprodutível, de elevado rendimento e baixo custo.

Nas **Figuras 4.9 a, b, c e d** estão representadas uma imagem TEM representativa das nanopartículas de Fe_3O_4 @AO, o respetivo padrão XRD, a curva de magnetização e de potencial ζ , respetivamente.

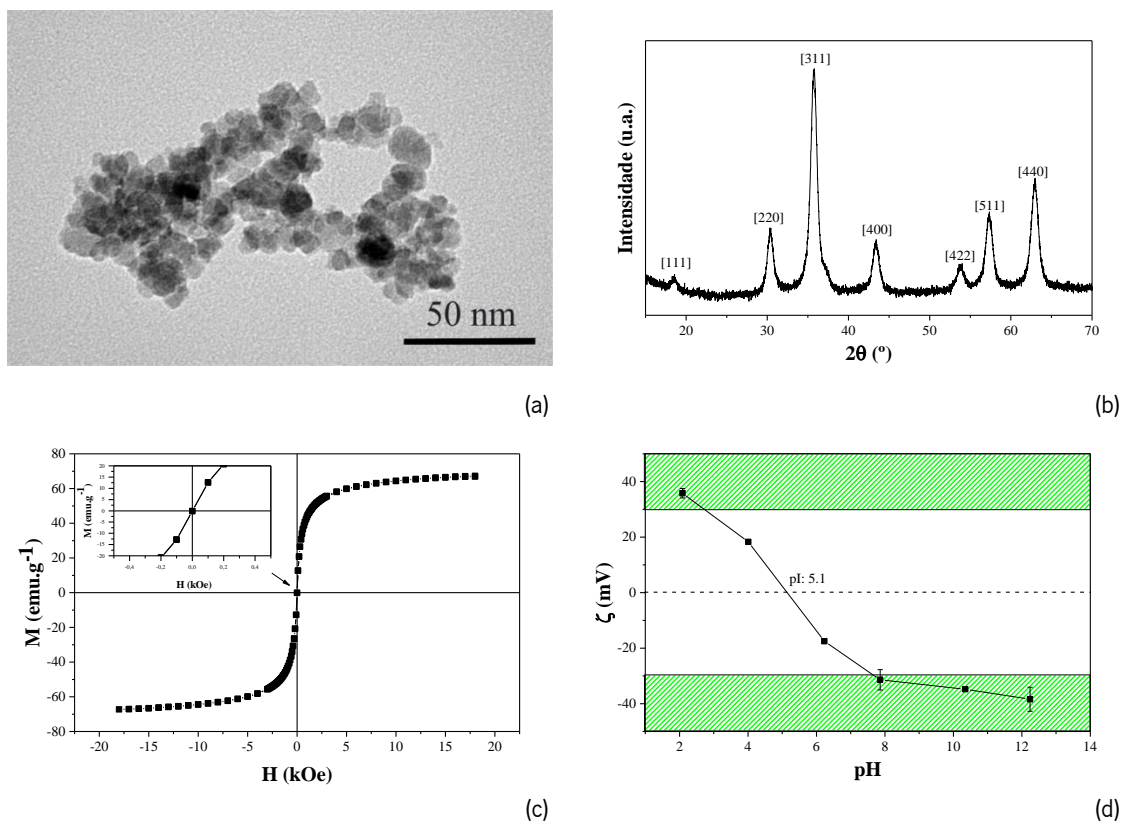


Figura 4.9 - (a) Imagem TEM das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$; (b), (c) e (d) Padrão XRD, curva de magnetização e potencial ζ , respectivamente, das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$.

A imagem TEM mostra que as nanopartículas apresentam uma forma aproximadamente esférica, típico do método de coprecipitação, com um tamanho médio de 7.9 ± 1.0 nm, muito inferior ao tamanho das nanopartículas comerciais de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{AO}$. Além disso, o padrão de XRD é consistente com a estrutura espinela de Fe_3O_4 na forma de magnetite, formando os picos característicos [111], [220], [311], [400], [422], [511] e [440] a aproximadamente 18° , 30° , 35° , 43° , 53° , 57° , 63° , respectivamente [110]. A cor acastanhada escura/preta da amostra obtida demonstra igualmente este resultado, típico da magnetite (como é possível ver pela **Figura 4.10**).

Na medição feita por VSM, é possível identificar um comportamento superparamagnético com uma coercividade H_c quase inexistente, com o valor de 0.5 Oe, e uma magnetização elevada de saturação M_s de 67 emu.g^{-1} , consistente com a literatura [110, 111].

Por fim, a análise do potencial ζ das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ mostra que estas são estáveis para valores de pH menores que 3 e iguais ou maiores que 8 e o seu ponto isoelétrico é para um valor de pH de 5.1.



Figura 4.10 – Imagem das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ sintetizadas em que mostra também o seu comportamento magnético.

4.4.2. Revestimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com sílica

Nas **Figuras 4.11 a e b** estão representadas as imagens TEM das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ revestidas com SiO_2 densa e mesoporosa, respetivamente, assim como nas **Figuras 4.11 c e d** os seus padrões XRD e curvas de magnetização incluindo das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ para efeito comparativo.

Os resultados obtidos demonstram uma morfologia quase esférica e densa no caso das esferas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2D$ e perfeitamente esféricas e porosas no caso das esferas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2M$. Além disso, ambas apresentam diâmetros de aproximadamente 110 ± 10 nm. Mais ainda, é possível identificar um núcleo constituído por conjuntos de nanopartículas magnética no seu interior, não tendo observado quaisquer partículas magnéticas não revestidas aquando as análises.

Tal como no caso das nanopartículas de CoFe_2O_4 os padrões de XRD das amostras obtidas são semelhantes, verificando-se a existência de um pico alargado nos 22° , relativo mais uma vez da presença de SiO_2 amorfa.

É possível verificar que embora a magnetização de saturação sofra uma diminuição, as amostras $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2M$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2D$ continuam a exibir valores elevados de 45 emu.g^{-1} e 34 emu.g^{-1} , respetivamente. Além disso, ambas apresentam um comportamento superparamagnético com coercividade, H_c , muito baixa, de 0.7 Oe .

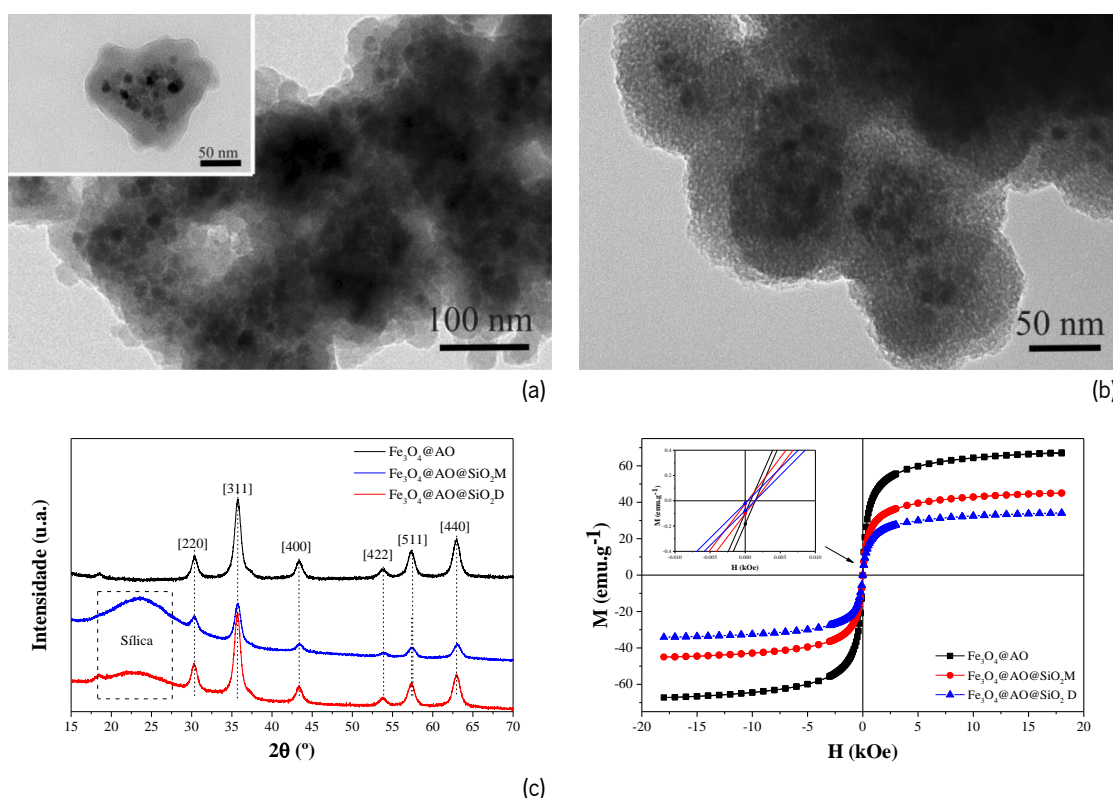


Figura 4.11 - Imagens TEM representativas das esferas de (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2D$ e (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2M$; (c) e (d) Padrões XRD e curvas de magnetização das esferas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2D$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2M$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ respectivamente.

Por fim, as curvas de potencial ζ das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ revestidas com SiO_2 estão representadas na **Figura 4.12**.

É possível verificar que as curvas das amostras $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2M$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2D$ apresentam um comportamento semelhante as esferas $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2D$. De facto, além do revestimento com SiO_2 levar a uma diminuição do ponto isoelétrico para um valor aproximado de 2.8, as esferas apresentam-se estáveis para pH superiores a 5 em ambos os casos. Dito isto, está mais do que comprovado que o SiO_2 desempenha um papel crucial no aumento da estabilidade das nanopartículas magnéticas em solução aquosa. Além disso, a elevada porosidade das esferas $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2M$ permite obter uma maior área de superfície para futura funcionalização.

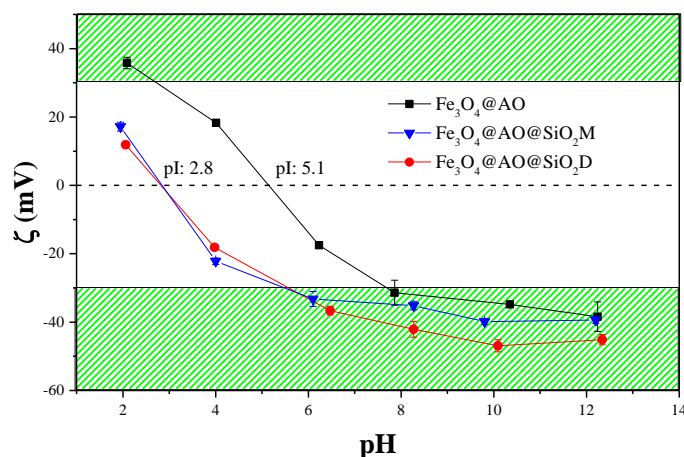


Figura 4.12 – Curvas de potencial ζ das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ e das esferas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2D$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@SiO_2M$.

4.4.3. Revestimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com poli (l-ácido láctico)

As Figuras 4.13 a, b e c apresentam as imagens SEM das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ revestidas com PLLA com diferentes frações volumétricas de 5 %, 10 % e 15 %, respetivamente. Além disso, o tamanho médio das mesmas está apresentado na Figura 4.13 d.

As imagens SEM demonstram a viabilidade da técnica de microemulsão no revestimento de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ com PLLA, contrariamente aos resultados obtidas com o revestimento das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO$. Este resultado pode indicar que a heterogeneidade da forma das nanopartículas de ferritas de cobalto juntamente com o seu maior tamanho comparativamente as de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ podem ter tido um papel preponderante nos resultados obtidos. No entanto as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ revestidas com PLLA 15 % aparentam apresentar algumas esferas igualmente colapsadas mas de número muito inferior as obtidas com $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO$. Além disso, apresentam também alguma porosidade superficial. Analisando o gráfico da Figura 4.13 d, verifica-se um aumento do tamanho das esferas de aproximadamente 430 nm para 940 nm com o aumento da fração volumétrica de PLLA de 10 % para 15 %. Relativamente as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ revestidas com PLLA 5 %, as mesmas apresentam um tamanho similar as de 10 %.

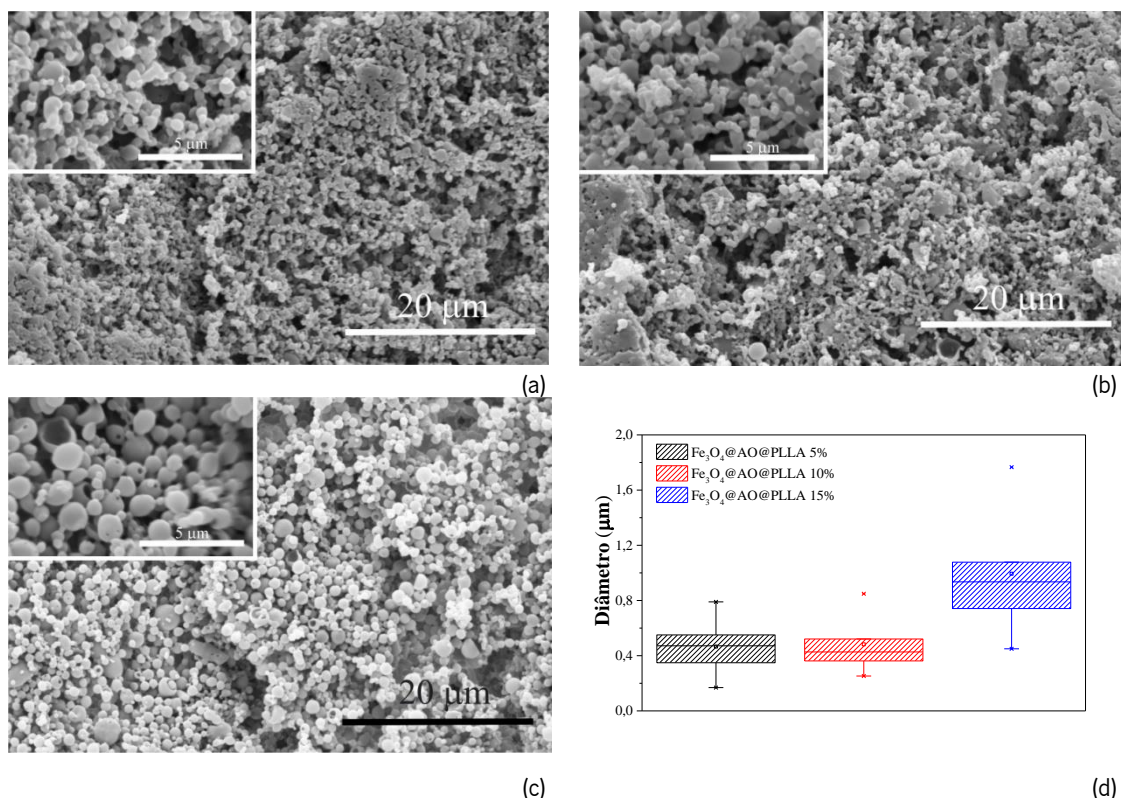


Figura 4.13 - Imagens SEM das nanopartículas de Fe₃O₄@AO revestidas com PLLA com uma fração volumétrica de (a) 5 %; (b) 10 %; (c) 15 %; (d) respectivo diâmetro das esferas obtidas.

O padrão XRD das esferas de Fe₃O₄@AO@ PLLA está exibido na **Figura 4.14 a** e é representativa de todas as amostras processadas, i.e., não depende da fração volumétrica de PLLA e a **Figura 4.14 b** apresenta as curvas de magnetização das esferas de Fe₃O₄@AO@PLL.

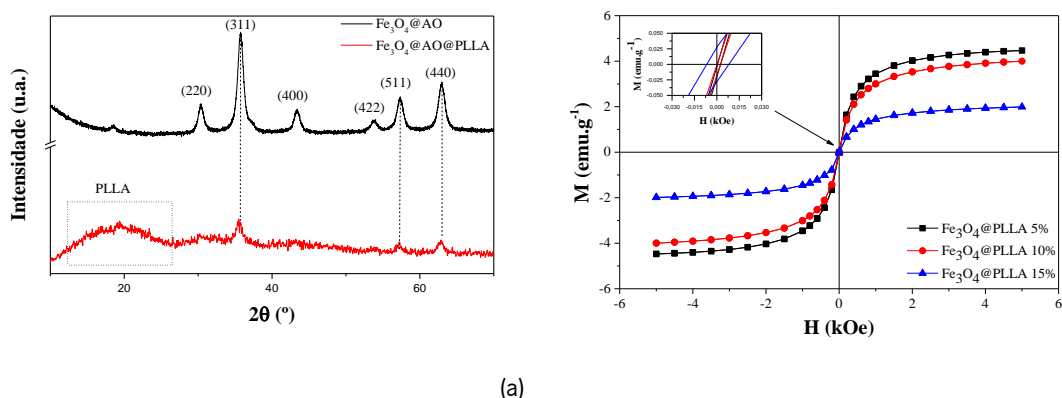


Figura 4.14 – (a) Padrão XRD das nanopartículas de Fe₃O₄@AO e Fe₃O₄@AO revestidas com PLLA e (b) Curvas de magnetização das nanopartículas de Fe₃O₄@AO revestidas com PLLA com uma fração volumétrica de 5 %, 10 % e 15 %.

Apesar de não ser tão evidente como para as partículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO$ revestidas com PLLA, continua a ser possível identificar a estrutura cristalina das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ com os picos característicos [311], [511] e [400]. Além disso, é possível identificar o pico alargado a aproximadamente 17° correspondente ao PLLA.

Há uma diminuição de valor de M_s com o aumento da fração volumétrica de PLLA de 10% para 15% (3.99 emu.g^{-1} para 1.99 emu.g^{-1}). Isto está de acordo com o esperado tendo em conta a análise SEM em que se verificou que há um aumento no tamanho das partículas, e respetivamente, na camada de PLLA. Para uma fração volumétrica de PLLA de 5% verifica-se que esta amostra apresenta um valor de magnetização de saturação (4.46 emu.g^{-1}) bastante próximo ao das partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ revestidas com PLLA com uma fração volumétrica de 10% o que é consistente com a análise SEM. Relativamente à coercividade, todas as amostras apresentam um baixo valor de H_c (2.08 Oe , 2.61 Oe e 6.22 Oe para as frações de 5%, 10% e 15% respetivamente) exibindo um comportamento superparamagnético.

Na **Figura 4.15** estão apresentadas as curvas de potencial ζ das esferas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO@PLLA$ com frações volumétricas de 5 %, 10 % e 15 %.

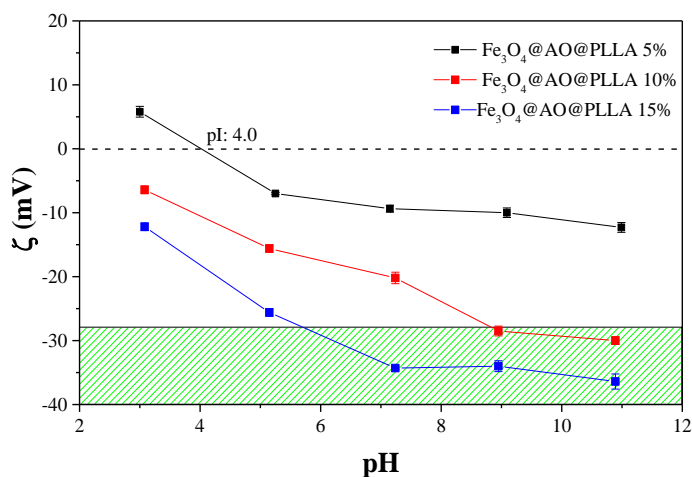


Figura 4.15 – Curvas de potencial ζ das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ revestidas com PLLA com uma fração volumétrica de 5 %, 10 % e 15 %.

Constata-se que com o aumento da fração volumétrica de PLLA existe um aumento na estabilidade das esferas em solução. Para as frações volumétricas de PLLA de 10% e 15%, as esferas apresentam-se estáveis para valores de pH iguais ou superior a 9 e 6, respetivamente.

Analisando os resultados em conjunto e como já referido anteriormente, a técnica de microemulsão verificou ser viável para o revestimento de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 com polímero biodegradável PLLA. Além disso, as frações volumétricas de PLLA de 10 % 15 % demonstraram ser as mais adequadas para a processamento de esferas com magnetização adequada e elevada estabilidade em solução, comprovando o seu potencial para muitas aplicações biomédicas. Mais ainda, embora possam apresentar alguma porosidade à superfície, o contacto das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 com o meio não impede ao seu uso visto não serem tóxicas, como será demonstrado no subcapítulo seguinte.

4.5. Ensaio de citotoxicidade

Para a utilização das esferas processadas em aplicações biomédicas é essencial avaliar a citotoxicidade das mesmas. Para este efeito foram realizados ensaios MTS, *in vitro*, e foi medida a viabilidade celular de células fibroblastos 3T3 como o meio exposto durante 72 h em cada amostra (Figura 4.16).

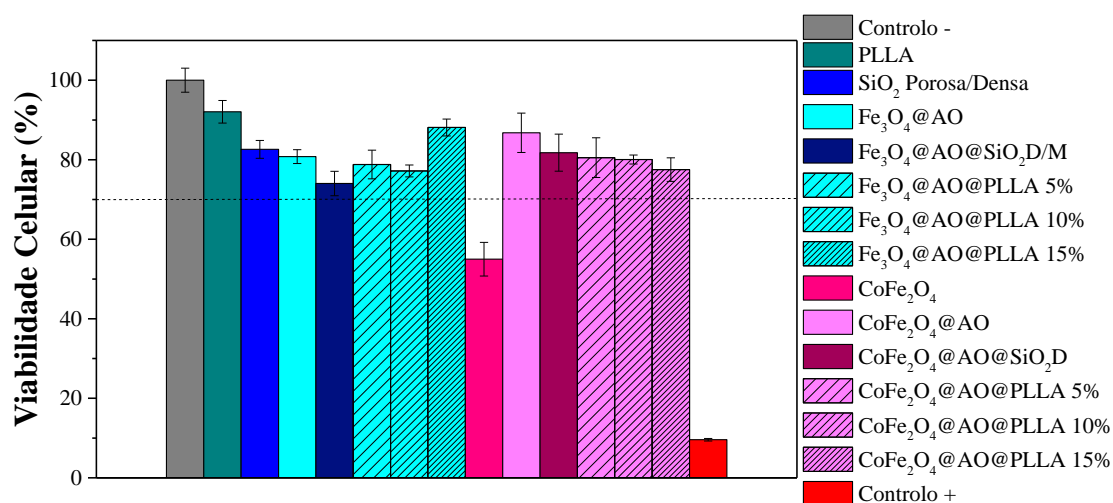


Figura 4.16 – Viabilidade celular de células fibroblastos 3T3 em contacto com o meio exposto às diferentes amostras até 72h.

De acordo com a norma ISO 10993-5, as amostras são consideradas citotóxicas quando a redução de viabilidade celular é maior que 30 %. Como tal, baseado nos resultados apresentados, é possível concluir que todas as amostras processadas não são citotóxicas, à exceção das nanopartículas de CoFe_2O_4 puras, como expectável.

É de notar que, em termos de viabilidade celular, o revestimento com PLLA é comparável com o revestimento com SiO_2 apresentando percentagens de viabilidade celular semelhantes.

Também algo que deve ser tomado em atenção é o efeito que o AO teve quando utilizado como estabilizador das nanopartículas de CoFe_2O_4 que eram inicialmente citotóxicas tornando-as compatíveis, com uma percentagem de viabilidade celular originalmente de 55 % passando a 87 %.

Finalmente comparando as amostras de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO$ com os diferentes revestimentos a nível da viabilidade celular, conclui-se que estas são comparáveis tendo percentagens de viabilidade celular semelhantes.

4.6. Sumário das propriedades dos materiais processados

Na **Tabela 4.1** estão descritos de forma resumida os resultados obtidos para cada uma das amostras estudadas de modo a ser realizado um estudo comparativo.

Como referido anteriormente, o primeiro passo deste trabalho passou por sintetizar esferas de SiO_2 , PLLA e nanopartículas de Fe_3O_4 , de modo a ter uma melhor compreensão das suas propriedades em termos individuais, isto é, sem qualquer núcleo ou revestimento.

Inicialmente foram sintetizadas esferas de SiO_2 densa e mesoporosa, em que ambas apresentam uma morfologia esférica, estabilidade para valores de pH igual ou acima a 7 e boa viabilidade celular. Foi também feito um estudo com diferentes frações volumétricas de PLLA de 5 %, 10 % e 15 % obtendo-se esferas com diferentes tamanhos e com boa viabilidade celular. No entanto, apenas para uma fração volumétrica de PLLA de 15 % foi verificada a estabilidade em solução para valores de pH iguais ou maiores que 5.

Nas amostras de CoFe_2O_4 , a utilização de AO como surfactante teve um efeito positivo tanto no aumento da sua estabilidade em solução como na sua viabilidade celular. Além disso, o valor de magnetização de saturação manteve-se constante com apenas um ligeiro aumento da coercividade, explicado pela anisotropia do revestimento. O revestimento das nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@AO$

com SiO₂ foi de natureza densa e levou a uma diminuição na magnetização de saturação e coercividade, mantendo-se, no entanto bastante elevado para este tipo de material. Por outro lado, aumentou a estabilidade em solução e uniformizou a morfologia das nanopartículas. Todas estas características abrem caminhos na utilização destas esferas em várias aplicações, inclusive aplicações *in vivo*. Por outro lado, o revestimento das nanopartículas de CoFe₂O₄@AO com PLLA mostrou-se desafiante, tendo-se comprovado a incapacidade da técnica de microemulsão em revestir de forma adequada e uniforme as nanopartículas magnéticas. De facto, verificou-se uma grande discrepância no tamanho e morfologia das amostras, observando-se ainda o colapso das esferas para uma fração volumétrica de PLLA de 15%. Os valores de magnetização de saturação foram baixos e os valores de coercividade eram significativos.

Relativamente às nanopartículas de Fe₃O₄@AO, por si só são viáveis tanto para aplicações *in vivo* como *in vitro* apresentando tamanho reduzido, morfologia esférica, estabilidade em solução numa elevada gama de pH, elevada magnetização de saturação, baixa coercividade (comportamento superparamagnético) e baixa citotoxicidade. Os resultados relativos ao revestimento das nanopartículas de Fe₃O₄@AO com SiO₂ densa e mesoporosa demonstrou um aumento no tamanho e uma diminuição na magnetização de saturação. É também verificada a continuação de um comportamento superparamagnético e baixa citotoxicidade assim com um aumento da estabilidade em solução fazendo com que a sua utilização em aplicações biomédicas seja mais apropriada que as nanopartículas de Fe₃O₄@AO sem revestimento. Por fim, a técnica de microemulsão provou ser adequada para o revestimento destas nanopartículas magnéticas com PLLA. Neste caso, as esferas obtidas apresentam-se uniformes. Contudo, a fração volumétrica de PLLA mostrou ser um fator relevante e teve um impacto significativo no tamanho, magnetização (embora continuando a exibir um comportamento superparamagnético) e estabilidade em solução. As nanopartículas de Fe₃O₄@AO revestidas com PLLA com frações volumétricas de 10 % e 15 % demonstraram ser aquelas que apresentam melhores propriedades para aplicações biomédicas, devido a sua maior estabilidade em solução aquosa. De facto, este é um dos fatores primordiais a considerar para qualquer aplicação biomédica.

Tabela 4.1 - Resumo de parâmetros obtidos para cada uma das amostras em estudo. (*estabilidade em solução considerada para valores superiores a |25| mV)

Amostra	Tamanho		Magnetização		Viabilidade Celular	
	(nm/ μ m)	Morfologia	M_s (emu.g ⁻¹)	H_c (Oe/kOe)	ζ (pH)	(%)
SiO ₂ densa	47 nm	Esférica	-	-	≥ 7	83
SiO ₂ mesoporosa	76 nm	Esférica	-	-	≥ 7	
PLLA 5%	55 μ m	Esférica	-	-	-	
PLLA 10%	0.49 μ m	Esférica	-	-	-	92
PLLA 15%	0.56 μ m	Esférica	-	-	$\geq 5^*$	
CoFe ₂ O ₄	35-55 nm	Heterogénea	60	0.55 kOe	-	55
CoFe ₂ O ₄ @AO	35-55 nm	Heterogénea	57	2.12 kOe	> 11	87
CoFe ₂ O ₄ @AO@SiO ₂ D	90 nm	Esférica	33	0.42 kOe	≥ 5	82
CoFe ₂ O ₄ @AO@PLLA 5%	84 μ m	Heterogénea	3.99	3.69 kOe	-	81
CoFe ₂ O ₄ @AO@PLLA 10%	703 μ m	Esférica	2.64	3.89 kOe	-	80
CoFe ₂ O ₄ @AO@PLLA 15%	1.27 μ m	Esférica	0.23	3.50 kOe	≥ 10	76
Fe ₃ O ₄ @AO	7.9 nm	Esférica	67	0.5 Oe	< 3 e ≥ 8	81
Fe ₃ O ₄ @AO@SiO ₂ D	110 nm	Esférica	34	0.7 Oe	> 5	74
Fe ₃ O ₄ @AO@SiO ₂ M	111 nm	Esférica	45	0.7 Oe	> 5	
Fe ₃ O ₄ @AO@PLLA 5%	0.47 μ m	Esférica	4.46	2.08 Oe	-	78
Fe ₃ O ₄ @AO@PLLA 10%	0.43 μ m	Esférica	3.99	2.61 Oe	≥ 9	77
Fe ₃ O ₄ @AO@PLLA 15%	0.94 μ m	Esférica	1.99	6.22 Oe	≥ 6	88

5. Conclusões e trabalhos futuros

Este capítulo destina-se a indicar as conclusões mais significativas do trabalho desenvolvido, apresentando ainda algumas perspetivas quanto a trabalhos futuros.

O objetivo principal deste trabalho incidiu na síntese de nanopartículas magnéticas e no seu revestimento, de modo a otimizar as suas características, visando a sua aplicação na biomedicina. Este trabalho teve então como base a produção de esferas de CoFe_2O_4 e Fe_3O_4 revestidas com SiO_2 ou PLLA.

Inicialmente foi realizado o processamento e respetiva caracterização de cada material de forma individual de modo a ser possível uma melhor compreensão das suas características. Deste modo, enquanto as nanopartículas de CoFe_2O_4 foram obtidas comercialmente, as de Fe_3O_4 foram sintetizadas por coprecipitação e apresentam uma morfologia esférica com um tamanho reduzido (~ 7.9 nm), estabilidade em solução numa elevada gama de pH, comportamento SPM (H_c de 0.5 kOe) e M_s elevada (67 emu.g⁻¹). Para além disso a sua boa viabilidade celular faz delas um bom candidato a aplicações *in vitro* e *in vivo*. Em ambos os casos, i.e., nanopartículas de CoFe_2O_4 e Fe_3O_4 , procedeu-se a uma pós-estabilização com AO. A utilização deste surfactante teve um efeito positivo tanto no aumento da estabilidade das nanopartículas em solução como na sua viabilidade celular. Além disso, o valor de magnetização de saturação manteve-se constante com apenas um ligeiro aumento da coercividade, explicado pela anisotropia do revestimento. Foram igualmente produzidas esferas de SiO_2 densas e mesoporosas adaptando o método de Stöber, sendo que as mesmas apresentam uma morfologia esférica, são estáveis em solução para valores de pH iguais ou superiores a 7 e apresentam boa viabilidade celular. As esferas de PLLA foram sintetizadas por microemulsão com diferentes frações volumétricas de PLLA de 5 %, 10 % e 15 %. Foram obtidas estruturas com morfologia esférica, tamanhos variados e boa viabilidade celular. Observou-se a existência de poros para uma fração volumétrica de PLLA de 15%, sendo a única amostra com estabilidade em solução para valores de pH iguais ou superiores a 5.

O revestimento das nanopartículas de CoFe_2O_4 @AO com SiO_2 densa foi bem sucedido. Foram obtidas estruturas com morfologia esférica, boa magnetização, baixa H_c e boa viabilidade celular, podendo assim ser aplicadas num variado leque de aplicações, incluindo *in vivo*. Já os resultados obtidos quanto as nanopartículas de CoFe_2O_4 @AO revestidas com PLLA permitiu concluir que a técnica de microemulsão apresenta limitações para a obtenção de esferas com propriedades adequadas e de forma eficiente e reprodutível. As únicas amostras que apresentam alguma potencialidade são as revestidas com PLLA 10 %, embora as mesmas possuam um tamanho elevado de aproximadamente 703 μm , impraticável para muitas aplicações.

As nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ foram revestidas com SiO_2 densa e mesoporosa, apresentando em ambos os casos um comportamento superparamagnético com morfologia esférica, estabilidade em solução para valores de pH acima de 5 e boa viabilidade celular. Por fim, neste caso, a técnica de microemulsão mostrou-se viável para o revestimento de nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ com PLLA, onde se obtiveram estruturas esféricas e uniformes. A fração volumétrica de PLLA mostrou ser um fator importante tendo impacto no tamanho, magnetização (embora continuando a exibir um comportamento superparamagnético) e estabilidade em solução. As nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ revestidas com PLLA com fração volumétrica de 10 % e 15 % demonstraram ser aquelas que apresentam melhores propriedades para aplicações biomédicas, devido a sua maior estabilidade em solução aquosa sendo este um dos fatores de maior importância para qualquer aplicação biomédica.

De um modo geral, estes resultados demonstram a viabilidade deste tipo de compósito com núcleo magnético para uso na biomedicina tanto *in vitro* como *in vivo*. No sentido de compreender melhor a potencialidade da aplicação destas estruturas, seria importante verificar o comportamento destas em diferentes situações mais específicas, funcionalizando-as e dotando-as de uma certa afinidade. Sendo depois testadas em diferentes áreas, como por exemplo, na libertação controlada e direcionada de fármacos ou até mesmo na microfluídica verificando a sua eficiência na captura e separação de biomoléculas específicas.

Bibliografia

1. Miller, M.M., G.A. Prinz, S.-F. Cheng, and S. Bounnak, *Detection of a micron-sized magnetic sphere using a ring-shaped anisotropic magnetoresistance-based sensor: A model for a magnetoresistance-based biosensor*. Applied Physics Letters, 2002. **81**(12): p. 2211-2213.
2. Safarik, I. and M. Safarikova, *Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides*. Biomagnetic Research and Technology, 2004. **2**: p. 7.
3. Neuberger, T., B. Schöpf, H. Hofmann, M. Hofmann, and B. von Rechenberg, *Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005. **293**(1): p. 483-496.
4. M.M.J. Modo and J.W.M. Bulte, *Molecular and Cellular MR Imaging*. 2007, Boca Raton, FL: CRC Press.
5. Sophie Laurent, Delphine Forge, Marc Port, Alain Roch, Caroline Robic, Luce Vander Elst, and R.N. Muller, *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications*. Chemical Reviews, 2008. **108**(6): p. 2064–2110.
6. Andrew H. Latham and M.E. Williams, *Controlling Transport and Chemical Functionality of Magnetic Nanoparticles*. Accounts of Chemical Research, 2007. **41**(3): p. 411-420.
7. Li, X., J. Wei, K.E. Aifantis, Y. Fan, Q. Feng, F.-Z. Cui, and F. Watari, *Current investigations into magnetic nanoparticles for biomedical applications*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2016. **104**(5): p. 1285-1296.
8. An-Hui Lu, E. L. Salabas, and F. Schüth, *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application*. Angewandte Chemie International Edition, 2007. **46**: p. 1222 – 1244.
9. Pankhurst, Q.A., J. Connolly, S.K. Jones, and J. Dobson, *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2003. **36**(13): p. R167.

10. Cardoso, V.F., S. Irusta, N. Navascues, and S. Lanceros-Mendez, *Comparative study of sol-gel methods for the facile synthesis of tailored magnetic silica spheres*. Materials Research Express, 2016. **3**(7): p. 075402.
11. Reddy, L.H., J.L. Arias, J. Nicolas, and P. Couvreur, *Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications*. Chemical Reviews, 2012. **112**(11): p. 5818-5878.
12. Tran, N. and T.J. Webster, *Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges*. Journal of Materials Chemistry, 2010. **20**(40): p. 8760-8767.
13. Gupta, A.K. and M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3995-4021.
14. Figuerola, A., R. Di Corato, L. Manna, and T. Pellegrino, *From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications*. Pharmacological Research, 2010. **62**(2): p. 126-143.
15. Kumfer, B.M., K. Shinoda, B. Jeyadevan, and I.M. Kennedy, *Gas-phase flame synthesis and properties of magnetic iron oxide nanoparticles with reduced oxidation state*. Journal of Aerosol Science, 2010. **41**(3): p. 257-265.
16. Shabanian, M., M. Khoobi, F. Hemati, H.A. Khonakdar, S.e.S. ebrahimi, U. Wagenknecht, and A. Shafiee, *New PLA/PEI-functionalized Fe₃O₄ nanocomposite: Preparation and characterization*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2015. **24**: p. 211-218.
17. Muriel K. Corbierre, Jean Beerens, and R.B. Lennox, *Gold Nanoparticles Generated by Electron Beam Lithography of Gold(I)-Thiolate Thin Films*. Chemical Materials, 2005. **17**: p. 5774-5779.
18. D. Soundararajan and K.H. Kim, *Synthesis of CoFe₂O₄ Magnetic Nanoparticles by Thermal Decomposition*. Journal of Magnetism, 2014. **19**(1): p. 5-9.
19. Lemine, O.M., K. Omri, B. Zhang, L. El Mir, M. Sajjedine, A. Alyamani, and M. Bououdina, *Sol-gel synthesis of 8 nm magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and their magnetic properties*. Superlattices and Microstructures, 2012. **52**(4): p. 793-799.
20. Song Ge, Xiangyang Shi, Kai Sun, Changpeng Li, Ctirad Uher, James R. Baker, Jr., Mark M. Banaszak Holl, and B.G. Orr, *Facile Hydrothermal Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Tunable Magnetic Properties*. The Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**: p. 13593-13599.

21. Masih, D., S. Frank, L. Joachim, R. Nathalie, S. Biplab, K. Werner, and W. Heiko, *Nanoscale size effect on surface spin canting in iron oxide nanoparticles synthesized by the microemulsion method*. Journal of Physics D: Applied Physics, 2012. **45**(19): p. 195001.
22. Oh, J.K. and J.M. Park, *Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical application*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**(1): p. 168-189.
23. M. Faraji, Y. Yamini, and M. Rezaee, *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications*. Journal of the Iranian Chemical Society, 2010. **7**(1): p. 1-37.
24. Jung, S., S. Lee, H. Lee, J. Yoon, and E.K. Lee, *Oleic acid-embedded nanoliposome as a selective tumoricidal agent*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016. **146**: p. 585-589.
25. Shinde, A.B., *Structural and Electrical Properties of Cobalt Ferrite Nanoparticles*. International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering, 2013. **3**(4): p. 64-67.
26. Kumar, L., P. Kumar, A. Narayan, and M. Kar, *Rietveld analysis of XRD patterns of different sizes of nanocrystalline cobalt ferrite*. International Nano Letters, 2013. **3**(1): p. 8.
27. Nlebedim, I.C., N. Ranvah, P.I. Williams, Y. Melikhov, J.E. Snyder, A.J. Moses, and D.C. Jiles, *Effect of heat treatment on the magnetic and magnetoelastic properties of cobalt ferrite*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2010. **322**(14): p. 1929-1933.
28. S. S. Shinde and K.M. Jadhav, *Bulk magnetic properties of cobalt ferrite doped with Si⁴⁺ ions*. Journal of Materials Science Letters, 1998. **17**: p. 849-851.
29. Mukta V. Limaye, Shashi B. Singh, Sadgopal K. Date, Deepti Kothari, V. Raghavendra Reddy, Ajay Gupta, Vasant Sathe, Ram Jane Choudhary, and S.K. Kulkarni, *High Coercivity of Oleic Acid Capped CoFe₂O₄ Nanoparticles at Room Temperature*. The Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**: p. 9070–9076.
30. López-Ortega, A., E. Lottini, C.d.J. Fernández, and C. Sangregorio, *Exploring the Magnetic Properties of Cobalt-Ferrite Nanoparticles for the Development of a Rare-Earth-Free Permanent Magnet*. Chemistry of materials, 2015. **27**: p. 4048–4056.
31. Rahman, M.T., M. Vargas, and C.V. Ramana, *Structural characteristics, electrical conduction and dielectric properties of gadolinium substituted cobalt ferrite*. Journal of Alloys and Compounds, 2014. **617**: p. 547-562.

32. R. M. Bozorth, Elizabeth F. Tilden, and A.J. Williams, *Anisotropy and Magnetostriction of Some Ferrites*. Physical Review, 1955. **99**(6): p. 1788-1798.
33. L. Stichauer, G. Gavoille, and Z. Simsa, *Optical and magneto-optical properties of nanocrystalline cobalt ferrite films*. Journal of Applied Physics, 1996. **79**(7): p. 3645-3650.
34. Torres, T.E., A.G. Roca, M.P. Morales, A. Ibarra, C. Marquina, M.R. Ibarra, and G.F. Goya, *Magnetic properties and energy absorption of CoFe₂O₄ nanoparticles for magnetic hyperthermia*. Journal of Physics: Conference Series, 2010. **200**(7): p. 072101.
35. Elvira Fantechi, et al., *A Smart Platform for Hyperthermia Application in Cancer Treatment: Cobalt-Doped Ferrite Nanoparticles Mineralized in Human Ferritin Cages*. ACS Nano, 2014. **8**(5): p. 4705–4719.
36. Jae-Hyun Lee, et al., *Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging*. Nature Medicine, 2007. **13**: p. 95-99.
37. Sugimoto, M., *The Past, Present, and Future of Ferrites*. Journal of American Ceramic Society, 1999. **82**(2): p. 269-280.
38. M. J. Carey, S. Maat, P. Rice, R. F. C. Farrow, R. F. Marks, A. Kellock, P. Nguyen, and B.A. Gurney, *Spin valves using insulating cobalt ferrite exchange-spring pinning layers*. Applied Physics Letters, 2002. **81**(6): p. 1044-1046.
39. Xiong, P., H. Huang, and X. Wang, *Design and synthesis of ternary cobalt ferrite/graphene/polyaniline hierarchical nanocomposites for high-performance supercapacitors*. Journal of Power Sources, 2014. **245**: p. 937-946.
40. Rajput, J.K. and G. Kaur, *Synthesis and applications of CoFe₂O₄ nanoparticles for multicomponent reactions*. Catalysis Science & Technology, 2014. **4**(1): p. 142-151.
41. Evangelos Hristoforou and A. Ktena, *Magnetostriction and magnetostrictive materials for sensing applications*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007. **316**: p. 372-378.
42. Correia, D.M., V. Sencadas, C. Ribeiro, P.M. Martins, P. Martins, F.M. Gama, G. Botelho, and S. Lanceros-Méndez, *Processing and size range separation of pristine and magnetic poly(l-lactic acid) based microspheres for biomedical applications*. Journal of Colloid and Interface Science, 2016. **476**: p. 79-86.
43. Yadavalli, T., H. Jain, G. Chandrasekharan, and R. Chennakesavulu, *Magnetic hyperthermia heating of cobalt ferrite nanoparticles prepared by low temperature ferrous sulfate based method*. AIP Advances, 2016. **6**(5): p. 055904.

44. R. M. Cornell and U. Schwertmann, *The iron oxides : structure, properties, reactions, occurrences, and uses*, ed. Weinheim. 2003: Wiley-VCH.
45. Xu, P., Z. Shen, B. Zhang, J. Wang, and R. Wu, *Synthesis and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as calcium-responsive MRI contrast agents*. Applied Surface Science, 2016. **389**: p. 560-566.
46. da Silva, D.G., S. Hiroshi Toma, F.M. de Melo, L.V.C. Carvalho, A. Magalhães, E. Sabadini, A.D. dos Santos, K. Araki, and e.H.E. Toma, *Direct synthesis of magnetite nanoparticles from iron(III) carboxymethylcellulose and their performance as NMR contrast agents*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2016. **397**: p. 28-32.
47. Soares, P.I.P., C.A.T. Laia, A. Carvalho, L.C.J. Pereira, J.T. Coutinho, I.M.M. Ferreira, C.M.M. Novo, and J.P. Borges, *Iron oxide nanoparticles stabilized with a bilayer of oleic acid for magnetic hyperthermia and MRI applications*. Applied Surface Science, 2016. **383**: p. 240-247.
48. Luong, T.T., S. Knoppe, M. Bloemen, W. Brullot, R. Strobbe, J.P. Locquet, and T. Verbiest, *Magneto-thermal release of payload from iron oxide/silica drug delivery agents*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2016. **416**: p. 194-199.
49. Lai, B.-H., C.-H. Chang, C.-C. Yeh, and D.-H. Chen, *Direct binding of Concanavalin A onto iron oxide nanoparticles for fast magnetic selective separation of lactoferrin*. Separation and Purification Technology, 2013. **108**: p. 83-88.
50. Sheng, W., W. Wei, J. Li, X. Qi, G. Zuo, Q. Chen, X. Pan, and W. Dong, *Amine-functionalized magnetic mesoporous silica nanoparticles for DNA separation*. Applied Surface Science, 2016. **387**: p. 1116-1124.
51. Park, J., N.R. Kadasala, S.A. Abouelmagd, M.A. Castanares, D.S. Collins, A. Wei, and Y. Yeo, *Polymer-iron oxide composite nanoparticles for EPR-independent drug delivery*. Biomaterials, 2016. **101**: p. 285-295.
52. Jonathan M. Zuidema, Christina Provenza, Tyler Caliendo, Silvio Dutz, and R.J. Gilbert, *Magnetic NGF-Releasing PLLA/Iron Oxide Nanoparticles Direct Extending Neurites and Preferentially Guide Neurites along Aligned Electrospun Microfiber*. American Chemical Society of Neuroscience, 2015. **6**(111781-1788).
53. Wei Wu, Zhaohui Wu, Taekyung Yu, C. Jiang, and W.-S. Kim, *Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications*. Science and Technology of Advanced Materials, 2015. **16**: p. 023501.

54. Nisha, S.K. and S.K. Asha, *Chiral poly(L-lactic acid) driven helical self-assembly of oligo(p-phenylenevinylene)*. Journal of Materials Chemistry C, 2014. **2**(11): p. 2051-2060.
55. Chen, A.-Z., L. Li, S.-B. Wang, X.-F. Lin, Y.-G. Liu, C. Zhao, G.-Y. Wang, and Z. Zhao, *Study of Fe₃O₄-PLLA-PEG-PLLA magnetic microspheres based on supercritical CO₂: Preparation, physicochemical characterization, and drug loading investigation*. The Journal of Supercritical Fluids, 2012. **67**: p. 139-148.
56. Schleich, N., et al., *Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded PLGA-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. **447**(1-2): p. 94-101.
57. Zhang, J., S. Chen, X. Tan, X. Zhong, D. Yuan, and Y. Cheng, *Highly sensitive electrochemiluminescence biosensors for cholesterol detection based on mesoporous magnetic core-shell microspheres*. Biotechnology Letters, 2014. **36**(9): p. 1835-1841.
58. Seo, M., I. Gorelikov, R. Williams, and N. Matsuura, *Microfluidic Assembly of Monodisperse, Nanoparticle-Incorporated Perfluorocarbon Microbubbles for Medical Imaging and Therapy*. Langmuir, 2010. **26**(17): p. 13855-13860.
59. Kooti, M., S. Saiahi, and H. Motamedi, *Fabrication of silver-coated cobalt ferrite nanocomposite and the study of its antibacterial activity*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2013. **333**: p. 138-143.
60. Di Guglielmo, C., D.R. López, J. De Lapuente, J.M.L. Mallafrè, and M.B. Suárez, *Embryotoxicity of cobalt ferrite and gold nanoparticles: A first in vitro approach*. Reproductive Toxicology, 2010. **30**(2): p. 271-276.
61. Slowing, I.I., J.L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, and V.S.Y. Lin, *Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(11): p. 1278-1288.
62. Supratim Giri, Brian G Trewyn, and V.S. Lin, *Mesoporous silica nanomaterial-based biotechnological and biomedical delivery systems*. Nanomedicine, 2007. **2**(1): p. 99-111.
63. Vinu A., Hossain K. Z., and A. K., *Recent advances in functionalization of mesoporous silica*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2005. **5**(3): p. 347-371.
64. Huang, S., C. Li, Z. Cheng, Y. Fan, P. Yang, C. Zhang, K. Yang, and J. Lin, *Magnetic Fe₃O₄@mesoporous silica composites for drug delivery and bioadsorption*. Journal of Colloid and Interface Science, 2012. **376**(1): p. 312-321.

65. An, J., X. Zhang, Q. Guo, Y. Zhao, Z. Wu, and C. Li, *Glycopolymers modified magnetic mesoporous silica nanoparticles for MR imaging and targeted drug delivery*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2015. **482**: p. 98-108.
66. Kim, B.C., et al., *Magnetic mesoporous materials for removal of environmental wastes*. *Journal of Hazardous Materials*, 2011. **192**(3): p. 1140-1147.
67. Fu Qingtao, He Tingting, Yu Lianqing, Liu Yongjun, Chai Yongming, and L. Chenguang, *Preparation and Application of Magnetic Core-shell Mesoporous Silica Microspheres*. *Progress in Chemistry*, 2010. **22**(06): p. 1116-1124.
68. Jian Liu, Shi Zhang Qiao, Qiu Hong Hu, and G.Q.M. Lu, *Magnetic nanocomposites with mesoporous structures: synthesis and applications*. *Small*, 2011. **7**(14): p. 425-443.
69. Knezevic, N.Z., E. Ruiz-Hernandez, W.E. Hennink, and M. Vallet-Regi, *Magnetic mesoporous silica-based core/shell nanoparticles for biomedical applications*. *RSC Advances*, 2013. **3**(25): p. 9584-9593.
70. Gao, J., X. Ran, C. Shi, H. Cheng, T. Cheng, and Y. Su, *One-step solvothermal synthesis of highly water-soluble, negatively charged superparamagnetic Fe₃O₄ colloidal nanocrystal clusters*. *Nanoscale*, 2013. **5**(15): p. 7026-7033.
71. J. Zhou, W. Wu, D. Caruntu, M. H. Yu, A. Martin, J. F. Chen, C. J. O'Connor, and W.L. Zhou, *Synthesis of Porous Magnetic Hollow Silica Nanospheres for Nanomedicine Application*. *The journal of Physical Chemistry C*, 2007. **111**: p. 17473-17477.
72. Won Hyuk Suh and K.S. Suslick, *Magnetic and Porous Nanospheres from Ultrasonic Spray Pyrolysis*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**: p. 12007-12010.
73. Abramson, S., W. Safrrou, B. Malezieux, V. Dupuis, S. Borensztajn, E. Briot, and A. Bée, *An eco-friendly route to magnetic silica microspheres and nanospheres*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011. **364**(2): p. 324-332.
74. Stöber, W., A. Fink, and E. Bohn, *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1968. **26**(1): p. 62-69.
75. Zhu, Y., T. Ikoma, N. Hanagata, and S. Kaskel, *Rattle-Type Fe₃O₄@SiO₂ Hollow Mesoporous Spheres as Carriers for Drug Delivery*. *Small*, 2010. **6**(3): p. 471-478.
76. Xuan, S.-h., et al., *Photocytotoxicity and Magnetic Relaxivity Responses of Dual-Porous γ -Fe₂O₃@meso-SiO₂ Microspheres*. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2012. **4**(4): p. 2033-2040.

77. Benelmekki, M., E. Xuriguera, C. Caparros, E. Rodríguez-Carmona, R. Mendoza, J.L. Corchero, S. Lancers-Mendez, and L.M. Martinez, *Design and characterization of Ni²⁺ and Co²⁺ decorated Porous Magnetic Silica spheres synthesized by hydrothermal-assisted modified-Stöber method for His-tagged proteins separation*. Journal of Colloid and Interface Science, 2012. **365**(1): p. 156-162.
78. Correia, D.M., R. Goncalves, C. Ribeiro, V. Sencadas, G. Botelho, J.L.G. Ribelles, and S. Lancers-Mendez, *Electrosprayed poly(vinylidene fluoride) microparticles for tissue engineering applications*. RSC Advances, 2014. **4**(62): p. 33013-33021.
79. Herrero-Vanrell, R., I. Bravo-Osuna, V. Andrés-Guerrero, M. Vicario-de-la-Torre, and I.T. Molina-Martinez, *The potential of using biodegradable microspheres in retinal diseases and other intraocular pathologies*. Progress in Retinal and Eye Research, 2014. **42**: p. 27-43.
80. Gao, Y., Y. Bai, D. Zhao, M.-W. Chang, Z. Ahmad, and J.-S. Li, *Tuning Microparticle Porosity during Single Needle Electrospraying Synthesis via a Non-Solvent-Based Physicochemical Approach*. Polymers, 2015. **7**(12): p. 2701–2710.
81. Goncalves, R., P. Martins, D.M. Correia, V. Sencadas, J.L. Vilas, L.M. Leon, G. Botelho, and S. Lancers-Mendez, *Development of magnetoelectric CoFe₂O₄ /poly(vinylidene fluoride) microspheres*. RSC Advances, 2015. **5**(45): p. 35852-35857.
82. Salvador A. Gómez-Lopera, José L. Arias, Visitación Gallardo, and Á.V. Delgado, *Colloidal Stability of Magnetite/Poly(lactic acid) Core/Shell Nanoparticles*. Langmuir, 2006. **22**: p. 2816-2821.
83. Rescignano, N., Y. González-Alfaro, E. Fantechi, M. Mannini, C. Innocenti, E. Ruiz-Hitzky, J.M. Kenny, and I. Armentano, *Design, development and characterization of a nanomagnetic system based on iron oxide nanoparticles encapsulated in PLLA-nanospheres*. European Polymer Journal, 2015. **62**: p. 145-154.
84. Yuanzhao Wu, Xi Yang, Xiaohui Yi, Yu Chen, Gang Liu, and R.-W. Li, *Magnetic Nanoparticle for Biomedicine Applications*. HSOA Journal of Nanotechnology: Nanomedicine & Nanobiotechnology, 2015. **2**(3): p. 100003.
85. M. Zubair Iqbal, Xuehua Ma, Tianxiang Chen, Ling'e Zhang, Wenzhi Ren, Lingchao Xiang, and A. Wu, *Silica Coated Super-paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONPs): A New Type Contrast Agent of T1 Magnetic Resonance Imaging (MRI)*. Journal of Materials Chemistry B, 2015. **3**: p. 5172–5181.

86. Ribeiro, C., V. Sencadas, D.M. Correia, and S. Lanceros-Méndez, *Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015. **136**: p. 46-55.
87. Hwang, J., E. Lee, J. Kim, Y. Seo, K.H. Lee, J.W. Hong, A.A. Gilad, H. Park, and J. Choi, *Effective delivery of immunosuppressive drug molecules by silica coated iron oxide nanoparticles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016. **142**: p. 290-296.
88. Rocha-Santos, T.A.P., *Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014. **62**: p. 28-36.
89. Aygar, G., M. Kaya, N. Özkan, S. Kocabiyik, and M. Volkan, *Preparation of silica coated cobalt ferrite magnetic nanoparticles for the purification of histidine-tagged proteins*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2015. **87**: p. 64-71.
90. Xiong, Z.-G., J.-P. Li, L. Tang, and Z.-Q. Chen, *A Novel Electrochemiluminescence Biosensor Based on Glucose Oxidase Immobilized on Magnetic Nanoparticles*. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010. **38**(6): p. 800-804.
91. Birgit Fischer, Leidong Mao, Mustafa Gungormus, Candan Tamerler, Mehmet Sarikaya, and H. Koser, *Ferro-microfluidic device for pathogen detection*. Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, 2008: p. 907-910.
92. Yang, H.-H., S.-Q. Zhang, X.-L. Chen, Z.-X. Zhuang, J.-G. Xu, and X.-R. Wang, *Magnetite-Containing Spherical Silica Nanoparticles for Biocatalysis and Bioseparations*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(5): p. 1316-1321.
93. Yen, S.K., P. Padmanabhan, and S.T. Selvan, *Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles for Diagnostics, Therapy and Macromolecule Delivery*. Theranostics, 2013. **3**(12): p. 986-1003.
94. Hu, F.X., K.G. Neoh, and E.T. Kang, *Synthesis and in vitro anti-cancer evaluation of tamoxifen-loaded magnetite/PLLA composite nanoparticles*. Biomaterials, 2006. **27**(33): p. 5725-5733.
95. Hwang, D.W., D.S. Lee, and S. Kim, *Gene Expression Profiles for Genotoxic Effects of Silica-Free and Silica-Coated Cobalt Ferrite Nanoparticles*. Journal of Nuclear Medicine, 2012. **53**(1): p. 106-112.
96. Nanostructured & Amorphous Materials, I.i.
<http://www.nanoamor.com/inc/sdetail/3968>.

97. Inkson, B.J., *2 - Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization*, in *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. 2016, Woodhead Publishing. p. 17-43.
98. Bandyopadhyay, A.K., *Nano Materials*. 2008: NewAge International.
99. Epp, J., *4 - X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization*, in *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. 2016, Woodhead Publishing. p. 81-124.
100. K. H. J. Buschow and F.R.d. Boer, *Physics of Magnetism and Magnetic Materials*. 2004: Kluwer Academic Publishers.
101. Louis-Philippe Carignan, Robert W. Cochrane, and D. Ménard, *Design of a compensated signal rod for low magnetic moment sample measurements with a vibrating sample magnetometer*. Review of Scientific Instruments, 2008. **79**: p. 035107.
102. *Zetasizer Nano Series User Manual*. Malvern Instruments Ltd., 2004.
103. Xu, R., *Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement*. Particuology 6, 2008: p. 112-115.
104. Bhattacharjee, S., *DLS and zeta potential –What they are and what they are not?* Journal of Controlled Release, 2016. **235**: p. 337–351.
105. Fan, H.Y., M. Nazari, G. Raval, Z. Khan, H. Patel, and H. Heerklotz, *Utilizing zeta potential measurements to study the effective charge, membrane partitioning, and membrane permeation of the lipopeptide surfactin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2014. **1838**(9): p. 2306-2312.
106. Pouya, E.S., H. Abolghasemi, H. Fatoorehchi, B. Rasem, and S.J. Hashemi, *Effect of dispersed hydrophilic silicon dioxide nanoparticles on batch adsorption of benzoic acid from aqueous solution using modified natural vermiculite: An equilibrium study*. Journal of Applied Research and Technology, 2016. **14**: p. 325–337.
107. Fang, J., X.-q. Shan, B. Wen, J.-m. Lin, X.-c. Lu, X.-d. Liu, and G. Owens, *Sorption and Desorption of Phenanthrene onto Iron, Copper, and Silicon Dioxide Nanoparticles*. Langmuir, 2008. **24**(19): p. 10929-10935.
108. Mathew, A.P., K. Oksman, and M. Sain, *The effect of morphology and chemical characteristics of cellulose reinforcements on the crystallinity of polylactic acid*. Journal of Applied Polymer Science, 2006. **101**(1): p. 300-310.

109. Kathuria, A., S. Al-Ghamdi, M.G. Abiad, and R. Auras, *The Influence of $Cu_3(BTC)_2$ metal organic framework on the permeability and perm-selectivity of PLLA-MOF mixed matrix membranes*. Journal of Applied Polymer Science, 2015. **132**(46): p. 42764.
110. Mascolo, C.M., Y. Pei, and A.T. Ring, *Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases*. Materials, 2013. **6**(12): p. 5549-5567.
111. Sun, J., S. Zhou, P. Hou, Y. Yang, J. Weng, X. Li, and M. Li, *Synthesis and characterization of biocompatible Fe_3O_4 nanoparticles*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007. **80A**(2): p. 333-341.