

Programa de Pós-Graduação em Física
Instituto de Física
Universidade de Brasília

LIZBET LEÓN FÉLIX

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA
COM E SEM RECOBRIMENTO DE OURO PARA APLICAÇÕES EM
HIPERTERMIA MAGNÉTICA**

Brasília
2017

LIZBET LÉON FÉLIX

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA
COM E SEM RECOBRIMENTO DE OURO PARA APLICAÇÕES EM
HIPERTERMIA MAGNÉTICA**

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Huamaní Coaquira

Co-orientador: Prof. Dr. Gerardo Fabián Goya Rossetti

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da
Universidade de Brasília, como parte dos requisitos à obtenção do grau de
Doutora em Física Experimental.

Brasília - DF, Julho de 2017

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L579s LEÓN FÉLIX, LIZBET
SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
MAGNETITA COM E SEM RECOBRIMENTO DE OURO PARA
APLICAÇÕES EM HIPERTERMIA MAGNÉTICA / LIZBET LEÓN FÉLIX;
orientador José Antonio Huamaní Coaquira; co
orientador Gerardo Fabián Goya Rossetti. --
Brasília, 2017.
133 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Física) --
Universidade de Brasília, 2017.

1. Nanopartículas de magnetita. 2. Nanopartículas
de ouro. 3. Estrutura núcleo/casca. 4.
Superparamagnetismo. 5. Hipertermia magnética. I.
Huamaní Coaquira, José Antonio, orient. II. Goya
Rossetti, Gerardo Fabián , co-orient. III. Título.

Dedicado esta tese à minha família, por acreditar em mim, especialmente a minha mãe Alicia Elvira que sempre me acompanha (*in memoriam*), meu pai Dante José e irmãos Cecibel, Josué e Dante David.

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as pessoas que fizeram possível este trabalho. Especialmente à minha família León Félix, que é sempre o meu motor e minha força para seguir avançando, sem ela não poderia ter chegado até onde cheguei. Este trabalho é dedicado especialmente à minha mãe Alicia Elvira Félix *in memoriam* e meu pai Dante José León, a meus irmãos Dante David, Josué Alexander e Cecibel María a quem amo muito, e a Carlos Sangüesa pela sua companhia e os lindos momentos compartilhados, fazendo minha estadia na Espanha mais tranquila.

Quero agradecer ao meu orientador, professor Dr. José A. H. Coaquira, pela confiança e orientação no desenvolvimento deste trabalho, assim como nas medidas e discussões que foram fundamentais para a construção da minha tese.

Agradeço também ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e à Universidade de Brasília pelo fornecimento da estrutura para a realização desta tese.

Gostaria de agradecer ao Dr. Gerardo Goya e a Dra. Beatriz Sanz pela orientação de meu trabalho durante meu estagio no Instituto de Nanociência de Aragón (INA) em Zaragoza, Espanha como parte do programa do Doutorado Sanduiche Financiado pela CAPES.

Aos amigos do Instituto de Física da UnB, Marco Rodriguez, Marcelo Parise, Ana Camilo, Kathusia, Abraham, Fermín, André, Vanessa P., Camila L., Marly, Ernesto, por sua ajuda e apoio, e aos Drs. Teobaldo Torres, Alfonso Ibarra e Rodrigo Pacheco do INA e demais colegas que proporcionaram um ambiente amigável durante meu estagio no INA e meus amigos do grupo *Soft Matter Nanotechnology* do Centro de Investigación Cooperativa em Biomateriales (CIC biomaGUNE). Aos professores da UnB, Dr. Marcelo H. Sousa, Dr. Paulo C. de Moraes e John Mantilla que contribuíram para a realização do presente trabalho. Ao Dr. L. de los Santos Valladaras e Dr. Crispin Barnes da Universidade de Cambridge pela sua colaboração e Dr. Sergio Moya do Centro do CICbiomaGUNE em San Sebastián, Espanha pela aceitação em seu grupo para continuar com minha pesquisa.

Termino agradecendo todas as pessoas que me ajudaram na finalização deste trabalho. A todas as Instituições que contribuíram no desenvolvimento da minha tese, como o Laboratório de Síntese de

Nanomateriais e Caracterização Magnética do Núcleo de Física Aplicado da UnB, Instituto de Nanociência de Aragón e BiomaGUNE.

RESUMO

Neste trabalho, é apresentado o estudo sobre a síntese e caracterização estrutural, morfológica e magnética, assim como testes de absorção de calor de nanopartículas (NPs) de magnetita (Fe_3O_4) com e sem recobrimento de ouro. Inicialmente, foram sintetizadas NPs de Fe_3O_4 por três métodos químicos: decomposição térmica, coprecipitação e hidrólise oxidativa. Os resultados de difração de raios-X (DRX) indicam a formação de NPs de Fe_3O_4 com diâmetros cristalinos médios de 6,2 nm, 10,1 nm e 18,5 nm, respectivamente. Estes resultados foram confirmados através da análise de imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET). O estudo detalhado das propriedades magnéticas indica que as NPs sintetizadas por coprecipitação e decomposição térmica mostraram comportamento superparamagnético governado por interações interpartículas, que são mais fortes para as nanopartículas sintetizadas por coprecipitação. As NPs sintetizadas por hidrólise oxidativa, mostraram comportamento ferromagnético na temperatura de 300 K. Nestas NPs observou-se a ocorrência de transição de Verwey em ~ 96 K. Experimentos de absorção de potência específica (AEP) realizados nas NPs, sintetizadas por decomposição térmica (6,2 nm de diâmetro), resultaram em AEP máximo de $69,5 \text{ Wg}^{-1}$ em temperatura de aquecimento de até 45°C .

Foi realizada a síntese de NPs com estrutura núcleo/casca de ouro/magnetita ($\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$) pelo método de decomposição térmica. Os resultados obtidos de MET revelaram a presença de um núcleo de Au de tamanho médio, $\langle d \rangle = (6,9 \pm 1,0)$ nm rodeado por uma casca de Fe_3O_4 com espessura média de $\approx 3,5$ nm. A formação da estrutura $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ foi confirmada por imagens de microscopia eletrônica de varredura por transmissão de campo escuro anular de alto ângulo. As propriedades magnéticas revelaram que a casca de Fe_3O_4 crescida sobre a superfície do núcleo de Au apresenta comportamento superparamagnético com uma temperatura de bloqueio de ~ 59 K. Verificou-se a presença de regiões magneticamente desordenadas localizadas na parte interna e externa da superfície da casca de Fe_3O_4 , cuja temperatura de congelamento é de $T \sim 40$ K, acima da qual o campo "Exchange bias" entre esta camada desordenada e a parte ordenada da casca de Fe_3O_4 desaparece.

Foram sintetizadas NPs de Fe_3O_4 recobertas com polietilanoimina (PEI) usando o método de hidrólise oxidativa. Estas NPs foram recobertas com NPs de Au ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$). A caracterização por MET revelou a formação de NPs de Au de $\langle d \rangle = (3,9 \pm 0,2)$ nm sobre a superfície das NPs de Fe_3O_4 cujo tamanho médio é de $\langle d \rangle = (49,2 \pm 3,5)$ nm. Este resultado foi confirmado por imagens de microscopia de campo escuro e por DRX. Foi constatado que a presença do Au na superfície não exerce influência nas propriedades magnética das NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$, e estas possuem comportamento ferromagnético a 300 K. Experimentos *in vitro* na linha celular BV2 revelou baixa toxicidade destas NPs em concentrações de até $100 \mu\text{g/mL}$. A captação celular revelou que as NPs se aderem à membrana celular, enquanto uma fração significativa agrega-se intracelularmente. Testes *in vitro* realizados para obter a eficiência do AEP das NPs em água e cultivo celular sob a

ação de um campo alternado foram bem-sucedidos. Além disso, viu-se que as NPs de Fe_3O_4 -PEI@Au mostraram pico de ressonância plasmônica em ~ 530 nm.

Abstract

In this work, the study on the synthesis and structural, morphological and magnetic characterization, as well as heat absorption tests of nanoparticles (NPs) of magnetite (Fe_3O_4) with and without gold coating are presented. Initially, Fe_3O_4 NPs were synthesized by three chemical methods: thermal decomposition, co-precipitation and oxidative hydrolysis. The results of X-ray diffraction (XRD) indicate the formation of Fe_3O_4 NPs with average crystalline diameters of 6.2, 10.1 and 18.5 nm, respectively. These results were confirmed by transmission electron microscopy (TEM) image analysis. The detailed study of the magnetic properties indicates that the NPs synthesized by coprecipitation and thermal decomposition show a superparamagnetic behavior governed by interparticle interactions, which are stronger for the nanoparticles synthesized by coprecipitation. The NPs synthesized by oxidative hydrolysis, showed a ferromagnetic behavior at 300 K. In these NPs, the occurrence of Verwey transition in ~ 96 K was observed. Specific power absorption (SPA) experiment performed in NPs synthesized by thermal decomposition (6.2 nm in diameter) provided a maximum SPA of 69.5 Wg^{-1} and a heating temperature of up to 45°C .

The synthesis of NPs with core/shell structure of gold/magnetite ($\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$) by the thermal decomposition method was performed. The results obtained from TEM revealed the presence of Au nucleus with a medium-sized $\langle d \rangle = (6.9 \pm 1.0)$ nm surrounded by a Fe_3O_4 shell with a mean thickness of ≈ 3.5 nm. The formation of the $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ structure was confirmed by scanning electron microscopy images by high angle annular dark field transmission. The magnetic properties revealed that the Fe_3O_4 shell grown on the surface of the Au core exhibited a superparamagnetic behavior with a blocking temperature of ~ 59 K. The occurrence of magnetically disordered regions located on the inside and outside of the surface of the shell of Fe_3O_4 , whose freezing temperature is $T \sim 40$ K, above which the "Exchange bias" field between this disordered layer and the ordered part of the Fe_3O_4 shell disappears.

Fe_3O_4 NPs coated with polyethylanimine (PEI) were synthesized using the oxidative hydrolysis method. These NPs were coated with Au NPs ($\text{PEI}-\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$). The characterization by TEM revealed the formation of Au NPs of $\langle d \rangle = (3.9 \pm 0.2)$ nm on the surface of the Fe_3O_4 NPs whose mean size is $\langle d \rangle = (49.2 \pm 3.5)$ nm. This result was confirmed by dark field imaging and XRD. It was determined that the presence of Au on the surface does not influence the magnetic properties of the $\text{PEI}-\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ NPs, which show a ferromagnetic behavior at 300 K. In vitro experiments in the BV2 cell line revealed a low toxicity of these NPs at concentrations up to $100 \mu\text{g}/\text{mL}$. Cellular uptake has revealed that NPs adhere to the cell membrane and a significant fraction is aggregated intracellularly. In vitro tests of the SPA efficiency of NPs in water and cell culture under the action of

an alternating field were successful. In addition, these PEI-Fe₃O₄@Au NPs were determined to show a resonant plasmon peak at ~ 530 nm.

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
CAPÍTULO I	14
INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO II	20
CONCEITOS FUNDAMENTAIS	20
2.1. Propriedades magnéticas	20
2.1.1 Ferromagnetismo	21
2.1.2 Superparamagnetismo	21
2.1.3 Curvas de magnetização de um sistema com distribuição de tamanho de partículas	26
2.1.4 Campo coercivo	28
2.1.5 Efeito de superfície na anisotropia	30
2.1.6 Interações interpartículas	30
2.1.7 Anisotropia de exchange em nanopartículas	32
2.2 Propriedades fundamentais da magnetite	34
2.3 Hipertermia	35
CAPÍTULO III	40
MATERIAIS, PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	40
3.1 Materiais	40
3.2 Procedimentos das sínteses das nanopartículas de magnetita	40
3.2.1 Co-precipitação	41
3.2.2 Decomposição térmica	41
3.2.3 Hidrólise oxidativa	42
3.3 Procedimento da síntese de nanopartículas Au/Fe ₃ O ₄	43
3.4 Procedimento da síntese de nanopartículas magnetita recobertas com NPs de ouro	44
3.5 Métodos de caracterizações	46
3.5.1 Difração de raios-X	46
3.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão	46

3.5.3 Caracterização magnética	48
3.5.4 Plasma de acoplamento indutivo	48
3.5.5 Medidas da absorção específica de potência	49
3.5.6 Espectroscopia UV-vis	50
3.5.7 Potencial zeta	50
3.5.8 Materiais para o estudo biológico	51
3.5.8.1 Cultivo celular	51
3.5.8.2 Ensaio de viabilidade celular	51
3.5.8.3 Absorção celular	52
3.5.8.4 Análises da distribuição das nanopartículas nas células usando sistema de duplo feixe de microscopia eletrônica de varredura/feixe de íons focalizados	52
CAPÍTULO IV	54
RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA	54
4.1.1 Estudo das nanopartículas de Fe ₃ O ₄ -PEI sintetizados pelo método de co-precipitação	54
4.1.1.1 Propriedades estruturais e morfológicas	54
4.1.1.2 Medidas de magnetização	57
4.1.1.3 Medidas de susceptibilidade AC	65
4.1.1.4 Testes de poder de absorção específico	67
4.1.2 Estudo das nanopartículas de Fe ₃ O ₄ sintetizados pelo método de decomposição térmica	70
4.1.2.1 Estudo estrutural e morfológico	70
4.1.2.2 Estudo das propriedades magnéticas DC	73
4.1.2.3 Susceptibilidade AC	77
4.1.3 Estudo das nanopartículas Fe ₃ O ₄ -PEI sintetizados pelo método de hidrólise oxidativa	79
4.1.3.1 Estudo estrutural e morfológico	79
4.1.3.2 Propriedades magnéticas	81
4.1.3.3 Susceptibilidade AC	84
4.2 PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E MAGNÉTICAS DE NANOPARTÍCULAS COM ESTRUTURA NÚCLEO/CASCA DE Au/Fe ₃ O ₄	89
4.2.1 Propriedades estruturais e morfológicas	89
4.2.2 Propriedades magnéticas	92
4.2.3 Susceptibilidade AC	97

4.3 DESENHO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DECORADAS COM OURO PARA HIPERtermia DUAL	100
4.3.1 Estudo morfológico e estrutural	100
4.3.2 Propriedades magnéticas	103
4.3.3 Teste de absorção específica de potência	106
4.3.4 Medidas UV-Vis	108
4.3.5 Estudo da viabilidade das células BV2 nas nanopartículas Fe ₃ O ₄ -PEI@Au	109
4.3.6 Testes da captação das nanopartículas pelas células BV2	109
4.3.7 Localização celular das nanopartículas Fe ₃ O ₄ -PEI@Au nas células	111
4.3.8 Caracterização do AEP em cultivo celular	114
CONCLUSÕES	118
TRABALHOS FUTUROS	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

As nanopartículas magnéticas são uma classe importante de materiais nano-estruturados que tem sido amplamente utilizado em aplicações tecnológicas, especialmente no campo da biomedicina, fundamentalmente na área de diagnóstico e terapia. Podemos destacar o uso das NPs no diagnóstico por imagem de ressonância magnética nuclear, tratamento por hipertermia magnética ou carreadores de fármacos a zonas específicas do organismo. Para tais aplicações, necessita-se de um controle na morfologia, tamanho e distribuição de tamanhos, estabilidade química, biocompatibilidade, propriedades magnéticas e capacidade de associar moléculas à sua superfície. Estas propriedades tornam-se importantes no momento de escolher a rota de síntese, etapa crucial do processo e que depende da aplicação desejada. Existem diferentes rotas de síntese de NPs, tais como co-precipitação, sol-gel, reação sonoquímica, decomposição térmica, hidrólises oxidativa, micromulsão dentre outros. Todos estes métodos apresentam vantagens e desvantagens para determinadas aplicações.

Relatos sobre rotas de síntese de NPs que visam evitar a aglomeração e garantir baixa polidispersão enfatizam as dificuldades encontradas na produção das NPs. No entanto, o método de co-precipitação química continua sendo um método simples e barato para produzir NPs [1] [2], contudo o método não oferece controle sobre a distribuição de tamanhos das NPs e nem na aglomeração. Já no método de decomposição térmica [3] as reações são obtidas em alta temperatura (até 320 °C) e se utiliza precursores metálicos na presença de surfactantes orgânicos. Estas condições parecem garantir a produção de nanopartículas monodispersas com morfologia controlada [4], podendo variar a temperatura da reação dos precursores que podem ser dispersos num solvente não polar ou fracamente polar, tal como hexano ou tolueno.

Por outro lado, o método de hidrólise oxidativa fornece NPs polidispersas com formas definidas, boa qualidade cristalina que são obtidas diretamente em meio aquoso [6] [7], o que

representa uma vantagem para a sua aplicação em sistemas biológicos, em comparação com partículas dispersas em meio hidrofóbico [8] [9]. As nanopartículas hidrofóbicas podem ser transformadas em hidrofílicas usando um surfactante bipolar (11-aminoundecanoato de tetrametilamônio), o que permite a obtenção das partículas em meio aquoso [4] [5]. De fato, a não toxicidade, estabilidade coloidal, solubilidade em meios aquosos e de fácil biodegradabilidade são pré-requisitos importantes para aplicações biomédicas *in vitro* e *in vivo*.

Sabe-se que a reatividade das NPs de óxido de ferro aumenta com a diminuição do tamanho e podem sofrer degradação quando expostas diretamente a certos meios. Para superar estas limitações é necessário recobrir as NPs produzindo nanoestruturas do tipo núcleo/casca (*core/shell*) nas quais o núcleo pode ser NPs de óxido de ferro e uma casca não magnética (diamagnética) de metais, polímeros, entre outros [10] [11]. A casca diamagnética não deve modificar notoriamente as propriedades magnéticas do núcleo, mas pode evitar processos de oxidação e pode ser usada como plataforma para a funcionalização [12]. Os recentes avanços em nanotecnologia estão focados no desenvolvimento e na fabricação de novos sistemas multicomponentes e multifuncionais nos quais a sua morfologia e suas propriedades inerentes mostram-se extremamente importantes para o melhoramento e ampliação na sua utilização em diferentes campos de aplicação como na nano medicina.

Para aplicações práticas em biomedicina exige-se que as partículas magnéticas possuam boa estabilidade química com um pH~7 [13]. Ou seja, a estabilidade coloidal do fluido depende da carga superficial o que possibilita a produção de novos materiais direcionados para a aplicação na administração de fármacos [14] [15] [16]. No geral, a escolha do recobrimento das NPs depende principalmente da biocompatibilidade, estabilidade coloidal e capacidade de funcionalizar. Também é necessário compreender o efeito deste recobrimento sobre as propriedades magnéticas e, em particular, a sua influência na dissipação de energia como na hipertermia magnética.

Um fator importante para as aplicações de hipertermia magnética é o aquecimento das NPs magnéticas, que é quantificado através da taxa de absorção específica de potência (AEP) em uma determinada faixa de frequências e campos magnéticos alternos aplicados. A capacidade de aumentar a temperatura local nos tecidos tumorais específicos, até um nível no qual a apoptose se inicia (~ 41- 45 °C, vários graus acima da temperatura fisiológica) pode facilitar a absorção de fármacos quimioterápicos através das membranas celulares para induzir o crescimento celular ou exercerem um efeito citotóxico [17].

A dissipação de calor gerado pelas NPs magnéticas para hipertermia também depende das características físico-químicas das NPs, propriedades magnéticas, tamanho, distribuição de tamanho, forma, viscosidade do meio, agente de revestimento, agregação das partículas, concentração de partículas. As condições de medida como o campo magnético alternado aplicado e a sua frequência devem ser toleráveis nos pacientes. Estes e outros parâmetros são fundamentais e devem ser considerados nas medidas do AEP [8] [18] para a produção eficiente de calor das NPs na aplicação de hipertermia [19] [20] [21] [22] [23] [24]. A vantagem de valores de AEP elevados é a redução do tempo de exposição e a possibilidade de um controle do calor na área afetada, reduzindo os danos aos tecidos saudáveis.

Porém um problema inevitável do uso das NPs magnéticas é a sua estabilidade intrínseca que se manifesta ao longo do tempo através da fácil oxidação em atmosfera ambiente, na qual o recobrimento com polímeros pode auxiliar. Entre os estabilizadores orgânicos (naturais ou sintéticos) mais utilizados estão o dextrano, quitosano, polietilenglicol, polivinilalcohol, poli(ácido acrílico) e os estabilizadores inorgânicos como sílica, metais, sulfetos, entre outros, que vem sendo utilizados para a funcionalização das nanopartículas. Entre os estabilizadores orgânicos sintéticos utilizados na funcionalização das NPs está o polímero poli(etilenoimina) (PEI) de fórmula estrutural $(-CH_2-NH-CH_2-)_n$, que apresenta grupos amina carregados positivamente, é solúvel em água e apresenta compatibilidade biológica [25]. Além disso, o PEI previne a agregação [26], evitando interações partícula-partícula, proporciona a estabilidade coloidal e facilitando a estabilização de espécies de carga negativa [27] [28] [29] [30].

Recentemente, a atenção tem se voltado para a sínteses de nanoestruturas magnéticas recobertas com ouro, devido ao fato de que estas estruturas apresentam boa funcionalidade, além de ressonância plasmônica vinda da superfície metálica [31] [32] [33]. Este é o principal mecanismo de resposta das propriedades ópticas das NPs de ouro, o que aumenta a funcionalidade destas nanoestruturas, tornando-as sistemas multifuncionais para aplicações biomédicas [34] [35] que envolvem a entrega e liberação de fármacos, imobilização de proteínas, agente de contraste na ressonância magnética [36] [37], ou como agente mediador de calor na terapia por hipertermia [38] [39] [40] [41].

Dentre as vantagens das NPs de ouro estão à estabilidade química que fornece proteção aos núcleos de óxido de ferro da oxidação, excelente biocompatibilidade, versatilidade na modificação

de superfície, capacidade de adsorção e boa condutividade elétrica [42], além da boa reatividade química com grupos tiolados [26] [43] e dissulfetos, proteínas/enzimas [44] [45] [46], oligonucleótidos e anticorpos [47] [48], mostrando bons resultados em estudos de adesão celular e a liberação de fármacos [17] [49]. O recobrimento de nanoestruturas magnéticas com NPs de ouro vem sendo amplamente empregado [36], mas ainda é difícil obter controle sobre a agregação de partículas, uniformidade e espessura da casca de ouro. Recentemente, algumas tentativas foram realizadas com a síntese de estruturas híbridas Fe₃O₄/Au [50] [51] utilizando um recobrimento polimérico como material biocompatível que proporciona boa estabilidade coloidal [8], magneto-manipulabilidade, é não tóxica e fornece funcionalidade.

O principal desafio para a combinação de hipertermia e quimioterapia é a baixa capacidade de transportar ou transferir fármacos devido ao revestimento superficial. Portanto, existe um grande interesse em elaborar nanoestruturas eficientes para a entrega de fármacos, juntamente com a hipertermia [39]. O desenvolvimento e aplicações destas nanoestruturas requer controle no tamanho das nanopartículas, forma e estabilidade, critérios que otimizam sua funcionalização.

Nanopartículas à base de óxido de ferro recobertas com polímeros e ouro, são os materiais mais favoráveis para aplicações de hipertermia no tratamento do câncer, devido à sua biocompatibilidade e baixa toxicidade conferindo benefícios no tratamento terapêutico que utiliza a capacidade de aquecimento das nanopartículas para aumentar a temperatura nos tecidos corporais, levando a mudanças na função das estruturas celulares e a morte celular [52]. Esses sistemas também podem ser acoplados a um sistema eficiente para a entrega de fármacos e terapia direcionada [24], tornando-os adequados para aplicações *in vivo* em terapia fototérmica e/ou usando campo magnético alternado que permita um controle fino na geração de calor na área selecionada.

Na Figura 1.1 é apresentado algumas das múltiplas possibilidades para funcionalizar a superfície das nanopartículas de magnetita recobertas com ouro. Já que o recobrimento com ouro tem afinidade com os grupos tióis, o que permite a funcionalização com moléculas específicas e fornece uma plataforma para ligações com oligonucleotídeos, anticorpos, fármacos, ligantes, moléculas, proteínas, etc.

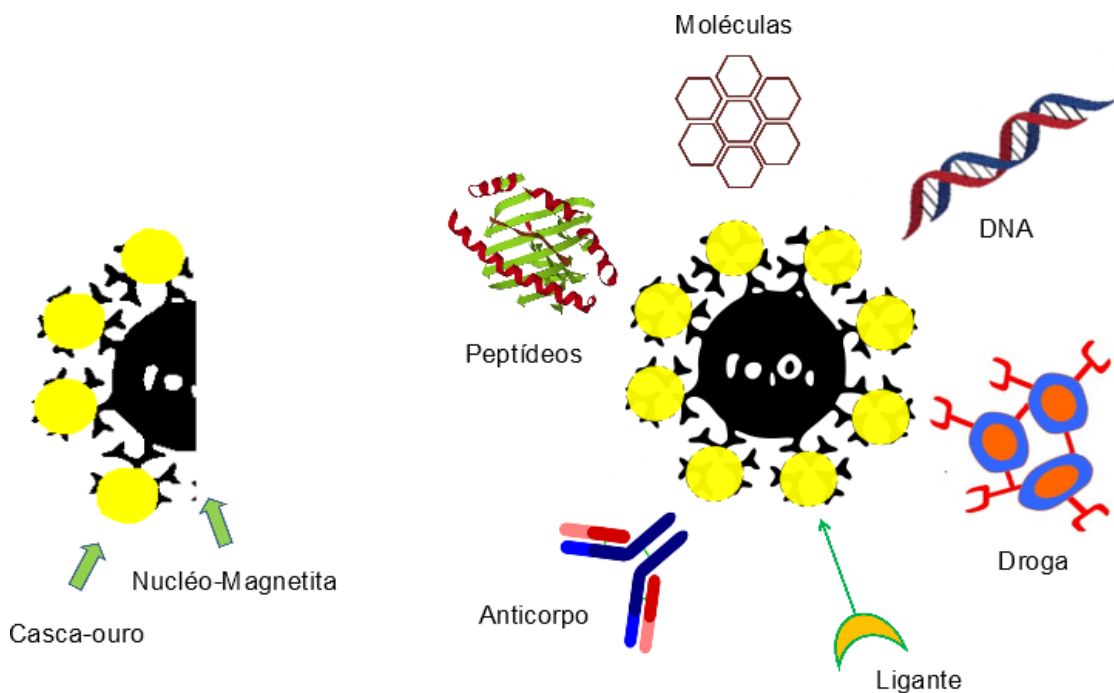


Figura 1.1 Representação esquemática das possíveis aplicações biomédicas das NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ na nanotecnologia.

Nos últimos anos, foi intensamente estudado o comportamento coletivo associado com interações interpartículas, dipolares e/ou de “exchange” em nanoestruturas magnéticas, estudo este que possui grande interesse devido ao seu potencial uso em válvulas de spin, junções de tunelamento magnético e dispositivo spintrônicos. Estudos que considerem propriedades magnetostáticas e magnetodinâmicas na interface de estrutura núcleo/casca de núcleos diamagnéticos e casca magnética ainda são muito escassos, como aqueles que dizem respeito ao acoplamento de troca entre duas regiões magnéticas diferentes, tal como uma camada superficial desordenada e um núcleo magneticamente ordenado que conduz a efeitos interessantes relacionados com a anisotropia de “Exchange”.

Uma vez que a região de interface entre o núcleo e a casca contém ligações quebradas e menor número de coordenação, gerando aleatoriedade nas interações de troca, esse efeito de desordem de spins na superfície torna-se mais forte à medida que o tamanho das NPs [53] [54] [55] é reduzido em consequência do aumento da razão superfície-volume. Considerando que as NPs com alta anisotropia apresentam efeitos de superfície mais fracos, espera-se que estas apresentem um efeito de “exchange bias” reduzido à medida que o tamanho diminui [56], reduzindo a complexidade da resposta magnética do sistema.

O efeito de “exchange bias” é refletido em um deslocamento da curva de histerese no processo de resfriamento em campo magnético aplicado [57] [58]. Além disso, trabalhos recentes relatam a ocorrência de “exchange bias” em sistemas de NPs núcleo/casca de Au/Fe₃O₄, que foi relacionado com a presença de uma camada que apresenta comportamento vidro de spin na superfície da partícula [59]. No entanto, em NPs magnéticos de fase única, esse efeito também tem sido atribuído à presença de spins desordenados na superfície [54] [60] [61]. A resposta magnética de nanoestruturas de multicomponentes depende de vários parâmetros, como da estrutura magnética na interface (spins não-compensados), efeitos de tamanho finito, morfologia e efeitos de superfície [62] [63]. A espessura da casca ou as diferenças de anisotropia magnética efetiva [64] são cruciais e determinam a intensidade do efeito “exchange bias” no sistema. A dependência térmica do campo de “exchange bias” pode fornecer pistas para determinar se a resposta magnética resulta de um efeito de tamanho finito ou está relacionada com a presença de uma camada superficial de spins desordenados [55].

Com o intuito de elucidar uma parte das questões em aberto sobre nanoestruturas magnéticas, neste trabalho será estudada a síntese e caracterização estrutural, morfológica e magnética de nanopartículas de Fe₃O₄ com e sem recobrimento de ouro. Primeiramente, apresentamos a síntese de NPs de Fe₃O₄ por três métodos químicos diferentes: co-precipitação, decomposição térmica e hidrólise oxidativa, nos quais o tamanho das NPs são controlados através do uso de surfactantes, a temperatura de trabalho e o método de síntese. Além disso, será estudada a síntese e caracterização de NPs com estrutura núcleo/casca de Au/Fe₃O₄ através do método de decomposição térmica. A influência do núcleo de ouro e a resposta magnética da casca magnética será estudada sistematicamente. E por fim será estudado o sistema de NPs sintetizadas por hidrólise oxidativa de Fe₃O₄ recobertas com poli(etilenoimina) (Fe₃O₄-PEI). Estas NPs serão adicionalmente recobertas com nanopartículas menores de Au (Fe₃O₄-PEI@Au), serão ainda realizados teste de citotoxicidade e absorção de potência visando aplicações em hipertermia magnética.

CAPÍTULO II

CONCEITOS FUNDAMENTAIS

2.1. Propriedades magnéticas

Estudaremos as principais propriedades de partículas magnéticas responsáveis por torná-las potencialmente importantes em aplicações tecnológicas. Estas são as propriedades estruturais, morfológicas e magnéticas que dependem fortemente de características como o tamanho, que afeta a magnetização de saturação, remanente, campo coercitivo e a anisotropia magnética, efeitos de superfície relacionados com a desordem de spins e os efeitos de interação que afetam a resposta magnética.

O comportamento magnético dos materiais pode ser explicado através da mecânica quântica e a propriedade do elétron conhecida como spin [65]. Um elétron possui dois tipos de momentos angulares: o momento de orbital e o momento de spin. Ambos podem interagir como qualquer par de dipolos e até produzir um acoplamento spin-orbital. Das características do acoplamento entre estes momentos magnéticos eletrônicos surgem as propriedades magnéticas dos átomos que compõem um material e como resposta a um campo magnético externo podemos ter o diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, etc. [66].

Estudaremos as propriedades magnéticas de partículas com domínio magnético único, onde as flutuações térmicas dominam os mecanismos de relaxação e o campo coercivo torna-se zero (superparamagnetismo), assim como a resposta magnética de partículas de tamanho grande, com múltiplos domínios magnéticos, que apresentam magnetização espontânea e histerese magnética (ferromagnetismo).

2.1.1 Ferromagnetismo

Os materiais ferromagnéticos apresentam momento magnético espontâneo em ausência de campo magnético. Estes materiais são formados por domínios magnéticos que quando um campo magnético externo é aplicado, exibem um ciclo de histerese em temperaturas abaixo da temperatura de Curie (T_C), (a magnética apresenta um $T_C \approx 858$ K). Acima desta temperatura, a agitação térmica destrói o alinhamento dos momentos magnéticos e o material exibe comportamento paramagnético. Num material ferromagnético, a magnetização aumenta com o aumento do campo magnético até atingir um valor de saturação, onde os momentos magnéticos tendem a se alinhar na mesma direção do campo aplicado. Ao remover o campo, os domínios magnéticos não retornam às suas orientações originais, o que causa uma magnetização remanente que só pode ser modificada aplicando-se um campo na direção oposta, conhecido como campo coercivo. A coercividade está estritamente relacionada com a constante de anisotropia magneto-cristalina que compõe a energia (energia de anisotropia) necessária para alterar a direção dos momentos magnéticos dos domínios, ou seja, mede a resistência de um material ferromagnético ser desmagnetizado.

Uma classe particular de materiais magnéticos são os ferrimagnéticos caracterizados pela existência de duas sub-redes, nas quais os momentos magnéticos estão orientados em direções opostas e vêm de elementos diferentes, ou íons diferentes (cargas diferentes). Um exemplo deste tipo de material é a magnetita que apresenta íons Fe^{2+} em um sub-rede e Fe^{3+} na outra. A magnetização total resultante vem da diferença entre a magnetização das duas sub-redes que não se anulam.

2.1.2 Superparamagnetismo

Com a diminuição do tamanho de um material ferromagnético, ocorre uma transição de multidomínio para um estado de um único domínio ou monodomínio. Quando o tamanho de uma partícula composta por átomos magnéticos é pequeno, a energia necessária para se dividir em domínios magnéticos é maior do que a energia necessária para permanecer como um único domínio magnético. No superparamagnetismo em um conjunto de nanopartículas monodomínio não interagentes magneticamente, considera-se que todos os momentos magnéticos atômicos (μ_{at}) giram coerentemente em cada partícula, o momento magnético da partícula é obtido somando o número total (N) de átomos que conformam a partícula e é dado por: $\mu = N\mu_{at}$. Por simplicidade, considerando uma anisotropia efetiva uniaxial, K , para o qual a barreira de energia que o momento da partícula precisa vencer é dada por: KV , onde V é o volume da partícula. Para uma partícula de

domínio único com anisotropia uniaxial e sob a ação de um campo magnético externo, H , a energia magnética pode ser dada por:

$$E = KV\text{sen}^2\theta - \mu H\text{cos}(\alpha - \theta) \quad (2.1)$$

Onde θ é o ângulo entre o momento magnético e o eixo fácil, α o ângulo entre campo aplicado e eixo fácil. A direção do momento magnético depende da anisotropia da própria partícula e do campo magnético externo, o qual caracteriza o eixo de fácil magnetização, que é uma direção preferencial na qual se orienta o vetor do momento magnético. Uma vez retirado o campo magnético, a magnetização segue o comportamento descrito por Néel [67]. Neste modelo após a retirada do campo magnético, a magnetização atinge o equilíbrio através de um processo de decaimento exponencial dado por:

$$M(t) = M_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.2)$$

Onde M é a magnetização total do sistema em função do tempo, M_0 é a magnetização inicial, t é o tempo transcorrido após retirar o campo magnético e τ é o tempo de relaxação. Para tempos de relaxação grandes, $M \rightarrow M_0$ e o sistema estão em equilíbrio.

A uma dada temperatura e em ausência de algum campo magnético, o momento magnético da partícula de domínio único, com interação fraca ou nula, a energia térmica força os momentos magnéticos flutuarem entre os mínimos separados pela barreira de energia e o tempo de relaxamento do momento magnético é dado por [66]:

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right) \quad (2.3)$$

Onde τ_0 é o tempo característico cujos valores se encontram em na faixa de 10^{-9} - 10^{-13} s [66] [68]. Para partículas de monodomínio, pode-se dizer que o regime superparamagnético é o resultado da flutuação térmica dos momentos das nanopartículas, onde $E_a = K_{\text{eff}}V$, representa a barreira de energia que é introduzida principalmente pela constante de anisotropia efetiva (K_{eff}) e o volume da partícula (V). Neste regime, a barreira de energia é facilmente superada pela energia térmica, $k_B T$, com k_B é a constante de Boltzmann, e T a temperatura. A anisotropia magnética descreve a dependência da energia interna na direção da magnetização espontânea. Esta anisotropia resulta na criação de fácil orientação, onde o vetor de magnetização total do sistema orienta-se ao longo do

eixo fácil de magnetização. As nanopartículas magnéticas de domínio único têm contribuições anisotrópicas na energia resultante em razão da sua forma (anisotropia de forma), estrutura cristalina (anisotropia magneto-cristalina), e efeitos de superfície.

A temperatura de bloqueio de uma partícula é determinada quando o tempo de medição do instrumento (τ_m) satisfaz $\tau = \tau_m$, e a energia térmica supera a barreira de energia da anisotropia, $k_B T \gg K_{eff} V$ (altas temperaturas ou partículas pequenas), tem-se então a flutuação aleatória da magnetização das partículas de domínio único, neste caso $\tau_m \gg \tau$, ou seja, a relaxação é bem mais rápida do que o tempo de medida, permitindo que o sistema atinja o equilíbrio termodinâmico e nestas condições o sistema comporta-se como um superparamagneto. Em baixas temperaturas, a magnetização de cada nanopartícula é orientada paralelamente a uma direção cristalográfica particular ou eixo fácil.; ou seja, $k_B T \ll K_{eff} V$, teremos que $\tau_m \ll \tau$, a relaxação é mais lenta que o tempo de medida e o momento magnético da partícula permanece no estado bloqueado. Neste estado, uma curva característica da magnetização em função do campo magnético apresentará histerese, já que a magnetização não consegue atingir o equilíbrio.

A temperatura que separa esses dois regimes é conhecida como temperatura de bloqueio (T_B), na qual $\tau_m = \tau$. Para um dado volume de partícula, temos que:

$$T_B \approx \frac{K_{eff} V}{k_B \ln(\tau_m / \tau_0)} . \quad (2.4)$$

Considerando que $\tau_m = 100$ s é o tempo característico para medidas de magnetização DC e $\tau_0 = 10^{-9}$ s, temos que $\ln(\tau_m / \tau_0) \sim 25$, observando que a temperatura de bloqueio é diretamente proporcional ao volume das partículas e à constante de anisotropia; ou seja, a temperatura de bloqueio é alta quando o volume da partícula é grande. Para temperaturas inferiores a T_B , os momentos magnéticos das partículas encontram-se bloqueados nos seus eixos de fácil magnetização por efeito da existência de barreiras de energia de anisotropia. A temperatura de bloqueio observada pode ser diferente em magnitude dependendo da técnica de medida utilizada. Acima da temperatura de bloqueio, a curva de magnetização de um conjunto de partículas superparamagnéticas é descrita pela função de Langevin.

Consideremos um conjunto de partículas a uma temperatura T , sob a ação de um campo magnético aplicado H , e em equilíbrio térmico. Em altas temperaturas, as partículas estão no estado superparamagnético ($KV \ll K_B T$) e podemos considerar apenas o segundo termo da Eq. (2.1).

Portanto, temos agora uma distribuição de partículas com momentos magnéticos relativos ao campo H , e cada momento magnético tem uma energia potencial, dada por

$$E_p = -\mu H \cos\theta \quad (2.5)$$

sendo θ o ângulo entre o momento magnético e campo magnético aplicado. Sabendo que a componente do vetor magnetização na direção do campo pode ser determinada estatisticamente e é dada por:

$$M = N\mu \left[\coth(x) - \frac{1}{x} \right] \quad (2.6)$$

com $x = \frac{\mu H}{k_B T}$, onde N é o número total de partículas, ou seja, a magnetização de saturação devido a N partículas com momento magnético μ é expressa como $M_s = N\mu$. Desta forma, a Eq. (2.6) pode ser escrita como:

$$M = M_s \mathcal{L} \left(\frac{\mu H}{k_B T} \right) \quad (2.7)$$

Onde $\mathcal{L} \left(\frac{\mu H}{k_B T} \right)$ é a função de Langevin dada por:

$$\mathcal{L} \left(\frac{\mu H}{k_B T} \right) = \coth \left(\frac{\mu H}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{\mu H} \quad (2.8)$$

Este comportamento sugere que o sistema é composto por partículas não-interagentes e monodispersas. Mas, em um sistema mais realístico tem-se um sistema com distribuição de tamanhos e, conseqüentemente, existirá uma distribuição de momentos magnéticos. Então, devemos considerar um modelo mais realista que inclui os efeitos da distribuição de tamanho de partícula usando a distribuição log-normal dada por:

$$f(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma d} \exp \left(-\frac{\ln^2(d/d_0)}{2 \sigma^2} \right) \quad (2.9)$$

Onde σ é a polidispersão de distribuição e d_0 é a mediana da distribuição. De igual forma, considerando os momentos magnéticos a distribuição log-normal de momentos magnéticos do sistema é dada por:

$$f(\mu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma \mu} \exp\left(-\frac{\ln^2(\mu/\mu_0)}{2 \sigma^2}\right) \quad (2.10)$$

Onde $f(\mu)$ é a distribuição de momentos magnéticos, μ_0 é a mediana do momento magnético e σ é a polidispersão. Incluindo $f(\mu)$, a magnetização total em função do campo de um conjunto de partículas (sistema polidisperso) pode ser dada por:

$$M(H, T) = \int_0^\infty \mu L\left(\frac{\mu H}{k_B T}\right) f(\mu) d\mu \quad (2.11)$$

O momento magnético, μ , de cada partícula está relacionado com o volume de partícula por $\mu = M_S V$. A função $f(\mu)d\mu$ é o número de partículas por unidade de volume da amostra com momentos magnéticos entre μ e $\mu + d\mu$ [69]. A relação de μ_0 com o momento magnético mais provável (μ_{\max}) é dada por:

$$\mu_{\max} = \mu_0 \exp(-\sigma^2)$$

Portanto, μ_{\max} corresponde ao máximo de $f(\mu)$. O μ_0 se relaciona com o momento magnético médio $\langle \mu \rangle$ através de [70]:

$$\langle \mu \rangle = \mu_0 \exp(\sigma^2/2)$$

Para obter o diâmetro da partícula, temos que

$$\mu_0 = M_S \frac{\pi}{6} d_0^3$$

$$\langle d \rangle = d_0 \exp\left(\frac{\sigma_d^2}{2}\right)$$

$$\sigma_\mu = 3 \sigma_d$$

De modo que a mediana e média do diâmetro da partícula podem ser obtidas por meio do ajuste dos dados experimentais usando a relação de Langevin.

2.1.3 Curvas de magnetização de um sistema com distribuição de tamanho de partículas

Na ausência de interações, as curvas zero-field-cooled (ZFC) e field-cooled (FC) em função da temperatura podem ser obtidas se assumirmos que o momento magnético da amostra resulta da superposição dos momentos magnéticos das partículas que estão no estado superparamagnético e no estado bloqueado. Esta superposição é governada pela distribuição de tamanhos. Sabendo que a susceptibilidade inicial é definida como o valor da derivada da magnetização em relação ao campo nas proximidades de $H \rightarrow 0$:

$$\chi_i = \left(\frac{dM}{dH} \right)_{H \rightarrow 0} \quad (2.12)$$

Em sistemas compostos por partículas idênticas no estado superparamagnético, a susceptibilidade inicial é obtida no limite de baixo campo da função de Langevin. Lembrando que $M_S = N\mu$, se obtém:

$$\chi_{SP} = \frac{M_S^2 V}{3k_B T} \quad (2.13)$$

No entanto, quando uma partícula se encontra no estado bloqueado e sob ação de um campo, o momento magnético alinha-se em uma direção intermediária à direção do campo e do eixo de anisotropia para minimizar a energia. Neste caso, a componente da magnetização da partícula ao longo da direção do campo é dada por:

$$M = M_S \cos(\alpha - \theta). \quad (2.14)$$

Podemos usar as Eqs. (2.12) e (2.14) para determinar a susceptibilidade inicial de uma partícula bloqueada:

$$\left(\frac{dM}{dH} \right)_{H \rightarrow 0} = \frac{M_S^2}{3 K_{eff}} \sin^2 \alpha. \quad (2.15)$$

Então a contribuição da susceptibilidade ZFC e FC das partículas no estado superparamagnético é obtida integrando-se a Eq.(2.13) na distribuição do volume:

$$\frac{M_S^2}{3 k_B T} \int_0^{V_{SP}} V f(V) dV$$

onde, $f(V)$ é a distribuição de volume, $f(V) dV$ é a fração de partículas com volume entre V e $V + dV$ e $V_{SP} = (25k_B T)/K_{eff}$ é o volume máximo que uma partícula pode ter, assumindo que esta encontra-se no estado superparamagnético, a uma temperatura T .

A contribuição das partículas à susceptibilidade FC é obtida substituindo T por $T_B = (K_{eff}V)/(25k_B)$ na Eq. (2.13) e integrando sobre a distribuição de volumes

$$\frac{25M_S^2 H}{3 K_{eff}} \int_{V_{SP}}^{\infty} f(V) dV,$$

e a contribuição à susceptibilidade ZFC é dada pela integral da Eq.(2.15)

$$\frac{M_S^2 H}{3 K_{eff}} \int_{V_{SP}}^{\infty} f(V) dV.$$

Agora podemos escrever as curvas de susceptibilidade ZFC e FC:

$$\chi_{ZFC} = \frac{M_S^2}{3k_B T} \int_0^{V_{SP}} V f(V) dV + \frac{M_S^2}{3 K_{eff}} \int_{V_{SP}}^{\infty} f(V) dV \quad (2.16)$$

$$\chi_{FC} = \frac{M_S^2}{3k_B T} \int_0^{V_{SP}} V f(V) dV + \frac{25M_S^2}{3 K_{eff}} \int_{V_{SP}}^{\infty} f(V) dV \quad (2.17)$$

A Eq.(2.4) permite associar a distribuição de volumes à função distribuição de temperaturas de bloqueio $f(T_B)$. Assumindo que $f(T_B)dT_B$ é a fração relativa de partículas com temperatura de bloqueio entre T_B e $T_B + dT_B$, podemos mostrar que:

$$\frac{V}{\langle V \rangle} = \frac{T_B}{\langle T_B \rangle}$$

Esta relação implica que $f(V)dV = f(T_B)dT_B$, logo permite substituir a integral sobre a distribuição de volumes por uma integral sobre a distribuição de temperaturas de bloqueio.

Experimentalmente, usando as curvas ZFC e FC podemos obter a distribuição da temperatura de bloqueio, que é dada por: $f(T_B) \sim -d(\chi_{FC} - \chi_{ZFC})/dT$ [71]. De modo geral, a distribuição de

temperaturas de bloqueio é modelada usando uma distribuição Log-normal de temperaturas de bloqueio:

$$f(T_B) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma_i T_B} \exp\left[-\frac{1}{2\sigma_i} \ln^2\left(\frac{T_B}{\langle T_{iB} \rangle}\right)\right]$$

Onde, $\langle T_{iB} \rangle$ é a média da temperatura de bloqueio, A é um fato de peso, e σ_i é o parâmetro da polidispersão [72].

Usando o modelo de partículas não-interagentes, neste caso, a susceptibilidade de ZFC é dada por [73]:

$$\chi_{ZFC}(T) = \frac{M_S^2}{3K_{eff}} \left[\text{Ln}\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right) \int_0^T \frac{T_B}{T} f(T_B) dT_B + \int_T^\infty f(T_B) dT_B \right] \quad (2.18)$$

De acordo com o mesmo modelo, a susceptibilidade FC é dada por [73]:

$$\chi_{FC}(T) = \frac{M_S^2}{3K_{eff}} \text{Ln}\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right) \left[\frac{1}{T} \int_0^T T_B f(T_B) dT_B + \int_T^\infty f(T_B) dT_B \right] \quad (2.19)$$

Numa dada temperatura T, o primeiro termo nas Eqs. (2.18) e (2.19) representa a contribuição das partículas no estado superparamagnético e o segundo termo refere-se à contribuição de partículas no estado bloqueado [72].

2.1.4 Campo coercivo

A fim de sondar os efeitos da distribuição de tamanho de partícula e/ou interações partícula-partícula, faz-se necessário realizar medidas sistemáticas da magnetização em função do campo aplicado, M vs. H, em várias temperaturas. Por meio dessas medidas, podemos obter o campo coercivo dependente da temperatura, cujo comportamento pode ser atribuído à distribuição de tamanho de partículas e/ou efeito de interações. Nunes *et al.* propuseram um modelo alternativo que considera o efeito da distribuição de tamanho de partícula para explicar o comportamento térmico do campo coercivo e também a coexistência de estados de partículas bloqueadas e superparamagnéticas [72]. Neste caso, a dependência do campo coercivo em função da temperatura é dada por:

$$\langle H_C \rangle_T = \frac{M_r(T)}{\chi_s + \frac{M_r(T)}{H_{CB}(T)}} \quad (2.20)$$

Onde, $M_r(T)$ é a magnetização de remanência que depende da temperatura, $\chi_s(T)$ é a susceptibilidade da partícula superparamagnética em uma determinada temperatura, e $H_{CB}(T)$ o campo coercivo das partículas bloqueadas. A magnetização de remanência está relacionada com T_B , de acordo com a seguinte relação

$$M_r(T) = \alpha M_s \int_T^\infty f(T_B) dT_B,$$

onde α é o parâmetro que depende do grau de anisotropia magnética da partícula [74].

A susceptibilidade superparamagnética, χ_s , para um sistema com uma distribuição de tamanho de partícula pode ser calculada [75] através da relação abaixo:

$$\chi_s = \frac{25M_s}{3K_{eff}T} \int_0^T T_B f(T_B) dT_B,$$

Por outro lado, considerando-se que para um sistema onde a distribuição de tamanhos de partículas corresponde a uma distribuição de T_B e levando em conta somente partículas bloqueadas, onde $T < T_B$ e anisotropia orientada aleatoriamente, o campo coercivo é expresso:

$$H_{CB}(T) = H_C \left[1 - \sqrt{\frac{T}{\langle T_B \rangle_T}} \right], \quad (2.21)$$

onde, $H_C(0) = 2\alpha K_{eff}/M_s$ é o campo coercivo em $T = 0K$ e $\alpha = 0,48$ e $\langle T_B \rangle_T$ considera apenas a fração volumétrica de partículas bloqueadas à temperatura T , definida como $\langle T_B \rangle_T = \frac{\int_T^\infty T_B f(T_B) dT_B}{\int_T^\infty f(T_B) dT_B}$.

Nunes *et al.* propõe que o efeito de aleatoriedade das interações pode ser descrito pelo parâmetro γ , que é um parâmetro empírico usado em $f(\gamma T_B)$ [75].

Como discutido acima, nanopartículas superparamagnéticas são por definição isoladas onde as interações magnéticas interpartículas são desprezíveis. Sabe-se que as nanopartículas magnéticas apresentam propriedades únicas e podem ser fortemente modificadas pelas interações entre as partículas.

2.1.5 Efeito de superfície na anisotropia

Quando o tamanho das partículas diminuiu, a energia de superficial se torna importante devido aos efeitos de superfície. A desordem superficial das partículas afeta o comportamento magnético, esse fato foi observado em medidas de magnetização em altas temperaturas nas curvas de M vs, existe ainda ausência de saturação revelando um comportamento linear com o campo que é atribuído a efeitos de superfície. A anisotropia de superfície é causada pela quebra de simetria cristalina e a redução do número de coordenação na superfície das partículas. Uma aproximação simples, no qual a energia de barreira pode ser escrita como: $\Delta E = K_{\text{eff}}V = K_V V + K_S S$, para uma partícula com simetria esférica, com $V = \pi D^3/6$ e $S = \pi D^2$, tem sido usada na contribuição da anisotropia efetiva que considera a contribuição de anisotropia por unidade de volume e superfície de uma partícula e é expressa como:

$$K_{\text{eff}} = K_V + \frac{6}{\langle D \rangle} K_S. \quad (2.22)$$

Onde K_{eff} é uma anisotropia efetiva que representa a altura da barreira de energia por unidade de volume que bloqueia a direção de orientação da magnetização de partículas, K_V e K_S são constantes da energia de anisotropia de volume e superfície, respectivamente [76] [77]. No geral, K_{eff} é assumida como independente de tamanho de partícula.

2.1.6 Interações interpartículas

Em um sistema real de partículas existem diferentes tipos de interações que varia com a concentração do volume do material e pode ter uma influência significativa nas propriedades estáticas e dinâmicas das nanopartículas. Os principais tipos de interações interpartículas podem ter várias origens e podem existir simultaneamente tornando o problema mais complicado. A energia total, E_{tot} , de um ferromagneto *bulk* é minimizada pela formação de domínios magnéticos e resulta da soma das contribuições dos termos de energia magnetostática, exchange, anisotrópica e de energia de Zeeman [144],

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{ani}} + E_H + E_{\text{ex}} + E_{d-d} \quad (2.23)$$

Onde a energia de anisotropia, E_{ani} , energia de Zeeman, E_H , energia de exchange, E_{ex} , e a energia de interação dipolar, E_{d-d} , contribuem para a energia total do sistema.

A energia térmica define a escala para comparar todas as estas energias, e por isso as energias são por vezes expressas em termos de uma temperatura equivalente. Na ausência de um campo magnético aplicado, a direção do momento é determinada pela anisotropia (E_{ani}), que para um volume determinado é dada por $E_{ani} = KV$. Diferentes tipos de anisotropia podem estar presentes, por exemplo, a anisotropia magnetocristalina que favorece a orientação da magnetização ao longo de uma direção cristalográfica particular. A anisotropia de forma favorece a magnetização dentro do plano de uma película fina, ou ao longo do eixo maior de um elipsoide [78]. Quando os momentos magnéticos atômicos são colocados em um campo externo aplicado, há uma energia Zeeman $E_H = \vec{\mu} \cdot \vec{H}$.

Para um sistema de nanopartículas de um só domínio, os momentos magnéticos podem interagir uns com os outros através da interação de troca que acontece na superfície das partículas que estão em contato direto. Num sistema onde as partículas se encontram separadas esta interação é desprezível. Outros tipos de interações entre partículas são as interações dipolares que atuam a uma distância maior que as interações de troca e não são desprezíveis. Interações de troca desempenham papel importante na ordem magnética de curto alcance, diferentemente das interações dipolares [78], que também tem forte influência na orientação dos spins [79].

Pode-se estimar a ordem de magnitude da interação dipolar para um sistema de partículas de monodomínio distribuídas aleatoriamente. Consideremos duas partículas com momento magnético médio, μ , e uma separação média, r , a energia de interação dipolar é dada por [80] [81] [82] [83] [84]:

$$E_{d-d} = -\frac{\mu_0 \mu^2}{4\pi r^3} \quad (2.24)$$

onde μ_0 representa a permeabilidade do vácuo. Esta interação é de longo alcance e de natureza anisotrópica. De acordo com a Eq. (2.24), verifica-se que a intensidade dessa interação depende muito da separação entre as partículas. O aumento da separação reduz a intensidade das interações dipolares conduzindo, à diminuição da barreira de energia efetiva modificada pelos efeitos de interação. Em sistemas superparamagnéticos ideais não existem interações, mas em um sistema real com altas concentrações de nanopartículas magnéticas, as interações de dipolo magnético não podem ser desprezíveis e podem ser quantificadas pela temperatura crítica T' , dada por:

$$T' \approx \frac{E_{d-d}}{k_B} \quad (2.25)$$

Nesta temperatura, a energia dipolar é equivalente à energia térmica, o que proporciona uma estimativa das interações.

A intensidade destas interações pode ser enfraquecida com o revestimento das partículas ou alterando a concentração das partículas no fluido magnético. Também é importante ter uma distribuição estreita de tamanhos, já que uma distribuição de tamanhos implica em uma distribuição dos tempos de relaxação das partículas isoladas [85].

As propriedades dinâmicas para um sistema de nanopartículas superparamagnéticas não interagentes com simetria uniaxial são descritas no modelo de Néel. Mas, quando as interações interpartículas não poder ser mais desprezíveis, as propriedades dinâmicas do sistema mudam e o tempo de relaxação diverge em uma temperatura finita e, neste caso, é utilizada a lei fenomenológica de Vogel-Fulcher que leva em conta as interações, na qual o tempo de relaxação é dado por [86]:

$$\tau = \tau_0 \exp \left[\frac{E_a}{k_B(T_{\max} - T_0)} \right] \quad (2.26)$$

2.1.7 Anisotropia de exchange em nanopartículas

Um dos fenômenos interessantes observado em nanopartículas magnéticas com estrutura núcleo/casca é o efeito de “exchange bias”, este efeito resulta da interação da camada superficial desordenada das partículas e o núcleo ferromagnético. Em algumas nanopartículas ferromagnéticas, a superfície do metal normalmente oxida no ar e forma uma casca de óxido metálico em torno do núcleo do metal ferromagnético [87]. Pelo qual, se terá o acoplamento de interface entre dois tipos de população com diferentes ordenamentos de spins, com características de um núcleo de spin ordenado e uma superfície de spin desordenada. Na interface, os spins do núcleo exercem um torque nos spins da superfície para fixá-los na sua posição original, sendo necessário um campo magnético (ou temperatura) para reverter completamente à camada [88], causando um deslocamento do laço de histerese ao longo do eixo dos campos magnéticos. Isto decorre principalmente da existência de momentos não compensados fixados na interface núcleo

/casca tornando-se que são significativos na determinação do campo de Exchange bias (H_{EX}) [89]. A origem do comportamento físico do H_{EX} não é clara.

No entanto, a principal indicação da existência do H_{EX} é observada no deslocamento dos laços de histerese após o resfriamento de campo. Este fenômeno depende basicamente de interações na interface entre materiais de diferentes anisotropias, isto requer que a anisotropia da casca seja muito maior com relação à do núcleo [90]. Além disso, outros efeitos de superfície incluindo, efeito de tamanho finito [91], a quebra de simetria superficial, redução do número de coordenação, rugosidade e interações entre partículas acompanham a observação na mudança dos laços de histerese. A desordem de spins na superfície causa, por exemplo, a redução na magnetização de saturação e o aumento na coercividade com a diminuição do tamanho de partículas. O mais usual é o aumento do campo coercivo após resfriamento de campo, quando a anisotropia da casca é menor em comparação com o acoplamento de troca dos spins no núcleo. Isto faz com que os spins na superfície das nanopartículas não sigam a direção da anisotropia do núcleo e tornam-se desordenadas levando a uma anisotropia ainda mais elevada em comparação com o núcleo das nanopartículas, tornando possível que exista um H_{EX} .

O H_{EX} pode aumentar com a redução do tamanho da partícula [87]. Em fluídos, a distância entre partículas é suficientemente grande, sendo assim as interações dipolares se tornam insignificantes e podemos considerar que o H_{EX} é puramente intrínseco. Como foram reportados, em dispersões coloidais congeladas ao aumentar a concentração das NPs revelam o papel da interação dipolar no H_{EX} é significativo, resultando em uma redução de H_{EX} . O H_{EX} aumenta ao aumentar-se o campo de resfriamento em consequência do aumento das rotações do núcleo durante o congelamento, verificou-se que acima de um certo valor de campo, há diminuição do H_{EX} . De fato, a presença de um máximo nas variações de H_{EX} é normalmente considerada como um limiar efetivo de depuração, acima do qual as interações magnéticas são superadas pelo acoplamento Zeeman. O acoplamento Zeeman entre o campo de resfriamento e os spins da superfície supera as interações magnéticas dentro da partícula e o H_{EX} diminui [92].

Podemos determinar o H_{EX} de: $H_{EX} = \frac{1}{2}(H_C^+ + H_C^-)$, onde H_C^+ e H_C^- são os pontos onde o laço intercepta o eixo do campo.

O modelo de campo aleatório de anisotropia exchange desenvolvido para o estudo de multicamadas ferro/antiferromagnético [93][94], foi usado para avaliar a espessura da camada de

spins desordenados em nanopartículas de γ -Fe₂O₃ [54]. No entanto, uma dependência térmica não foi considerada no H_{EX}. Contudo, usando o modelo de campo aleatório [95], o campo de anisotropia exchange está relacionado com anisotropia magnética por:

$$H_{EX} = \Lambda K_{eff}^{1/2}, \quad (2.27)$$

Onde Λ é um parâmetro relacionado a magnetização e o espessura da camada FM, e K_{eff} é anisotropia magnética efetiva. À medida que a temperatura aumenta, a energia anisotrópica uniaxial da fase AFM e o acoplamento da interface FM/AFM diminuem, levando à diminuição de H_{EX}, já que a ordem AFM será diminuída devido às flutuações térmicas, o que resulta no enfraquecimento da interação interfacial e reduz o deslocamento do laço ao longo da direção do campo.

Com base na teoria clássica de Zener sobre o efeito da temperatura na anisotropia magnética fornece uma relação entre a magnetização M e a constante de anisotropia do primer ordem K₁ na forma $\frac{K_1(T)}{K_1(0)} = \left[\frac{M(T)}{M(0)}\right]^n$, com n que depende da correlação da rotação [96]. Considerando K_{eff} dependente da temperatura, podemos usar a relação empírica Brukhatov-Kirensky [143], $K_1(T) = K_1(0)\exp[-\alpha T^2]$. A dependência térmica de H_{EX} toma a forma

$$H_{EX}(T) = \Lambda K_{eff}^{\frac{1}{2}} = H_{EX}(0)e^{-BT} \quad (2.28)$$

com H_{ex}(0)= $\Lambda K_1(0)$ é o campo de exchange bias em T=0 e B é uma constante.

2.2 Propriedades fundamentais da magnetite

A magnetita (Fe²⁺(Fe³⁺)₂O₄) exibe estrutura cristalina de espinélio inversa à temperatura ambiente com uma célula unitária constituída por 8 unidades cúbicas e constante de rede igual a 8,396 Å [97]. Cada célula unitária contém 56 átomos, incluindo 32 átomos de oxigênio, 16 íons Fe³⁺ e 8 íons Fe²⁺ localizada em dois sítios cristalográficos diferentes: octaédricos e tetraédricos. Existem 32 sítios octaédricos (sítio B) e 64 tetraédricos (sítio A) na célula unitária. Por esta razão, a célula unitária da magnetita pode ser representada pela fórmula (Fe³⁺)_A[Fe³⁺ Fe²⁺]_BO₄, para um espinélio inverso e (Fe²⁺)_A[Fe³⁺ Fe³⁺]_BO₄, para um espinélio normal. Isto significa que no espinélio inverso, os íons de Fe³⁺ são distribuídos entre 16 sítios da célula unitária, isto é, o íon trivalente ocupa tanto o sítio tetraédrico quanto o octaédrico [88]. Sabe-se que a magnetita não-estequiométrica contém

deficiência de cátions Fe^{2+} , enquanto a magnetita estequiométrica apresenta uma razão molar de $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}= 1:2$.

A magnetita mostra ordem ferromagnética abaixo de $T_N \approx 860$ K. Os íons Fe^{3+} e Fe^{2+} nos sítios octaédricos são acoplados ferromagneticamente através do mecanismo de troca dupla. Um elétron neste sítio pode ser trocado entre dois locais octaédricos [98]. Por outro lado, os íons Fe^{3+} em locais tetraédricos e octaédricos são acoplados antiferromagneticamente através do átomo de oxigênio, produzindo magnetização nula no sub-rede de Fe^{3+} .

Os valores da magnetização de saturação à temperatura ambiente da magnetita *bulk* estão na faixa ~ 82 -90 emu/g, outro parâmetro importante é constante de anisotropia que encontra-se na faixa de $1,1 - 1,35 \times 10^4$ J/m³. Além disso, uma transição estrutural/magnética de primeira ordem conhecida como a temperatura de transição de Verwey, T_V , é muito sensível à estequiometria e ocorre em $T_V \sim 120$ K na magnetita *bulk*. Acima desta temperatura, a carga do elétron flutua entre os Fe^{2+} e Fe^{3+} nos sítios octaédricos, que leva a condutividade moderada de acima de $0,01\Omega$ à temperatura ambiente. Abaixo de T_V , a resistividade aumenta em 2 ordens. Verwey explicou este efeito baseado na ordem de carga no subsistema: íons Fe^{2+} ao longo da direção [110] e Fe^{3+} ao longo [1-10] [99]. Foi relatado que a T_V em sistemas de nanopartículas se desloca para temperaturas menores a ~ 120 K [98].

2.3 Hipertermia

Hipertermia magnética utiliza nanopartículas magnéticas como agentes de aquecimento para elevar a temperatura no tecido celular no tratamento do câncer. Espera-se que estas nanopartículas sejam suspensões coloidais estáveis e livre de toxicidade. É essencial que as partículas tenham alta capacidade de dissipação de potência, que não se precipitem com a gravidade ou por força eletrostática, e que se tenha um controle adequado sobre a homogeneidade da distribuição da temperatura na região tratada.

Durante um tratamento, ocorre o aquecimento das nanopartículas estrategicamente colocadas no tecido, onde as NPs absorvem energia do campo magnético AC e logo é transformada em calor, provocando o aumento da temperatura nas células cancerígenas, que compreende uma faixa de 41-46 °C [13] [100], danificando completamente as células tumorais sem destruir o tecido saudável, pois sabe-se que o aquecimento acima de 46 °C pode induzir a morte celular. O calor gerado pelas

partículas deve ser suficiente para manter a temperatura nos tecidos acima do limiar terapêutico de 42 °C por um tempo de cerca de 30 min , para que o câncer seja destruído [101].

A capacidade de um material gerar calor sob a ação de um campo magnético alternado é quantificado através da AEP pelas nanopartículas magnéticas. As propriedades magnéticas dos coloides preparados são diferentes no ambiente intracelular. Os parâmetros que afetam a eficiência de aquecimento são a viscosidade, constante dielétrica, hidrofobicidade, a anisotropia magnética e as interações dipolares que devido à aglomeração intracelular são a principal causa de alterações na dinâmica de relaxamento magnético das NPs *in vitro* [102]. Isto demonstra que é um desafio aperfeiçoar e manter a eficiência de aquecimento no ambiente celular em terapia por hipertermia.

Em hipertermia magnética, os principais mecanismos de aquecimento em um ferrofluido sob a ação de um campo magnético AC são: perda por histereses, relaxação e corrente Eddy (Foucault) [103]. Estas são as principais contribuições para a taxa de absorção específica em partículas magnéticas e a contribuição de cada é fortemente dependente do tamanho, forma, anisotropia cristalina, grau de agregação das nanopartículas ou raio hidrodinâmico, viscosidade do solvente, intensidade do campo magnético aplicado e a frequência. Estudos sobre o incremento da concentração de nanopartículas indicam uma diminuição no tempo de relaxação.

O mecanismo de aquecimento induzido por perda de histerese é devido ao processo de magnetização irreversível em um campo magnético AC. Em partículas ferromagnéticas com multi-domínios, esta perda permite o aquecimento induzido magneticamente e é dado por [104]:

$$P_{FM} = \mu_0 f \oint H dM,$$

onde μ_0 é a permeabilidade magnética do espaço livre, f é a frequência do campo magnético AC e expressa como $\omega = 2\pi f$ (ω é a frequência angular), M a magnetização das NPs e H a amplitude do campo magnético aplicado. A integral é avaliada em todo o laço de histerese. Para este tipo de partículas o mecanismo de aquecimento por corrente de Foucault é desprezível.

O mecanismo de aquecimento por nanopartículas magnéticas monodispersas, não-interagentes como os sistemas superparamagneticos, onde a perda de histereses se converte rapidamente. A resposta da susceptibilidade magnética em um campo AC (parte imaginária, χ'') pode ser relacionada com a geração de calor e expressa como [105]:

$$P_{SPM}(H, f) = \mu_0 \pi \chi'' f H^\lambda \quad (2.29)$$

quando $\lambda = 2$, assume que a resposta magnética é linear ao campo magnético aplicado e satisfeito quando, $\mu_0 M_S V H < k_B T$, isto é conhecido como a teoria da resposta linear (LRT). Quando tem a influência das interações partícula-partícula ou NPs aglomeradas, é esperado na região não linear para valores de $\lambda > 2$ e podem ser entendidos quando a condição do campo aplicado é comparável ao campo de anisotropia, $H \approx H_A$ (este efeito está relacionado com a contribuição de Néel e seria, portanto, mais pronunciado quando o relaxamento browniano estiver ausente), o que significa que a área sob o laço de histerese M-H aumenta mais rapidamente e de forma não linear [102].

χ'' é dada pela relação:

$$\chi'' = \frac{\omega \tau_{eff}}{1 + (\omega \tau_{eff})^2} \chi_0,$$

onde χ_0 é a susceptibilidade inicial de equilíbrio a campo zero, τ_{eff} é o tempo de relaxação efetiva dos momentos magnéticos determinado pela contribuição de ambos mecanismos de relaxação de Néel e Brown e que depende fortemente do volume da partícula. τ_{eff} é expressa como:

$$\frac{1}{\tau_{eff}} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B},$$

se a anisotropia magnética da partícula é suficientemente forte para superar a inércia da resistência da viscosidade, um campo magnético alternado pode fazer com que a partícula gire em um fluido, enquanto que o momento magnético permanece fixo em relação ao eixo do cristal. Tal ação constitui o mecanismo Browniano, ou seja, quando o momento magnético se alinha na direção do campo e estas bloqueado ao eixo do cristal e a rotação física das partículas no meio viscoso depende fortemente da viscosidade do líquido carreador (η) e do volume hidrodinâmico da partícula, V_H . Este mecanismo Browniano é dado pela seguinte relação:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T},$$

onde k_B é a constante de Boltzmann e T a temperatura. Experimentalmente, o V_H pode ser determinado através de medidas hidrodinâmicas, tais como espalhamento de luz dinâmico e pode ser calculado de acordo com a fórmula:

$$V_H = \left(1 + \frac{\delta}{R}\right)^3 \frac{4\pi R^3}{3}$$

Onde δ é a espessura da camada do surfactante das NPs e R é o raio magnético.

Em nanopartículas superparamagnéticas que consistem de um só domínio, cada partícula pode manter o momento magnético constante. Na ausência do campo, a orientação destes momentos pode ser determinada pela anisotropia cristalina das partículas. Entretanto, sob a ação de um campo magnético aplicado podem ter energia suficiente para deslocar o momento para uma orientação preferencial. A relaxação do momento para o equilíbrio permite a liberação de energia que resulta no aquecimento local. No caso do mecanismo da relaxação de Néel (isto é, devido à rotação dos momentos magnéticos atômicos dentro de um domínio, sem rotação da partícula), o período do campo magnético alternado é suficientemente curto para que a orientação física da partícula permaneça inalterada enquanto que o momento se reorienta. O tempo de relaxação de Néel (foi posteriormente modificada por Brown) é dado por:

$$\tau_N = \tau_0 \frac{\exp(KV_M/k_B T)}{KV_M/k_B T},$$

onde τ_0 é um tempo característico do material, K é a constante de energia de anisotropia magnética, $V_M = 4\pi R^3/3$ é volume magnético da partícula.

A perda de calor devido a correntes Foucault surge como resultado da interação de um material condutor com um campo magnético alternado, de acordo com as leis de Faraday e Lenz. Portanto, depende muito da resistividade elétrica do material. A perda de calor devido a correntes Foucault (ED) é dada por [13] [22]:

$$ED = \frac{(\mu\pi d f H)^2}{20 \rho},$$

onde μ é a permeabilidade do material, d é o diâmetro da partícula e ρ é a resistividade do material. No entanto, a maioria dos materiais tipo ferritas apresentam resistividade elétrica alta, ou seja, baixa condutividade, que leva a uma corrente de Foucault desprezível na geração de calor sob a ação de um campo magnético AC. Assim, o aquecimento por indução magnética de materiais tipo ferrita é causado principalmente pela perda de histerese e pelos mecanismos de relaxação (relaxação de Néel e Brown) em um campo magnético AC. No entanto, as relaxações de Néel e Brown são mais

proeminentes no caso de partículas monodomínio que contribuem com a geração de calor e ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente quando se tem uma distribuição de tamanhos.

A perda de potência obtida na Eq. (2.29) para sistemas de nanopartículas magnéticas está relacionada com o AEP. O AEP pode ser atribuído a dois tipos de mecanismos de perda de potência: perda de histerese e por relaxação e as duas são funções do tamanho da partícula. A AEP de uma partícula magnética exposta a um campo magnético alterno é dada por: $AEP = P/\rho$, onde ρ é a densidade de massa das nanopartículas magnéticas [106]. A capacidade de aquecimento ou geração de calor de um coloide magnético pode ser medido pela AEP (Wg^{-1}) sob a amplitude de um campo magnético AC e pode ser expressa pela seguinte relação [107]:

$$AEP = C \left(\frac{m_s}{m_m} \right) \left(\frac{dT}{dt} \right) \quad (2.30)$$

onde $C = 4,186 \text{ J}(g^\circ\text{C})^{-1}$ é a capacidade calorífica específica da suspensão, $\frac{dT}{dt}$, taxa inicial da variação da temperatura no tempo, m_s massa de suspensão e m_m massa do material magnético em suspensão [108]. O valor do AEP deve ser o mais elevado possível para minimizar a quantidade de material magnético e assim otimizar o sistema de nanopartículas para terapia por hipertermia. A perda de potência em hipertermia magnética é proporcional ao quadrado da amplitude do campo magnético aplicado, e como é esperado, o AEP geralmente incrementa com o aumento da intensidade do campo.

Capítulo III

MATERIAIS, PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS E TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

Nesta parte do trabalho são descritos os materiais, os processos de síntese das nanopartículas, as técnicas e os equipamentos que foram usados nas caracterizações das amostras. Foram sintetizadas nanopartículas de Fe_3O_4 por três métodos químicos diferentes, nanopartículas com estrutura núcleo/casca de $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ e nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$.

3.1 Materiais

Os seguintes materiais foram usados: acetato de ouro (III) de Alfa Aesar, nitrato de potássio (KNO_3), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato ferroso (III) tetra-hidratado ($\text{Fe}_3\text{SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 99%), di-hidrato de citrato de sódio tribásico, boro-hidreto de sódio (NaBH_4), polietilenoimina (PEI ramificada, M_w 25,000 Da), acetilacetonato de ferro (III) ($\text{Fe}(\text{acac})_3$), ácido oléico, oleilamina, 1,2-hexadecanotiol, foram adquiridos da Sigma Aldrich. Etanol absoluto (Scharlau), 1-octadeceno, hexano (C_6H_{14}), etanol e água milli-Q foram utilizados como solventes.

3.2 Procedimentos das sínteses das nanopartículas de magnetita

As nanopartículas magnéticas podem ser sintetizadas através de vários métodos, com cada método de produção podemos obter nanopartículas com diferentes tamanhos, morfologia, composição química e propriedades magnéticas. As rotas comuns para a síntese de nanopartículas magnéticas aqui utilizadas foram co-precipitação, decomposição térmica e hidrólise oxidativa.

3.2.1 Co-precipitação

As nanopartículas de magnetita revestidas com polietilanoimina (PEI) foram sintetizadas em um único passo pela rota de coprecipitação. Como ilustrado na Figura 2.1, inicialmente, a solução de água contendo NaOH foi aquecida até 90 °C com agitação vigorosa e com borbulha de nitrogênio. Depois de 10 min nesta temperatura, os cloretos de ferro (II) e (III) com PEI foram adicionados à solução de base. Sob agitação constante, o sistema foi mantido a esta temperatura durante 2 horas. Após a conclusão da reação, a solução resultante foi removida da fonte de aquecimento e arrefecida à temperatura ambiente em um banho de gelo e lavado com água várias vezes, para isolar o sobrenadante por decantação magnética e redispersão em água até obter um pH de 7.

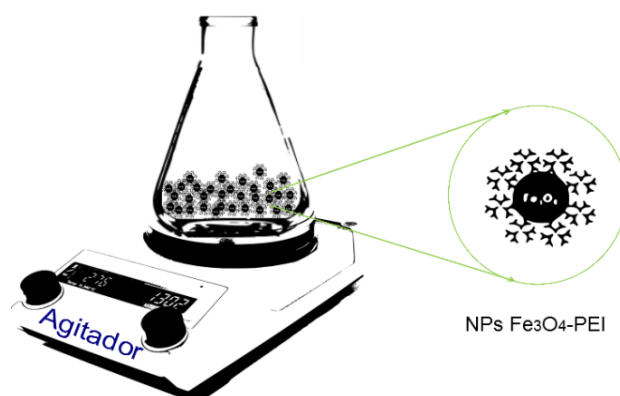


Figura 3.1 Representação esquemática da síntese das nanopartículas de magnetita pelo método de coprecipitação.

3.2.2 Decomposição térmica

Como mencionado anteriormente, para maior controle sobre o tamanho e forma das partículas foi utilizado o método de decomposição térmica para a síntese de nanopartículas em alta temperatura.

As nanopartículas de magnetita foram sintetizadas misturando 2 mmol de Fe(acac)₃, 10 mmol de 1,2-hexadecatotiol, 6 mmol de oleilamina e 6 mmol de ácido oléico em 20 mL de 1-octadeceno como solvente orgânico (ponto de ebulição de 318 °C). A mistura foi aquecida até atingir uma temperatura de 290 °C e foi mantida constante por 3 horas em um balão de três bocas, em fluxo controlado de argônio. Este tempo foi suficiente para completar as ligações de troca para a formação da Fe₃O₄. Após a síntese, a solução foi coletada à temperatura ambiente e lavada com etanol e hexano para ser finalmente redispersada em hexano.

Apesar das muitas vantagens deste método, ainda se tem dificuldade de troca de meio, pelo fato de que as partículas são produzidas a partir de um solvente orgânico. Para obter as nanopartículas em solução aquosa deve ser realizado adequadamente um processo de transferência de fase para o seu uso em aplicações em biomedicina.

3.2.3 Hidrólise oxidativa

Para obter partículas em solução aquosa, sintetizamos as nanopartículas de magnetita recobertas com PEI pelo método de hidrólise oxidativa previamente relatado em outros trabalhos [109] [110]. Inicialmente foi preparada a mistura de 1,36 g de nitrato de potássio e 0,57 g de hidróxido de sódio, que foi dissolvida em 130 mL de água milliQ em um balão de três bocas e borbulhar, com fluxo de N₂. Em seguida, 15 mL de água com 0,306 g de PEI foi levado ao ultrassom até que o polímero estivesse bem disperso. Posteriormente, foi adicionado 0,315 g de sulfato ferroso (III) hidratado que foi agregado à solução base (na solução presente no balão de três bocas). A mistura é aquecida até atingir os 90 °C por 24 horas com agitação de ~ 56 rpm e, durante tudo o processo de síntese, foi passado um fluxo de gás de argônio (Ar). Finalmente, o precipitado de cor preta é coletado a temperatura ambiente em banho de gelo. O produto final das nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄-PEI) foi separado por decantação magnética e lavado várias vezes com água milliQ para remover todas as impurezas remanescentes após a síntese. Para as medidas magnéticas, uma parte da amostra foi seca em fluxo de Ar.

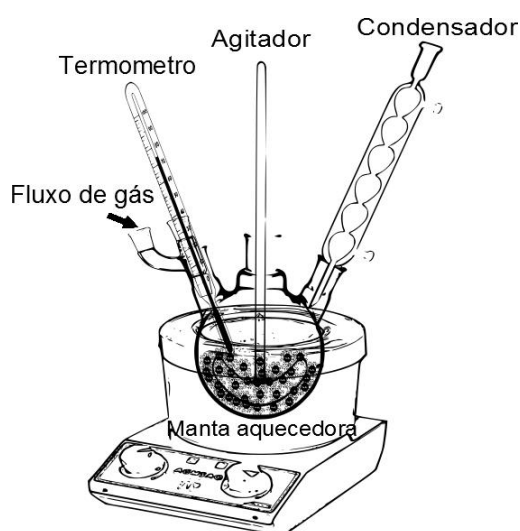


Figura 3.2 Configuração experimental da síntese das nanopartículas de magnetita pelo método hidrólise oxidativa.

3.3 Procedimento da síntese de nanopartículas Au/Fe₃O₄

As nanopartículas de Au/Fe₃O₄ foram sintetizadas usando o método de decomposição térmica com algumas modificações no procedimento descrito por outros autores [59][111][112]. Este método se baseia na mistura do acetilacetonato de ferro (III) e acetato de ouro (III) na presença de ligantes. Primeiramente, para a formação da fase da Fe₃O₄ utilizamos 1 mmol de acetilacetonato de ferro (III), 5 mmol de 1,2-hexadecatolol como agente redutor. A mistura de surfactantes é composto de 3 mmol de oleilamina e 3 mmol de ácido oléico em 10 mL de 1-octadeceno, usado como solvente orgânico (ponto de ebulição de 318 °C). A mistura foi aquecida até uma temperatura de 120 °C em um balão de três bocas em fluxo controlado de gás de argônio. Subsequentemente, 0,3 mmol de acetato de ouro (III) foi adicionado à solução mantendo a temperatura de 120 °C por 30 min, e depois a temperatura foi elevada para 260 °C, por 150 minutos. Este tempo foi suficiente para completar as ligações de troca e a formação da estrutura núcleo/casca de Au/Fe₃O₄. A mistura foi magneticamente agitada sob fluxo de gás durante todo o processo de síntese. Após ~ 30 min, a solução foi coletada à temperatura ambiente. Todas estas condições são essenciais para o controle do tamanho e forma da partícula e obter uma distribuição com uma menor polidispersão.

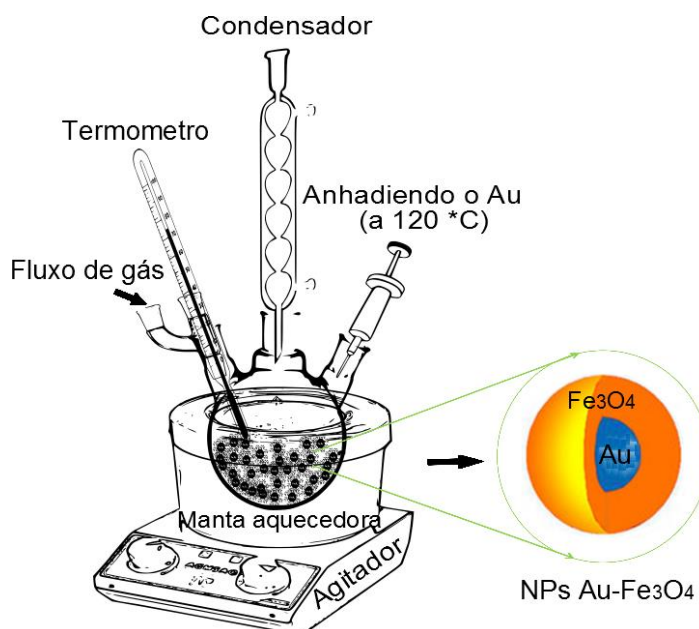


Figura 3.3 Representação esquemática do processo da síntese das NPs Fe₃O₄/Au com estrutura núcleo/casca por decomposição térmica.

Durante o processo, foram utilizados os surfactantes para prevenir a aglomeração das partículas (e crescimento desordenado). Além disso, o precursor de ouro foi cuidadosamente adicionado e conservado à 120 °C para controlar o processo de crescimento das diferentes fases. Estes parâmetros de síntese são cruciais para controlar o crescimento do ouro (núcleo) no início da reação, seguido pela formação da fase de magnetita (casca). As nanopartículas núcleo/casca são formadas quando a temperatura aumenta na presença de agentes surfactantes. As nanopartículas obtidas são dispersas formando um fluido magnético estável. Com o objetivo de obter um pouco de amostra em pó uma parte do fluido foi lavada várias vezes em uma solução-mistura de etanol e hexano e finalmente seca a 70 °C, durante 24 h.

3.4 Procedimento da síntese de nanopartículas magnetita recobertas com nanopartículas de ouro

As nanopartículas de magnetita recobertas com PEI foram sintetizadas em um único passo usando o método de hidrólise oxidativa, que foi modificado a partir do método previamente relatado em outros trabalhos [109] [110]. Os núcleos magnéticos à base de magnetita foram inicialmente preparados da mistura de 1,36 g de nitrato de potássio e 0,57 g de hidróxido de sódio dissolvido em 130 mL de água milliQ em um balão de três bocas e borbulhar com fluxo de N₂. Em seguida, a solução de 0,306 g de PEI em 15 mL de água foi colocada em um ultrassom até que o polímero fique bem disperso. Após, foi adicionado 0,315 g de sulfato ferroso (III) hidratado. Esta última mistura foi agregada na solução base (na solução que já está no balão de três bocas). A mistura é aquecida até atingir os 90°C, por 24 horas e em constante agitação de ~ 56 rpm. Durante todo o processo de síntese foi mantido fluxo de gás Ar. Finalmente, o precipitado de cor preta foi coletado em um banho de gelo. O produto final das nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄-PEI) foi separado por decantação magnética e através de lavagem por várias vezes com água milliQ para remover todas as impurezas remanescentes após a síntese.

A síntese das nanopartículas de magnetita recobertas com PEI serviram como base para o crescimento do ouro. O crescimento de nanopartículas de ouro sob a superfície das partículas de magnetita-PEI foi realizado seguindo as direções apontadas na literatura [26] [113], com algumas modificações. As nanopartículas Fe₃O₄-PEI são a base para o crescimento de NPs de ouro, onde o PEI age como um intermediador entre a magnetite e as NPs de ouro, através de interações eletrostáticas dos íons do citrato, que contêm três grupos carboxilo com carga negativa, sobre a superfície das nanopartículas de ouro [30].

Usamos as nanopartículas de Fe_3O_4 -PEI como sementes para o crescimento das nanopartículas de ouro. Para esta finalidade, 2 mL de nanopartículas de Fe_3O_4 -PEI a uma concentração de 1,66 mg/mL são dispersas em 40 mL de água milliQ e sonificado por 45 min antes do crescimento das nanopartículas de ouro, para garantir boa dispersão das nanopartículas Fe_3O_4 -PEI. A solução de ouro foi adicionada com 0,068 mmol de citrato trissódico, 0,019 mmol de borohidreto de sódio como agente redutor e 0,027 mmol de acetato de ouro (III) em 50 mL de água milliQ. Uma vez que o Au foi reduzido para formar NPs metálicas, a solução passou a mostrar uma cor vermelha clara. A mistura de NPs Fe_3O_4 -PEI com a solução de Au é agitada e aquecida até 60°C , por 10 min e nesta temperatura foi adicionado 0,1 g de citrato trissódico, que foi disperso em 5 mL de água milliQ.

Após, a reação entre Fe_3O_4 -PEI e o Au foi mantida à temperatura ambiente em agitação, por mais 2 horas. Uma vez que o Au foi reduzido para formar NPs metálicas, a solução mostrou-se de cor vermelha escura e foram eletrostaticamente atraídas à superfície das nanopartículas Fe_3O_4 -PEI. As nanopartículas Fe_3O_4 -PEI@Au foram isolados por separação magnética de solução de síntese para garantir que as nanopartículas de Au que se encontram em excesso na solução sejam descartadas. O resultado foi lavado por várias vezes para ajustar o pH a 7 com água milli-Q e, finalmente, suspenso em água milli-Q.

As nanopartículas Fe_3O_4 -PEI@Au foram recolhidas, lavados com etanol e secas sob fluxo de N_2 para posterior utilização na caracterização magnética.

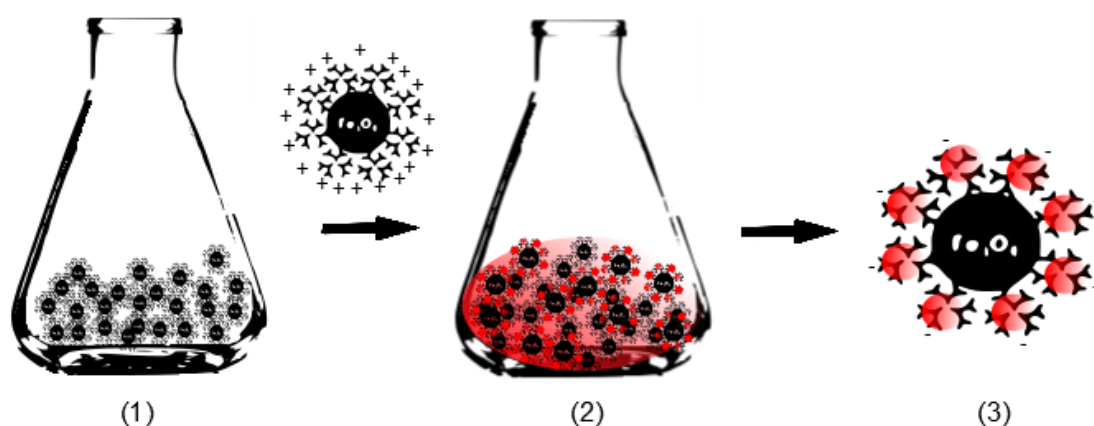


Figura 3.4 Representação esquemática da síntese das nanopartículas de magnética recobertas com nanopartículas de ouro: (1) as nanopartículas de Fe_3O_4 -PEI dispersas, (2) processo do crescimento do ouro sobre as nanopartículas magnéticas recobertas com PEI e (3) formação do produto final Fe_3O_4 -PEI@Au.

3.5 Métodos de caracterizações

As caracterizações das amostras foram obtidas usando as seguintes técnicas.

3.5.1 Difração de raios-X

Usamos difração de raios-X (DRX) para identificar a estrutura cristalina e obter informação dos parâmetros de rede e diâmetro cristalino. Quando um feixe de raios-X com um determinado comprimento de onda incide sobre a amostra, há uma dispersão em todas as direções sobre a amostra e o feixe que faz interferência construtiva, uma vez que a dispersão satisfaça a condição de Bragg e os picos de difração são obtidos [114] [115]. Podemos estimar o tamanho médio de partícula (cristalito) usando a relação de Scherrer dada por [114],

$$D = 0,916 \lambda / \beta_{hkl} \cos \theta_{hkl} \quad (3.1)$$

onde, λ é o comprimento de onda da radiação, β_{hkl} é a largura de linha medida à meia altura, e θ_{hkl} é o ângulo de Bragg [115]. As larguras de linha dos picos de difração foram obtidas da análise quantitativa do padrão de difração feita pelo método de Rietveld.

As medidas foram realizadas usando um difratômetro de raios-X comercial (Rigaku, modelo Miniflex) operando a 150 mA e 40 kV no Laboratório de Nanotecnologia Verde, da Faculdade de Ceilândia da UnB. A fonte de radiação foi o $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), e a varredura angular foi no intervalo 2θ de 20 a 80°, usando um passo de 0,05° e um tempo de 0,4 s, por passo. As amostras foram preparadas por deposição das partículas em pó e em fluido sob uma placa de silício de difração zero. Os padrões de difração das amostras foram comparados com a base de dados padrão Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS).

3.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão

Usamos microscopia eletrônica de transmissão (MET) convencional e de alta resolução para obter informação da morfologia, tamanho e distribuição de tamanho, informações estruturais e composição química de nossas amostras. As imagens obtidas por MET foram utilizadas para montar os histogramas de distribuição de tamanhos das NPs, utilizando o método de Sturges. Uma vez obtidas as imagens, se usou o processamento de imagens (software ImageJ) para contar um

total de N partículas a partir das micrografias de MET. Após a montagem do histograma dos tamanhos das partículas, este foi modelado usando a função lognormal:

$$f(D) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \sigma D \exp \left[-\ln^2 \left(\frac{D}{D_0} \right) / 2\sigma^2 \right], \quad (3.2)$$

onde D_0 é o diâmetro mediano da distribuição e σ representa o grau de polidispersão da distribuição de tamanhos. O valor médio do diâmetro é dado por: $\langle D \rangle = D_0 \exp(\sigma^2/2)$ e o desvio padrão da distribuição é calculado de: $\sigma_D = \langle D \rangle \sqrt{e^{\sigma^2} - 1}$.

As distâncias interplanares foram medidas a partir da transformada de Fourier das imagens de MET de alta resolução, usando o software Gatan Digital Micrograph. O MET usado é equipado com um espectrômetro de energia dispersiva de raios-X (EDX) onde se posiciona o feixe de elétrons e se adquire o espectro de emissão de raios-x para obter-se uma análise elementar das amostras.

No microscópio também obtivemos imagens usando o modo de microscópio eletrônico de transmissão-varredura (do inglês Scanning-Transmission Electron Microscopy, STEM). Este sistema usa um detector anular de campo escuro para recolher o sinal. No STEM mede-se a dispersão elástica dos elétrons transmitidos após a interação com a amostra. Sobre a amostra incide um feixe de elétrons convergente e a imagem vai se formando ponto a ponto à medida que a sonda eletrônica varre a superfície da amostra. O sinal que gera a amostra é recolhido por um detector com geometria anular que detecta os elétrons dispersados em alto ângulo no modo de campo escuro (do inglês High Angle Annular Dark Field, HAADF) para reconstruir a imagem ponto a ponto. À medida que aumenta o diâmetro interno do detector anular, elimina-se a maior parte da difração coerente. A formação da imagem e o seu contraste é proporcional à densidade e ao número atômico ($\sim Z^2$). Usando o STEM-HAADF é possível obter informação estrutural e da composição da amostra (elementos químicos presentes).

As imagens foram obtidas utilizando um microscópio Tecnai F30 operado a uma voltagem de aceleração de 300 kV do Instituto de Nanociencia de Aragon da Universidad de Zaragoza e também usamos um JEOL JEM-1400 PLUS (120 kV) do Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales CIC biomaGUNE, na Espanha.

3.5.3 Caracterização magnética

As propriedades magnéticas foram medidas usando um magnetometro de alta sensibilidade. Quando a amostra é submetida a um movimento oscilatório, se produz uma variação de fluxo magnético que é detectado pelas bobinas de detecção que por sua vez gera uma diferença de potencial induzindo uma corrente elétrica. Estas bobinas são acopladas a um dispositivo de interferência quântica de supercondutor (em inglês SQUID), que através da quantificação do fluxo magnético mede o sinal da amostra medida.

As propriedades magnéticas das amostras foram medidas num magnetômetro tipo SQUID, modelo MPMS3 (da Quantum Design, Inc. San Diego, CA). As curvas zero-field-cooled (ZFC) e field-cooled (FC) foram medidas na faixa de temperaturas entre 2 a 300 K, e aplicando campos de $H_{FC} = 10 - 500$ Oe. As curvas de magnetização como função do campo magnético foram obtidas variando a temperatura na faixa de 5 – 300 K em campos máximos aplicados de até 70 kOe. As medidas de susceptibilidade magnética AC foram obtidas usando o modulo AC do magnetometro SQUID numa faixa de temperaturas de 2 a 300 K, e variando as frequências na faixa desde 0,2 a 1 kHz e em campo magnético AC de $H_{ac}=1$ Oe. Todas as medidas magnéticas foram realizadas no Laboratório de Síntese de Nanomateriais e Caracterização Magnética do NFA do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

Os valores do momento magnético das nanopartículas foram normalizados com relação à massa do núcleo magnético. A concentração de Fe e Au foram determinadas por análise elementar utilizando a técnica de plasma de acoplamento indutivo. No caso das medidas das amostras em pó foram recolhidas, lavadas com etanol e secas com fluxo de N_2 para a caracterização magnética.

3.5.4 Plasma de acoplamento indutivo

Na espectroscopia de emissão por plasma de acoplamento indutivo (ICP) os átomos presentes na amostra são ionizados ou excitados pelos íons produzidos no plasma de argônio e os íons excitados emitem fótons que possuem comprimentos de onda característicos de cada elemento. Isto fornece uma análise qualitativa multi-elementar do número total de fótons recolhidos que é proporcional à concentração de cada elemento presente na amostra.

Para a análise fizemos um ataque químico na amostra de tal forma que íons passem a formar parte da solução aquosa. Utilizamos 200 µl da amostra que foi colocada em um tubo falcão (15 mL) para ser digerido com ácido nítrico concentrado e clorídrico e completado com água durante 2 h, com a finalidade de que os elementos passem a formar íons livres e a solução ficou de cor amarela. Então a solução foi completada até 10 ml de água destilada. Para determinar a composição química de nossas amostras usamos um espectrómetro ACTIVA da Horiba Jobin Yvon Company do Laboratório de Ensaio e Calibrações do Instituto Tecnológico de Aragón (ITA), na Espanha.

3.5.5 Medidas da absorção específica de potência

Foram realizadas medidas de AEP das nanopartículas e das NPs em cultivo celular em função da aplicação de campos magnéticos 200 a 300 Oe a uma frequência fixa de 571 kHz, o valor do AEP foi calculado utilizando a relação: $AEP = \frac{C_{Liq}\delta_{Liq}}{\phi} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)$, onde C_{Liq} e δ_{Liq} são a capacidade de aquecimento específico e a densidade do solvente, respectivamente, e ϕ é a concentração de peso dos NPs no coloide. O termo ΔT é o incremento da temperatura para uma dada massa de NPs diluídos no solvente transportador durante o intervalo de tempo (Δt), e $\Delta T/\Delta t$ é a taxa de aquecimento da amostra durante o experimento. Para as medidas do AEP, as NPs foram dispersas numa matriz polimérica PVA com concentração de 10% para evitar a precipitação. Para as medidas do AEP das NPs nas células, foram previamente cultivadas as células durante uma noite com as NPs a uma concentração de 100 µg/mL. As células foram separadas subsequentemente das placas de cultivo celular e transferidas para um tubo PCR-ependorf com um volume total de 100 µL de meio de cultivo. Foi usado um comprimento de onda de 478 nm para medir a absorbância das nanopartículas e assim determinar a concentração de ferro no fluido depois de uma completa dissolução das NPs em médio ácido usando um espectrômetro de absorção ultravioleta-visível (UV-vis).

O arranjo experimental consiste em fazer circular por uma bobina uma corrente elétrica alternada que proporciona um campo magnético oscilante a uma frequência determinada. Variando a corrente através do circuito a potência entregue à bobina pode ser controlada e, portanto, a magnitude do campo magnético. O tubo experimental que contém o coloide magnético é isolado termicamente e inserido numa bobina de indução magnética arrefecida com água para assegurar uma temperatura e impedância constante. Para detectar a temperatura da amostra se usa um termômetro de fibra óptica colocada no centro do coloide. Para garantir melhor o isolamento usado para minimizar qualquer perda de calor gerada pela amostra para o ambiente, a amostra é acoplada

num balão de dewar com ligação para bomba de vácuo. O solenoide é uma parte de um circuito ressonante, cuja frequência pode ser alterada através da troca de diferentes capacitores no circuito alimentado por um amplificador de potência [107].

As medidas foram feitas usando um aplicador de campo magnético comercial (aplicador DM1, nB Nanoscale Biomagnetic S.L., Espanha) no Instituto de Nanociencia de Aragón da Universidad de Zaragoza, na Espanha.

3.5.6 Espectroscopia UV-vis

A espectroscopia UV-vis é baseada no processo de absorção da radiação eletromagnética na região ultravioleta-visível (comprimentos de onda entre os 160 e 780 nm) pelos íons metálicos que sofrem transições eletrônicas e causam a remoção de um elétron de seu estado fundamental a um estado excitado ao absorver a radiação e o resto da radiação é transmitida. Devido a isto, a espectroscopia Uv-vis se utiliza para identificar grupos funcionais de moléculas e para a determinação quantitativa de íons metálicos de transição.

Os espectros de absorção das amostras sintetizadas foram realizados usando espectrômetros UV-vis modelo Varian Cary 50, Thermo Scientific Evolution 220 Diode Array e Jasco (V670) do Instituto de Nanociencia de Aragón (INA). Para determinar a concentração de ferro nas amostras usamos o comprimento de onda máxima de 478 nm para medir a absorvência das nanopartículas e por comparação da absorbância da amostra com a curva de calibração que auxilia na determinação quantitativa da massa do material presente na amostra.

3.5.7 Potencial zeta

As medidas de potencial zeta foram realizadas para obter informação a respeito da carga superficial das partículas em suspensão coloidal. Esta técnica consiste em submeter a suspensão coloidal (que cria uma capa elétrica na região da interfase partícula-liquido) a um potencial elétrico entre os dois eletrodos da célula na qual está contida o fluido. O fluido é irradiado por um feixe de luz monocromático entre os dois eletrodos e se analisam as variações da dispersão de luz que são diretamente proporcionais à velocidade de deslocamento das partículas. Portanto, quanto maior a carga superficial da partícula, maior será sua velocidade de deslocamento e mais estável a solução.

As medições de potencial zeta foram avaliadas à temperatura ambiente usando um Zeta Plus-Brookhaven 90 (Zetasizer Nano, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) a partir de uma suspensão diluída da amostra em água destilada e meio de cultivo para obter informação sobre a carga superficial das NPs.

3.5.8 Materiais para o estudo biológico

3.5.8.1 Cultivo celular

Para os experimentos *in vitro* usamos a linha celular microgliais murinas (BV2). Foram cultivadas em suplemento em meio de sais de Eogle modificado (DMEM) acrescidos de 15% de soro fetal bovino, 100 IU/mL de penicilina, 2mM L-glutamina e 100µg/ml de estreptomicina. As células foram cultivadas em frascos de T25 e T75 com DMEM com condições padrão de incubação a 37 °C com umidade atmosférica de 5% CO₂ e 95% ar.

3.5.8.2 Ensaio de viabilidade celular

Experimentos *in vitro* foram realizadas para avaliar a toxicidade celular das NPs de Fe₃O₄-PEI@Au, na linha de celular BV2 por ensaios de exclusão de azul de tripan, que é um composto químico que atravessa a membrana plasmática das células mortas e são manchadas de azul (este é um método de exclusão para testar a viabilidade).

Como um primeiro passo, as células BV2 foram semeadas em placas de 6-poços com concentração de 25×10⁴ células/mL em meio de cultivo por 24 horas a 37 °C em umidade atmosférica de 5% CO₂. Após as 24 horas de incubação, o meio de cultivo foi descartado e substituído com meio de cultivo fresco contendo diferentes concentrações de NPs de Fe₃O₄-PEI@Au desde 10 a 100 µg/mL e incubadas por 24 horas. Após essa última incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas cuidadosamente com PBS (500 µL) para remover as nanopartículas. As células foram separadas utilizando tripsina (300 µL tripsina, 2 min) e combinadas com as células soltas e suspensas em 1 mL de meio fresco. As células foram então coloridas com corante azul de tripano e contadas. A porcentagem de viabilidade celular em relação ao poço de controle foi calculada assumindo que o poço de controle tinha 100% de viabilidade. Cada experimento foi realizado em triplicado e contados utilizando um microscópio óptico inverso (Nikon TS100, Nikon Instruments, Wien, Áustria) e os dados foram apresentados graficamente como

média. Os resultados foram calculados como percentagem de sobrevivência comparada com o controle não tratado.

3.5.8.3 Absorção celular

Para mostrar a concentração de NPs absorvidas pelas células, foram cultivadas células em pratos de 6-poços com uma concentração de 25×10^4 células/mL e incubada durante a noite a 37°C baixo 5% CO_2 em um meio de crescimento. Após 24 h de incubação, o meio foi substituído e as células foram lavadas cuidadosamente com PBS para remover qualquer célula morta e foi substituído pela suspensão de diferentes concentrações de NPs desde 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ em meio fresco de crescimento e foram incubadas por 24 horas. As células foram lavadas com PBS no intuito de se remover as partículas não internalizadas, tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultivo para serem contadas. Uma vez contadas, as células foram centrifugadas (1200 rpm durante 6 min) para somente ficar com o pelet, o sobrenadante foi descartado.

Para determinar o conteúdo de magnetita no pelet (pelo conteúdo de Fe), o pelet foi suspenso em ácido nítrico (6 M) e ácido clorídrico (1:1 v/v) e deixado por 2 h para dissolver as NPs de magnetita. Após as 2 h, a solução foi completada com ácido clorídrico (um total de 5 mL de solução) para determinar a concentração de Fe por espectrofotometria de transmissão UV-vis CARY-50 (Varian Company, Palo Alto, CA), usando um comprimento de onda de 478 nm.

3.5.8.4 Análises da distribuição das nanopartículas nas células usando um sistema de duplo feixe de microscopia eletrônica de varredura/feixe de íons focalizados

Para determinar a distribuição das nanopartículas nas células utilizamos o sistema de duplo feixe que combina um microscópio eletrônico de varredura (MEV) e uma coluna de feixe de íons focalizado ou FIB (no inglês *focused ion beam*) no mesmo sistema. Em MEV usamos feixe de elétrons para obter as imagens e no FIB usa-se um feixe de íons de galio (Ga^+), que são mais pesados que os elétrons e provocam a remoção do material na forma dos átomos e a ruptura das ligações químicas. A amostra é posicionada no ponto de coincidência de ambos os feixes e a altura eucêntrica é determinada com precisão para que a amostra permaneça focada, mesmo após a etapa de inclinação. Em seguida a coluna FIB é inclinada num ângulo de 52° em relação à coluna de elétrons e o feixe de íons esta perpendicular à superfície da amostra.

A preparação das amostras foi feita por cultivo de células BV2 numa lamina de vidro estéril a uma densidade de 10^4 células/poço em 0,5 mL de meio DMEM por 24 horas a 37 °C. Após 24 h, o meio foi removido substituído por um meio frasco contendo uma concentração de 100 µg/mL das NPs. Após incubação durante a noite, as células foram lavadas rapidamente duas vezes com PBS e fixadas com solução de 4% de glutaraldeído por 2 h, lavadas três vezes em tampão de cacodilato (pH 7,2) e então posfixada com 1% de tetróxido de ósmio contendo 2,5% de ferrocianato de potássio. Após serem lavadas, as amostras foram gradualmente desidratadas à temperatura ambiente via imersão em concentrações de metanol de 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. Finalmente, as amostras foram revestidas com ouro para serem vistas por MEV-FIB.

Usamos o equipamento de duplo feixe MEV/FIB (Nova 200 NanoLab, FEI Company) para uma análise superficial e elemental. Este equipamento está integrado a uma coluna de emissão de íons de Ga a uma voltagem de 30 kV e corrente de 10 pA, que foi utilizado para secções transversais de células individuais e observado com feixe de elétrons a uma voltagem de 5 kV e 0,4 nA no modo MEV. Estas medidas foram realizadas no Instituto de Nanociencia de Aragón da Universidade de Zaragoza, na Espanha.

Capítulo IV

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA

Nesta parte do trabalho é apresentado o estudo das propriedades estruturais, morfológicas e magnéticas de nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas por co-precipitação, decomposição térmica e hidrólises oxidativa.

4.1.1 Estudo das nanopartículas de Fe_3O_4 -PEI sintetizados pelo método de co-precipitação

4.1.1.1 Propriedades estruturais e morfológicas

A Figura 4.1 mostra o padrão de difração de raios-X da amostra em pó das NPs Fe_3O_4 revestidas com PEI sintetizadas por co-precipitação. Todos os picos de difração correspondem à estrutura de espinélio cúbica (Fd-3m) de magnetita. Não foram observados outros picos relevantes além dos picos desta fase. Além disso, o padrão de difração foi refinado usando o método de Rietveld e a forma dos picos foi modelada com a função Pseudo-Voigt. Os parâmetros de rede obtidos do refinamento foram $a = b = c = 8,367 \text{ \AA}$, que é comparável com o valor de $a = 8,396 \text{ \AA}$, reportado para a magnetita *bulk* [97]. Todos os picos de difração refinados foram utilizados para estimar o tamanho médio de cristalitos usando a equação de Scherrer (Eq. 3.1). Esta análise proporcionou um diâmetro médio de $\langle D \rangle_{\text{DRX}} = 10,1 \pm 2,5 \text{ nm}$.

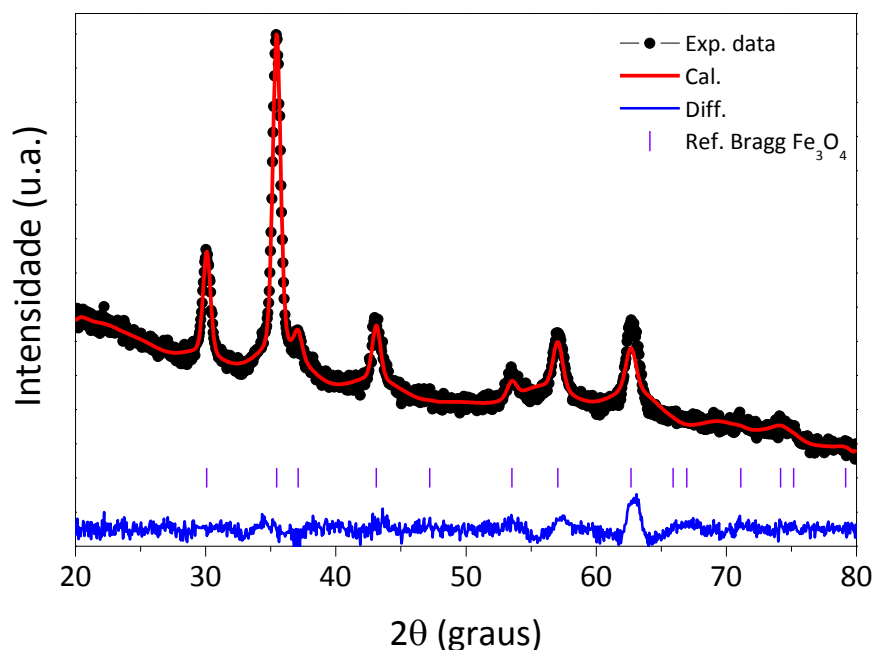


Figura 4.1 Padrão de difração de raios-X das NPs Fe₃O₄ em pó refinado usando o método de Rietveld. Os dados experimentais e calculados são representados pelos pontos e linha sólida, respectivamente. A diferença entre os dados experimentais e calculado também são mostrados na parte inferior do gráfico de linha na cor azul e indexada com as reflexões de Bragg da estrutura do espinélio cúbico (cor violeta).

Para pesquisar a morfologia e estrutura das nanopartículas Fe₃O₄-PEI, foram obtidas imagens de alta resolução de MET como são mostradas na Figura 4.2. A morfologia das nanopartículas evidencia uma aparência de forma esférica, no entanto, partículas aglomeradas também são observadas quando aparecem como uma única partícula grande. Isto foi associado à existência de interações dipolares magnéticas interpartículas.

Foram analisadas várias imagens de MET para determinar seu respectivo histograma e polidispersão. O número total de partículas, N~1000 partículas, foi contabilizado com ajuda do software Image-J. Para montar o histograma foi usado o método de Sturges [1]. Subsequentemente, a distribuição histográfica foi modelada com uma função lognormal e o ajuste dos dados proporcionou um valor da mediana $D_0 = 9,4$ com uma polidispersão de $\sigma = 0,19$. Usando a relação: $\langle D \rangle = D_0 \exp(\sigma^2/2)$, determinamos o tamanho médio das partículas que foi de $\langle D \rangle_{\text{MET}} = (9,6 \pm 1,0)$ nm. Este diâmetro médio está de acordo com o valor encontrado por DRX. Para obter mais informações estruturais, uma única nanopartícula foi localizada e analisada por meio do MET de alta resolução. Os resultados confirmam a cristalinidade das nanopartículas e é possível observar claramente as distâncias interplanares, como apresentado mostra na Figura 4.2 (b). O padrão de difração de área selecionada e a imagem da transformadas de Fourier mostram os pontos que representam as distâncias interplanares de 4,85 Å; 2,48 Å; 2,59 Å e 2,49 Å, que correspondem ao

conjunto de planos (111), (222), (113) e (222), respectivamente (ver gráfico inserido na parte superior da Figura 4.2(b)).

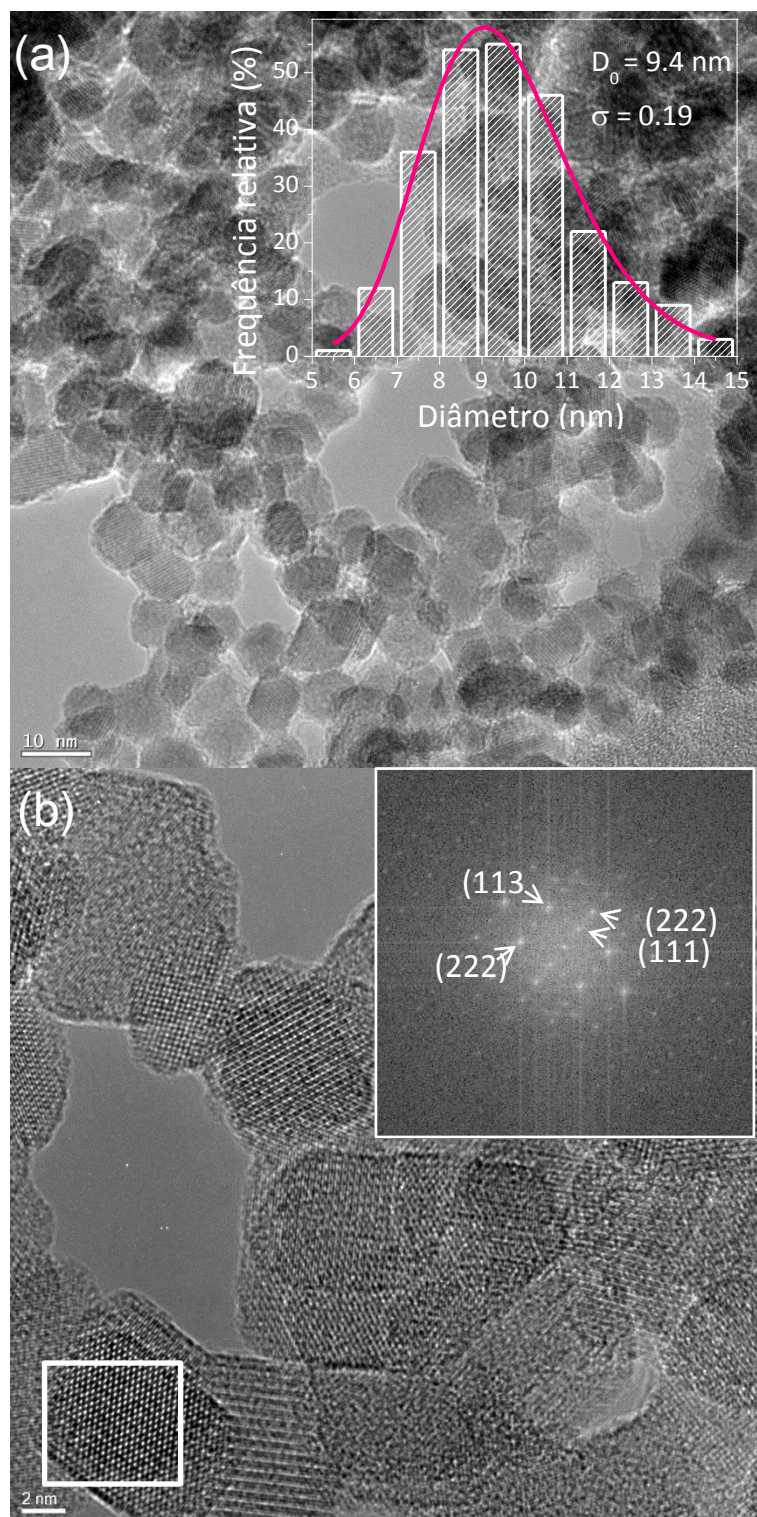


Figura 4.2 (a) Imagem de MET das NPs Fe₃O₄-PEI e inserido sua distribuição histogrâmica de tamanho da partícula ajustado com log-normal (linha sólida). (b) Imagem de alta resolução de MET das NPs com sua respectiva imagem da transformada de Fourier da área selecionada.

4.1.1.2 Medidas de magnetização

A magnetização em função da temperatura foi medida no modo ZFC e FC aplicando campos magnéticos de 30, 200 e 400 Oe como se apresenta na Figura 4.3. Observa-se que estas NPs tendem a exibir temperatura de irreversibilidade entre as curvas ZFC e FC, em $T_{irr} \sim 295$ K (a 30 Oe). Este comportamento irreversível foi associado às interações interpartículas. Também pode inferir-se, das curvas ZFC/FC, que não existem evidências da ocorrência da transição de Verwey no intervalo de temperaturas de 5 a 300 K.

As curvas ZFC apresentam uma temperatura máxima (T_{max}) em $T_{max} \sim 195$ K, 136 K e 96 K em um campo de medida de 30, 200 e 400 Oe, respectivamente. Esta T_{max} se desloca para temperaturas inferiores com o aumento na intensidade do campo.

Os valores de T_{max} não apresentam consistência com o esperado para as partículas de ~ 10 nm, o que indica que o T_{max} não pode ser associada com a temperatura de bloqueio de partículas não-interagentes. Resultados obtidos de microscopia revelaram distribuição e agregação de partículas, nas quais as interações interpartículas são não-desprezíveis e suficientemente fortes para deslocar a T_B para temperaturas maiores. As interações interpartículas podem ter várias origens: interações de tipo “*Exchange*” (troca) que acontecem na superfície de contato das partículas a que podem ser consideradas desprezíveis devido à distância que separam as partículas, já que NPs estão recobertas com PEI. Outra fonte de interações interpartículas são as interações dipolares que atuam a maior distância que as interações de troca e parecem ser as que determinam o deslocamento de T_B para maiores valores. Além disso, os efeitos de superfície nas nanopartículas não são desprezíveis devido à falta de simetria de translação, ao baixo número de coordenação dos íons magnéticos e à existência de ligações de troca magnética quebradas, que são responsáveis pela desordem de spin superficial.

A magnetização FC cresce moderadamente à medida que diminui a temperatura que comumente indica a existência de uma interação dipolar não negligenciável [116] e a curvatura da magnetização diminui com o aumento do campo aplicado (gráfico inserido na Figura 4.3), onde a magnetização é inicialmente orientada ao longo da direção de H e flutuações térmicas mais elevadas em maior T reduzem a componente de magnetização ao longo da direção de H [117].

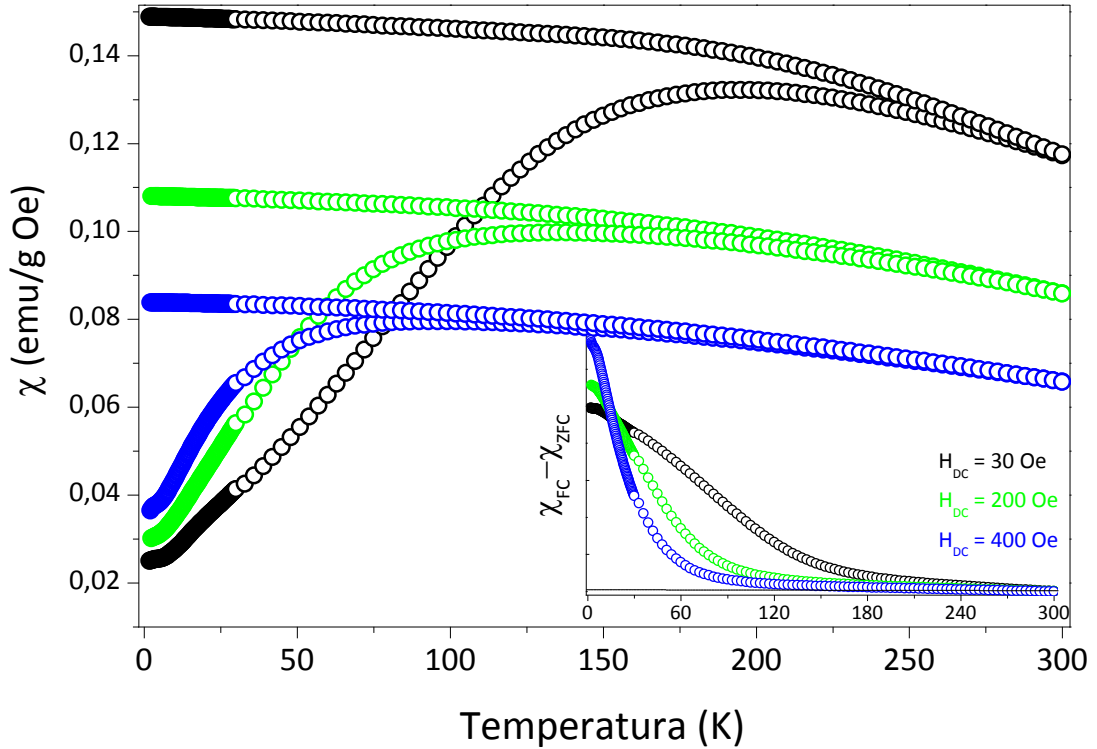


Figura 4.3 Curvas ZFC/FC da amostra Fe_3O_4 -PEI obtidas a vários campos magnéticos aplicados de 30, 200 e 400 Oe. Este gráfico exibe a diferença entre as curvas de magnetização FC e ZFC.

Assumindo a T_{max} da curva ZFC obtida ao campo de 30 Oe como a T_B do sistema, este valor é bem maior do que o esperado para um sistema de partículas superparamagnéticas, cujo valor é de: $T_B = \frac{K_{\text{eff}}V}{25 k_B} = 17,5 \text{ K}$, usando o valor meio do tamanho obtido por MET (9,6 nm) e K_{eff} da magnetita *bulk*. Este valor elevado T_{max} alto confirma a presença de interações magnéticas [118]. Por outro lado, a ausência de coercividade e magnetização de remanência são bem observadas acima de $\sim 150 \text{ K}$, indicando que a amostra se encontra no estado superparamagnético acima de 150 K (ver Figura 4.6).

Por outro lado, a distribuição de tamanhos num sistema real implica numa barreira de anisotropia diferente para cada tamanho e, portanto, uma distribuição de T_B . Se consideramos a distribuição de diâmetros obtidos por MET, podemos obter uma distribuição de T_B , usando a relação: $T_B = \frac{K_{\text{eff}}V}{25 k_B} = 15,5 \text{ K}$, onde consideramos o valor K_{eff} da magnetita *bulk*. Outra forma de determinar a distribuição T_B é calculando a derivada de T da diferença entre as curvas ZFC e FC, como mostrado no gráfico pertencente à Figura 4.4. Como pode ser visto na distribuição obtida da diferença entre as curvas ZFC/FC mostra dois máximos em $\sim 15 \text{ K}$ e $\sim 80 \text{ K}$. O máximo de menor valor é consistente com aquele obtido a partir da distribuição de tamanhos obtida por medidas MET

(painel principal da Figura 4.4); Já o máximo de alta temperatura (~ 80 K) não tem relação direta com a distribuição de tamanhos de partículas.

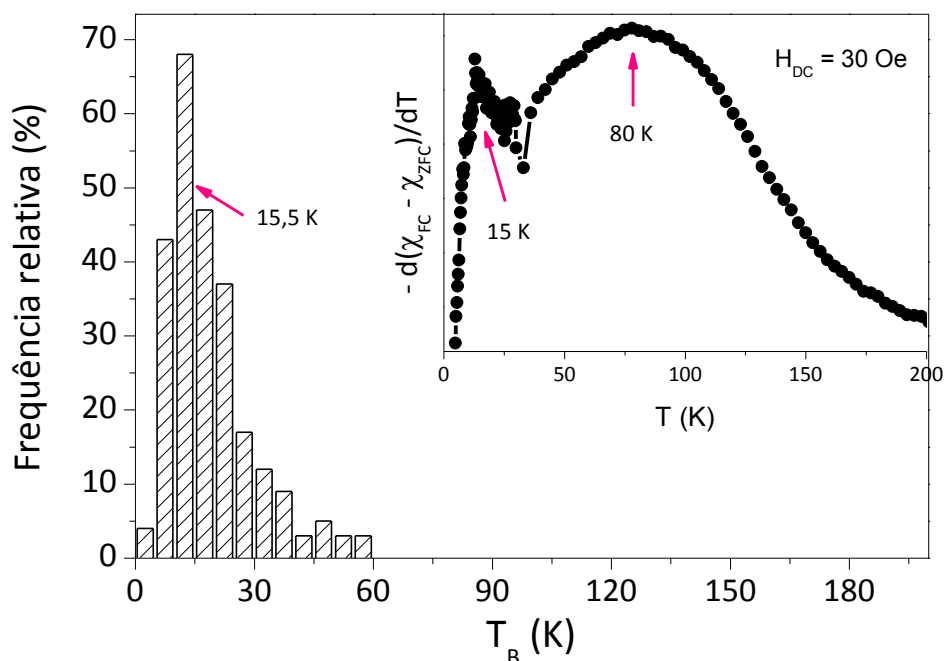


Figura 4.4 Distribuição de T_B obtidas da distribuição de tamanhos por MET. No gráfico inserido mostra-se a $-d(\chi_{FC} - \chi_{ZFC})/dT$ em função da temperatura.

O máximo em torno de 80 K pode ser associada com as nanopartículas que interagem magneticamente. Como estas partículas estão recobertas com PEI, podemos dizer que as interações de troca podem ser consideradas como insignificantes [73], e que as interações dipolares são as que predominam neste sistema. Se consideramos o segundo máximo obtido na distribuição de T_B (80 K), como a temperatura de bloqueio média e usarmos a constante de anisotropia do sistema bulk, encontra-se o valor médio do tamanho magnético de ~ 16 nm. Este valor está acima do obtido por MET, o que confirma que a presença de interações interpartículas promovem correlação entre as partículas individuais e, porém, um tamanho maior de partículas.

Por outro lado, medidas de magnetização em função do campo magnético foram obtidas em diferentes temperaturas. Na Figura 4.5 é mostrado os laços de histereses obtidos a 5 e 300 K das NPs Fe_3O_4 -PEI. Como se observa nesta figura, a magnetização a 300K não indica tendência de saturação mesmo aplicando campo de até 7 T. Isto é geralmente atribuído ao efeito da desordem de spins na superfície das NPs, que são difíceis de alinhar à longa da direção do campo magnético aplicado, causando uma tendência à não saturação.

Para estimar a magnetização de saturação utilizamos a lei de aproximação à saturação dada por: $M(H) = M_s \left[1 - \frac{b}{H^2}\right] + \chi_{hf} H$, onde χ_{hf} é a susceptibilidade de alto campo e $b = (4K_{eff}^2)/(15M_s^2)$ é uma constante que está relacionada com anisotropia magnetocristalina, K_{eff} [66]. A $T = 300$ K o valor obtido é de $M_s = 66,5$ emu/g e a $T = 5$ K de $79,4$ emu/g. Este valor de magnetização de saturação é significativamente menor quando comparado com o valor para a magnetita *bulk*, o que está atrelado ao efeito da massa não-magnética da camada de PEI. A tendência à não saturação das curva M vs H observado na região de altos campos pode ser uma consequência da presença da camada superficial com desordem magnética ou oxidação da superfície [119].

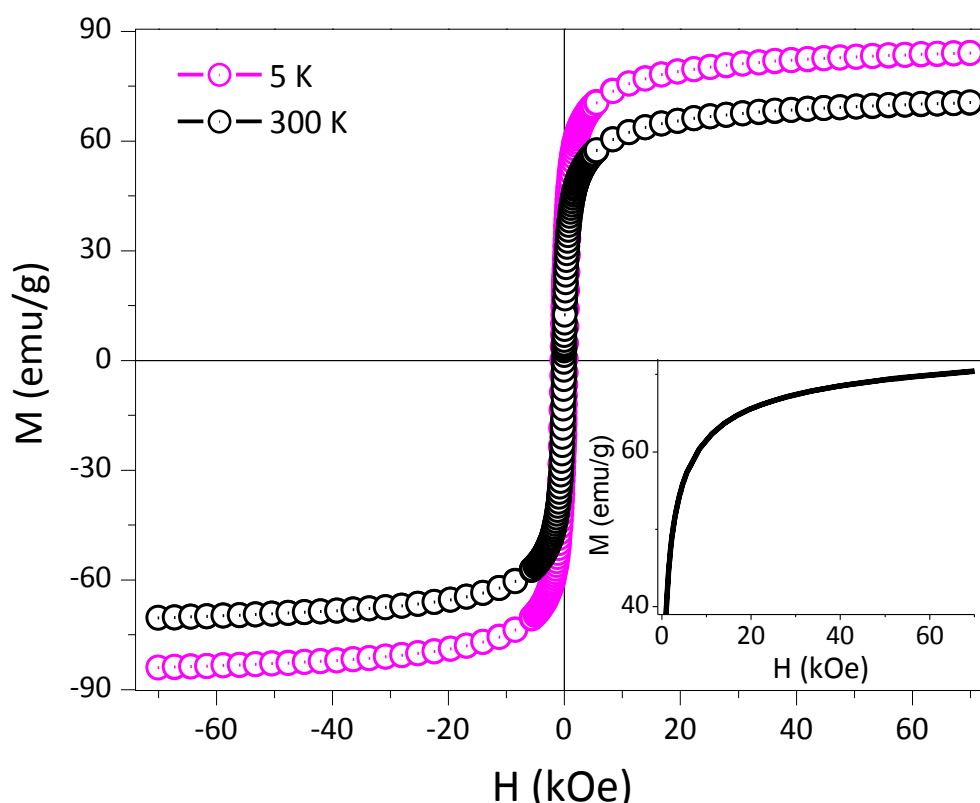


Figura 4.5 Laços de histerese para amostra Fe_3O_4 -PEI obtidas a 5 e 300 K. Na figura inserida mostra-se a tendência a não saturar da curva M vs H a 300 K.

O campo coercitivo determinado das curvas M vs. H a 5 K foi de $H_c \sim 310$ Oe. A curva obtida a 300 K contempla campo coercitivo o que é consistente com o comportamento superparamagnético esperado nesta temperatura. Vale à pena ressaltar que nas curvas M vs. H obtidas em temperaturas inferiores a ~ 150 K o campo coercitivo é diferente de zero, indicando um regime de estado bloqueado e para temperaturas acima de ~ 150 K a energia térmica é dominante e as orientações dos momentos magnéticos são aleatórias, então apresentam um campo coercitivo nulo como se pode observar na Fig. 4.6.

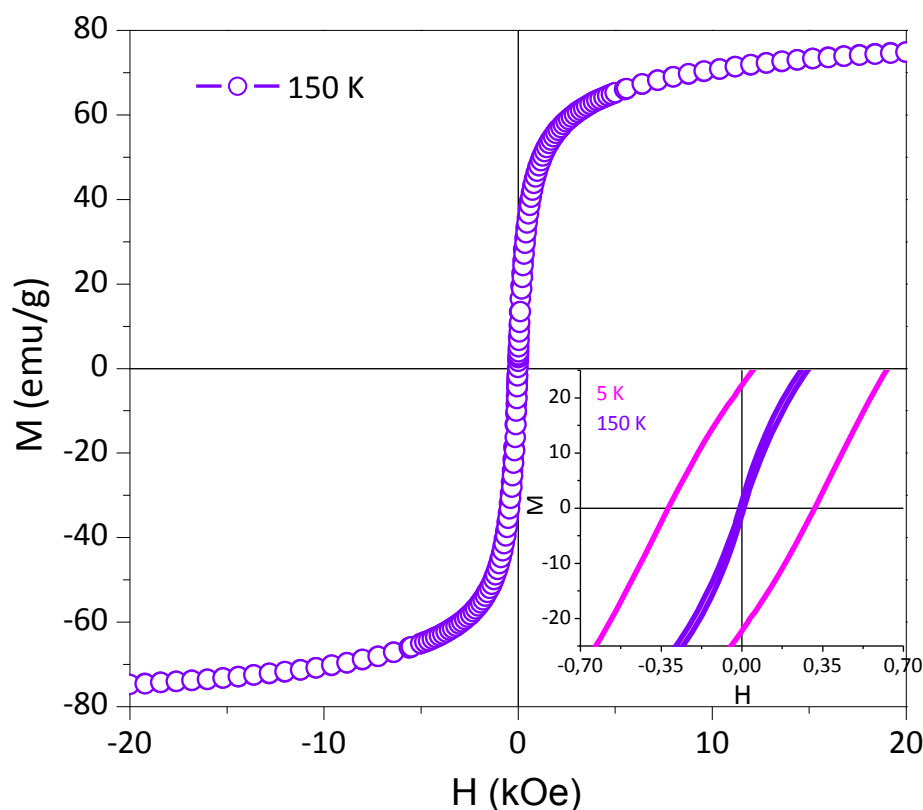


Figura 4.6 Laço de histerese da amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ obtida a 150 K. Na figura inserida mostra-se uma ampliação da curva M vs H a 5 K e 150 K.

Assumindo que as curvas M vs. H obtidas a 300 K descreve um sistema de partículas monodomínio que se encontram no estado superparamagnético (nesta condição, temos que $KV \ll k_B T$), os dados experimentais da curva M vs. H pode ser ajustado usando a função de Langevin (Eq. 2.11) com o objetivo de obter informação da distribuição do momento magnético médio e a polidispersão.

O resultado obtido do ajuste é mostrado na Figura 4.7. Os parâmetros obtidos do ajuste são: $\mu_0 = 9748 \mu_B$ e $\sigma = 1,61$. A partir de este valor ajustado pode-se calcular o momento magnético médio ($\langle \mu \rangle = \mu_0 \exp(\sigma^2/2)$), resultando em $\langle \mu \rangle = 35627 \mu_B$. A partir desses resultados, podemos estimar o diâmetro médio obtido da relação: $\langle \mu \rangle = M_S \langle V \rangle = \frac{\pi M_S \langle D \rangle^3}{6}$, onde M_S é a magnetização de saturação obtida a 300 K, o que proporciona o valor de $\langle D \rangle = 10,1$ nm. Este valor é ligeiramente maior ao valor advindo do MET; no entanto, se obtém um valor alto para a polidispersão. Uma simulação da curva M vs. H considerando os parâmetros obtidos por MET na função de Langevin é mostrada na Figura 4.7 (linha de cor azul). Este resultado sugere que o comportamento do sistema

no estado superparamagnético é influenciado pelo grau de polidispersão magnética das nanopartículas.

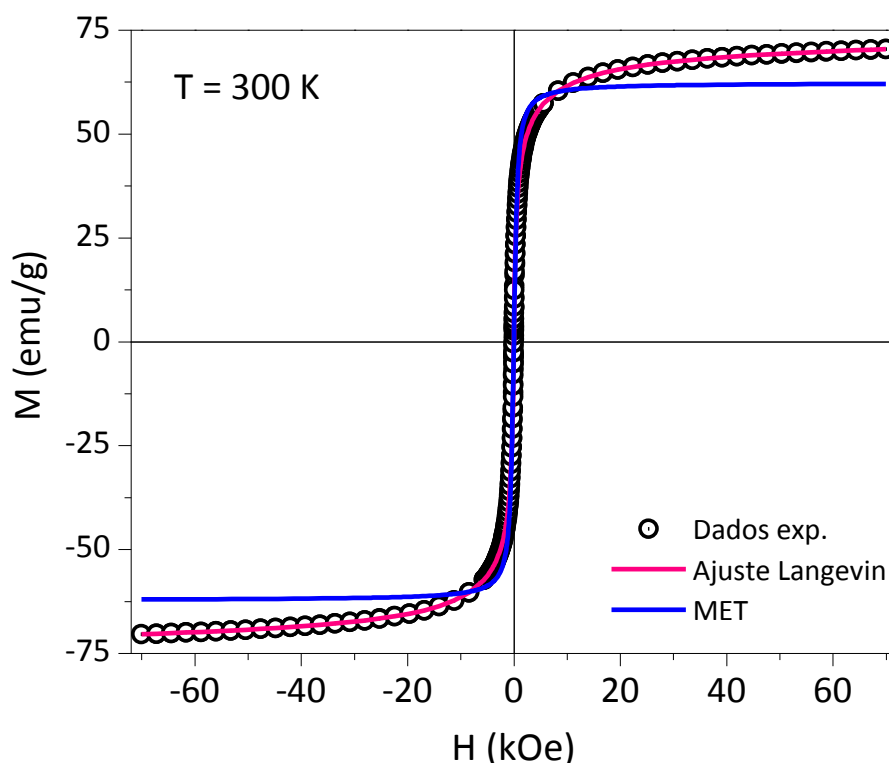


Figura 4.7 Curva M vs. H obtida a $T = 300$ K. Os pontos experimentais foram ajustados usando a função de Langevin para as nanopartículas Fe_3O_4 -PEI (linha vermelha) e curva simulada com os dados de MET (linha azul).

Na Figura 4.8 é mostrado o campo coercitivo (H_C) obtido das curvas M vs. H em diferentes temperaturas para as NPs de Fe_3O_4 -PEI. Nota-se que o campo coercitivo possui um incremento com a diminuição da temperatura. Sabe-se que o H_C é determinado pela natureza da anisotropia que é muito sensível a fatores, tais como, o tamanho e a distribuição das partículas, a morfologia, desordem de spin superficial e as interações entre as partículas. Entretanto, em nossas amostras, devemos considerar que a anisotropia superficial e a interação dipolar são os fatores predominantes que afetam H_C .

Como podemos verificar na Figura 4.8, na região de baixas temperaturas ($T < 100$ K) o H_C exibe comportamento linear em $T^{1/2}$. Esta dependência linear pode ser explicada considerando um sistema de nanopartículas monodisperso, não-interagentes com anisotropia orientada aleatoriamente e descrita pela Eq. 2.21. Os dados experimentais de $H_C(T)$ para $T < 70$ K podem ser bem ajustados usando esta equação. Este resultado sugere que o processo de reversão da

magnetização das partículas acontece de forma coerente, onde as interações entre as partículas pouco afetam o comportamento térmico do campo coercitivo. Usando os resultados do ajuste, se obteve um valor $H_c(0) = 401$ Oe valor médio de $\langle T_B \rangle = 83$ K. Vale ressaltar que acima de 150 K, o campo coercivo tende a zero e a temperatura de bloqueio, obtida a partir da medida de histerese magnética com variação da temperatura, está em concordância com os resultados obtidos das curvas ZFC/FC (segundo máximo em ~ 80 K). O valor de $T_B = 83$ K representa a população de NPs com interações dipolares.

Conhecendo $H_c(0)$ e usando o valor da $M_s = 81$ emu/g obtida da curva M vs. H a $T = 2$ K, encontramos valor de $K_{eff} = 1,75 \cdot 10^4$ J/m³. Este valor é próximo dos valores esperados para a magnetita *bulk* reportados na literatura [66] e confirma que a dependência térmica do campo coercitivo é pouco perturbada pelas interações entre as nanopartículas. Podemos usar este valor de K_{eff} para estimar a contribuição de anisotropia de superfície. Usando a Eq. 2.22 determinamos um valor de $K_s = 0,64 \cdot 10^{-5}$ J/m² para estas NPs Fe₃O₄-PEI, que é um valor baixo se comparado com os mencionados na literatura em sistemas que apresentam uma anisotropia superficial forte [120].

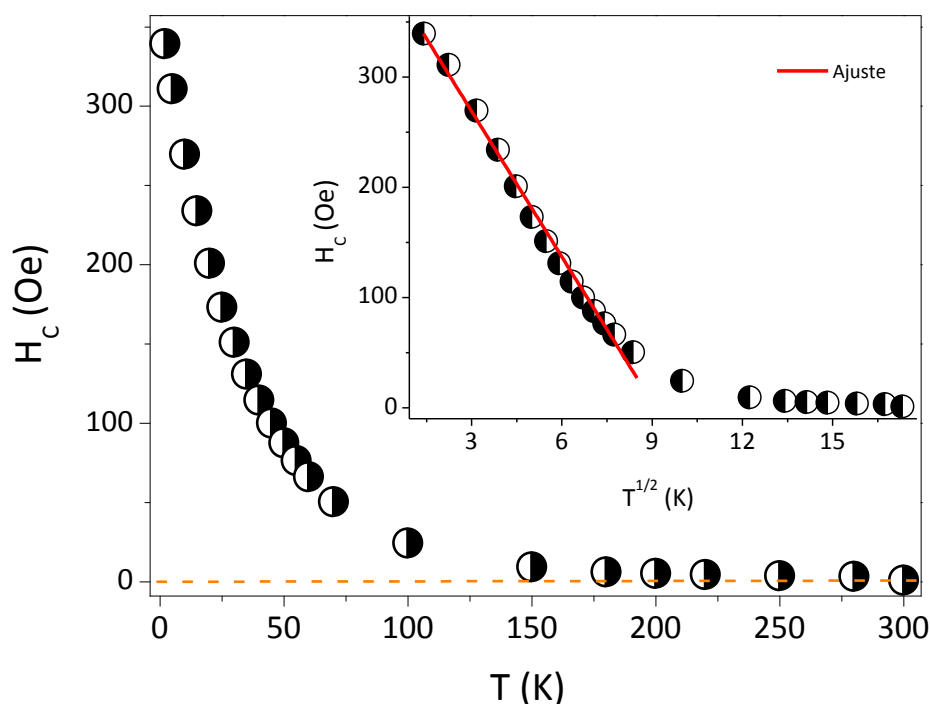


Figura 4.8 O campo coercitivo obtido das curvas M vs. H em diferentes temperaturas para as NPs de Fe₃O₄-PEI. Na figura inserida o ajuste do gráfico de H_c vs. $T^{1/2}$.

Devido à presença de desordem de spin na superfície das partículas espera-se efeitos de campo de anisotropia de exchange bias (H_{EX}) nestas nanopartículas. Para determinar o H_{EX} foram

realizadas medidas de M vs. H após resfriar a amostra na presença de um campo magnético de 2 T (ver Figura 4.9 (a)). Na Figura 4.9 (b) é mostrado a dependência térmica do H_{EX} que diminui à medida que se incrementa a temperatura, chegando a se anular em ~ 60 K.

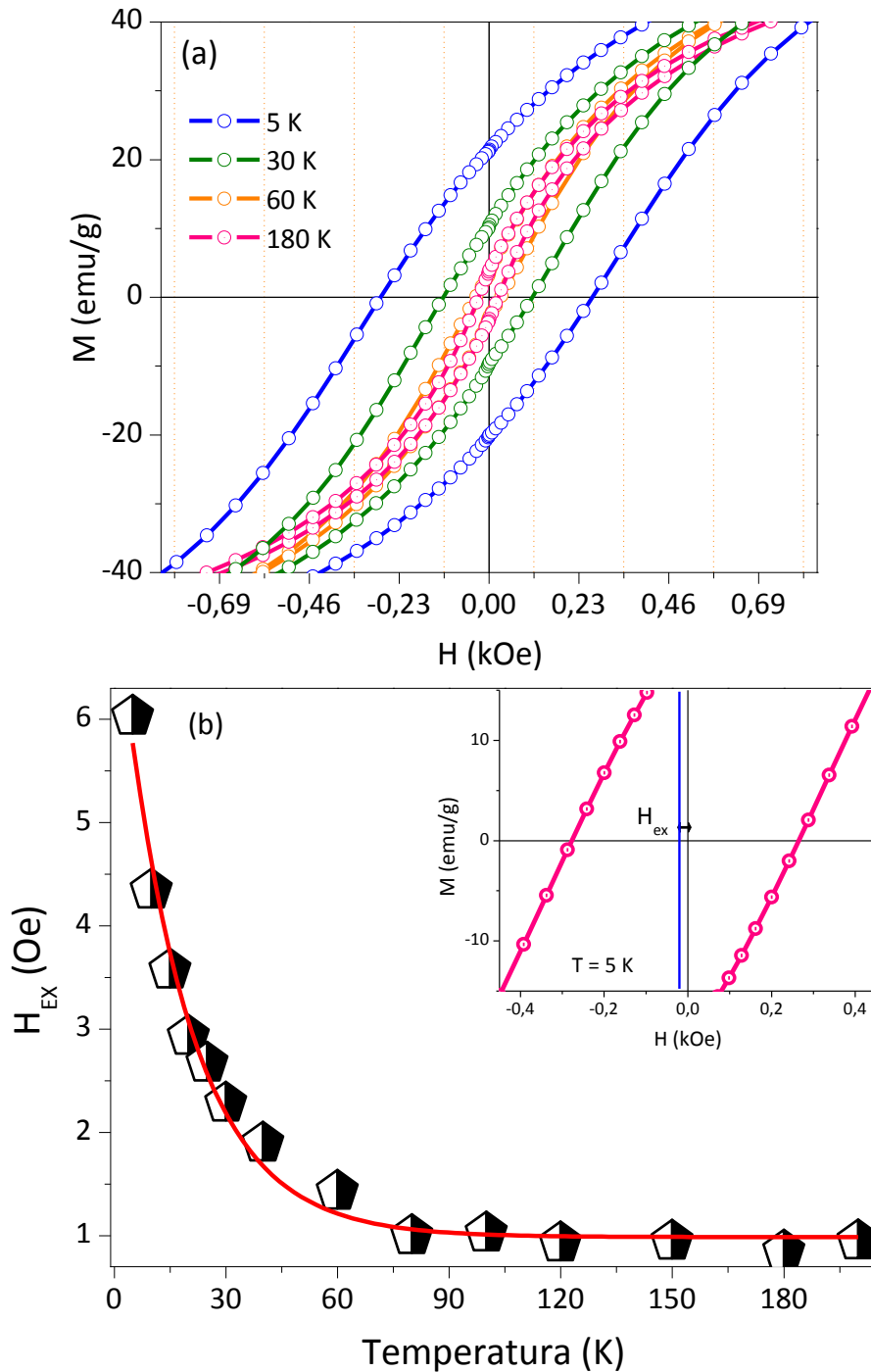


Figura 4.9 (a) os valores de H_{EX} foram obtidas do deslocamento dos laços de histerese nas diferentes temperaturas após um processo FC em campo de 2 T e (b) campo de anisotropia de exchange bias em função da temperatura. Na curva inserida se ilustra o deslocamento do laço de histerese da magnetização em 5 K para as nanopartículas Fe₃O₄-PEI.

A origem do H_{EX} é remetida ao acoplamento na interface de dois tipos de ordenamento, uma camada de spins desordenados na superfície e uma região bem ordenada de spin no núcleo da partícula. Os spins do núcleo exerce torque nos spins da superfície que não seguem a direção de anisotropia do núcleo levando a existência de um H_{EX} . Para avaliar a anisotropia de exchange em temperaturas baixas usamos a dependência térmica de H_{EX} (Eq. 2.28) de onde resulta um $H_{EX}(0) = 6,3 \text{ Oe}$ e $B = 5,5 \cdot 10^{-2} \text{ K}^{-1}$.

O baixo valor do H_{EX} encontrado indica que as duas fases magnéticas apresentam acoplamento fraco, onde a anisotropia efetiva do núcleo espera-se ser maior para conseguir a reversão dos spins na interface é por isso que se observa um H_{EX} menor. É necessário enfatizar que estamos considerando que o H_{EX} é de origem puramente intrínseca e que as interações dipolares não afetam o H_{EX} , o que poderia resultar na redução do H_{EX} em grandes campos de resfriamento.

4.1.1.3 Medidas de susceptibilidade AC

A Figura 4.10 exprime as dependências térmicas da componente real $\chi'(T)$ e imaginária $\chi''(T)$ da susceptibilidade AC, em um campo magnético AC de 1 Oe e variando a frequência de excitação na faixa de $0,2 \leq f \leq 1 \text{ kHz}$ para este sistema de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$, a fim de entender melhor a natureza das interações interpartículas.

Como mostrado na Figura 4.10 (a), a curva χ' vs. T possui um máximo bem definido e localizado em $T_{\max} \sim 200 \text{ K}$ para menor frequência e este máximo deslocando-se para temperaturas mais elevadas à medida que a frequência aumenta [121]. Já as curvas χ'' vs. T mostram dois máximos, Figura 4.10 (a). O pico de baixas temperaturas mostra claramente uma dependência com frequência, que pode ser visto na curva $d\chi''/dT$ vs. T (Figura 4.10 (c)). A presença deste pico tem sido pouco relatada na literatura e está associada ao comportamento de “*spin-glass*” [121] [122]. Já o pico de altas temperaturas desloca-se para temperaturas maiores quando a frequência é aumentada em consistência com o comportamento observado no pico da parte real da susceptibilidade.

A dependência de T_{\max} na frequência de excitação pode ser modelada utilizando a lei de Néel, Eq. 2.3. Assumindo que T_{\max} (no gráfico T) das curvas de susceptibilidade representa a temperatura de bloqueio do sistema e usando a relação de Néel para o ajuste dos dados experimentais, se obtém um $\tau_0 = 9,8 \times 10^{-14} \text{ s}$ e $E_a/k_B = 4224 \text{ K}$ (ver Fig. 4.10 (b)) para o pico de maior temperatura. A dependência térmica do pico de menor temperatura é melhor observado na

curva $d\chi''/dT$ vs. T (ver Fig. 4.10 (d)). Aplicando o mesmo modelo para este pico, o resultado foi de $\tau_0 = 1,9 \times 10^{-8}$ s e $E_a/k_B = 325$ K.

Este último tempo característico encontra-se no intervalo esperado para um sistema de NPs com comportamento superparamagnético não-interagente. Além disso, o valor obtido da energia de ativação (E_a/k_B) podem ser usados para estimar o diâmetro médio das NPs considerando-as como esféricas. Usando um valor da constante de anisotropia efetiva da magnetita *bulk*, o valor de 8,7 nm foi estimado para o pico de menor temperatura, o que confirma que este pico representa partículas não interagentes do sistema. Já a energia de ativação do pico de maior temperatura possibilita tamanho de ~21 nm, o que aponta a existência de forte influência das interações interpartícula.

Destes dois picos determinados anteriormente podemos calcular o parâmetro empírico, Φ , dado por [86]: $\Phi = \frac{\Delta T_f}{T_f \Delta \log_{10}(\omega)}$, onde ΔT_f é a diferença entre as temperaturas de congelamento correspondente à variação $\Delta \log_{10}(\omega)$. Os resultados experimentais para o pico de menor temperatura geraram valor de $\Phi = 0,14$, que é um valor próprio de partículas com comportamento superparamagnético não-interagente ($\Phi = 0,100-0,130$). Já para o pico de maior temperatura, se obtém um $\Phi = 0,071$. Este valor pequeno localiza-se na faixa de valores de sistemas com comportamento superparamagnético de nanopartículas interagentes ($\Phi = 0,03-0,1$) [123]. Destes resultados podemos inferir que o sistema estudado contém NPs isoladas que apresentam comportamento superparamagnético não interagente e NPs que interagem e formam agregados.

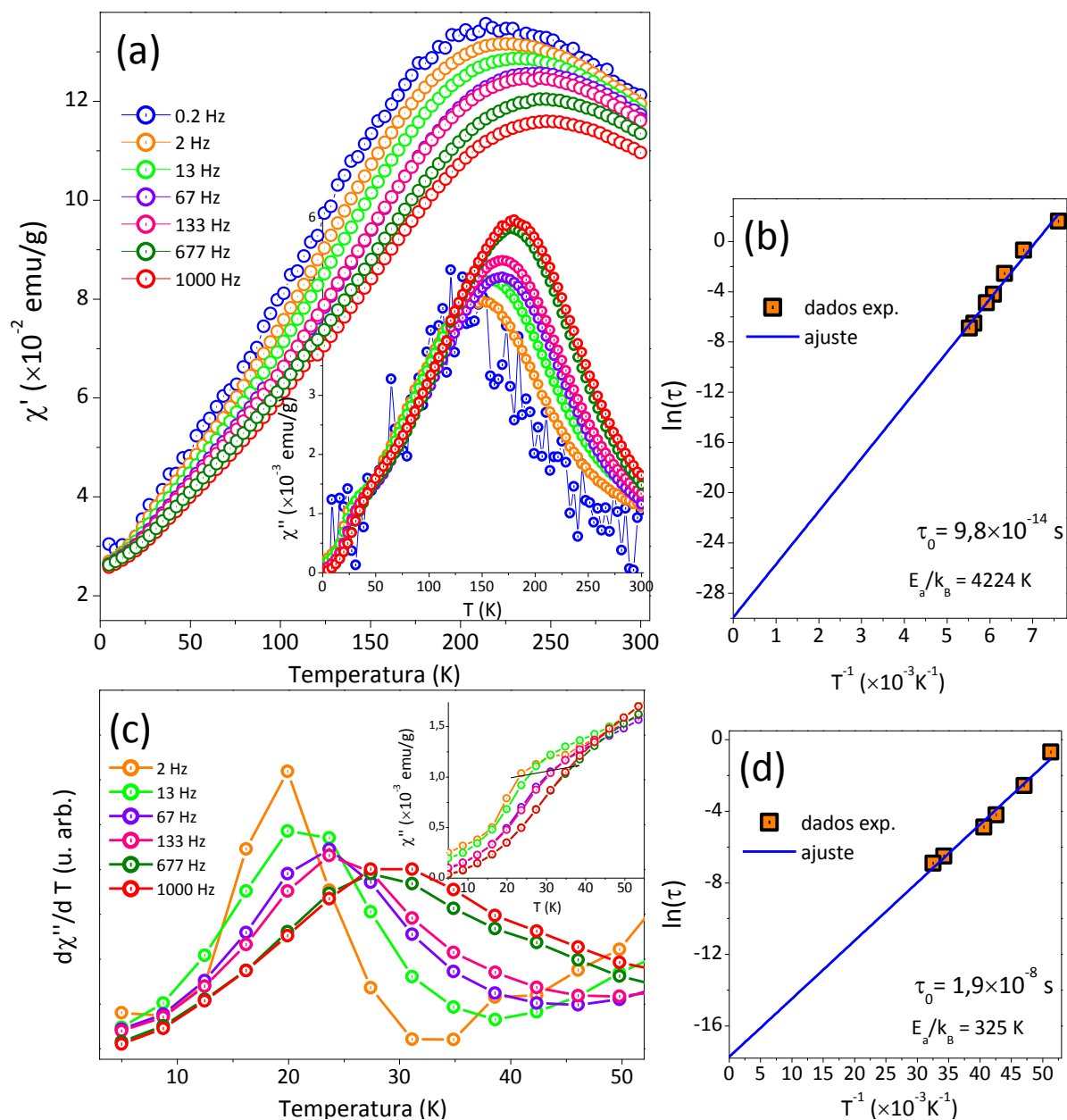


Figura 4.10 Susceptibilidade AC em função da temperatura para diferentes frequências de excitação para as nanopartículas Fe₃O₄-PEI. (a) Parte real e na figura inserida a parte imaginária. (b) Gráfico do log do inverso da frequência em função da temperatura do (T_m). A linha sólida representa o ajuste linear da relação de Néel. (c) derivada de χ'' com relação à temperatura em função de T na região do pico de baixa temperatura e (d) o ajuste dos pontos usando a relação de Néel.

4.1.1.4 Testes de poder de absorção específico

Determinamos a eficiência do potencial de aquecimento das nossas NPs Fe₃O₄-PEI suspensas em água (a uma concentração 2,67 mg mL⁻¹) desde a temperatura ambiente até temperaturas

acima de 40 °C. Nas condições de medida de campo magnético AC de 0,03 T e a uma frequência de 571 kHz, a curva de aquecimento da amostra mostra um aumento da temperatura com o tempo como demonstrado na Figura 4.11. O tempo transcorrido para chegar a 44 °C desde a temperatura ambiente foi de ~ 8 min, nas condições acima mencionadas. Normalmente, a temperatura na região de 41 - 45 °C é considerada adequada para uso na terapia por hipertermia magnética [13] [100]. A natureza física do aumento rápido da temperatura no estágio inicial pode ser atribuída às relaxações de Néel e de Brown de cada nanopartícula no estado superparamagnético ativado pelo campo magnético AC.

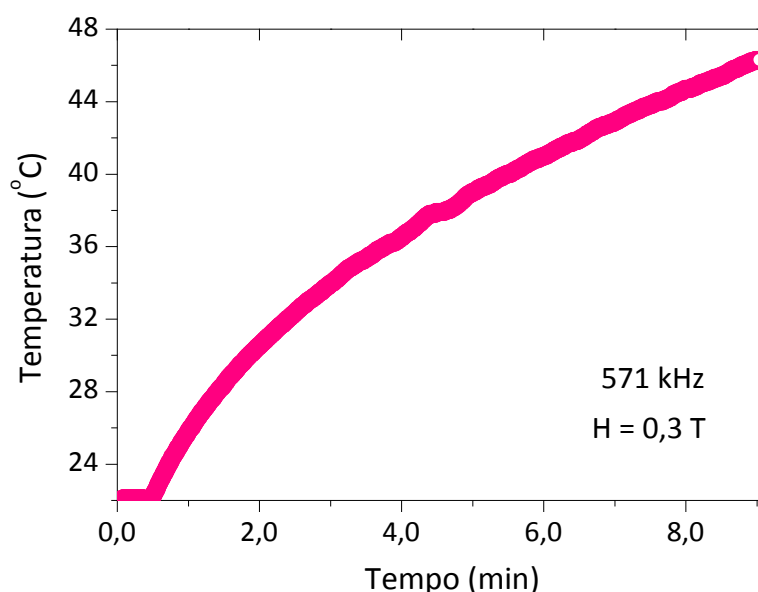


Figura 4.11 Curva da temperatura vs. tempo de aquecimento para as nanopartículas de Fe₃O₄-PEI obtida em uma amplitude de campo magnético AC de 0,03 T e frequência de 571 kHz.

Para determinar a eficiência como agente de aquecimento das NPs Fe₃O₄-PEI disperso em água a pH 7 na geração de calor foram realizadas medidas do poder de absorção, como função do campo magnético alternado na faixa de 170 – 300 Oe e com uma frequência fixa de 571 kHz. Para calcular o poder de absorção por unidade de massa do material magnético, AEP (W/g) usamos a Eq. 2.30. Como verificado na Figura 4.12, os valores de AEP variam desde 29,84 W g⁻¹ até 69,48 W g⁻¹ com o incremento na amplitude do campo AC desde 170 Oe até 300 Oe, respectivamente.

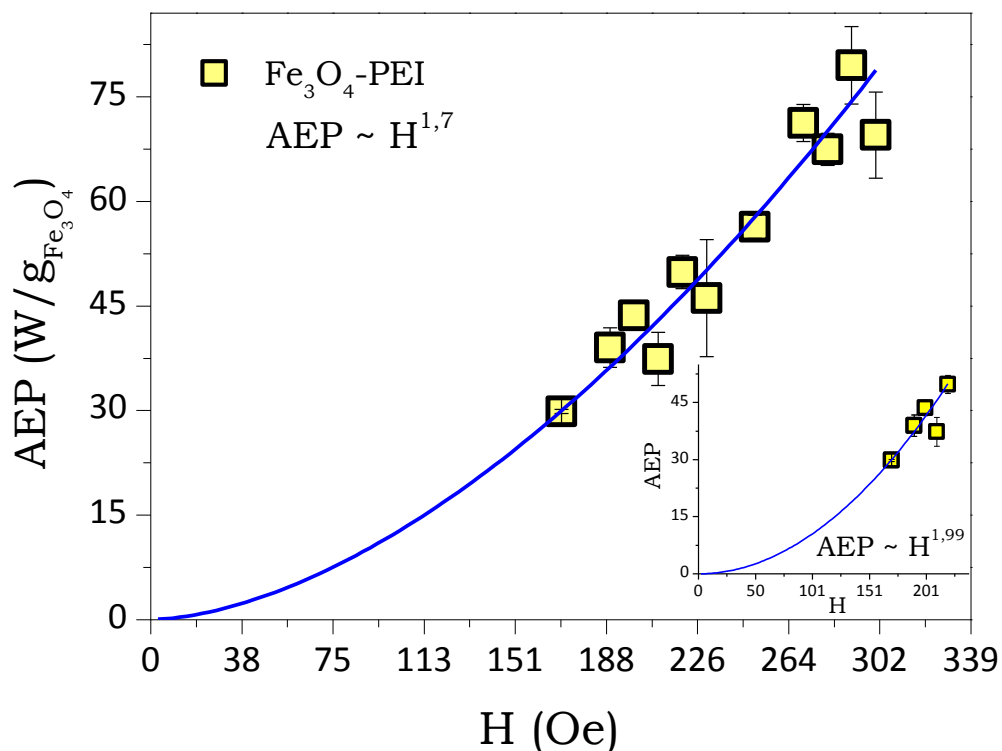
O valor do AEP determinado nas NPs Fe₃O₄-PEI é maior quando comparado a valores apontados na literatura para NPs Fe₃O₄ recobertas com polietilenoglicol e sintetizadas por coprecipitação, cujo valor máximo é de ~ 60 W g⁻¹ [22]. Essa diferença no valor do AEP pode estar associada à presença de interações magnéticas, distribuição de tamanho das partículas [124],

anisotropia magnética [125] [18], e/ou condições experimentais diferentes (frequência e campo magnético aplicados diferentes) dentre outros, que são parâmetros importantes para otimizar a eficiência de absorção de calor.

A maior concentração de nanopartículas magnéticas resulta no aumento das interações partícula-partícula, o que aumenta a energia de acoplamento de troca e afeta o aquecimento por indução [126], revelando claramente que o aumento na concentração de partículas não é uma razão óbvia para encontrar valores elevados de AEP [13]. Para otimizar a potência de aquecimento das NPs é importante determinar a concentração das NPs (para evitar as interações ou aglomerados), otimizar o tamanho das NPs (maiores aos encontrados nesta amostra) com uma distribuição estreita, a fim de que a aplicação de hipertermia magnética seja eficiente [127].

Os resultados experimentais mostram que em toda a faixa de medidas, o AEP aumenta com o incremento do campo e isto pode ser ajustado com uma lei de potência [102]. Na Figura 4.12 mostra-se o gráfico de AEP em função do campo AC aplicado. Usando a lei de potências para realizarmos o ajuste, determinamos a relação de $AEP \sim H^{1.7}$, que está em desacordo com a TRL desenvolvida por Roseinsweig. Acredita-se que os principais fatores que afetam o comportamento linear estar ligados à presença de interações, ao agente de revestimento, tamanho e distribuição das partículas e suas propriedades magnéticas. Como foi encontrada na seção anterior, a presença de interações magnéticas que governam o comportamento superparamagnético a temperatura ambiente do sistema as que podem influenciar na sua resposta.

Para campos menores de 220 Oe, obtemos um $AEP \sim H^{1.99}$, uma dependência aproximadamente quadrática ($\lambda \sim 2$) com o campo magnético (ver gráfico inserido na Figura 4.12), que está de acordo com a TRL para partículas superparamagnéticas. A origem para a geração de calor destas nanopartículas superparamagnéticas pode ser descrita de acordo com a relaxação de Néel (devido à rotação dos momentos magnéticos atômicos) e Browniano (rotação física das partículas no médio portador).



Figuras 4.12 Dependência do AEP com o campo magnético alterno a uma frequência fixa de 571 kHz. A linha contínua representa o ajuste dos dados experimentais usando a equação de potência para calcular a dependência ($AEP = \Phi H^\lambda$). No gráfico inserido mostra-se o AEP em função do campo magnético na região de baixos campos.

4.1.2 Estudo das nanopartículas de Fe₃O₄ sintetizados pelo método de decomposição térmica

4.1.2.1 Estudo estrutural e morfológico

Figura 4.13 mostra o padrão de difração de raios-X das nanopartículas de magnetita. Como se observa, todos os picos de difração correspondem à estrutura spinélio cúbico (Fd-3m) da fase magnetita (JCPDS-ICCS Card #75-449) e não foram detectados picos extras de impurezas no padrão DRX. O parâmetro de rede foi de $a = b = c = 8,3602 \text{ \AA}$. Os picos de difração DRX são bastante largos o que reflete o tamanho nanométrico das partículas. O tamanho médio dos cristalitos foi estimado usando a largura de todos os picos de difração (modelados usando uma função Pseudo-Voigt pelo método de refinamento de Rietveld) e a equação de Scherrer. O tamanho médio estimado foi de $\langle D \rangle_{\text{DRX}} = 6,2 \pm 0,1 \text{ nm}$.

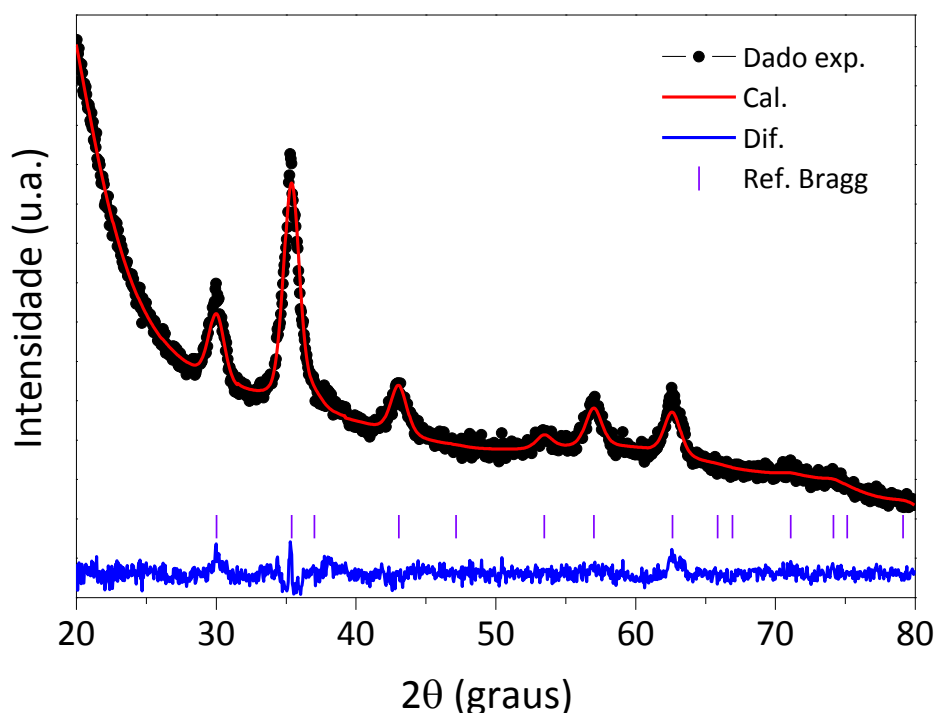


Figura 4.13 Padrão de difração de raios-X da nanopartículas de magnetita refinado usando o método de Rietveld. Os dados experimentais e calculados são representados pelos pontos e linhas sólidas, respectivamente. A diferença entre os dados experimentais e calculados também é mostrada na parte inferior do gráfico (linha azul). As posições das reflexões de Bragg da estrutura do espinélio cúbico também são mostradas (cor violeta).

Para pesquisar a morfologia das nanopartículas, foram obtidas imagens de MET. Na Figura 4.14 estão presentes algumas das imagens. Nestas imagens é possível verificar que as nanopartículas possuem forma aproximadamente esférica. Foram analisadas várias imagens de MET para montar o histograma com ajuda do software Image-J. Se contaram $N \sim 500$ partículas e o histograma foi construído seguindo o modelo de Sturges. Esse histograma é mostrado no gráfico contido na Figura 4.14 (a). Subsequentemente, a distribuição histográfica foi modelada com a função lognormal e o ajuste dos dados levaram ao valor do diâmetro mediano de $D_0 = 6,15$ nm com uma polidispersão de $\sigma = 0,15$. Usando estes valores, se determinou um tamanho médio das partículas de $\langle D \rangle_{\text{MET}} = (6,3 \pm 0,2)$ nm. Este valor é comparável com o valor obtido por DRX.

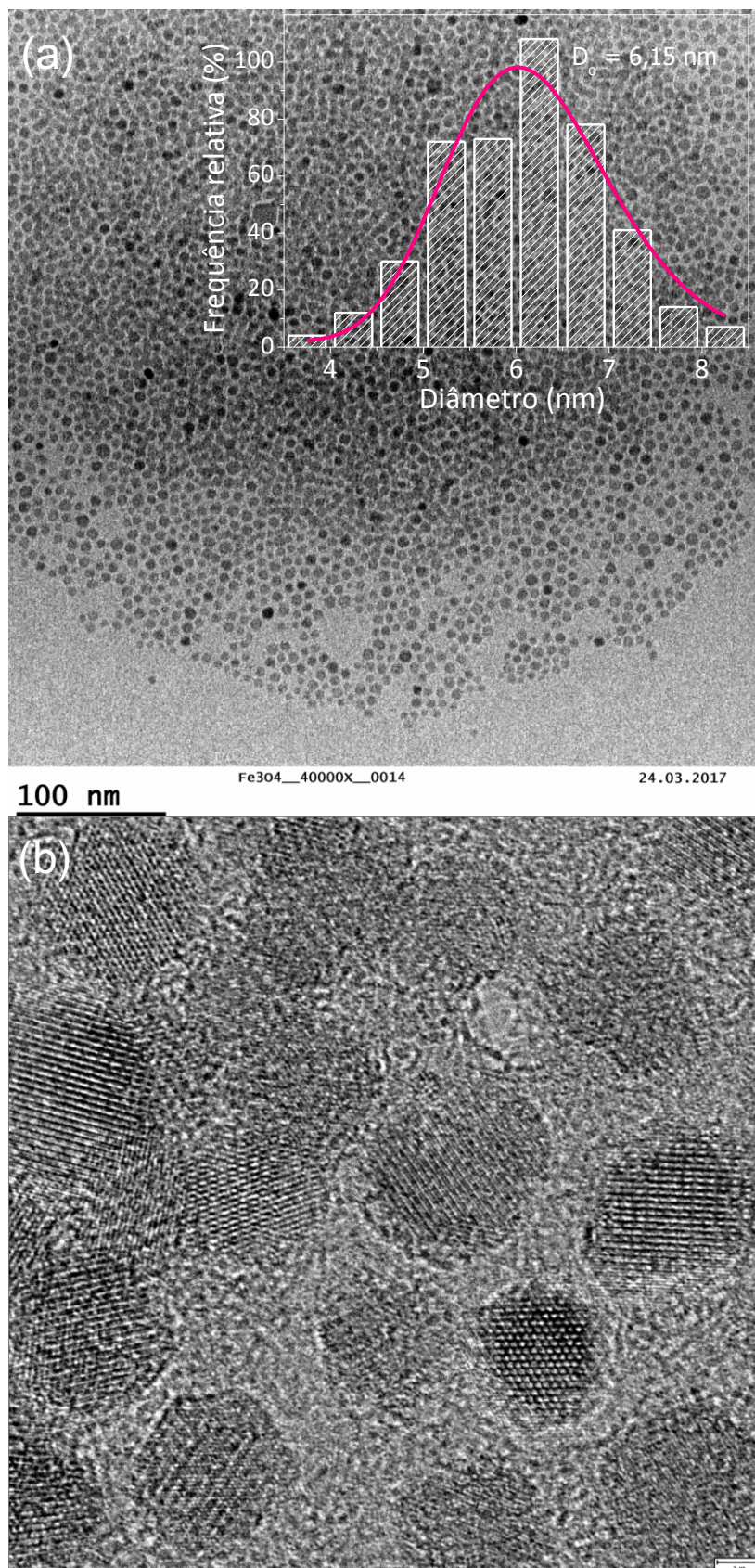


Figura 4.14 (a) Imagem de MET das nanopartículas Fe₃O₄. No gráfico inserido, se mostra o histograma modelado com uma distribuição lognormal representada pela linha contínua e (b) uma imagem ampliada das NPs.

4.1.2.2 Estudo das propriedades magnéticas DC

Na Figura 4.15 apresentam-se as curvas de magnetização zero-field-cooled (ZFC) e field-cooled (FC) em função da temperatura obtidas com diferentes campos magnéticos aplicados de 30, 200 e 400 Oe para a amostra em fluido de NPs de Fe_3O_4 . Como se observa na Figura 4.15 (a) a curva ZFC obtida em 30 Oe mostra um máximo localizado em 21 K, e, à medida que se aumenta a intensidade do campo, o pico máximo tende a deslocar-se para temperaturas menores.

Em condições ideais, um comportamento similar ao observado nestas nanopartículas nas curvas ZFC/FC é comumente associado com a relaxação térmica dos momentos magnéticos das partículas monodispersas e não-interagentes. A posição do máximo na curva ZFC está relacionada com a T_B do sistema. Também se nota que as curvas FC crescem monotonicamente com a diminuição da temperatura e tendem a separar-se das curvas ZFC em temperaturas um pouco acima de T_B . Este comportamento irreversível entre as curvas ZFC e FC acontece próximo do máximo da curva ZFC, a uma temperatura chamada de irreversibilidade, $T_{irr} \sim 39$ K (para as curvas ZFC/FC obtidas em campo de 30 Oe). Este resultado indica a ausência de agregados de partículas e uma distribuição de tamanhos estreita que é consistente com os resultados obtidos da análise por MET.

Considerando T_B proporcional à constante efetiva de anisotropia e ao volume das partículas segundo: $25 k_B T_B = K_{eff} V$, onde se assumiu que a janela de tempo em medidas magnéticas DC é de $t_m = 100$ s. Utilizando o valor de K_{eff} do sistema *bulk*, se obtém um diâmetro de $D = 10,5$ nm para as NPs estudadas. Este tamanho é significativamente maior que os obtidos por MET e DRX. Assumindo-se que a K_{eff} não muda no sistema de NPs com relação ao *bulk*, uma das explicações é que existem interações entre as partículas que provocam o deslocamento da temperatura de bloqueio para temperaturas maiores do que a esperada para o tamanho encontrado por MET e DRX.

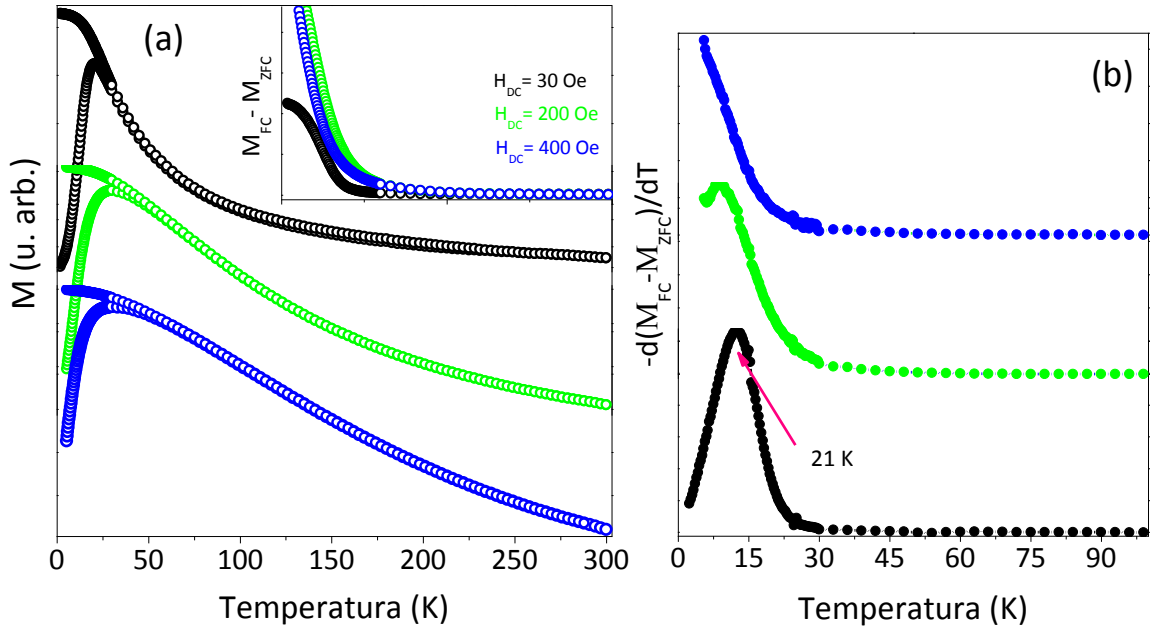


Figura 4.15 (a) curvas ZFC e FC obtidas em diferentes campos magnéticos para as nanopartículas de Fe_3O_4 e inserido a diferença da magnetização para os diferentes campos e (b) derivada da susceptibilidade DC obtida em diferentes campos.

Para determinar as interações entre partículas de Fe_3O_4 foram realizadas medidas do fluido. Na Figura 4.16 se mostra as curvas ZFC e FC em função de temperatura obtidas a 30 Oe. Sabe-se que em um sistema real de partículas magnéticas devemos considerar o efeito da distribuição do tamanho da partícula, as interações entre partículas, efeitos de desordem de spin na superfície, e anisotropia magnética.

Considerando o efeito da distribuição do tamanho das partículas que dá origem a uma distribuição de temperaturas de bloqueios T_B [128] e usando as curvas ZFC e FC podemos obter a distribuição da temperatura de bloqueio a partir da relação $f(T_B) \sim -d(\chi_{FC} - \chi_{ZFC})/dT$ [71]. Como observado no gráfico da Figura 4.16, os dados experimentais mostram uma característica modal sugerindo a presença de uma distribuição de temperaturas de bloqueio que pode ser modelada usando uma distribuição lognormal de temperaturas de bloqueios: $f(T_B) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma T_B} \exp\left[-\frac{1}{2\sigma^2} \ln^2\left(\frac{T_B}{\langle T_B \rangle}\right)\right]$, onde $\langle T_B \rangle$ é o valor médio da temperatura de bloqueio da distribuição e σ é o parâmetro de polidispersão.

O ajuste dos dados experimentais (ver gráfico inserido na Figura 4.16) proporcionou os valores de $\langle T_B \rangle = 12,8$ K e $\sigma = 0,41$. Esses valores obtidos do ajuste foram usados na simulação das curvas ZFC e FC usando a Eqs. 2.18 e 2.19, nas quais se considera a contribuição de

partículas bloqueadas e não-bloqueadas (em estado superparamagnético). O resultado da simulação é representado com a linha contínua na Figura 4.16. Como se pode observar, as curvas ZFC e FC experimentais são muito bem reproduzidas e como resultado da comparação se estimou um valor de $K_{\text{eff}} = 4,4 \times 10^4 \text{ J/m}^3$.

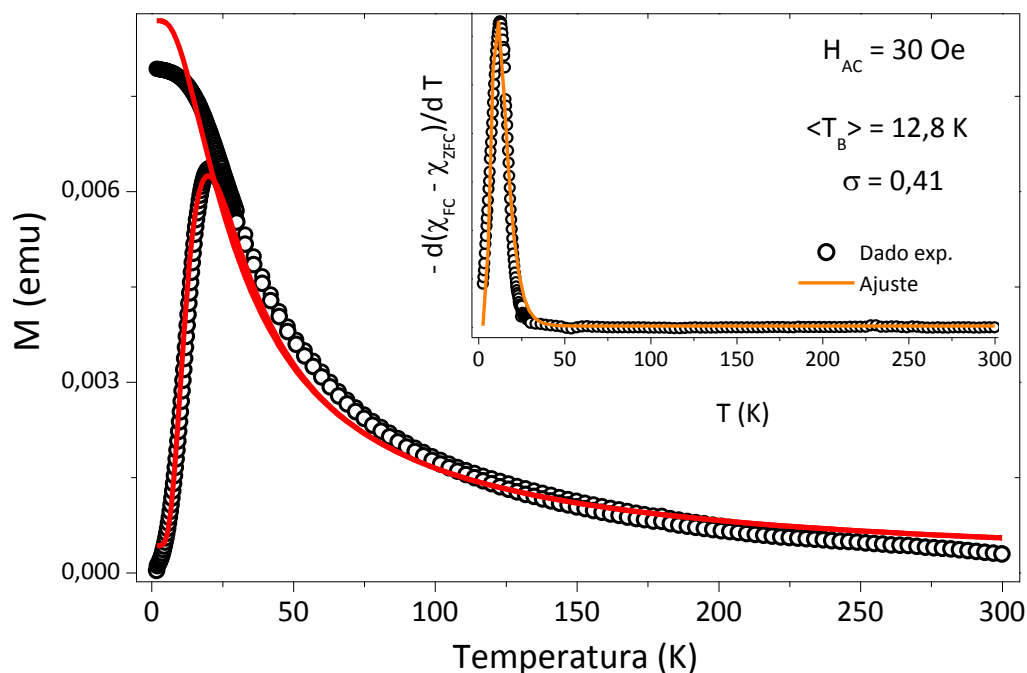


Figure 4.16 Curvas de magnetização ZFC e FC obtidas em um campo de $H = 30 \text{ Oe}$ para as nanopartículas Fe_3O_4 (amostra em fluido). A simulação (linha contínua) foi obtida usando as Eqs. 2.18 e 2.19. No gráfico inserido é mostrado a $-d(\chi_{FC} - \chi_{ZFC})/dT$ em função da temperatura e a linha sólida representa a função lognormal para ajustar os dados experimentais.

Para determinar o efeito da distribuição do tamanho de partícula e/ou das interações partícula-partícula, nós obtivemos curvas de magnetização em função do campo aplicado (M vs. H) para diferentes temperaturas. A Figura 4.17 (a) mostra a curva M vs. H obtida a 5 K e 300 K . As curvas revelam campo coercivo nulo a 300 K (ausência de histerese) e um $H_c \sim 312 \text{ Oe}$ em 5 K , além do aumento rápido de magnetização na região de baixos campos magnéticos. Estas características são consistentes com o comportamento superparamagnético e com os resultados obtidos das curvas ZFC e FC.

Assumindo que o sistema de NPs são monodomínio e que se encontram no estado superparamagnético, a curva M vs. H obtidas a 300 K pode ser ajustada usando a função de Langevin (Eq. 2.11) para obter informação da distribuição de momento magnético: valor médio e a polidispersão. O ajuste da curva é mostrado na Figura 4.17 (b). Os parâmetros obtidos do ajuste

são: $\mu_0 = 6485$ e $\sigma = 0,76$. Usando este resultado, pode-se calcular o momento magnético médio de $\langle \mu \rangle = \mu_0 \exp(\sigma^2/2)$, que leva a um $\langle \mu \rangle = 8656 \mu_B$. Uma estimativa do valor do diâmetro médio magnético nos fornece um $\langle D \rangle = 6,9$ nm, usando M_s da magnetita *bulk*. Este valor é próximo ao valor obtido por MET e DRX, o indicando que a intensidade das interações partícula-partícula é fraca nesta amostra e a população de agregados magnéticos ou correlações magnéticas é desprezível.

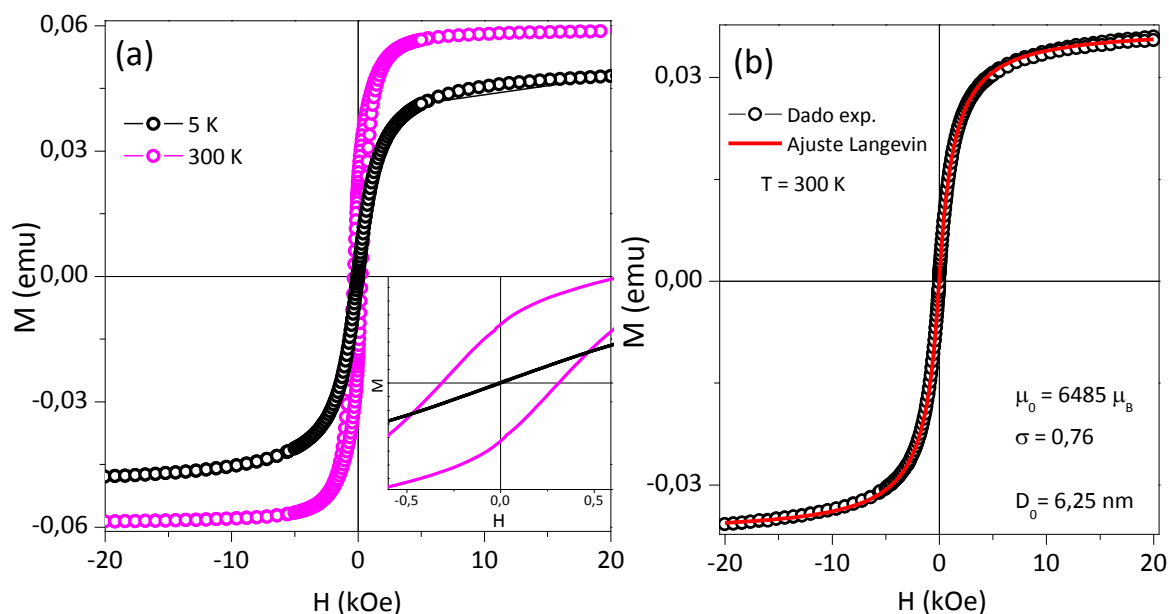


Figura 4.17 (a) Laços de histereses para amostra Fe_3O_4 medidas a 5 e 300 K e inserido na figura uma expansão para observar a coercividade. (b) Ajuste da curva de M vs. H obtidas a $T = 300$ K usando a função de Langevin.

Valores do campo coercitivo (H_c) foram obtidos das curvas de histerese em diferentes temperaturas para as NPs Fe_3O_4 em fluido. Na Figura 4.18, expomos o comportamento do H_c em função da temperatura. Conforme observado o H_c diminui rapidamente à medida que a temperatura é aumentada e acima de ~ 30 K seu valor é muito pequeno tendendo a desaparecer. Isto confirma que as NPs se encontram no estado superparamagnético acima dessa temperatura, de acordo com resultado da análise dos traços ZFC-FC.

No entanto, a dependência da temperatura do campo coercivo pode ser atribuída à distribuição do tamanho de partícula e/ou efeitos de interação. Nunes *et al.* [72] propuseram um modelo alternativo para explicar esta dependência térmica do H_c que leve em consideração o efeito da distribuição de tamanho de partícula, no qual a coexistência de ambos estados de partículas superparamagnéticas e bloqueadas é considerado [72]. Neste caso, usando os valores

obtidos das análises das curvas ZFC e FC, a dependência do H_c com a temperatura é bem modelado, como se mostra na Figura 4.18. Nunes *et al.* propuseram que o efeito da interação pode ser descrito pelo parâmetro empírico γ , usado na função $f(\gamma T_B)$ [72]. No nosso caso, o valor deste parâmetro foi de $\gamma = 0,67$, que pode ser considerado pequeno indicando interações fracas. A contribuição das partículas superparamagnéticas assim como da temperatura de bloqueio média são importantes para descrever a dependência térmica do campo coercivo.

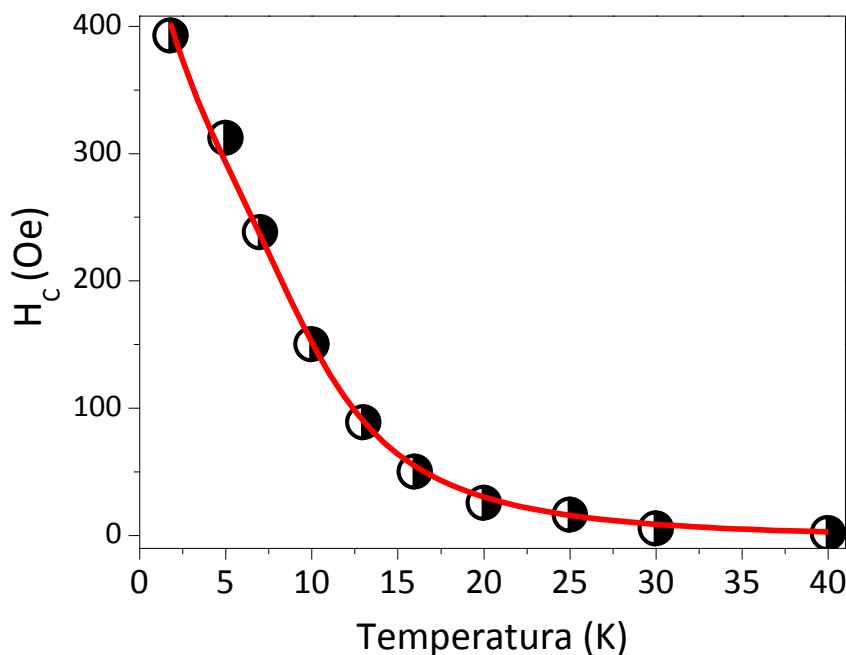


Figura 4.18 Campo coercivo em função da temperatura. Os símbolos representam os dados experimentais a linha continua o ajuste.

4.1.2.3 Susceptibilidade AC

Foram realizadas medidas de susceptibilidade magnética AC na amostra fluido, variando a frequência de excitação na faixa de $0,2 \text{ Hz} \leq f \leq 1 \text{ kHz}$. Na Figura 4.19 se mostram as curvas $\chi'(T)$ e $\chi''(T)$ vs. T. Ambas curvas mostram um máximo cuja posição depende de f, o que é consistente com a relaxação magnética de momentos magnéticos. A posição do máximo T_m observado na curva χ' vs. T é deslocada para altas temperaturas quando a frequência é aumentada. Na Fig. 4.19 (b) encontra-se no gráfico do inverso da frequência ($\tau=1/f$) em função do inverso de T_m . O comportamento linear pode ser modelado usando a relação de Néel. O ajuste originou um tempo de relaxação característico de $\tau_0 = 2,3 \times 10^{-12} \text{ s}$ e uma energia de ativação de $E_a/k_B = 747 \text{ K}$. O valor τ_0 está na faixa esperada para um sistema mostrando comportamento superparamagnético.

Uma análise considerando a E_{d-d} e o volume médio obtido da análise de MET, uma estimativa da energia indica que $T' = \frac{E_{d-d}}{k_B} \sim 36$ K, quando consideramos que as NPs estão em contato uma com as outras. Uma vez que as partículas possuem separação física entre elas devido à camada de surfactante existente, se espera a diminuição rápida na intensidade da interação dipolar dada por: $\frac{E_{d-d}(\alpha)}{E_{d-d}(0)} \sim d_W^3 / (d_W + \alpha)^3$, onde α é a separação entre as bordas das partículas e d_W é o tamanho médio das partículas. Para um $\alpha/d_W \sim 2$, a interação partícula-partícula é $\sim 8\%$ do valor de $E_{d-d}(0)$. Este resultado indica que as interações dipolares são desprezíveis e que a barreira de energia somente tem a contribuição da energia de anisotropia magnetocristalina e é dada por: $E_a = E_{ani} = K_{eff}V$. Usando o volume da NPs da magnetita obtidas por MET, nós estimamos um valor da constante de anisotropia efetiva de $K_{eff} = 0,98 \times 10^4$ J/m³. Este valor é da ordem de magnitude dos valores reportados da constante de anisotropia da magnetita *bulk*.

O último resultado é confirmado ao calcular o parâmetro $\Phi = 0,085$ para estas NPs Fe₃O₄ que é consistente com os valores reportados para sistemas de partículas com interações fracas, reforçando que a contribuição das interações dipolares entre as partículas desprezíveis neste sistema.

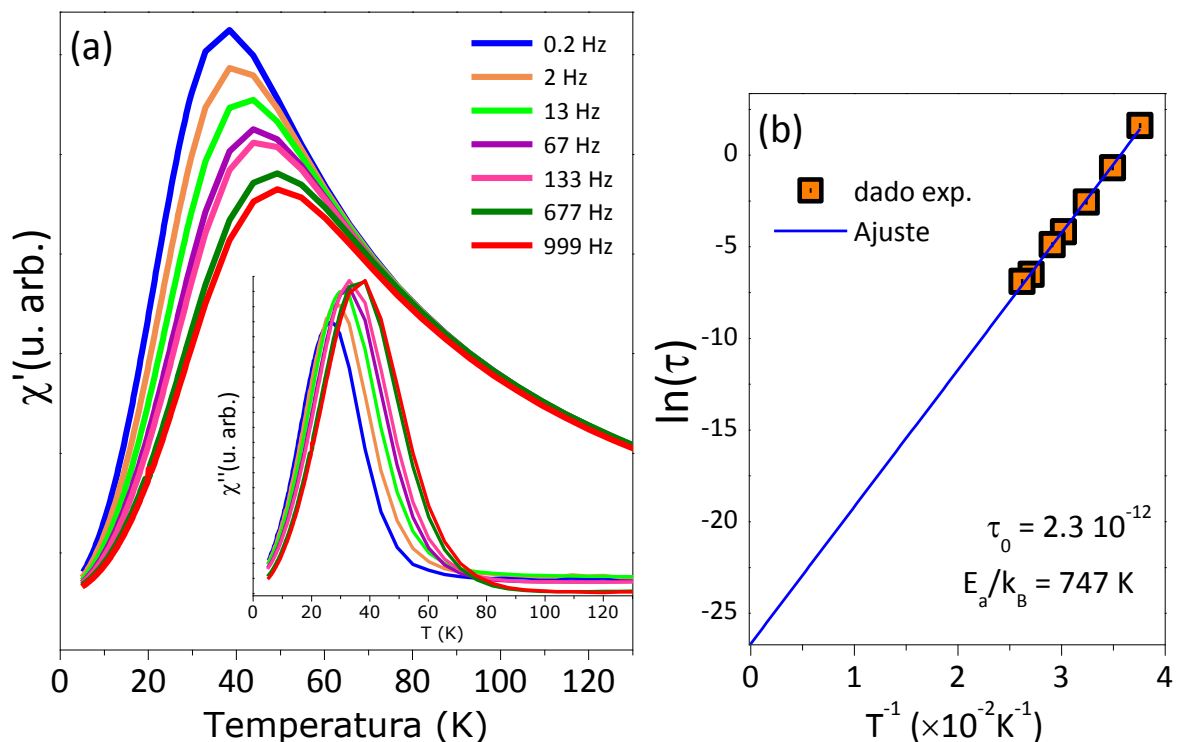


Figura 4.19 (a) medidas da susceptibilidade AC em função da temperatura em diferentes frequências de excitação para o fluido de NPs Fe₃O₄. (b) O inverso da frequência de excitação como função do inverso de T_m . A linha sólida representa o ajuste usando a relação de Néel.

4.1.3 Estudo das nanopartículas Fe₃O₄-PEI sintetizados pelo método de hidrólise oxidativa

4.1.3.1 Estudo estrutural e morfológico

Na Figura 4.20 é mostrado o padrão de difração de raios-x da amostra em pó de NPs de Fe₃O₄ recobertas com PEI. Todos os picos de difração da amostra foram identificados com a fase cristalina da magnetita e nenhuma fase secundária foi observada. O parâmetro de rede obtido tem um valor de $a = b = c = 8,3654 \text{ \AA}$. O tamanho médio dos cristalitos foi calculado usando a equação de Scherrer considerando todos os picos de difração, e proporcionou um $(D)_{\text{DRX}} = 18,5 \pm 1,1 \text{ nm}$.

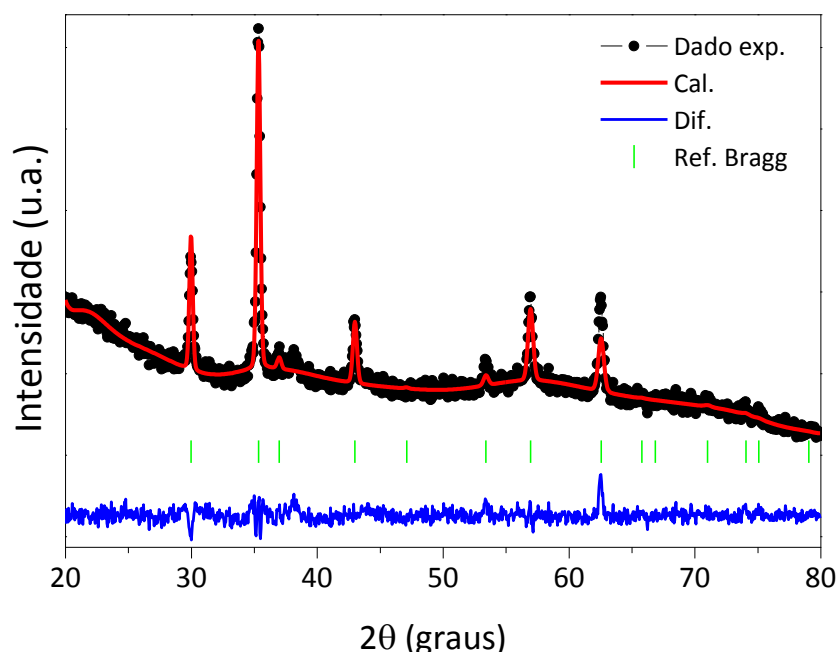


Figura 4.20 Padrão de difração de raios-X da amostra em pó da magnetita recoberta com PEI refinada usando o método de refinamento de Rietveld. Os dados experimentais e calculados são representados pelos pontos e linhas sólidas, respectivamente. A diferença entre os dados experimentais e calculados também é mostrada na parte inferior do gráfico (linha cor azul) as reflexões de Bragg da estrutura do espinélio cúbico também são indicadas (cor violeta).

Para pesquisar a morfologia das nanopartículas de Fe₃O₄-PEI sintetizadas por hidrólise oxidativa, foram obtidas imagens de MET como mostrada na Figura 4.21. A morfologia das NPs evidencia uma forma octaédrica, no entanto, partículas aglomeradas também são observadas apresentando-se como uma única partícula grande, isto pode ser uma consequência das interações dipolares magnéticas entre as nanopartículas (ver Fig. 4.21) e com distribuição grande de partículas. As imagens MET foram utilizadas para contar $N \sim 700$ partículas com ajuda do software Image-J. Seguidamente, se montou o histograma usando o método de Sturges, que é mostrado no gráfico da Figura 4.21(a).

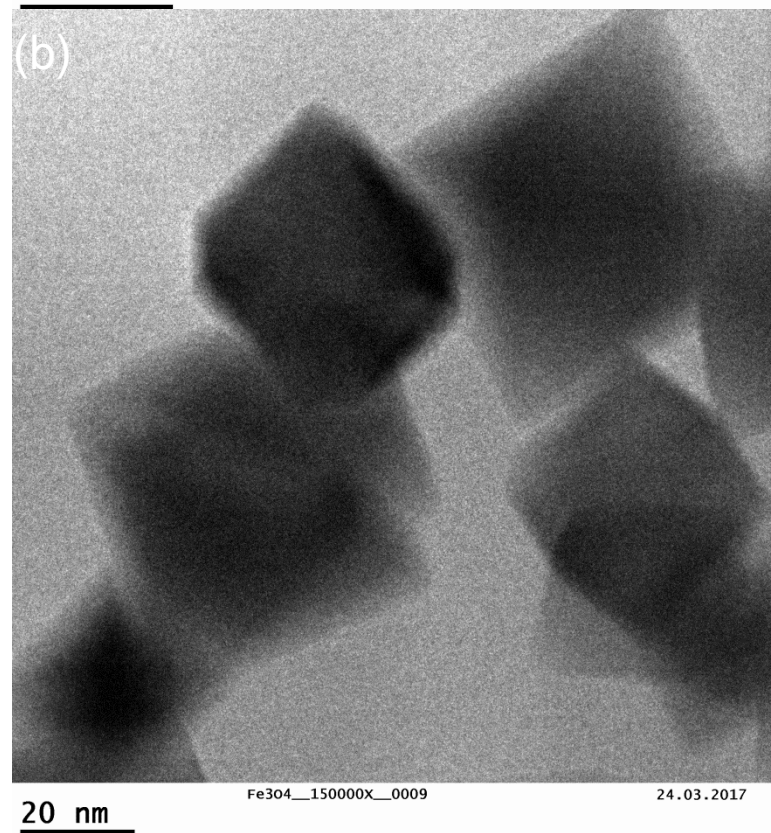
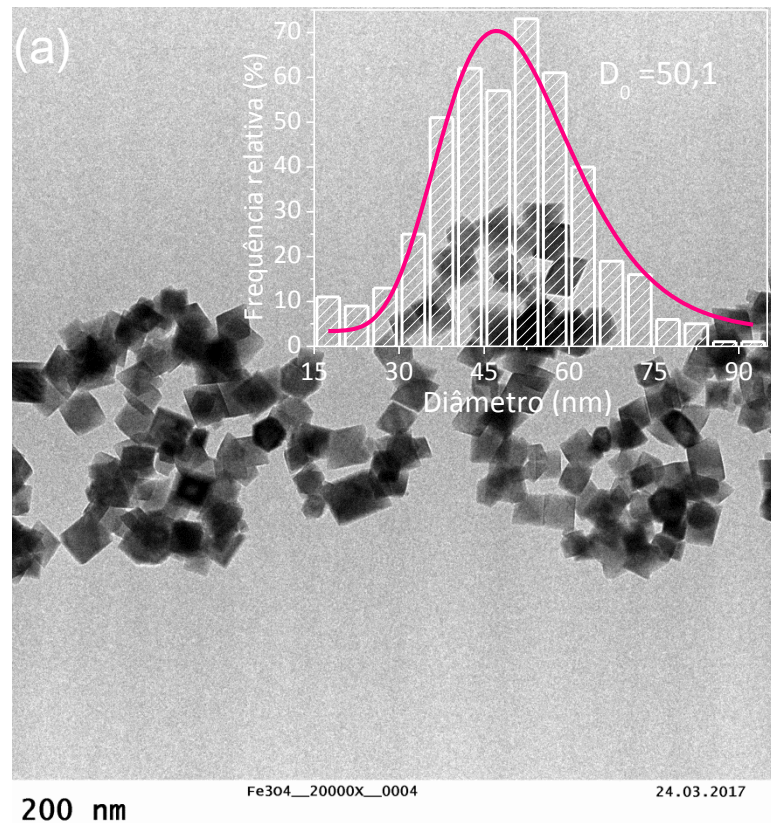


Figura 4.21 (a) Imagem de MET das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ e inserido sua distribuição histogrâmica de tamanho de partícula. (b) Imagem de amplificado de MET das nanopartículas com sua respectiva imagem da transformada de Fourier da área selecionada com suas reflexões.

Este histograma foi modelado usando uma função lognormal e o ajuste dos dados forneceu valor da mediana de $D_0 = 50,1$ e uma polidispersão de $\sigma = 0,24$. Usando estes valores, o tamanho médio das partículas foi de $\langle D \rangle_{\text{MET}} = (51,6 \pm 5,3)$ nm. Um diâmetro cristalino menor foi encontrado por DRX. A diferença entre os dados de DRX e de MET claramente sugeriu que as NPs são policristais, o que invalida a aplicação da relação de Scherrer para estimar o tamanho cristalino adequadamente.

4.1.3.2 Propriedades magnéticas

Na Figura 4.22 se mostra as curvas ZFC/FC das NPs Fe_3O_4 -PEI medidas em pó em diferentes campos magnéticos aplicados desde 10 – 500 Oe. Como se observa, as curvas mostram comportamento magnético similar nos diferentes campos aplicados.

Em baixa temperatura, as curvas de magnetização ZFC em todos os campos aplicados mostram dois pontos de inflexão em temperaturas $T_1 \approx 30$ K e $T_2 \approx 96$ K. O ombro em T_2 foi atribuído à transição de Verwey das NPs de magnetita estudadas que é inferior à temperatura de Verwey de magnetita *bulk* (~ 120 K) [129]. Este valor menor foi atribuído ao efeito de tamanho das nanopartículas, o qual reduz a temperatura de transição segundo reportes na literatura [98] [99] [123] [130] ou forma da partícula [131]. No entanto, a presença desta transição indica boa estequiometria de $\text{Fe}^{2+/3+}$ nas nanopartículas que apresentam formato octaédrico [129]. As curvas FC mostram pequena protuberância na mesma temperatura em todos os campos aplicados (ver gráfico inserido na Figura 4.22). Observamos também que as curvas FC indicam aumento da magnetização com a diminuição da temperatura.

Por outro lado, o ombro em T_1 tem sido observado também em NPs de magnetita cuja origem não está esclarecida [120] [132]. Na nossa amostra, este ombro fica mais alargado com o aumento do campo aplicado, o que pode ter relação com processos de relaxação/bloqueio térmico de NPs fracamente ou não interagentes, que leva a uma barreira reduzida para reorientação do momento magnético [99]. Isto está de acordo com os resultados obtidos da análise MET que evidenciaram a presença de partículas menores.

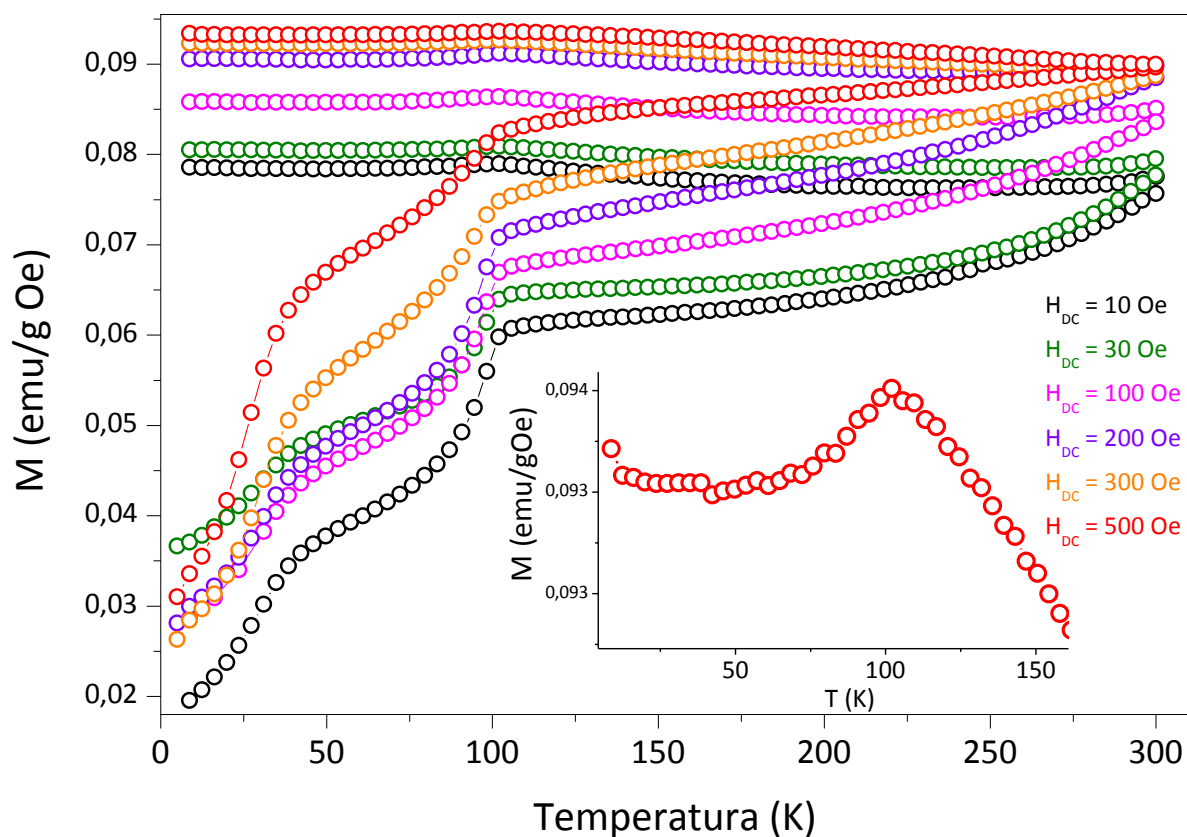


Figura 4.22 Curvas ZFC/FC obtidas em diferentes campos magnéticos aplicado para as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$. No gráfico inserido se mostra o máximo na curva FC obtida em 500 Oe.

Na Figura 4.23, os laços de histereses obtidos a 5 e 300 K são apresentados. Em 300 K, notamos que as partículas exibem comportamento ferromagnético, o que é esperado, uma vez que temos NPs relativamente grandes para as quais a temperatura de bloqueio devem estar acima de 300 K. Além disso, a magnetização tende a saturar em 7 T (ver gráfico inserido na Figura 4.23). A 5 K, o valor de magnetização de saturação é de 97,5 emu/g que é ligeiramente maior do o valor obtido a 300 K (91,6 emu/g). Estes valores são próximos dos valores mencionados para a magnetita *bulk* e confirmam a alta cristalinidade das NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$. Como é esperada, a presença da camada PEI não tem influência nas propriedades magnéticas das NPs do núcleo de Fe_3O_4 .

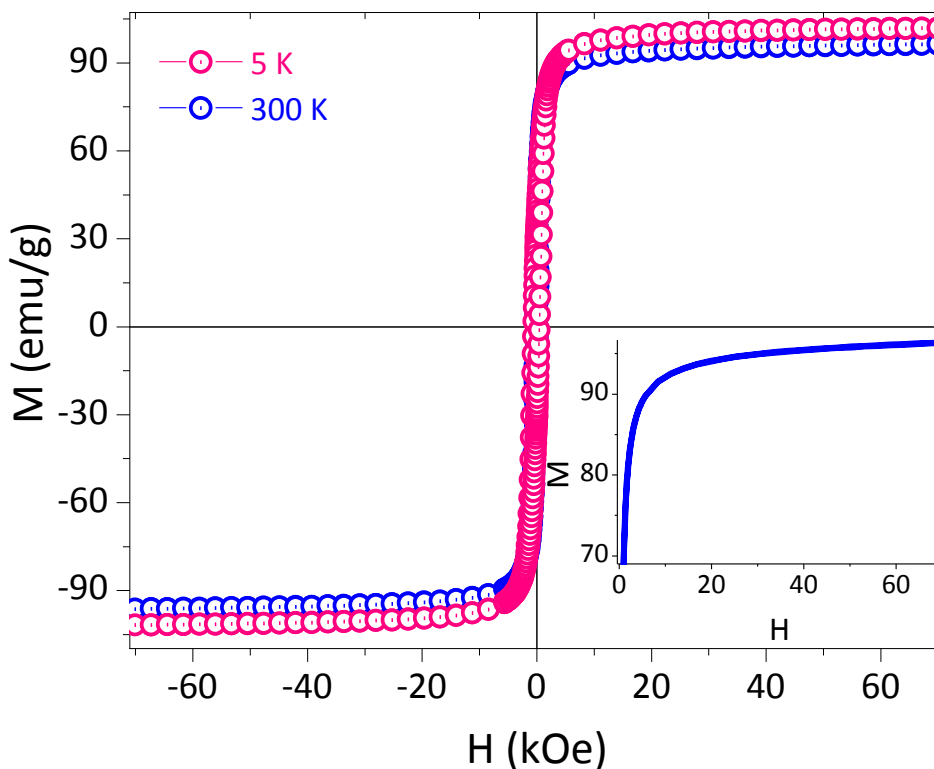


Figura 4.23 Curvas de magnetização como função do campo magnético aplicado para as NPs de Fe_3O_4 -PEI medidas a 5 e 300 K. No gráfico inserido se mostra a tendência a saturação da magnetização em 300 K.

Valores do campo coercitivo (H_c) foram obtidos dos laços de histerese medidos a diferentes temperaturas nesta amostra. A Figura 4.24 mostra a dependência do H_c com a temperatura. O comportamento do H_c diminui quando a temperatura é aumentada. Podemos observar a presença de dois pontos de inflexão. A fim de distinguir a mudança induzida pela temperatura no H_c , separamos duas regiões, como mostrado na Fig. 4.24, próximas a ~ 35 K e 105 K. A posição destas temperaturas se encontra próximo à posição do máximo determinado nas curvas de susceptibilidade AC e nas curvas ZFC-FC em função de temperatura. Pode-se inferir que os efeitos de partículas bloqueadas podem explicar o comportamento do H_c a baixas temperaturas já que ao diminuir a temperatura, a população destas partículas aumenta, o que aumenta o valor de H_c . No gráfico da Figura 4.24, podemos verificar a variação de campo coercivo: em 5 K um valor de $H_c \sim 495$ Oe e a 300 K um valor do $H_c \sim 101$ Oe.

Quando o campo coercitivo difere de zero em altas temperaturas pode indicar a existência de uma distribuição larga de tamanhos de nanopartículas e que são suficientemente grandes para permanecerem no estado bloqueado ou que existam interações partícula-partícula que retardam a relaxação térmica dos momentos magnéticos das partículas.

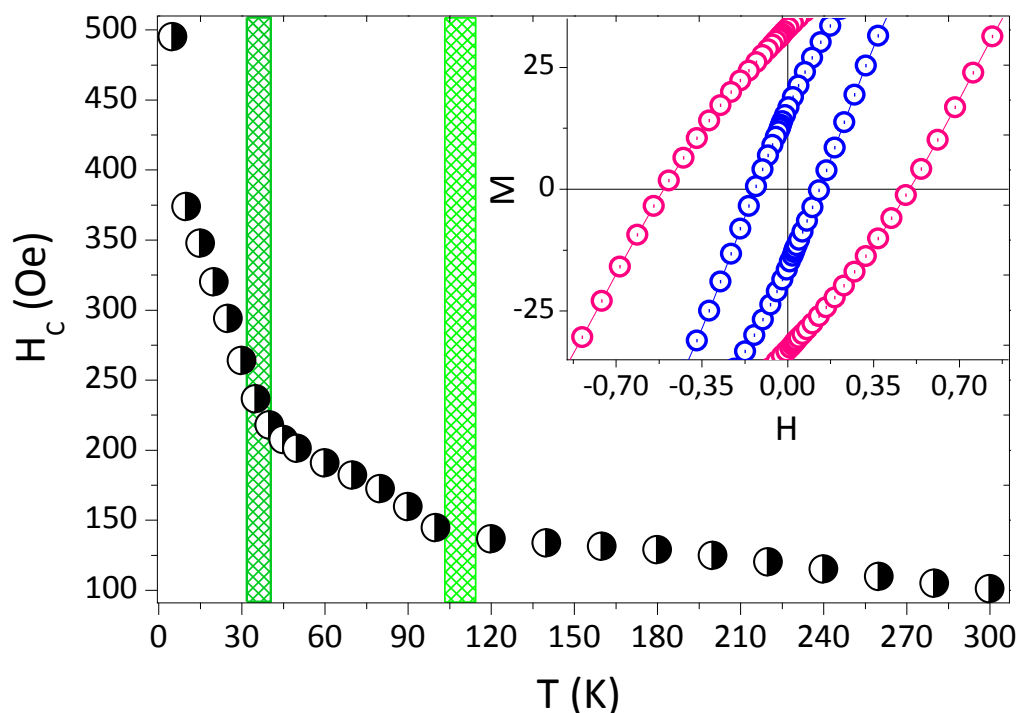


Figura 4.24 Campo coercivo em função da temperatura. As linhas verticais indicam duas regiões de comportamento. No gráfico inserido mostram ser os laços de histerese e campos coercivos obtidos a 5 e 300 K.

4.1.3.3 Susceptibilidade AC

Para analisar o efeito de interações interpartículas, temos estudado as propriedades dinâmicas de nosso sistema através da dependência da temperatura das componentes da parte real ($\chi'(T)$) e imaginária ($\chi''(T)$) da susceptibilidade magnética AC da amostra em pó. Como se observa na Figura 4.25, a curva χ' vs. T mostra duas mudanças sugerindo duas transições. Na região de baixa temperatura, um ombro próximo a $T_1 \sim 48$ K e em temperaturas maiores, a posição de um máximo em $T_2 \sim 105$ K é observado. Estas duas temperaturas características não apresentam deslocamento significativo ao mudar a frequência de excitação. A posição destas temperaturas se encontra próxima à posição do máximo determinado nas curvas ZFC-FC. No gráfico inserido da Fig. 4.25 é mostrado o gráfico da componente χ'' vs. T, onde pode distinguir-se um máximo em baixas temperaturas (T_1) e outro bem largo na região de T_2 .

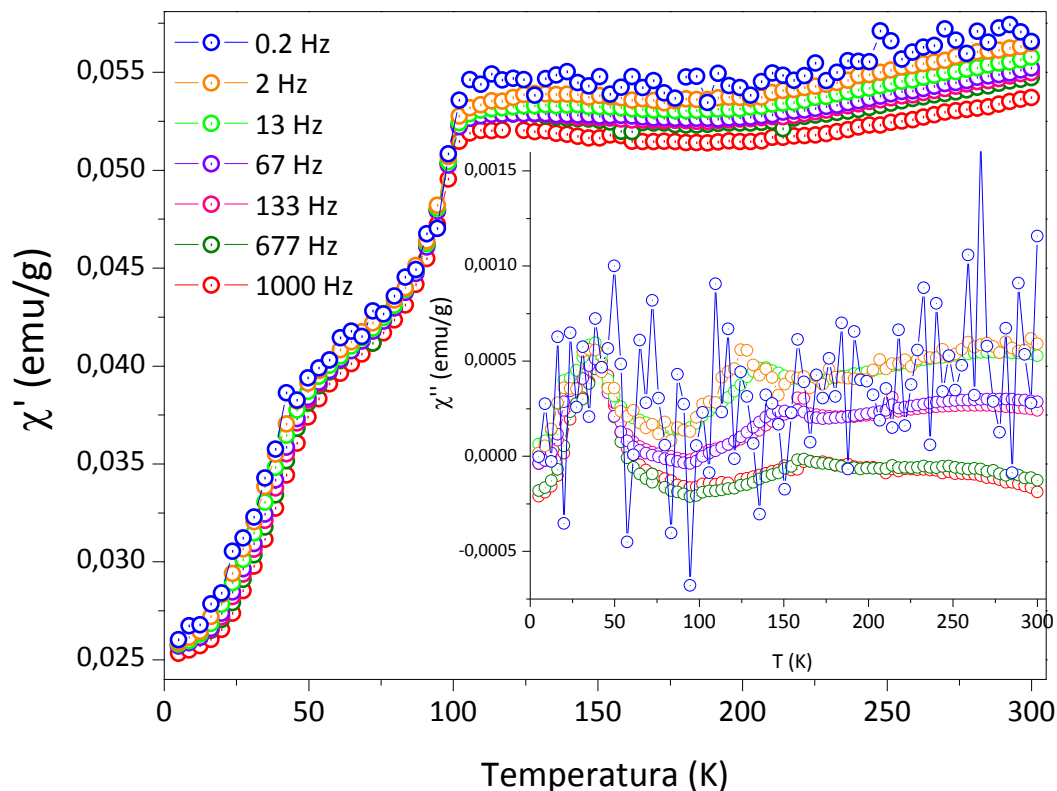


Figura 4.25 Medidas da susceptibilidade AC como função da temperatura obtidas com um campo oscilante AC de 5 Oe para as nanopartículas Fe₃O₄-PEI parte real e inserido mostra a componente $\chi''(T)$ vs. T .

Para redefinir melhor os pontos experimentais foram refeitas as medidas da componente χ'' vs T em baixa temperatura na mesma faixa de frequências. Como se mostra na Figura 4.26 observa-se uma temperatura máxima bem definida que se desloca para temperaturas maiores quando a frequência é aumentada. Para estudar o comportamento dinâmico determinamos a temperatura máxima da componente $\chi''(T)$ para cada frequência. Na Figura 4.26 (b) pode ser visto o gráfico do tempo característico da medida em função do inverso da temperatura máxima (T_m). Os pontos experimentais foram ajustados usando a lei de relaxação de Néel e o ajuste permitiu encontramos um tempo de relaxação característico de $\tau_0 = 2,9 \times 10^{-20}$ s e uma energia de ativação de $E_a/k_B = 1485$ K. O valor de τ_0 sugere que a dinâmica de relaxação do sistema não poder ser adequadamente descrito pelo modelo de Néel (ver Figura 4.26 (b)). Este valor não é fisicamente aceitável e é consiste com valores comumente encontrados para nanopartículas magnéticas acopladas por interações magnéticas [119].

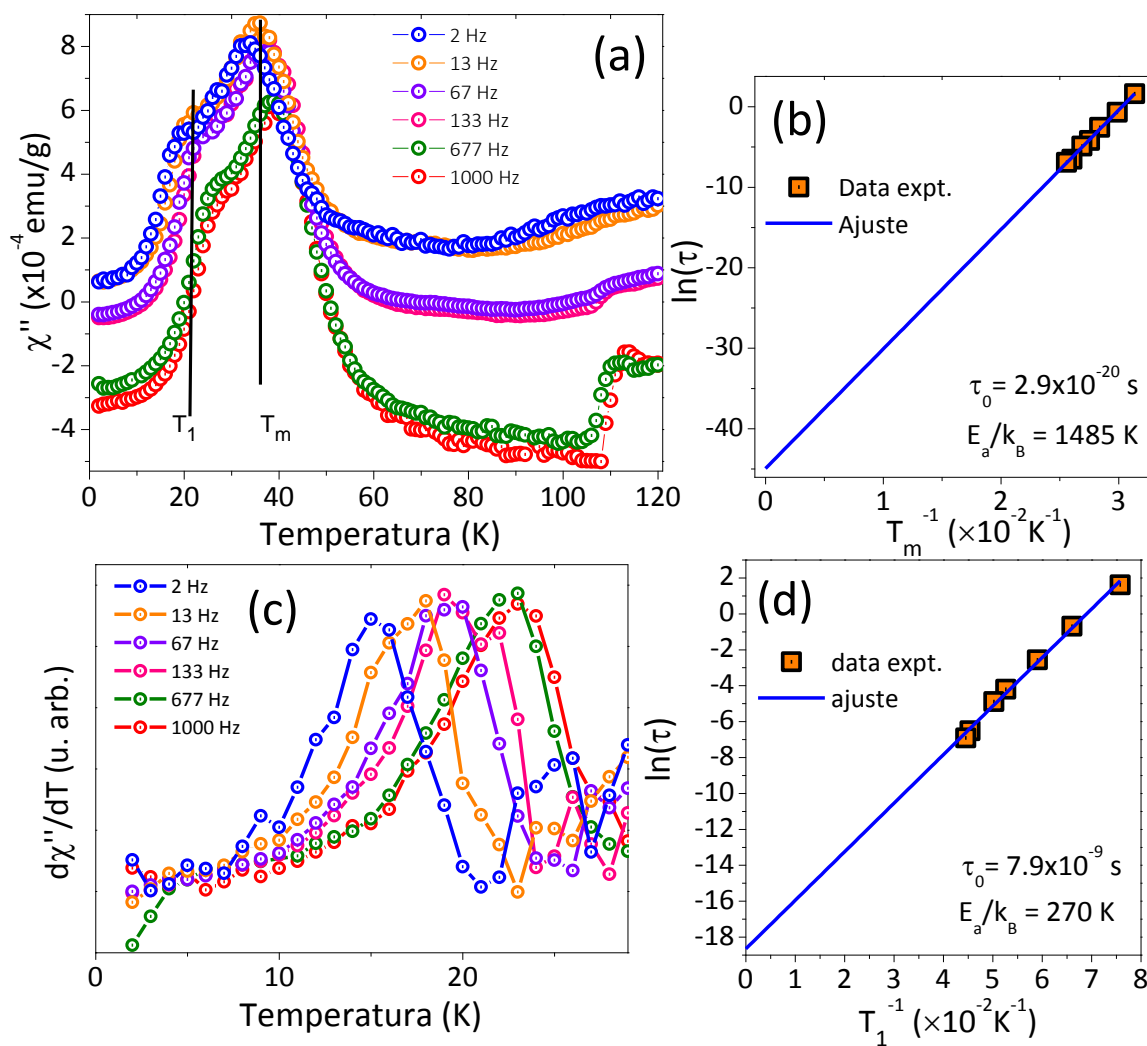


Figura 4.26 (a) Susceptibilidade AC em função da temperatura para diferentes frequências de excitação da componente imaginária da susceptibilidade AC em função da temperatura. (b) Gráfico do log do inverso da frequência em função da temperatura do (T_m). A linha sólida representa o ajuste linear da relação de Néel. (c) derivada de χ'' em função da temperatura na região do pico de baixa temperatura (T_1) e (d) o ajuste dos pontos usando a relação de Néel.

O valor irreal de τ_0 sugere a presença de interações entre partículas. Neste caso, o modelo de Néel deve ser substituído pelo modelo de Vogel-Fulcher (Eq. 2.26). Assumindo um tempo característico de $\tau_0 = 10^{-9}$ s, válido para sistemas superparamagnéticos.

O ajuste mostrado na Figura 4.27 levou a um valor de $T_0 = 20,4$ K, que representa a magnitude das interações, e $\frac{E_a}{k_B} = 260,8$ K, a barreira de energia. O valor de $\frac{E_a}{k_B}$ obtido foi usado para estimar o diâmetro magnético considerando um sistema com simetria octaédrica e obtivemos um $D = 12$ nm. Este valor é inferior ao obtido por MET e DRX.

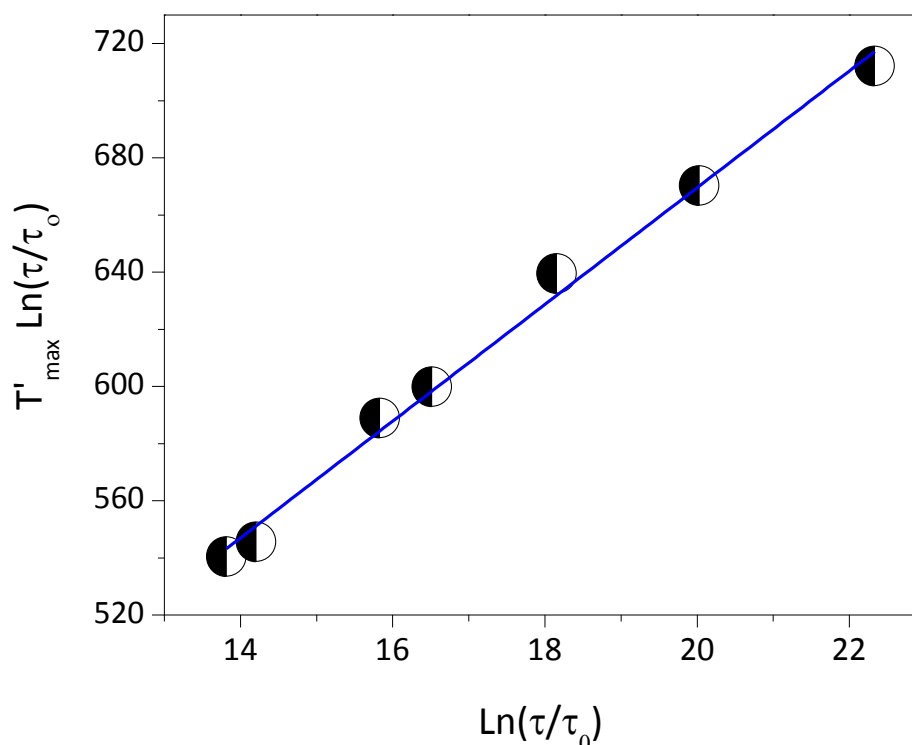


Figura 4.27 Gráfico usando o modelo de Vogel-Fulcher para a amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$.

Como se observa na Figura 4.26 (a), existe um ombro do lado de menores temperaturas do máximo. Para determinar a dependência da posição do ombro (T_1) se analisou a derivada de $\chi''(T)$ com T , como se mostra na Fig.4.26 (c). Observou-se variação da posição do máximo do gráfico de $d\chi''/dT$ vs. T com a frequência. Na Figura 4.26 (d) temos o gráfico do tempo de medida em função do inverso de T_1 . Os dados experimentais foram ajustados usando a relação de Néel, de onde obtivemos um $\tau_0 = 7,9 \times 10^{-9}$ s e uma energia de ativação de $E_a/k_B = 270$ K. Este valor τ_0 se encontra na faixa de valores esperados para um sistema com comportamento superparamagnético. Da energia de ativação determinamos um valor de diâmetro médio de 12 nm, o que confirma a presença de partículas de tamanhos cristalinos menores.

Outra forma de quantificar o comportamento do sistema é usando o parâmetro Φ . Dos resultados obtidos para o máximo de maior temperatura (T_m) obtivemos um valor de $\Phi = 0,05$, este valor se encontra na faixa entre o comportamento de partículas interagentes ($\Phi = 0,03\text{-}0,1$) [123] e o comportamento de spin-glass ($\Phi = 0,005\text{-}0,06$). Este resultado pode ser devido às interações na interface que leva ao comportamento tipo spin-glass. Para o ombro em temperaturas inferiores (T_1) encontramos um valor de $\Phi = 0,11$, o que indica um comportamento superparamagnético.

Em conclusão, foram sintetizados exitosamente NPs de magnetita com e sem recobrimento de polietilanoimina usando três métodos químicos diferentes. Usando o método de co-precipitação puderam preparar-se NPs Fe₃O₄-PEI dispersa em água e os resultados evidenciam a ocorrência de fortes interações interpartículas. Já nas NPs Fe₃O₄ sintetizadas por decomposição térmica, se obteve NPs com maior controle na polidispersão, morfologia e ferrofluido (solvente orgânicos) e os resultados evidenciam um sistema com interações interpartículas fracas. A síntese de NPs Fe₃O₄-PEI por hidrólise oxidativa proporciona NPs de tamanho maiores (~ 50 nm), com formato octaédrico que apresenta propriedades similares à magnetita *bulk*.

4.2 PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E MAGNÉTICAS DE NANOPARTÍCULAS COM ESTRUTURA NÚCLEO/CASCA DE Au/Fe₃O₄

Nesta parte é apresentado o estudo as propriedades estruturais, morfológicas e magnéticas nanopartículas de Au/Fe₃O₄ por decomposição térmica com estrutura núcleo/casca.

4.2.1 Propriedades estruturais e morfológicas

Na Figura 4.28 (a) é mostrada a imagem de MET das nanopartículas caroço/casca de Au/Fe₃O₄ e na Figura 4.28 (b) a imagem de alta resolução de MET das nanopartículas caroço/casca com seu respectivo histograma da polidispersão obtida para a partícula inteira e para o núcleo. A parte escura de alto contraste nas regiões núcleo de cada partícula foi atribuída à fase de ouro e parte clara em torno da região do caroço designada como sendo à fase de Fe₃O₄. Esta diferença de contraste está em conformidade com a diferença de densidades eletrônica entre o Au e Fe.

A imagem de MET foi bem usada para estimar o diâmetro das regiões do caroço (parte escura) e todo (parte escuras mais a parte clara) em um total de $N \approx 900$ nanopartículas foram contadas com auxílio do software Image-J e os histogramas para cada região foram construídos utilizando o método Sturges como observado na inserção da Figura 4.28 (b). A distribuição histográfica dos tamanhos das partículas foi modelada por ajuste dos dados com uma função lognormal (Eq. 3.2). Os parâmetros de ajuste fornecem um tamanho médio de $\langle d_c \rangle = 6,9 \pm 1,0$ nm com uma dispersão de $\sigma = 0,14$ para a região do core e um tamanho médio de $\langle d_w \rangle = 14,1 \pm 1,2$ nm com dispersão de $\sigma = 0,17$ para o tamanho de toda a partícula. Assim, uma espessura média da região da casca (Fe₃O₄) é estimada como sendo $\approx 3,5$ nm.

As imagens de alta resolução MET das NPs Au/Fe₃O₄ foram usadas para determinar a distância interplanar das regiões do caroço/casca e os valores coincidem com as distâncias interplanares da estrutura de espinélio cúbica da magnetita (com grupo espacial Fd-3m) e estrutura cúbica do ouro (grupo espacial Fm-3m). Assim, as análises da transformada de Fourier das imagens alta resolução MET realizado em uma única partícula mostram os padrões de difração de ambos do Au e Fe₃O₄ (ver a inserção na parte superior da Figura 4.28 (c)). A análise dos dados indica que alguns pontos correspondem à planos atômicos (111), (022) e (113) da fase espinel da Fe₃O₄ com distâncias interplanares de 4,84; 2,93 e 2,52 Å, respectivamente. Além disso, alguns outros pontos correspondem aos planos atômicos (111) e (022) da fase cúbica do Au com distâncias interplanares

de 2,35 Å e 1,46 Å, respectivamente. Estes valores são consistentes com o padrão da magnetita (No. de card 75-449) e ouro (No. de card 89-3697) e confirmam a formação da estrutura de Au (caroço)/Fe₃O₄(casca) determinado pelas imagens de alta resolução MET.

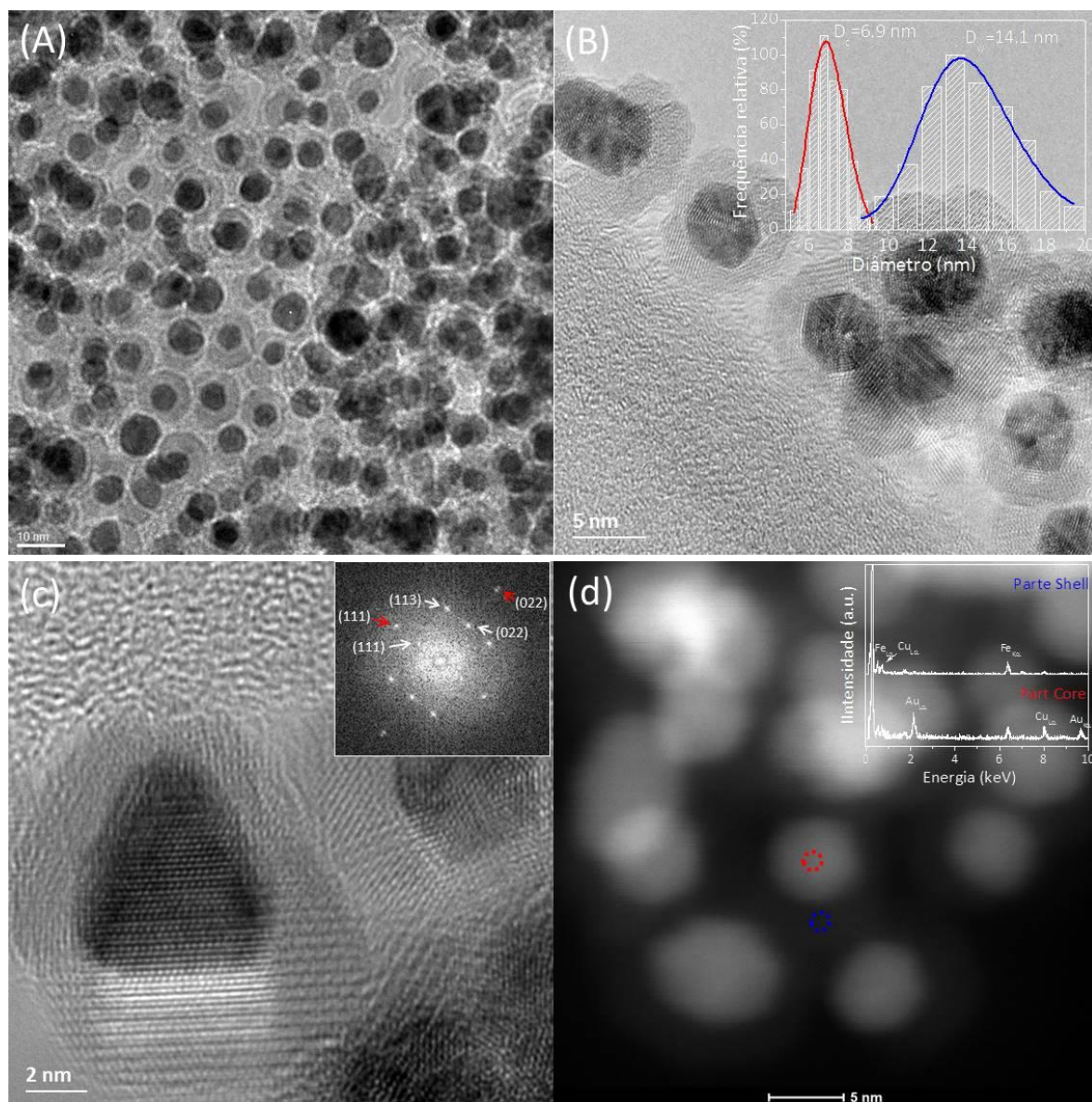


Figura 4.28 (a) Imagem de MET das nanopartículas Au/Fe₃O₄ mostrando a formação da estrutura caroço/casca, (b) imagem de alta resolução de MET e inserido mostra o histograma da distribuição do tamanho da partícula e a linha sólida representa a função lognormal como descrito no texto, (c) imagem de alta resolução de MET das nanopartículas com seu respectivo FFT e (d) imagem de campo escuro MET das nanopartículas Au/Fe₃O₄ e o gráfico inserido mostra os espectros EDX adquiridos das áreas marcadas.

Nas imagens foi também constatado o crescimento epitaxial da fase da Fe₃O₄ ao longo dos planos atômicos (111) e (022) da fase Au. As imagens realizadas HAADF-STEM em várias NPs Au/Fe₃O₄ confirmam a estrutura caroço/casca descrita acima (ver Figura 4.28 (d)). Análises da

composição química em uma única partícula foram realizadas através de HAADF-STEM usando EDX e demonstram a formação da estrutura caroço/casca das NPs Au/Fe₃O₄. O gráfico inserido na Figura 4.28 (d) mostra os espectros EDX adquiridos das áreas marcadas e confirmando claramente a presença de núcleo de Au e casca de magnetita (os picos Cu e C são devido à grade de cobre carbono).

Na Figura 4.29 apresentamos uma das possibilidades do crescimento das nanopartículas de ouro, que servem como base para o crescimento da camada de magnetita. Na Figura 4.29 (a) é mostrada uma imagem de alta resolução de MET de uma única nanopartícula de ouro, com as análises dos padrões de difração de elétrons obtidos das áreas selecionadas P₁, P₂ e P₃ (inseridos do lado direito da Figura). Na Figura 4.29 (b) é mostrada uma imagem de alta resolução MET de uma partícula individual caroço/casca de Au/Fe₃O₄ e um padrão de difração de elétrons da parte selecionada (inserida na parte superior direita). A superfície facetada do núcleo de Au corresponde às distâncias interplanares de 2,89; 2,55; 2,45; 2,43 e 2,96 Å referentes às reflexões de (022), (113), (222), (222) e (022) da estrutura do espinélio da magnetita (e a distância interplanar de 2,31 Å, com reflexão (111), corresponde ao núcleo de ouro). Na parte superior da Figura 4.29 (b) encontram-se as distâncias interplanares 2,89 e 2,88 Å obtidas a partir da região selecionada na figura 4. 29 (b), as que correspondem às reflexões (111) e (022) da magnetita.

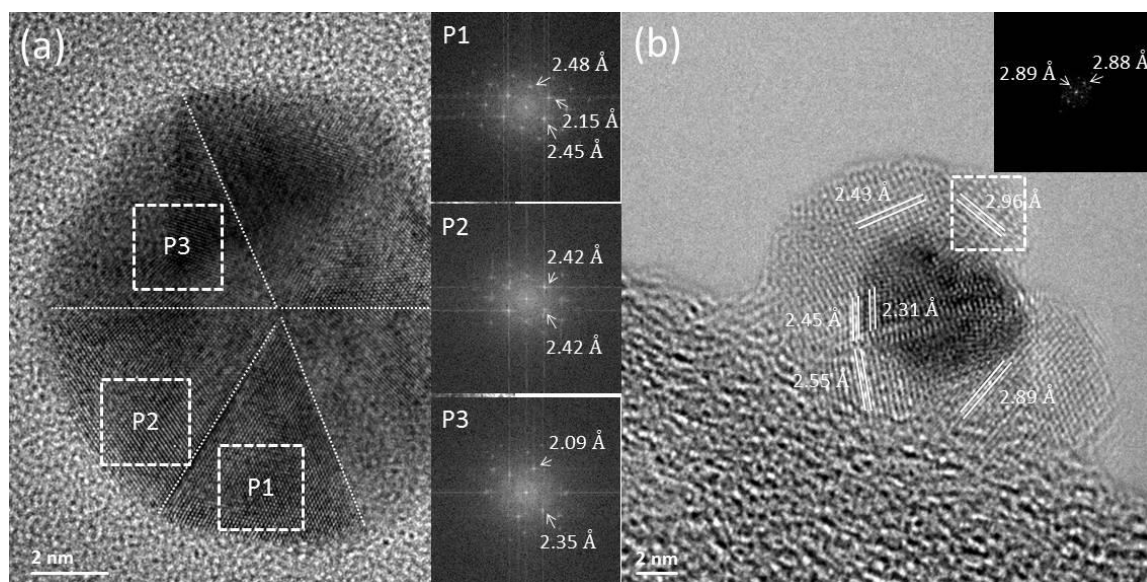


Figura 4.29 (a) Imagem alta resolução MET de uma nanopartícula de ouro com a respectiva análise de difração de elétrons e (b) uma particular individual caroço/casca de Au/Fe₃O₄ com a análise de suas distâncias interplanares e padrão de difração de elétrons obtido da área selecionada (inserido).

4.2.2 Propriedades magnéticas

As curvas de magnetização FC e ZFC foram obtidas num campo magnético de 30 Oe (ver a Figura 4.30 (a)) para as NPs núcleo-casca de Au/Fe₃O₄ em fluido. As características apresentadas pelas curvas de magnetização ZFC/FC, tal como um máximo na curva ZFC e irreversibilidade entre os dois traços são consistentes com comportamento superparamagnético. A irreversibilidade começa em ~ 190 K bem acima da posição do máximo da curva de ZFC em T_{max} ~ 75 K, o que sugere a ocorrência de interações interpartículas. A Figura 4.30 (c) apresenta as curvas ZFC/FC obtidas às NPs Au/Fe₃O₄ depois de seca a amostra (amostra em pó). Como se observa, o máximo da curva ZFC é deslocado para temperaturas maiores (T_{max} ~ 195K) em comparação com a amostra em fluido. Este resultado sugere fortemente a presença de interações magnéticas fortes interpartículas após o processo de secagem, provavelmente está relacionada com a remoção dos surfactantes [133].

Se for considerado o efeito da distribuição do tamanho das partículas, um sistema com uma determinada distribuição de tamanho de partículas da origem a uma distribuição de temperaturas de bloqueios T_B [128], a susceptibilidade ZFC-FC é modelada usando as Eqs. (2.18) e (2.19) onde assumem a contribuição de partículas no estado superparamagnético e no estado bloqueado.

Usando as curvas ZFC e FC podemos obter a distribuição da temperatura de bloqueio de acordo com a seguinte relação $f(T_B) \sim -d(\chi_{FC} - \chi_{ZFC})/dT$ [71]. Como observado na Figura 4.30 (b) os dados experimentais mostram uma característica bimodal e sugerem a ocorrência de duas distribuições de temperaturas de bloqueio que podem ser modelados usando duas distribuições lognormais: $f(T_B) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma_1 T_B} \exp\left[-\frac{1}{2\sigma_1} \ln^2\left(\frac{T_B}{\langle T_{1B} \rangle}\right)\right] + \frac{(1-A)}{\sqrt{2\pi}\sigma_2 T_B} \exp\left[-\frac{1}{2\sigma_2} \ln^2\left(\frac{T_B}{\langle T_{2B} \rangle}\right)\right]$, onde $\langle T_{iB} \rangle$ é o valor meio da temperatura de bloqueio de cada distribuição, A é o fator de peso e σ_i é o parâmetro de polidispersão [72].

O ajuste dos dados experimentais é mostrado na Figura 4.30 (b) e os valores obtidos são $\langle T_{1B} \rangle = 59$ K, $\langle T_{2B} \rangle = 20$ K, $\sigma_1 = 0,48$, $\sigma_2 = 0,63$ e $A = 0,68$ para a amostra de ferrofluido das NPs de Au/Fe₃O₄. Esses valores obtidos do ajuste foram usados na simulação das curvas ZFC e FC usando as Eqs. (2.18) e (2.19) e o resultado é apresentado na Fig. 4.30 (a). Como pode ser observado, as curvas ZFC/FC da amostra ferrofluido de NPs de Au/Fe₃O₄ são bem reproduzidas usando um K_{eff} = 1 × 10⁴ J/m³. Este valor K_{eff} está em concordância com o valor reportado para a magnetita *bulk* [123]. Diferenças entre a curva FC experimental e calculada podem ser atribuídas

à ocorrência de interações partícula-partícula, as que provocam o achatamento da curva de FC, de acordo com os resultados apresentados na literatura [135]. Na região de baixa temperatura, a distribuição de temperatura de bloqueio foi atribuída principalmente à contribuição de NPs pequenas de magnetita não interagentes. A presença de uma temperatura de bloqueio atribuído a NPs de magnetita individuais em nanopartículas de Ag/Fe₃O₄ é um fato que já foi observado e pode ser visto na referência [136]. Além disso, a distribuição das temperaturas de bloqueio na região de baixas temperaturas é consistente com o ombro observado na curva ZFC da amostra em pó, tal como se indica na Fig. 4.30 (c).

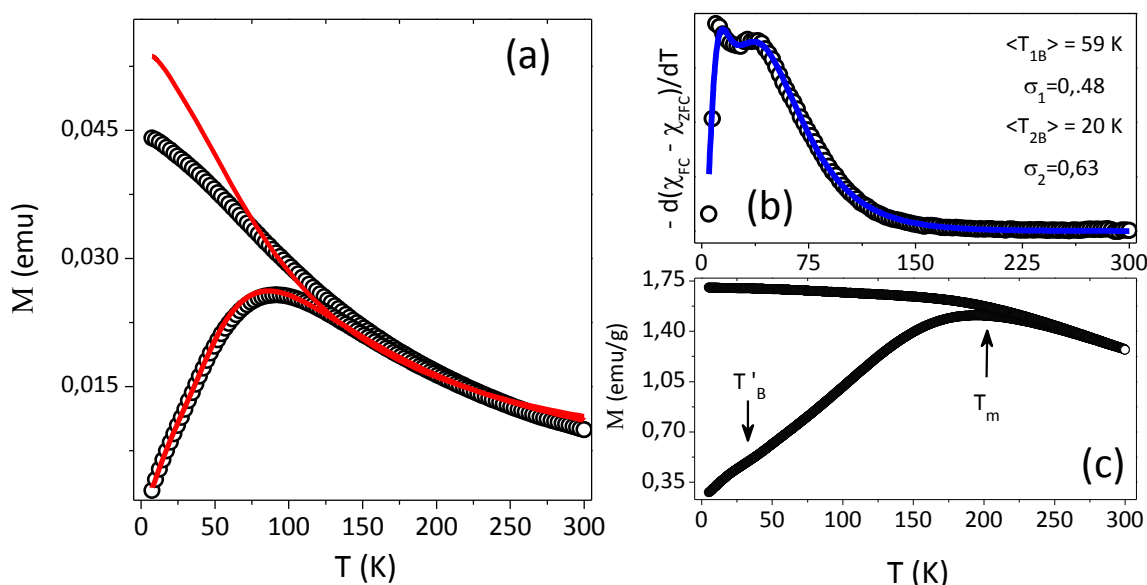


Figure 4.30 (a) curvas de magnetização ZFC – FC ($H = 30$ Oe) das nanopartículas núcleo/casca Au/Fe₃O₄ (amostra em ferrofluido). (b) $-d(\chi_{FC} - \chi_{ZFC})/dT$ como função da temperatura. A linha sólida representa a função lognormal como função da temperatura usada para ajustar o dado, (c) curva ZFC – FC obtida para amostra seca das nanopartículas Au/Fe₃O₄.

Com a finalidade de provar o efeito da distribuição do tamanho de partícula e/o da interação partícula-partícula, realizamos medidas sistemáticas da magnetização como função do campo aplicado, M vs. H , a diferentes temperaturas. Na Figura 4.31 (a) temos a curva M vs. H obtida a 5 K e 300 K para amostra ferrofluido. Como pode observar-se, a curva de M vs. H a 300 K mostra um campo coercitivo nulo e um aumento rápido de magnetização na região de baixos campos magnéticos, o que é consistente com um comportamento superparamagnético, de acordo com a dependência da temperatura das curvas ZFC e FC discutidas anteriormente. A magnetização de saturação encontrado para amostra em pó a $T = 300$ K mostram um valor de $M_s = 28$ emu/g, de acordo com valores previamente observados em nanopartículas de ouro/óxido de ferro núcleo/casca [59]. A redução de M_s em relação aos valores de magnetita *bulk* pode ser atribuída também à

contribuição da desordem de spins na superfície, refletindo no comportamento não saturado das curvas M vs. H em altos campos magnéticos (até 7 T).

A dependência do campo coercitivo (H_c) em função da temperatura é mostrado na Figura 4.31 (b). O H_c diminui rapidamente à medida que a temperatura é aumentada e acima de ~ 60 K o valor é muito pequeno e tende a desaparecer. Este resultado confirma que o conjunto de NPs núcleo-casca se encontram no estado superparamagnético acima dessa temperatura, de acordo com o obtido a partir da análise dos traços ZFC-FC (ver Fig. 4.30). No entanto, a dependência da temperatura do campo coercivo pode ser atribuída à distribuição do tamanho de partícula e/ou efeitos de interação.

Usando o modelo proposto por Nunes *et al.* [72] e os valores obtidos dos análises das curvas ZFC e FC, a dependência da temperatura do campo coercitivo é bem modelado usando a Eq.(2.20), como mostrado na Figura 4.31 (b).

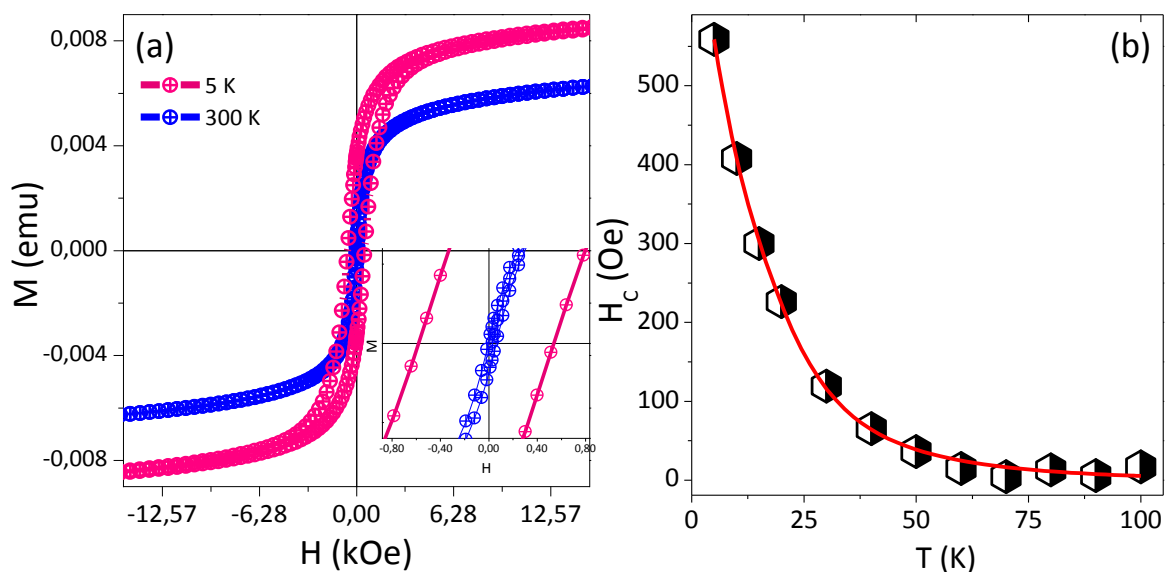


Figure 4.31 (a) os laços de histerese dos NPs de Au/Fe₃O₄ obtidos a 5 K e 300 K e inserido uma ampliação das mesmas temperaturas e (b) dependência do campo coercitivo com a temperatura e ajustado usando o modelo considerando à coexistência de partículas bloqueadas e não bloqueadas.

A possibilidade de ocorrência de exchange bias nestas NPs tipo núcleo-casca de Au/Fe₃O₄ foi também pesquisado. Os laços de histerese magnética da amostra Au/Fe₃O₄ (em ferrofluido) foram obtidos em diferentes temperaturas desde 2 a 300 K, resfriando a amostra em um $H_{FC} = 2$ T. O campo H_{EX} foi determinado a partir do deslocamento dos laços de histereses ao longo do eixo do campo como se mostra na Figura 4.32.

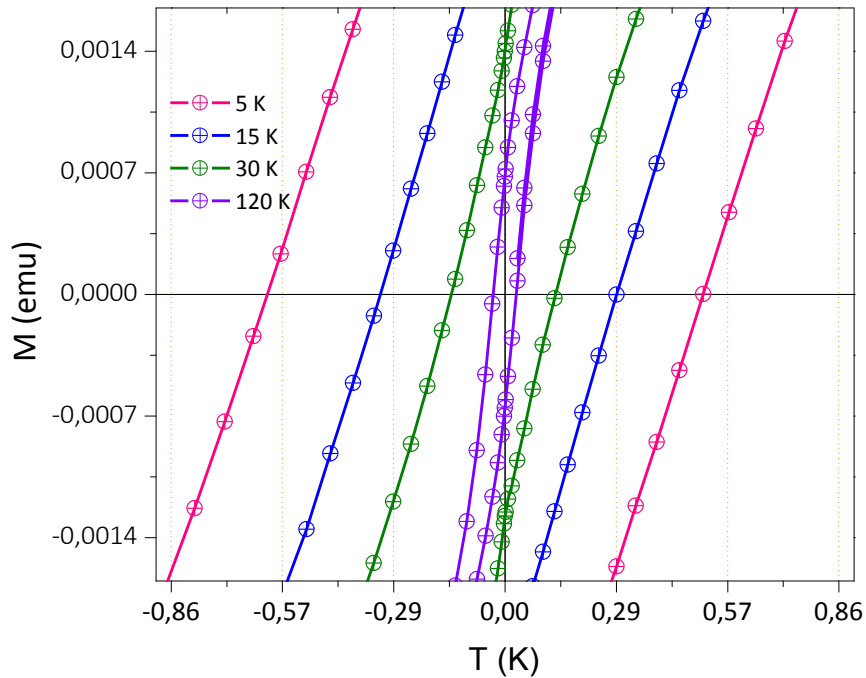


Figura 4.32 (a) O campo de exchange bias como função da temperatura obtida depois de um processo FC com um campo de 2 T

A dependência da temperatura do H_{EX} está representada no painel principal da Figura 4.33 (a) e uma curva de histerese obtida a 5 K é mostrada na figura inserida. Em contraste com o H_c , o H_{EX} apresenta aumento rápido abaixo ~ 40 K. Para temperaturas acima de ~ 40 K, a ausência de efeito de Exchange bias é determinado. Já o H_c mostra valores não nulos acima desta temperatura. Este resultado sugere a ocorrência de um fenômeno de congelamento de spins abaixo de ~ 40 K, que nós atribuímos especulativamente aos spins desordenados localizadas provavelmente nas duas superfícies do casca da magnetita: na superfície interna da interface Au/Fe₃O₄ e na superfície externa do casca da magnetita. Uma representação esquemática das diferentes regiões magnéticas é mostrada na Fig. 4.33 (b).

O início da desordem magnético está relacionado com a quebra de simetria e/ou ruptura de ligações que ocorrem na interface e superfície das partículas, que conduz a frustrações magnéticas. Em altas temperaturas, devido à ação do campo magnético aplicado, o conjunto de spins de todas as regiões é alinhado ao longo da direção do campo magnético. Quando o conjunto de spins é resfriado abaixo da temperatura de congelamento (~ 40 K), os spins congelados atuam como agentes de fixadores durante a reversão do spin da região ordenada, produzindo o deslocamento do laço de histerese. A ocorrência do campo de anisotropia Exchange bias relacionado a uma camada de spins magneticamente desordenada na superfície foi previamente vista em estudos que

consideram nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\text{CoO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ e em nanopartículas ocas de Fe_3O_4 . O exchange bias mais fraco observado no nosso sistema, comparativamente com os resultados da literatura, pode estar relacionado com a camada de desordem magnética menor nas superfícies mais interna e externa do casca magnético [55][63][137][138][139].

Para avaliar a dependência térmica de H_{EX} , usamos o modelo de campo aleatório de anisotropia exchange em baixa temperaturas (Eq. 2.28). Os dados experimentais são bem modelados e o ajuste proporcionou um $H_{\text{EX}}(0) = 90,5 \text{ Oe}$ e $B = 1,3 \cdot 10^{-2} \text{ K}^{-1}$.

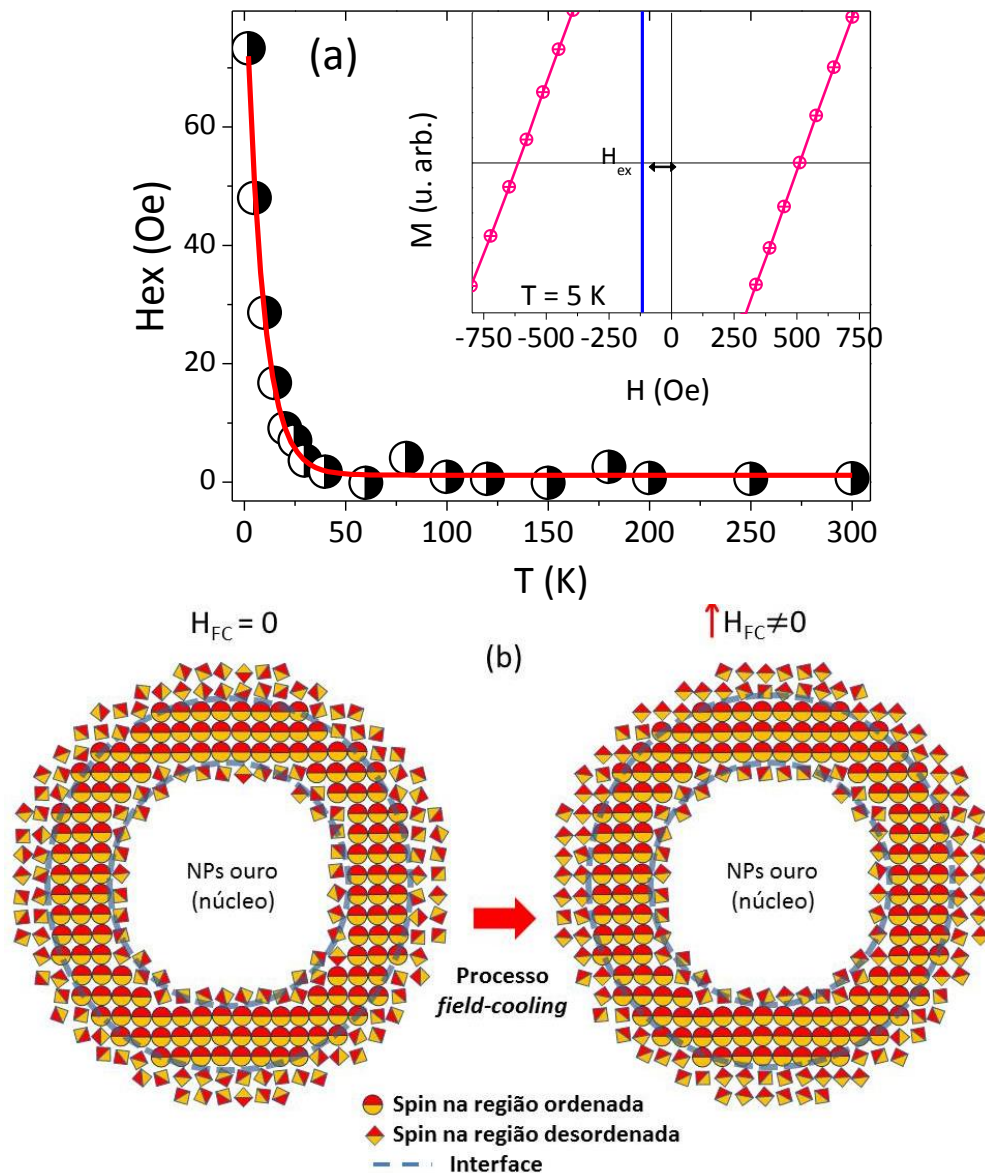


Figura 4.33 (a) O campo de exchange bias como função da temperatura obtida depois de um processo resfriamento da amostra em um campo de 2 T, a inserção ilustra o deslocamento do laço de histerese da magnetização em 5 K. (b) Representação esquemática das diferentes regiões magnéticas em uma partícula e o efeito produzido pelo H_{FC} .

4.2.3 Susceptibilidade AC

Como objetivo de analisar o efeito de interações nas propriedades dinâmicas foram realizadas medidas da susceptibilidade magnética AC em função da temperatura em um campo magnético oscilante AC de 1 Oe e variando a frequência de excitação na faixa de $15 \text{ Hz} \leq f \leq 1 \text{ kHz}$. Como mostrado na Figura 4.34 (a), ambas componentes $\chi'(T)$ e $\chi''(T)$ mostram um pico. A posição do máximo (T_m) da curva χ' vs. T é deslocada para altas temperaturas com a frequência. Também, a posição de T_m é consistente com a posição do máximo determinado das curvas ZFC-FC.

É conhecido que a resposta dinâmica de um conjunto de nanopartículas é determinada pelo tempo de medida $\tau_m \sim 1/\omega$ em cada técnica experimental [73]. Usando a relação de Néel para analisar a dependente de T_m com a frequência, o ajuste dos dados experimental (ver Figura 4.34 (b)) proporciona uma energia de ativação de $E_a/k_B = 1231 \text{ K}$ e um tempo de relaxação característico de $\tau_0 = 5 \times 10^{-11} \text{ s}$. O valor τ_0 está na faixa esperado para um sistema mostrando comportamento superparamagnético. Assumindo que o termo dipolar é desprezível à barreira de energia de ativação, usamos a espessura média da casca da magnetita, estimamos um valor da energia de anisotropia de $K_{\text{eff}} = 1,3 \times 10^4 \text{ J/m}^3$. Este valor se encontra na faixa de valores reportados para a magnetita *bulk*, e o resultado indica que as interações partícula-partícula são fracas nas amostras estudadas. De fato, uma análise aproximada da interação dipolar pode ser feita, considerando um par de partículas.

Tendo em conta a espessura da casca magnética obtida da análise MET, se obtém uma energia de $T' = \frac{E_{d-d}}{k_B} \sim 980 \text{ K}$, para partículas que estão em contato direto. Uma vez que as partículas apresentam separação física entre elas devido à camada de surfactante existente, é esperada a diminuição rápida na força da energia de interação dipolar de acordo com $\frac{E_{d-d}(\alpha)}{E_{d-d}(0)} \sim d_W^3 / (d_W + \alpha)^3$, onde α é o espaçamento de borda-borda e d_W é o tamanho médio das partículas. Para um $\alpha/d_W \sim 2$, a interação partícula-partícula é $\sim 3\%$ de $E_{d-d}(0)$. Isto indica que a energia de interação dipolar é mais fraca que a energia de anisotropia, levando a um conjunto de partículas fracamente interagente na amostra estudada [140][116].

O último resultado é confirmado pelo valor do parâmetro empírico Φ calculado. Nós obtivemos um valor de $\Phi=0,098$ para nossas NPs Au/Fe₃O₄ que é consistente com os valores reportados para sistemas de partículas com interações fracas e sistemas superparamagnéticos [141][142], reforçando que as interações dipolares entre as partículas são fracas.

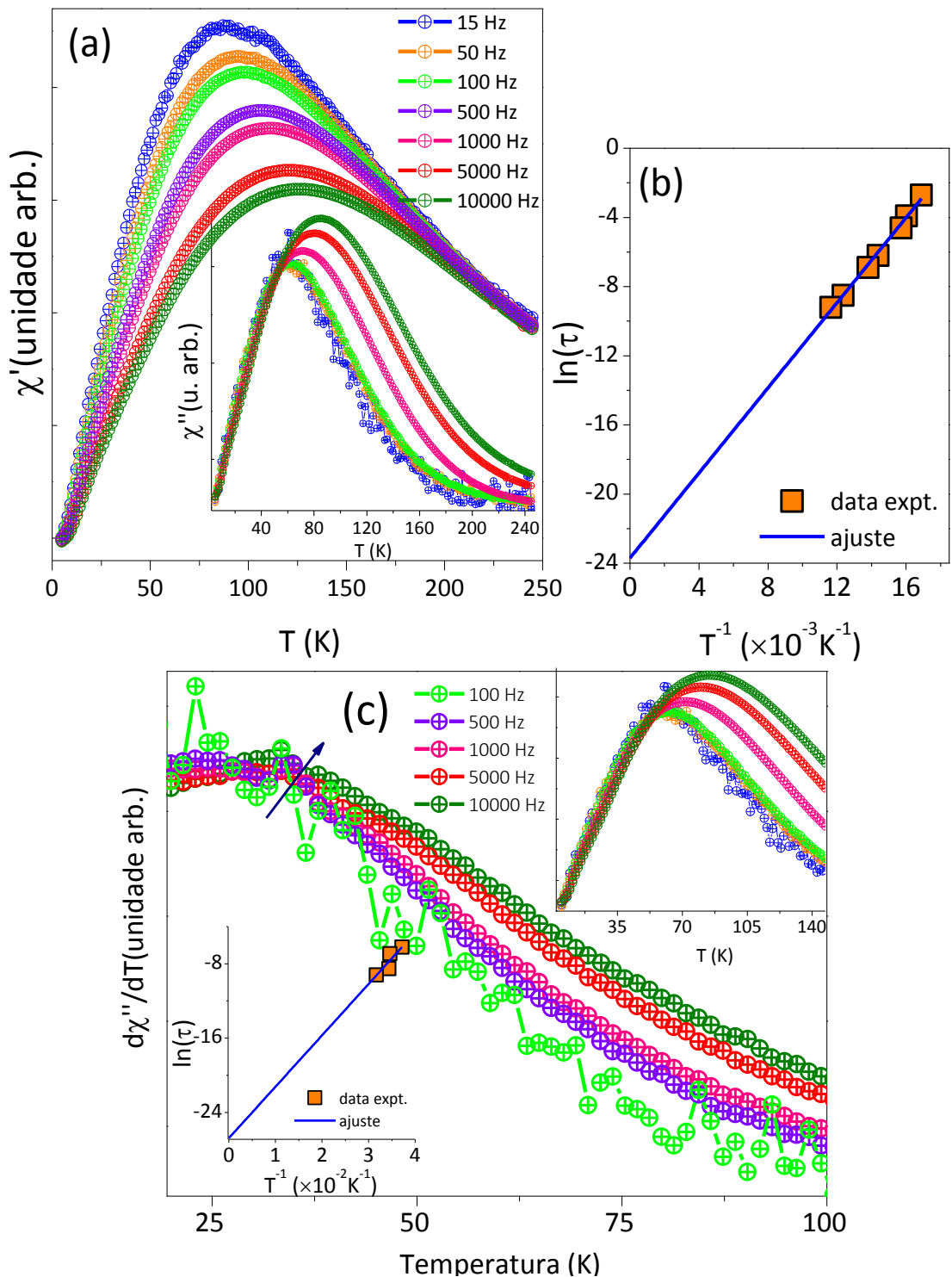


Figura 4.34 (a) componente em fase da susceptibilidade, $\chi'(T)$, como função da temperatura obtida por a variando da frequência de excitação e com um campo oscilante de 1 Oe para a o ferrofluido das NPs núcleo/casca Au/Fe₃O₄. (b) o ajuste usando a lei de Néel, (c) curvas $d\chi''/dT$ vs T e a inserção superior mostra o componente $\chi''(T)$ vs. T e na parte inferior o ajuste usando a lei de Néel.

Na região de baixas temperaturas, se observa um ombro largo na curva χ' vs. T (ver Figura 4.34 (a)). A presença de um segundo pico em ~ 30 K foi determinada das curvas $d\chi''/dT$ vs T (ver Figura 4.34 (c)). Usando a relação de Néel para modelar o comportamento deste máximo em baixas temperaturas com a frequência, o ajuste gerou um $\tau_0 = 9 \times 10^{-13}$ s, que encontra-se na faixa de valores de nanopartículas superparamagnéticas. A presença deste segundo pico é também consistente com os resultados determinados das medidas ZFC-FC, e foi assinado à resposta magnética de nanopartículas de magnetita não interagentes.

Em resumo, mostramos o estudo das propriedades estruturais, morfológicas e magnéticas das NPs com estrutura núcleo/casca de Au/Fe₃O₄. Estas NPs Au/Fe₃O₄ foram sintetizadas com êxito por decomposição térmica. As medidas magnéticas realizadas na amostra nos permitem avaliar as interações interpartículas e o modelo de anisotropia de troca. Mostrando comportamento superparamagnético com interações interpartículas fracas e que a ocorrência de efeitos de exchange bias é devido à desordem magnética na superfície interna e externa da casca.

4.3 DESENHO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DECORADAS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA HIPERTERMIA DUAL

Nesta parte do trabalho é apresentado estudo as propriedades estruturais, morfológicas e magnéticas de nanopartículas de Fe_3O_4 -PEI adicionalmente recobertas com NPs de Au (Fe_3O_4 -PEI@Au), as quais foram testadas para aquecimento visando aplicações em hipertermia. Além disso, foram realizados testes de biocompatibilidade *in vivo*.

4.3.1 Estudo morfológico e estrutural

Na Figura 4.35 (a) mostra-se uma imagem MET das nanopartículas. Como se observa, a imagem exibe a presença de NPs de ouro crescidas sobre a superfície das NPs Fe_3O_4 -PEI. O núcleo de NPs de Fe_3O_4 mostra uma forma octaédrica e as NPs de ouro mostram uma forma esférica (ver Figura 4.35 (b)). Acredita-se que as NPs de Au estão ligadas à superfície de NPs Fe_3O_4 -PEI através de interações eletrostáticas entre a carga positiva de NPs de Fe_3O_4 -PEI, associada à presença do revestimento PEI sobre a superfície de NPs [109][145], e os íons citrato da superfície das nanopartículas de ouro [30].

As imagens MET mostram uma distribuição uniforme das NPs de Au sobre a superfície das NPs Fe_3O_4 -PEI e que a presença dessas NPs de Au sobre as NPs de Fe_3O_4 -PEI não modifica a sua morfologia octaédrica. As imagens MET foram utilizadas para contar o diâmetro de $N > 500$ partículas tanto da magnetita (região do núcleo) como das NPs de ouro (região da superfície). Foram construídos os histogramas de cada região usando o método de Sturges e estes histogramas foram ajustados com função lognormal (ver gráfico inserido na Figura 4.35 (a)). O resultado revelou tamanho médio do núcleo de Fe_3O_4 de $(49,2 \pm 3,5)$ nm com uma dispersão de $\sigma = 0,34$; enquanto que o tamanho médio das NPs de Au foi de $(3,9 \pm 0,2)$ nm ($\sigma = 0,13$). Foi obtida uma imagem HAADF-STEM como se mostra na Fig. 4.35 (c). Os resultados confirmam a presença de NPs de Au ligadas ao PEI sobre a superfície das NPs de magnetita. Os pontos brilhantes foram relacionados com as NPs de Au [146]; enquanto que a região mais escura foi relacionada com o óxido de Fe (fase da Fe_3O_4), uma vez que o ouro metálico possui um número atômico maior (ou seja, uma maior densidade eletrônica) do que a fase de Fe_3O_4 .

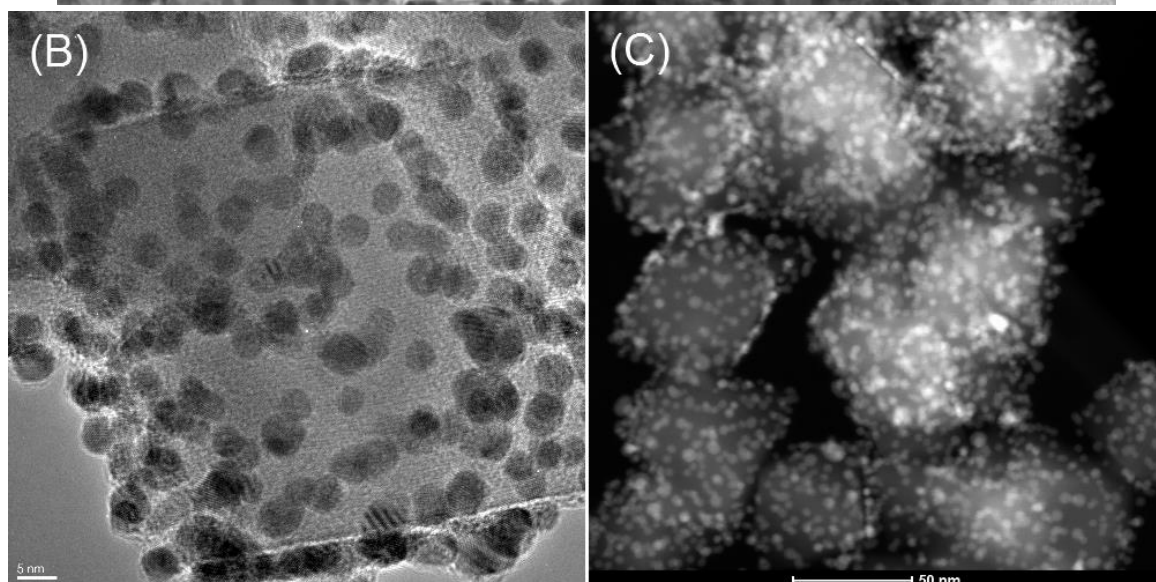
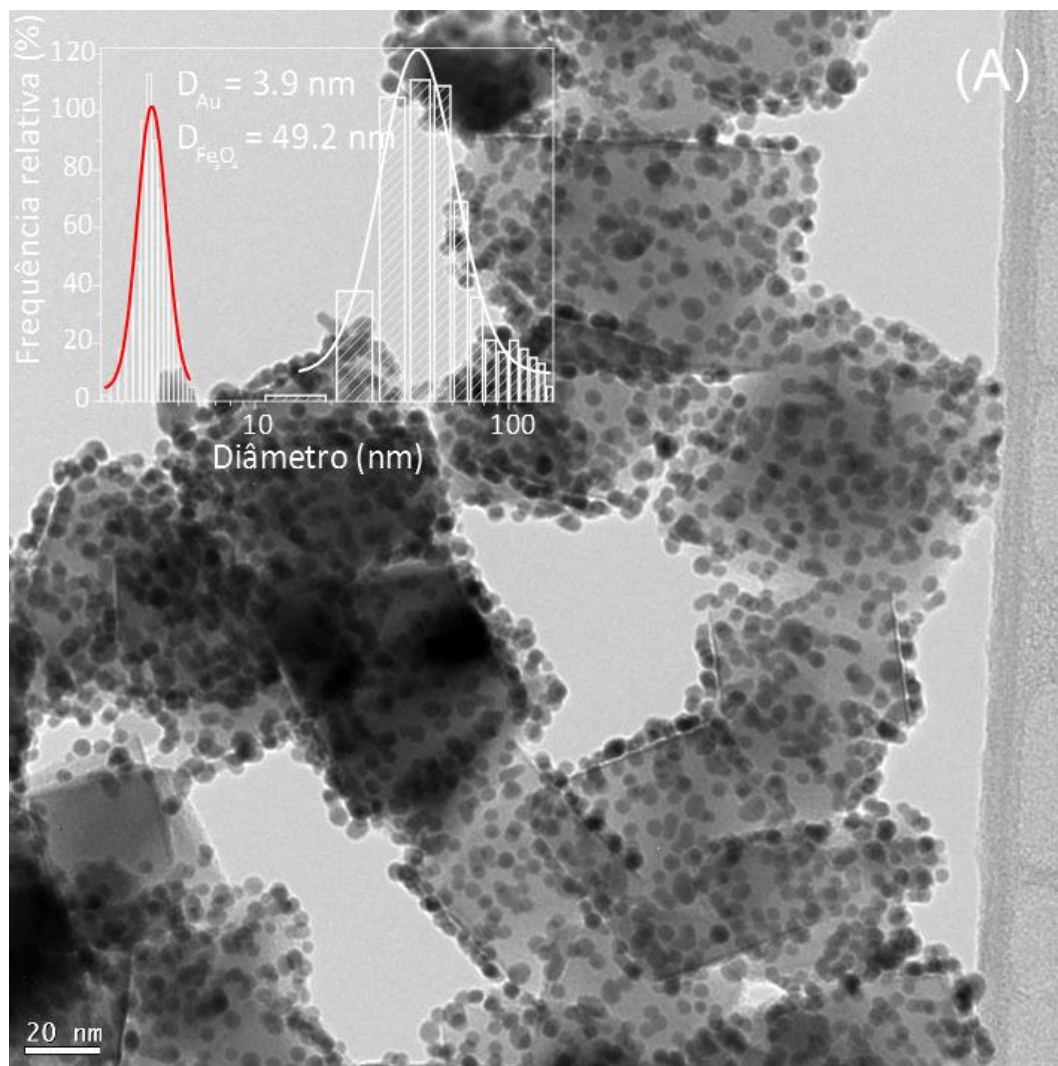


Figura 4.35 Imagem MET das (a) NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ indicando o crescimento bem-sucedido de NPs de ouro sobre a superfície da magnetita. No gráfico inserido se mostra o histograma distribuição de tamanhos modelados com a função lognormal (linhas contínuas), (b) imagem de uma partícula individual, (c) Imagem HAADF-STEM dos NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$.

As imagens de alta resolução de MET mostram o espaçamento interplanar da rede cristalina (Figura 4.36 (a) e (b)) e podem ser indexadas com planos que pertencem ao grupo espacial Fd-3m da fase magnetita. Enquanto que, as distâncias interplanares identificadas na região das NPs de Au podem ser associados aos planos da estrutura cúbica do ouro (grupo espacial: Fm-3m) em concordância com o determinado por DRX. Além disso, o polímero foi identificado através das imagens MET, revelando-se uma camada amorfa que recobre as regiões cristalinas e apresenta uma espessura de ~ 1,5 nm. A análise por transformada de Fourier (TFF) das imagens de alta resolução de MET mostra postos de difração que correspondem aos planos atômicos (111), (113) e (333) da fase Fe_3O_4 (ver figura inserida na Figura 4.36 (a)) com distâncias interplanares de 4,88, 2,53 e 1,63 Å, respectivamente. Os outros pontos no gráfico inserido na Figura 4.36 (b) correspondem ao plano atômico (111) da fase do Au com uma distância interplanar de 2,35 Å.

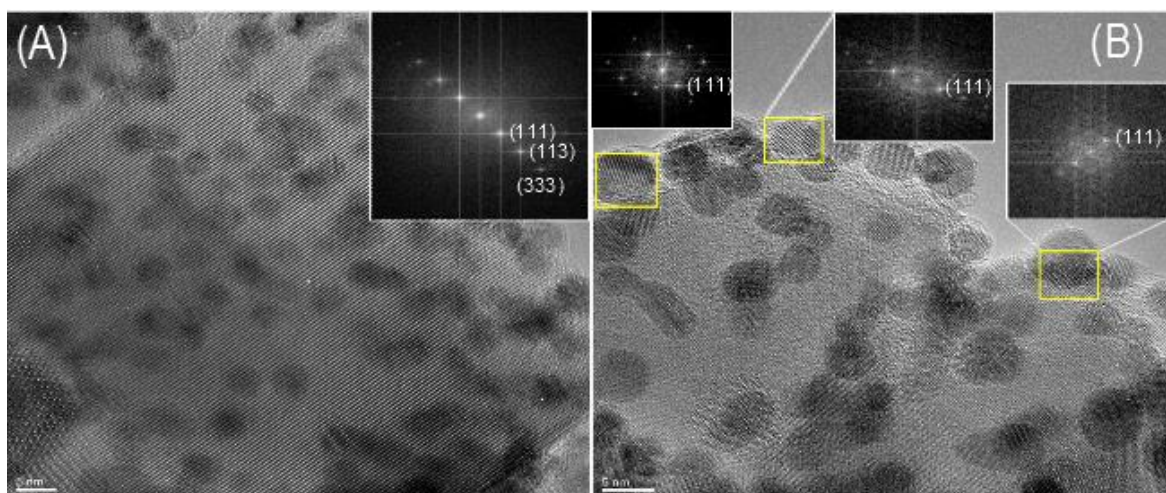


Figura 4.36 Imagem MET de alta resolução das NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$. As figuras inseridas correspondem à transformada de Fourier (FFT) obtida para cada região.

Para analisar mais detalhes da estrutura cristalina das NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$, realizou-se medidas de difração de raios-X. Na Figura 4.37 se mostra o padrão de difração no qual foram indexados os picos de difração que correspondem à fase da magnetita (JCPDS número card 75-449) e a fase de ouro metálico (JCPDS número card 89-3697) e não se observou a presença de picos extras. Os parâmetros de rede obtidos foram de $a = 8,371$ Å e $a = 4,078$ Å para Fe_3O_4 e Au, respectivamente. Estes valores estão próximos aos determinados na literatura para os materiais *bulk*. Usando a largura dos picos de difração e a relação de Scherrer se estimou o tamanho de 4 nm para as NPs de ouro e 23,6 nm para as NPs de magnetita. O tamanho das partículas de ouro é consistente com o valor obtido da análise das imagens MET. Para a fase de Fe_3O_4 foi determinado

um diâmetro cristalino menor por DRX. A diferença entre estes tamanhos obtidos por DRX e MET claramente sugere que as NPs de Fe_3O_4 são conformadas partículas policristalinas e limitam a aplicação da relação de Scherrer para estimar o tamanho.

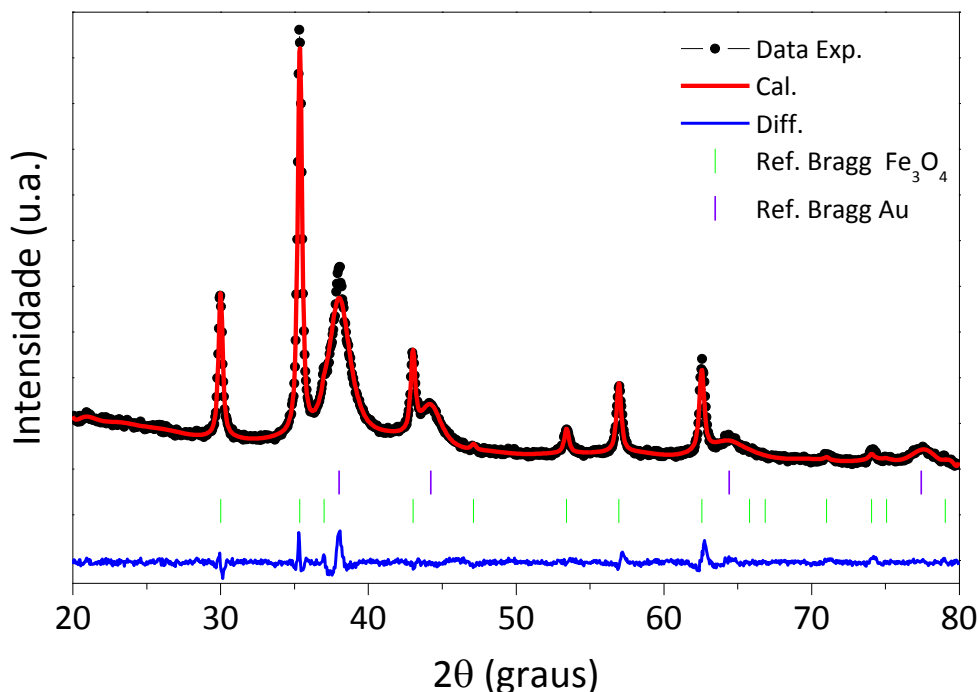


Figura 4.37 Padrão de difração de raios-X das NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ refinado usando o método de Rietveld. Os dados experimentais e calculados são representados pelos pontos e linhas sólidas, respectivamente. A diferença entre os dados experimentais e calculados também é mostrada na parte inferior do gráfico (linha cor azul) as reflexões de Bragg das estruturas indicadas (para a fase do Au, cor violeta e Fe_3O_4 , cor verde).

4.3.2 Propriedades magnéticas

O estudo das propriedades magnéticas das NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ com e sem NPs de Au apresentaram resultados semelhantes, o que sugere que a presença das NPs Au não modifica notoriamente as propriedades magnéticas do núcleo das NPs de Fe_3O_4 . Na Figura 4.38 (a) mostram-se as curvas ZFC e FC de ambas as amostras ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$) para comparação. Como se observa, ambas as amostras apresentam comportamento magnético muito semelhante, sugerindo que a presença das NPs de Au não afeta notoriamente a resposta magnética das NPs de magnetita.

Para ambas as amostras, as curvas ZFC e FC mostram irreversibilidade até 300 K. As curvas ZFC não exibem um máximo claro, sugerindo que as partículas estão bloqueadas mesmo à temperatura ambiente, o que está de acordo com relatos na literatura de Fe_3O_4 com tamanhos

médios ≥ 50 nm [123]. Em baixas temperaturas, as curvas ZFC mostram dois pontos de inflexão nas temperaturas $T_1 \approx 45$ K e $T_2 \approx 98$ K. O ombro em T_2 foi atribuído à transição de Verwey da magnetita, o que indica que as amostras apresentam boa cristalinidade e estequiometria dos íons $\text{Fe}^{2+/3+}$ [129].

As curvas FC mostram pequena protuberância na mesma temperatura. Por outro lado, o ombro em T_1 tem sido observado também em NPs de magnetita e cuja origem não é ainda clara [120] [132]. Este ombro pode estar associado com processos de relaxamento/bloqueio térmico de NPs de tamanho menor que interagem fracamente ou não interagem; portanto, possuem barreira de energia menor que facilita a reorientação dos momentos magnéticos [99]. Este resultado é consistente com o observado na análise MET que evidenciou a presença de partículas menores. O valor baixo da temperatura da transição de Verwey acredita-se que esteja relacionado com os efeitos de tamanho [130] ou forma das partículas [131]. O valor da magnetização das curvas FC mostra claramente uma tendência a aumentar com a diminuição da temperatura, o que reforça a presença de processos de relaxação nas amostras.

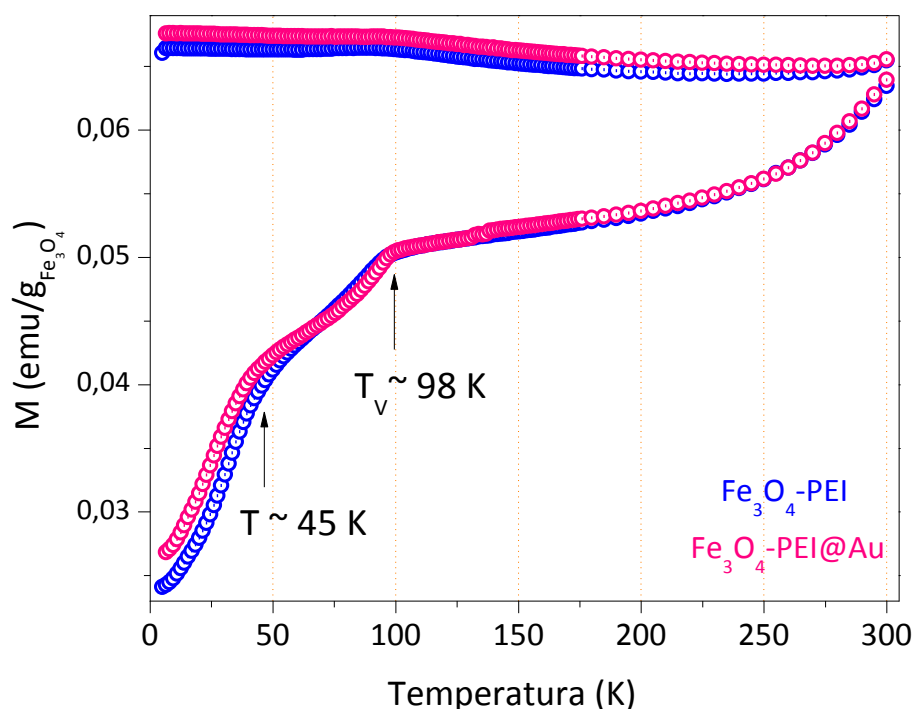


Figura 4.38 Curvas ZFC/FC das amostras $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ obtidas em um campo aplicado de 30 Oe.

Foram obtidos laços de histerese magnética das NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ a 5 K e 300 K. Na Figura 4.39 mostra-se o laço de histerese somente a 300 K. Ambas as amostras mostram

ordem ferromagnética esperada para partículas em estado bloqueado, uma vez que temos NPs grandes, para as quais a temperatura de bloqueio está acima de 300 K. Ambas as amostras mostram uma magnetização de saturação (M_s) de 82,5 e 84 emu/g para as NPs de Fe_3O_4 -PEI e Fe_3O_4 -PEI@Au, respectivamente. A 5 K (dados não mostrados aqui), os valores de magnetização de saturação são ligeiramente maiores do que os obtidos a 300 K (90 e 91 emu/g para as NPs de Fe_3O_4 -PEI e Fe_3O_4 -PEI@Au, respectivamente). Esses valores são próximos aos reportados para a magnetita *bulk* e confirmam os resultados obtidos do estudo das imagens de MET de alta resolução sobre a alta cristalinidade apresentada pelas NPs Fe_3O_4 .

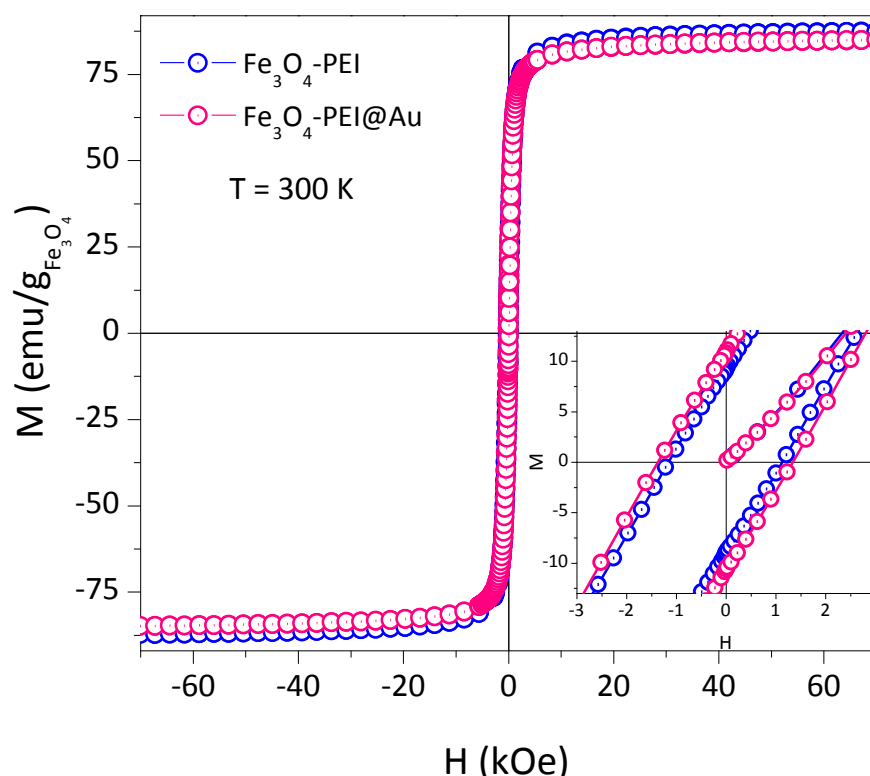


Figura 4.39 Curvas da magnetização em função do campo magnético obtidas a 300 K. NO gráfico Inserido é mostrado uma ampliação dos laços de histerese.

Os laços de histerese obtidos a 5 K (não mostrados aqui) mostram um campo coercitivo (H_c) de 415 Oe para as NPs Fe_3O_4 -PEI e 369 Oe para as NPs Fe_3O_4 -PEI@Au. A 300 K, esses valores de campos coercitivos são de 92 a 106 Oe para as NPs Fe_3O_4 -PEI e Fe_3O_4 -PEI@Au, respectivamente. Um valor de H_c diferente de zero em 300K também sugere que as NPs apresentam uma temperatura de bloqueio (um máximo na curva ZFC) acima de 300 K, o que pode ser inferida da tendência de aumento com a temperatura apresentada pelas curvas ZFC perto de 300 K como se mostra na Figura 4.38. Além disso, determinou-se uma constante de anisotropia

calculada usando a relação: $K_{\text{eff}} \approx \mu_0 H_c M_s / 0,96$ de $2,02 \cdot 10^4 \text{ J/m}^3$, o qual está muito próximo do valor encontrado para a magnetita *bulk*, o que novamente confirma a boa qualidade das NPs de Fe_3O_4 recobertas e não recobertas com ouro.

4.3.3 Teste de absorção específica de potência

O principal parâmetro de caracterização da capacidade de aquecimento de ambos os coloides magnéticos com e sem Au ligado à superfície das NPs é dada pela AEP obtida na presença de um campo magnético alternado para uma determinada massa de NPs diluídas. Os valores de AEP calculados normalizados com relação ao conteúdo de magnetita em função de vários campos magnéticos alternativos (h_{AC}) numa frequência fixa de 571 kHz mostram tendência diferente, como pode ser observado na Figura 4.40.

A $h_{AC} = 300 \text{ Oe}$, o valor máximo do valor de AEP para as NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ é de $251 \pm 18 \text{ W/g}$, que é maior do que o valor determinado para os NP de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$, de $168 \pm 15 \text{ W/g}$. Sabe-se que o aquecimento se deve à absorção de energia pelas NPs magnéticas do campo magnético alternado, esta energia absorvida se manifesta na forma de calor para os arredores.

O valor baixo do AEP obtido em virtude do calor liberado pelas NPs magnéticas propaga-se pela camada do polímero e ouro para chegar ao meio. Ou seja, o calor liberado pelas NPs magnéticas encontra como primeira barreira o polímero, isto diminui a difusão do calor em concordância com o que foi relatado para partículas magnéticas revestidas com sílica, onde a difusão do calor desaparece o que foi associado com a baixa condutividade térmica da sílica [147]. Isto faz com que o calor que chega às NPs de ouro seja pequeno, o que explicaria que o calor dissipado no meio pela partícula toda seja menor, mesmo sabendo que o ouro apresenta boa capacidade de condução de calor. O AEP menor obtido para as NP de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ se deve a que a contribuição da massa do ouro não foi considerada nos valores do AEP, uma vez admitido essa massa, espera-se que o valor final do AEP apresente valores compráveis ou até maiores que para as NPs sem ouro.

Sabe-se que a AEP depende de vários fatores, incluindo os fatores intrínsecos ao material, tais como forma e estrutura cristalina, tamanho da partícula, distribuição de tamanhos e propriedades magnéticas tais como magnetização de saturação, anisotropia [18] [125] e interações partícula-partícula. Estes últimos são proporcionais à concentração de partículas no fluido carreador [148],

viscosidade do líquido e agente de revestimento [149] que pode mediar à interação dipolar entre partículas e alterar o seu volume hidrodinâmico (modificando o tempo de relaxação browniano). As condições experimentais de frequência e amplitude do campo magnético aplicado são também parâmetros importantes para se obter uma absorção de calor mais eficiente.

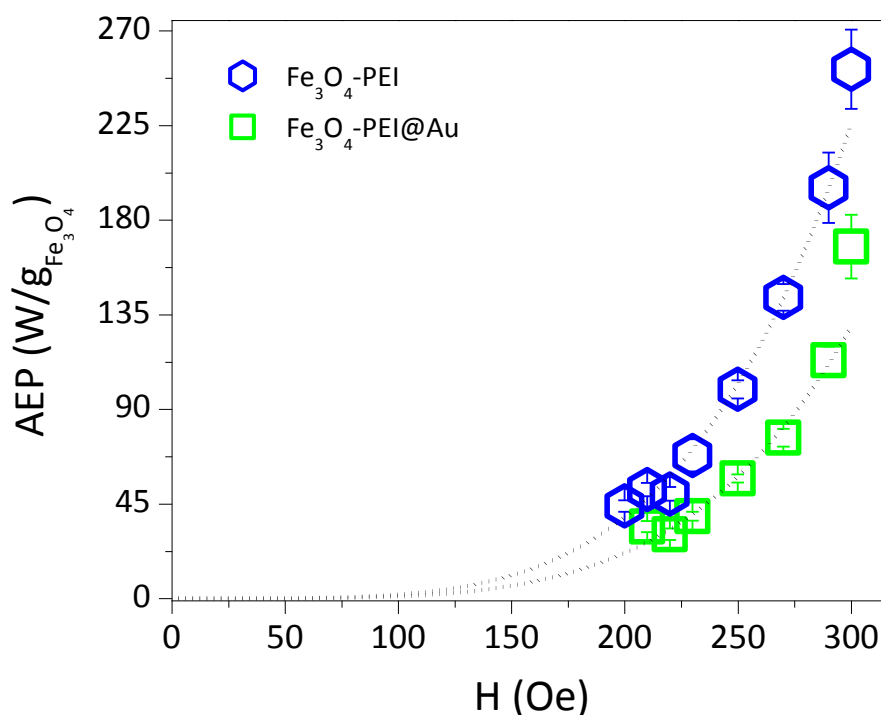


Figura 4.40 Dependência da resposta AEP na amplitude do campo magnético AC a uma frequência fixa de 571 kHz. Os dados experimentais são ajustados usando a equação de potência, $AEP \approx H^\lambda$.

Para um campo acima de 200 Oe, a taxa de AEP das amostras aumenta rapidamente com a amplitude do campo magnético. Os dados experimentais de AEP podem ser bem modelados usando a lei de potência ($AEP \sim H^\lambda$) [150] [151] como mostrado na Figura 4.40. O ajuste dos dados experimentais nos levou a uma relação $AEP \sim H^{4.4}$ para a NPs Fe_3O_4 -PEI@Au e $AEP \sim H^{4.35}$ para as NPs Fe_3O_4 -PEI, o que está em desacordo com a teoria de resposta linear (TRL), mas em concordância com o que se espera de NPs grandes no estado ferromagnético, em cujo caso a TRL não é mais válida. Como demonstrado acima, à temperatura ambiente as NPs estão em estado bloqueado (o aquecimento é conseguido principalmente por perdas de histerese canônico) que é fortemente dependente de tamanho [149] e interações interpartícula que favorecem a formação de agregados que podem influenciar na resposta do sistema. Sabe-se que a resposta esperada pela TRL é válida para NPs magneticamente independentes e só quando $\mu_0 H M_s V < k_B T$ (condição de resposta linear da magnetização com o campo magnético [106]). No entanto, esta condição leva

precisamente a $\mu_0 H < 200$ Oe. Acima deste limite, o modelo TRL não é mais válido para estas nanopartículas.

4.3.4 Medidas UV-Vis

Foram obtidos espectros de absorção óptica UV-visível das NPs de Fe_3O_4 -PEI e Fe_3O_4 -PEI@Au dispersas em água que são mostrados na Figura 4.41. As NPs de Fe_3O_4 -PEI não apresentam pico de absorbância significativo na região visível, o que está de acordo com reportes na literatura [10].

No entanto, as NPs Fe_3O_4 -PEI@Au apresentam banda ampla de absorção em torno de 530 nm que é característico da absorção de superfície de partículas de ouro [152]. Este resultado confirma a presença de NPs de ouro na superfície das NPs de magnetita. Não se observa pico plasmônico bem definido e sim uma banda larga o que foi atribuída ao revestimento não uniforme das NPs de ouro como visto através das imagens MET. O efeito plasmônico é atribuído às nanopartículas de ouro que estão em contato direto partícula-partícula de que provocam o espalhamento dos elétrons de condução na superfície induzido pela excitação coletiva dos elétrons livres [45] [153]. Além disso, a presença de uma única banda plasmônica na região do visível pode ser atribuída à forma quase esférica das NPs de ouro. A presença de duas bandas plasmônicas tem sido reportado para nanorods de ouro [154]. O resultado obtido está de acordo com reportes na literatura que sugerem que as propriedades de ressonância plasmônica de superfície de NPs Au são fortemente dependentes do tamanho, forma e distância interpartículas [9] [26] [152] [155] [156] [157].

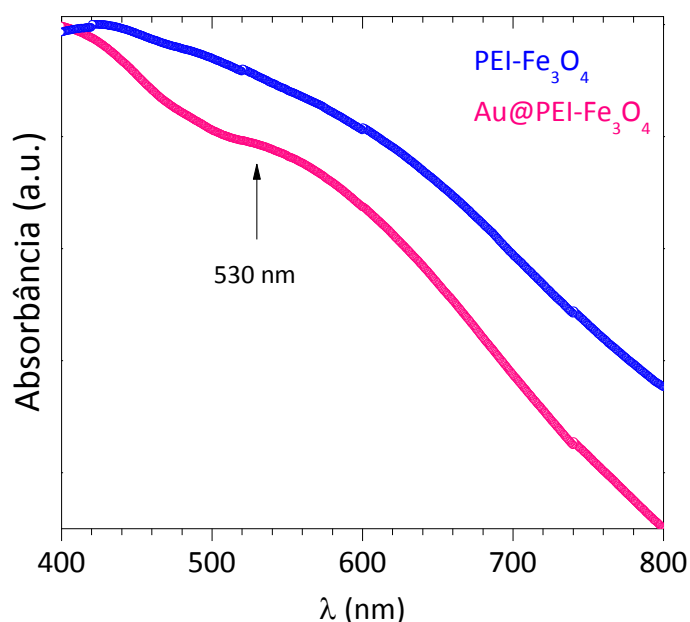


Figure 4.41 Espectro UV-vis das NPs Fe_3O_4 -PEI (linha azul) e as NPs Fe_3O_4 -PEI@Au (linha vermelha).

4.3.5 Estudo da viabilidade das células BV2 nas nanopartículas Fe₃O₄-PEI@Au

Os experimentos foram realizados *in vitro* para avaliar a toxicidade celular das NPs Fe₃O₄-PEI@Au na linha celular BV2 por ensaios de exclusão de azul de tripano. O resultado mostrou baixa toxicidade nesta linha celular, após 24 horas de incubação em todas as concentrações de NPs trabalhadas. Como se mostra na Figura 4.42, não se observam diferenças significativas quando comparadas com resultados relatados na literatura, para NPs de magnetita revestidas somente com PEI [158] [145]. Este resultado indica excelente biocompatibilidade das nanopartículas Fe₃O₄-PEI@Au sintetizadas, indicando que as nossas NPs são boas candidatas para aplicações biológicas.

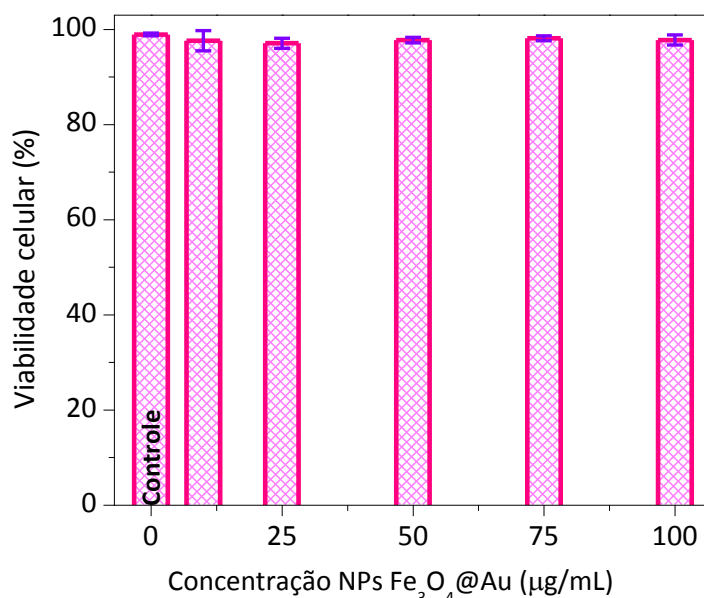


Figura 4.42 Resultado da viabilidade celular de nanopartículas Fe₃O₄-PEI@Au tratadas na presença de células BV2. As células foram incubadas com nanopartículas nas concentrações que vão de 10 – 100 µg mL⁻¹ durante 24 horas. Os valores da viabilidade das células tratadas, em porcentagem, com relação das correspondentes células controle.

4.3.6 Testes da captação das nanopartículas pelas células BV2

Para obter informações da cinética de captação celular das NPs Fe₃O₄-PEI@Au foram realizados experimentos *in vitro* com a linha celular BV2. A Figura 4.43 (a) mostra a massa total de NPs de Fe₃O₄-PEI@Au captadas por células BV2 em função da massa total de NPs adicionadas e co-cultivadas durante 24 h. Em todas as concentrações testadas foi encontrado aumento gradual de NPs captadas pelas células quando se aumentou a concentração das NPs. A taxa de captação em função da concentração das NPs de Fe₃O₄-PEI@Au mostra comportamento linear. O ajuste a uma

reta (taxa linear) indica que as células foram capazes de incorporar 64 ± 9 % das partículas disponíveis.

A cinética de absorção foi analisada desde o número de NPs absorvidas por célula em função da concentração de NPs disponíveis (Figura 4.43 (b)). O resultado experimental revela a alta afinidade das NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ pelas células onde há uma adsorção de proteínas séricas do meio do cultivo celular na superfície das partículas que favorece a aderência. Este resultado foi inesperado, já que a superfície das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ encontra-se carregada negativamente devido à presença de íons citrato e porque estão recobertas com proteínas do meio de cultivo, o que deveria ter influência na sua captação pelas células. No entanto, isto pode ser atribuído ao fato de que a adsorção de proteínas séricas do meio do cultivo celular sobre as NPs de ouro é reduzida pelo efeito de carga, já que a superfície celular tem muitos menos receptores para proteínas séricas.

Segundo alguns autores, se concluiu que a adsorção não específica das proteínas séricas sobre a superfície do ouro pode mediar a captação das NPs e entrar nas células através de um processo de endocitose mediada pelo receptor da membrana específica [153] [154]. Isto depende do tamanho e forma das partículas (dependem também do tipo de célula), da densidade superficial do ligando [159], do tempo e da temperatura de incubação e da concentração das NPs de ouro usado pode mudar a captação celular.

A carga superficial das partículas é o principal fator que influencia na captação celular. Verificou-se que a melhor absorção é observada para partículas revestidas com polímeros carregados positivamente, em comparação com as revestidas com polímeros carregados negativamente e neutros, onde a natureza química do polímero de revestimento também pode ser importante; por exemplo, as aminas quaternárias são mais efetivas que as aminas primárias [43].

A adsorção de proteínas pode interferir fortemente na influência dos polímeros utilizados para revestir partículas funcionalizadas. Assim, é importante considerar o papel das composições de proteínas do soro de meio de cultivo. Estas proteínas adsorvidas sobre as partículas podem reduzir a eficiência de absorção [154].

Para determinar a carga superficial das nanopartículas e sua influência na adsorção das proteínas, foram feitas medidas de potencial- ζ . Para a solução das NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ em água, se

obteve um valor de +20,5 mV, que foi associado com a carga positiva dos grupos de aminas da cadeia polimérica. Após 24 h de incubação em meio de cultivo celular (DMEM completo), este valor foi de - 11 mV, que está em concordância com reportes na literatura [36]. A maior adsorção das proteínas foi associada à sua interação eletrostática com as NPs Fe_3O_4 -PEI carregadas positivamente. Por outro lado, foi também encontrado que o potencial- ζ das NPs de Fe_3O_4 -PEI@Au dispersas em água apresentaram valor negativo de -25 mV, enquanto que incubadas em DMEM foi para -12 mV. A diminuição observada foi atribuída ao efeito da absorção das proteínas na superfície das NPs Fe_3O_4 -PEI que é maior em comparação às NPs Fe_3O_4 -PEI@Au, nas quais as NPs de Au cobrem quase toda a superfície das NPs, além da carga negativa devido à presença de íons citrato. Isso poderia explicar porque NPs Fe_3O_4 -PEI@Au são encontrados em maior porcentagem na superfície das células após a incubação, em concordância com o observado nas imagens MEV/FIB.

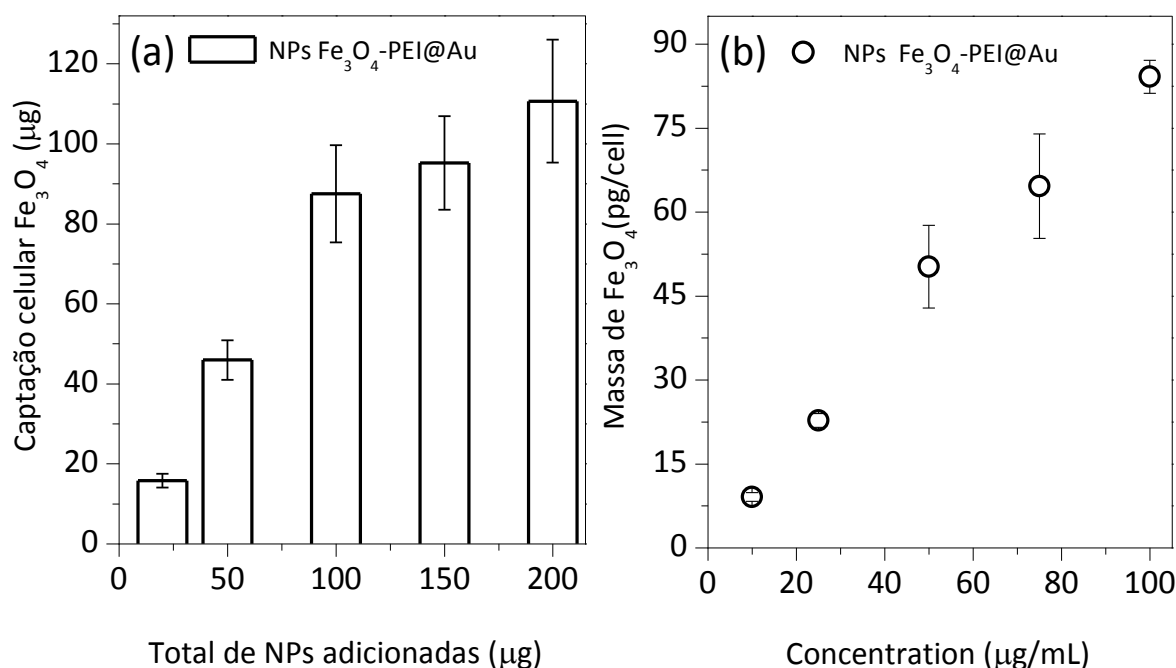


Figure 4.43 Captação celular total vs. quantidade total adicionada de NPs Fe_3O_4 -PEI@Au durante 24 h de incubação. (b) Relação entre as quantidades de NPs Fe_3O_4 -PEI@Au incorporadas por célula em função da concentração de incubação.

4.3.7 Localização celular das nanopartículas Fe_3O_4 -PEI@Au nas células

Para determinar se as nanopartículas foram absorvidas na superfície celular ou internalizadas foram obtidas imagens MEV/FIB. Na Figura 4.44 (a) podemos ver a imagem MEV das células de controle BV2 fixas e na Figura 4.44 (b), a tendência geral de uma célula incubada com NPs Fe_3O_4 -PEI@Au a uma concentração de 100 µg/mL, após 24 h de incubação. A imagem revelou a presença

de NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ agregadas e ligadas fortemente à superfície da membrana celular formando grandes “clusters” (ver Figura 4.44 (d)).

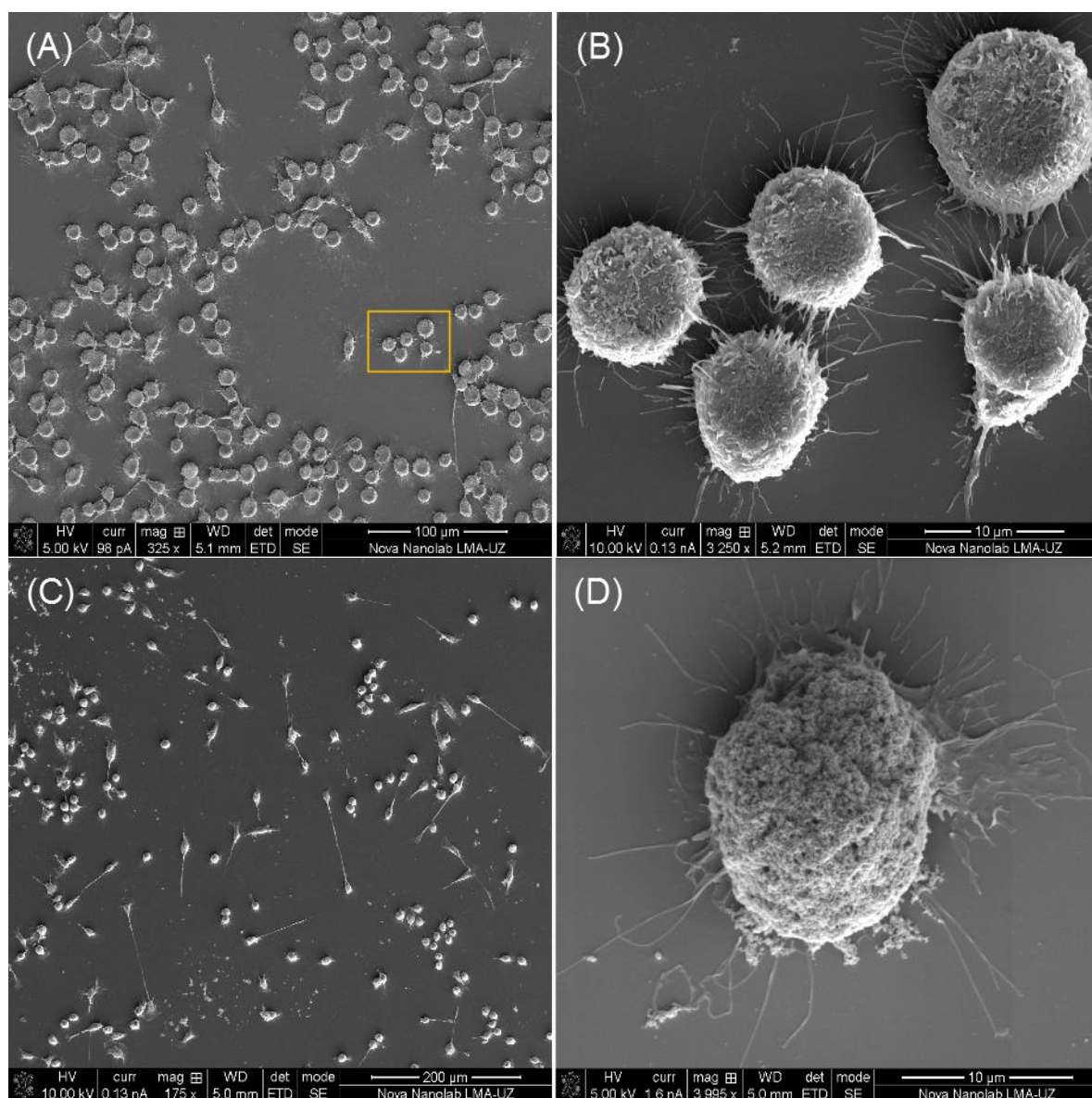


Figura 4.44 Imagens de duplo feixe de MEV/FIB de (a-b) célula controle BV2 e as (c-d) células incubadas por 24 horas com NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ a uma concentração $100 \mu\text{g/mL}$, onde se mostra a presença de aglomerados das NPs na superfície da membrana celular.

Para determinar a difusão das NPs para dentro da célula, uma célula BV2 cultivada foi seccionada transversalmente por FIB. A imagem MEV/FIB encontra-se na Figura 4.45 (a) e revelou a presença de uma fração significativa de agregados de NPs no interior das células. Medidas de EDX confirmaram a presença de ouro e ferro dentro da célula. Podemos afirmar que as NPs estão dentro das células e este efeito pode ocorrer devido à natureza adesiva das nanopartículas

revestidas com menos ouro na superfície da magnetita, o que ajuda com a maior absorção de proteínas e, assim, facilita que sejam difundidas para dentro das células como reportado em outros trabalhos de NPs de Fe_3O_4 -PEI. No entanto, isto não ocorreu em nossas NPs, possivelmente devido à interação que ocorre na superfície da partícula de Fe_3O_4 -PEI@Au e as proteínas. Por outro lado, foi demonstrado que a captação de NPs pelas células é controlada pelo revestimento protéico na superfície das nanopartículas, o diâmetro da partícula e outros parâmetros que afetam a captação celular, como discutido anteriormente. Assim, as nanopartículas de Fe_3O_4 -PEI@Au podem ser utilizadas para marcação não específica de vários tipos de células em aplicações biológicas.

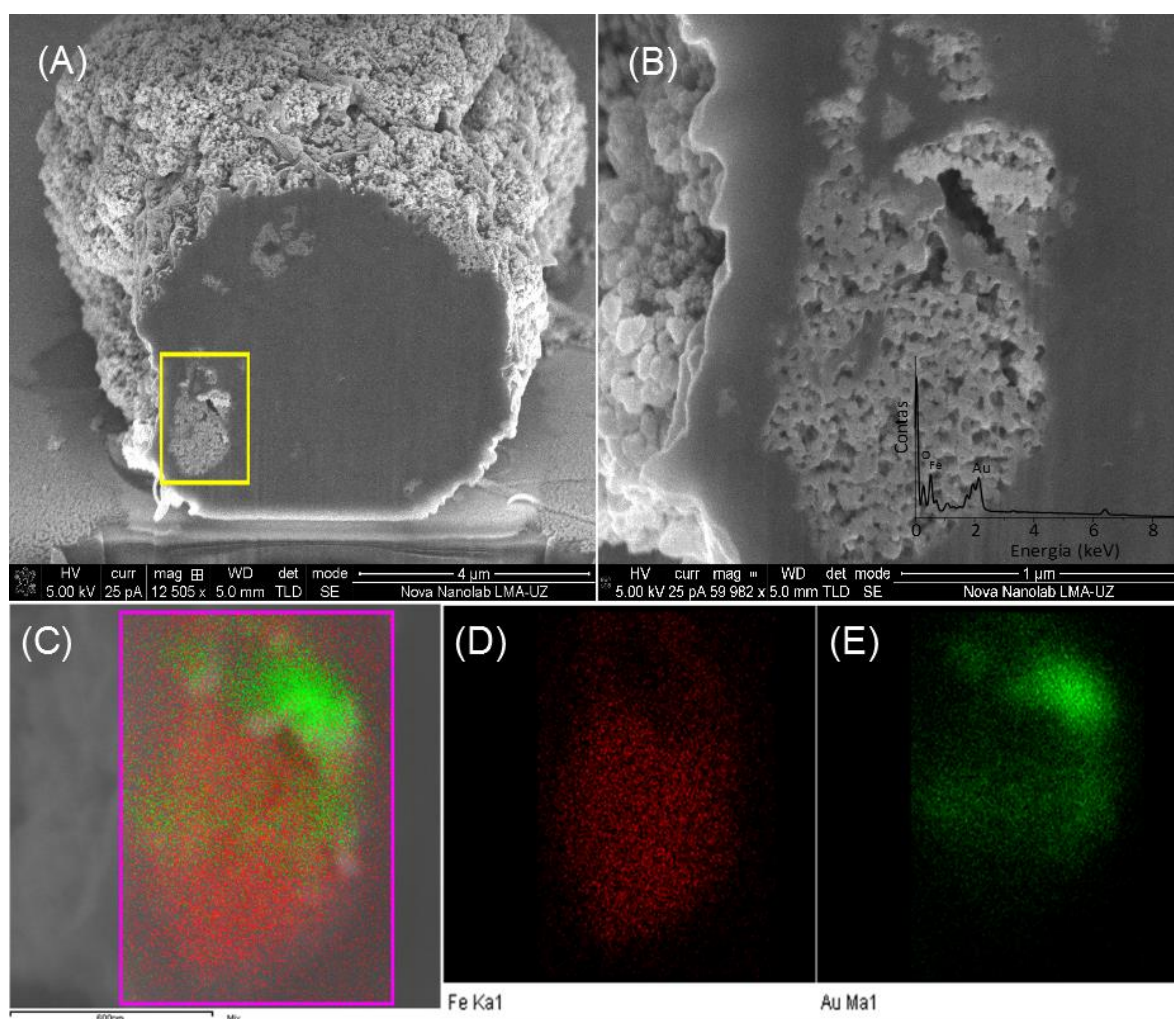


Figura 4.45 (a-b) imagem de uma única célula após ter sido cultivada que foi seccionada transversalmente, confirmando a presença de NP sem menor porcentagem dentro da célula; (c-e) amplificação da seção de corte com análise EDX.

4.3.8 Caracterização do AEP em cultivo celular

Na Figura 4.46 é mostrado o resultado de AEP das NPs de Fe₃O₄-PEI com e sem revestimento de ouro no ambiente celular em diferentes amplitudes de campos magnéticos AC desde 200 a 300 Oe e frequência constante de 571 kHz.

Para determinar a capacidade de aquecimento de nossas amostras, foram usadas um total de 9 milhões de células, as que foram incubadas durante uma noite com uma concentração fixa de NPs de 100 µg/mL. Após a incubação, a solução de cultivo celular foi lavada várias vezes para eliminar as NPs não ligadas à membrana celular e imediatamente quantificadas após o experimento para calcular a absorção de potência das NPs nas células.

Os resultados evidenciam a redução dos valores de AEP para as duas amostras revestidas com e sem ouro em cultivo de celular em comparação com os colóides não cultivados. Como observado na Figura 4.46, para a máxima amplitude de campo aplicado (300 Oe), o valor de AEP de Fe₃O₄-PEI é de $\sim 127 \pm 2$ W/g e permanece mais estável que nas NPs Fe₃O₄-PEI@Au ($\sim 143 \pm 10$ W/g); ou seja, os valores de AEP dos campos próximos ao campo máximo aplicado de 300 Oe estão dentro do valor da faixa de incerteza correspondente ao máximo campo aplicado.

Em uma amplitude de campo de 290 Oe, encontramos um valor de 123 ± 5 W/g, para as NPs Fe₃O₄-PEI; enquanto que para as NPs Fe₃O₄-PEI@Au um valor de 136 ± 12 W/g. Como o número de células semeadas (cerca de 9 milhões) e como as propriedades magnéticas são semelhantes em ambas as amostras, este resultado indicaria que as diferenças observadas nos valores de AEP no cultivo celular poderiam ser atribuídas à quantidade de NPs ligadas à membrana celular, que esperava-se fosse maior nas NPs de Fe₃O₄-PEI. Este resultado inesperado pode ser devido à distribuição não homogênea de nanopartículas em cada sistema.

A dependência da AEP na amplitude do campo magnético AC para ambos os tipos de NPs pode ser bem ajustado usando a mesma lei de potência usada para os colóides. Os valores de λ são menores aos encontrados nos colóides, sendo de $3,2 \pm 0,1$ e $3,0 \pm 0,2$ para as NPs Fe₃O₄-PEI e Fe₃O₄-PEI@Au, respectivamente. Este resultado confirma o efeito não linear entre a magnetização e a amplitude de campo aplicada. Isto pode interpretar-se como se o ciclo de histerese aumentasse mais rapidamente, exibindo um campo coercivo e resultando nos valores de λ observados, uma vez

que o mecanismo de aquecimento é induzido por perdas de histerese devido ao processo de magnetização irreversível em um campo magnético AC.

Também, analisamos a eficiência de aquecimento das NPs de magnetita por célula ($\mu\text{W}/\text{célula}$). Para avaliar a capacidade real de dissipação de calor das NPs em uma temperatura desejada na região do tumor. A análise do AEP por célula mostra pequenas diferenças em ambas as NPs. Neste caso, se avalia o impacto da captação das células de um tipo de NPs na eficiência de aquecimento final (ver o gráfico inserido na Figura 4.46). A potência máxima dissipada por célula foi estimada em 39,2 e 47,5 $\mu\text{W}/\text{cell}$ para as NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$, respectivamente.

Os valores de AEP mostram uma diminuição em ambas as nanopartículas em cultivo celular, o que sugeriu que a capacidade de gerar calor no ambiente celular depende de quais mecanismos realmente ocorrem dentro do ambiente celular, e este efeito pode estar relacionado com a inibição da rotação de partículas devido ao ambiente intracelular ser mais viscoso [106]. Também, o incremento do diâmetro hidrodinâmico das NPs na cultura celular, que depende fortemente das características superficiais das partículas para as quais a contribuição da relaxação Browniana é desprezível [38] [160]. Além disso, em sistemas com alta anisotropia ou interação dipolar induzida pela aglomeração das NPs no ambiente celular, o mecanismo de relaxação de Néel também pode ser alterado significativamente através de alterações na barreira de energia anisotrópica, quando o campo magnético aplicado (permitido em hipertermia) não é suficiente para superar a barreira de energia de anisotropia, o que contribui com a produção de calor.

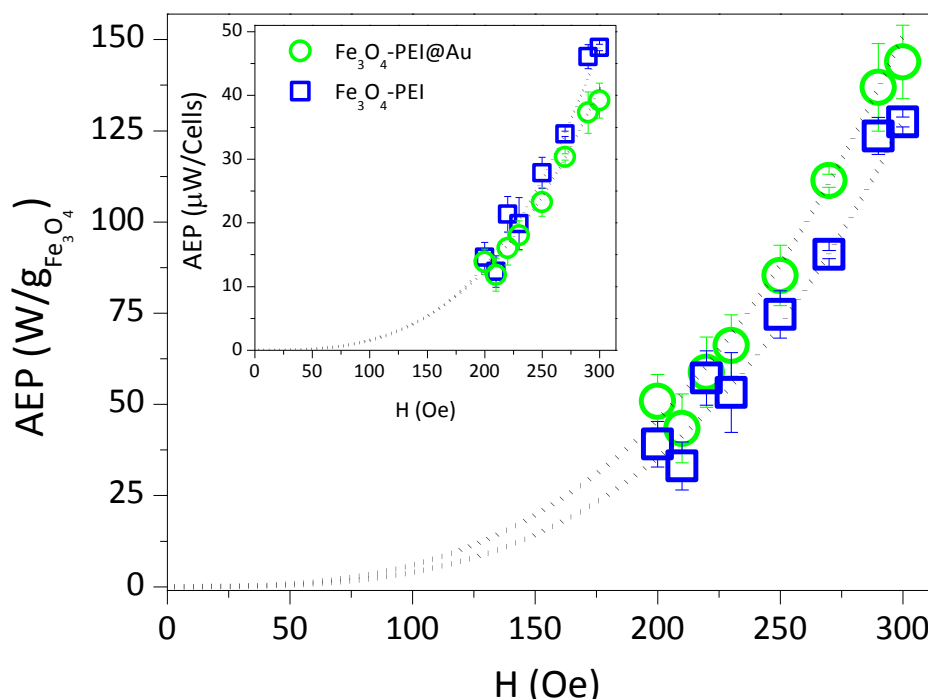


Figura 4.46 AEP das NPs magnéticas em cultivo celular como função da amplitude de campo alterno ($f = 571$ kHz). As células foram incubadas durante uma noite com as NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ (círculos) e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ (quadrados). Os dados experimentais foram ajustados com a relação $\text{AEP} = H^\lambda$ (curva pontilhada).

Nossas observações experimentais indicam que as interações magnéticas entre partículas não podem ser desprezadas dentro da proteína corona (conjunto de NPs recobertas com proteínas), já que se formam aglomerados como foi observado nas imagens MEV/FIB (a tendência de agregação de NPs em grandes “clusters” localizados na membrana celular e também uma fração significativa dentro da célula). Este efeito, em conjunto com a alta anisotropia magnética diminui a eficiência de aquecimento das NPs em experimentos *in vitro*. Não está claro ainda se estes valores de AEP podem ser melhorados ajustando o tamanho da partícula e o revestimento de ouro para o uso adequado em hipertermia, o que deve ser mais investigado.

Vale ressaltar que, apesar dos baixos valores de AEP determinados para nossas amostras, estes induzem danos locais nas células e provocam a morte celular. Estes resultados de viabilidade celular indicam que nossas NPs têm um uso potencial como plataformas multimodais para uma gama de aplicações biomédicas, tal como a liberação de fármacos ou hipertermia magnética.

Em resumo, nesta parte do trabalho foi relatada a síntese de nanopartículas com estrutura $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ para aplicações em hipertermia dual. As NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ foram sintetizadas com êxito usando o método de hidrólise oxidativa e depois recobertas com NPs de Au. Neste sistema, se determinou que o PEI atue como mediador para a captura celular das NPs de Au. Os resultados de

teste de citotoxicidade mostram que os NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ apresentam boa biocompatibilidade. Os resultados mostram que as NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ sintetizadas neste estudo apresentam um alto potencial para aplicações de hipertermia e na liberação de fármacos para o tratamento do câncer.

CONCLUSÕES

Nanopartículas de Fe_3O_4 , com e sem recobrimento de ouro, foram sintetizadas com sucesso pelos métodos de co-precipitação, decomposição térmica e hidrólise oxidativa com tamanhos médios dos cristalinos de ~ 10 , ~ 6 e ~ 18 nm. O estudo das propriedades magnéticas indicou comportamento superparamagnético para as NPs sintetizadas por co-precipitação e decomposição térmica, se determinando interações interpartículas mais fortes para as NPs sintetizadas por co-precipitação e fracas para as NPs sintetizadas por decomposição térmica. Já as NPs sintetizadas por hidrólise oxidativa mostraram comportamento ferromagnético a 300K com transição de Verwey (≈ 96 K). Testes de absorção específica de potência (AEP) das NPs de Fe_3O_4 sintetizados por co-precipitação indicaram valor máximo de 69,48 W/g que foi atribuída aos mecanismos de relaxação de Néel e Browniano. A temperatura de aquecimento máxima atingida foi de 45°C o que possibilita o seu uso como aquecedor em hipertermia magnética.

Também foram sintetizadas, com grande sucesso, nanoestruturas de $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ por decomposição térmica formadas por um núcleo de Au e uma casca de Fe_3O_4 e cujo tamanho médio do núcleo é de ~ 7 nm e a espessura da casca é de $\sim 3,5$ nm. Estas NPs mostram comportamento superparamagnético com interação interpartículas fraca. Determinou-se a ocorrência de desordem magnético na interface núcleo/casca e na superfície externa da casca que se manifestou através de um campo de “exchange bias” que desaparece em ~ 40 K, a qual foi assinada como a temperatura de congelamento dos spins desordenados.

Foram sintetizadas NPs de Fe_3O_4 recobertas com polietilanoimina (PEI) por hidrólise oxidativa as foram decoradas com NPs menores de Au para obter a nanoestrutura $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$, onde o núcleo de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ tem um tamanho médio de ~ 49 nm e as NPs de Au aderidas na superfície um tamanho de ~ 4 nm. O estudo das propriedades magnéticas indica um comportamento ferromagnético a 300 K e determinou-se que a presença do Au não modifica notoriamente as propriedades magnéticas. Através dos testes de AEP em água destas nanoestruturas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ se determinou um máximo de AEP de 168 W/g. Já no cultivo celular este AEP foi menor o que foi associado com a influência do meio mais viscoso e com a presença de agregados resultante das interações magnéticas. Ensaios de toxicidade *in vitro* usando a linha celular BV2 revelaram uma boa biocompatibilidade das nanoestruturas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$. Experimentos de captação celular demonstraram a presença de aglomerados de NPs que se localizam principalmente sobre a

membrana celular e em baixa proporção no espaço intracelular, o que pode ser explicado pela captação intracelular da carga superficial das NPs na absorção não-específica de proteínas.

Estes resultados mostraram que o revestimento da superfície das partículas de magnetita com PEI facilitam o recobrimento com nanopartículas de ouro de tamanho menor. Uma vez que estas NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI@Au}$ mostram atividade plasmônica das NPs de Au, este sistema pode ser classificado como um material bifuncional promissor para aplicações como o tratamento do câncer por hipertermia magnética.

TRABALHOS FUTUROS

Após os estudos realizados neste trabalho percebeu-se que:

- É de interesse continuar com o estudo da propagação do calor das partículas de magnetita recobertas com e sem ouro na direção do meio (cultivo celular), visando as potenciais aplicações em hipertermia.
- Melhorar o recobrimento com ouro das NPs com uma casca mais uniforme de ouro e alterar o tamanho das nanopartículas de ouro sobre a superfície das NPs de magnetita. Isto com o interesse das múltiplas aplicações que apresentam este tipo de estruturas entre elas o uso com campo magnético e com luz laser.
- Testar a funcionalização da superfície do ouro com outro tipo de moléculas, drogas, proteínas, etc. para aplicações biomédicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. L. Félix, J. Chaker, M. Parise, J. A. H. Coaquira, L. De Los Santos Valladares, A. Bustamante · V. K. Garg, A. C. Oliveira & P. C. Morais. Synthesis and characterization of uncoated and gold-coated magnetite nanoparticles. *Hyperfine Interact* (2013). Doi: 10.1007/s10751-013-0857-y.
- [2] M.E. Sadat, Ronak Patel, J. Sookoor, S. L. Bud'ko, R. C. Ewing, J. Zhang, Hong Xu, Yilong Wang, G. M. Pauletti, D. B. Mast & Donglu Shi. Effect of spatial confinement on magnetic hyperthermia via dipolar interactions in Fe₃O₄ nanoparticles for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C*, **42**, 52 (2014).
- [3] N. A. Frey, S. Peng, K. Cheng & S. Sun. Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage. *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 2532 (2009).
- [4] S. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, M. P. Rice, Shan X. Wang & G. Li. Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 273 (2004).
- [5] G. S. Alvarez, J. Sort, S. Suriñach, M. D. Baró & J. Nogués. Synthesis and size-dependent exchange bias in inverted core-shell MnO/Mn₃O₄ nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 9102 (2007).
- [6] C. Riggio, M. P. Calatayud, C. Hoskins, J. Pinkernelle, Beatriz Sanz, T. E. Torres, M. R. Ibarra, L. Wang, G. Keilhoff, G. F. Goya, V. Raffa, A. Cuschieri. Poly-L-lysine-coated magnetic nanoparticles as intracellular actuators for neural guidance. *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 3155 (2012).
- [7] M. P. Arachchige, H. Nemala, V. M. Naik & R. Nai. Effect of magnetic dipolar interactions on temperature dependent magnetic hyperthermia in ferrofluids. *J. Appl. Phys.*, **121**, 023901 (2017).
- [8] M. A. Vergés, R. Costo, A. G. Roca, J. F. Marco, G. F. Goya, C. J. Serna & M. P. Morales. Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain–multidomain limit. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **41**, 134003 (2008).
- [9] M. Ji, W. Yang, Q. Ren & D. Lu. Facile phase transfer of hydrophobic nanoparticles with poly(ethylene glycol) grafted hyperbranched poly(amido amine). *Nanotechnology* **20**, 075101 (2009).
- [10] J.-D. Qiu, M. Xiong, R.-P. Liang, H.-P. Peng & F. Liu. Synthesis and characterization of ferrocene modified Fe₃O₄@Au magnetic nanoparticles and its application. *Biosens. Bioelec.*, **24**, 2649 (2009).
- [11] W. Wu, Q. He, H. Chen, J. Tang & L. Nie. Sonochemical synthesis, structure and magnetic properties of air-stable Fe₃O₄/Au nanoparticles. *Nanotechnology*, **18**, 145609 (2007).

- [12] S.-J. Cho, J. C. Idrobo, J. Olamit, K. Liu, N. D. Browning & S. M. Kauzlarich. Growth Mechanisms and Oxidation-Resistance of Gold-Coated Iron Nanoparticles. *Chem. Mater.* **17**, 3181 (2005).
- [13] V. M. Khot, A. B. Salunkhe, N. D. Thorat, R. S. Ningthoujam & S. H. Pawar. Induction heating studies of dextran coated MgFe_2O_4 nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Dalton Trans.*, **42**, 1249 (2013).
- [14] S. C McBain, H. H. P. Yiu & J. Dobson. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int. j. Nanomedicine*, **3**, 169 (2008).
- [15] O. Veisoh, J. W. Gunn & M. Zhang. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **62**, 284 (2010).
- [16] S. Parveen, MS, Ranjita Misra, MS, Sanjeeb K. Sahoo, PhD. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **8**, 147 (2012).
- [17] N. S. Abadeer & C. J. Murphy. Recent progress in cancer thermal therapy using gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. C*, **120**, 4691 (2016).
- [18] A. E. Deatsch & B. A. Evans. Heating efficiency in magnetic nanoparticles hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **354**, 163 (2014).
- [19] O. Sandre, C. Genevois, E. Garaio, L. Adumeau, Stéphane Mornet & F. Couillaud. In Vivo Imaging of Local Gene Expression Induced by Magnetic Hyperthermia. *Genes*, **8**, 61 (2017).
- [20] G. F. Goya, V. Grazú, & M. R. Ibarra. Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy. *Current Nanoscience*, **4**, 1 (2008).
- [21] Ihab M. Obaidat, B. Issa & Y. Haik. Magnetic Properties of Magnetic Nanoparticles for Efficient Hyperthermia. *Nanomaterials*, **5**, 63 (2015).
- [22] R. Ghosh, L. Pradhan, Y. P. Devi, S. S. Meena, R. Tewari, A. Kumar, S. Sharma, N. S. Gajbhiye, R. K. Vatsa, B. N. Pandey & R. S. Ningthoujam. Induction heating studies of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles capped with oleic acid and polyethylene glycol for hyperthermia. *J. Mater. Chem.*, **21**, 13388 (2011).
- [23] L. C. Branquinho, M. S. Carrião, A. S. Costa, N. Zufelato, M. H. Sousa, R. Miotto, R. Ivkov & A. F. Bakuzis. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia. *Sci. Rep.*, **3**, 2887 (2013).
- [24] H. Nemala, J. S. Thakur, V. M. Naik, P. P. Vaishnava, G. Lawes, & R. Naik, Investigation of magnetic properties of Fe_3O_4 nanoparticles using temperature dependent magnetic hyperthermia in ferrofluids. *J. App. Phys.* **116**, 034309 (2014).

- [25] J. Li, F. Wang, H. Wan, J. Liu, Z. Liu, K. Cheng & H. Zou. Magnetic nanoparticles coated with maltose-functionalized polyethyleneimine for highly efficient enrichment of N-glycopeptides. *J. Chromatography A*, **1425**, 213 (2015).
- [26] I. Y. Goon, L. M. H. Lai, M. Lim, P. Munroe, J. J. Gooding & R. Amal. Fabrication and dispersion of gold-shell-protected magnetite nanoparticles: systematic control using polyethyleneimine. *Chem. Mater.*, **21**, 673 (2009).
- [27] I. Karimzadeh, M. Aghazadeh, T. Doroudi, M. R. Ganjali & P. H. Kolivand. Superparamagnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles Coated with PEG/PEI for Biomedical Applications: A Facile and Scalable Preparation Route Based on the Cathodic Electrochemical Deposition Method. *Advances in Physical Chemistry*, ID 9437487 (2017).
- [28] Wei Lu, Min Ling, Min Jia, Ping Huang, Chengkui Li & Biao Yan. Facile synthesis and characterization of polyethyleneimine coated Fe₃O₄ superparamagnetic nanoparticles for cancer cell separation. *Molecular Medicine Rep.*, **9**, 1080 (2014).
- [29] M. Khoobi, T. M. Delshad, M. Vosooghi, M. Alipour, H. Hamadi, E. Alipour, M. P. Hamedani, S. E. Sadatebrahimi, Z. Safaei, A. Foroumadi & A. Shafiee. Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles: an efficient, reusable and water tolerance nanocatalyst. *J. Mag. Mat.*, **375**, 217 (2015).
- [30] Hai-Yan Xie, R. Zhen, B. Wang, Yong-Jun Feng, P. Chen & J. Hao. Fe₃O₄/Au Core/Shell nanoparticles modified with Ni²⁺-nitrilotriacetic acid specific to histidine-tagged proteins, *J. Phys. Chem. C*, **114**, 4825 (2010).
- [31] J. A. Hachtel, S. Yuc, A. R. Lupini, S. T. Pantelides, M. Gich, A. Laromaine & A. Roig. Gold nanotriangles decorated with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a compositional and microstructural study. *Faraday Discuss.*, **191**, 215 (2016).
- [32] D. K. Chatterjee, P. Diagaradjane, S. Krishnan. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther. Deliv.* **2**, 1001 (2011).
- [33] L. C. Kennedy, L. R. Bickford, N. A. Lewinski, A. J. Coughlin, Y. Hu., E. S. Day, J. L. West & R. A. Drezek. A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle Mediated Thermal Therapies. *Small*, **7**, 169 (2011).
- [34] C. J. Murphy, A. M. Gole, J. W. Stone, P. N. Sisco, A. M. Alkilany, E. C. Goldsmith & S. C. Baxter. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. *Acc. Chem. Res.*, **41**, 1721 (2008).
- [35] J. T. Jørgensen, K. Norregaard, P. Tian, P. M. Bendix, A. Kjaer & L. B. Oddershede. Single particle and PET-based platform for identifying optimal plasmonic nano-heaters for photothermal cancer therapy. *Sci. Rep.*, **6**, 30076 (2016).

- [36] C. Hoskins, Y. Min, M. Gueorguieva, C. Mc Dougall, A. Volovick, P. Prentice, Z. Wang, A. Melzer, A. Cuschieri & L. Wang. Hybrid gold-iron oxide nanoparticles as a multifunctional platform for biomedical application, *J. Nanobiotechnology*, **10**:27 (2012).
- [37] M. Khafaji, M. Vossoughi, M. R. Hormozi-Nezhad, R. Dinarvand, F. Börrnert & A. Irajizad. A new bifunctional hybrid nanostructure as an active platform for photothermal therapy and MR imaging, *Sci. Rep.*, **6**, 27847 (2016).
- [38] A. Espinosa, R. Di Corato, J. Kolosnjaj-Tabi, P. Flaud, T. Pellegrino & C. Wilhelm. Duality of iron oxide nanoparticles in cancer therapy: amplification of heating efficiency by magnetic hyperthermia and photothermal bimodal treatment. *ACS Nano*, **10**, 2436 (2016).
- [39] A. R. K. Sasikala, R. G. Thomas, A. R. Unnithan, B. Saravanakumar, Y. Y. Jeong, Chan H. Park & Ch. S. Kim. Multifunctional nanocarpets for cancer theranostics: remotely controlled graphene nanoheaters for thermo-chemosensitisation and magnetic resonance imaging. *Sci. Rep.*, **6**, 20543 (2016).
- [40] P. Ghosh, G. Han, M. De, Ch. K. Kim & V. M. Rotello. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 1307 (2008).
- [41] M. Ravichandran, G. Oza, S. Velumani, J. T. Ramirez, F. G. Sierra, N. B. Andrade, A. Vera, L. Leija & M. A. G. Navarro. Plasmonic/magnetic multifunctional nanoplatform for cancer theranostics. *Sci. Rep.*, **6**, 34874 (2016).
- [42] B. I. Ipe, K. Yoosaf & K. G. Thomas. Functionalized gold nanoparticles as phosphorescent nanomaterials and sensors. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1907 (2006).
- [43] Lev A. Dykman & Nikolai G. Khlebtsov. Uptake of Engineered Gold Nanoparticles into Mammalian Cells. *Chem. Rev.*, **114**, 1258 (2014).
- [44] J. Bao, W. Chen, T. Liu, Y. Zhu, P. Jin, L. Wang, J. Liu, Y. Wei & Y. Li. Bifunctional Au-Fe₃O₄ nanoparticles for protein separation. *ACS nano*, **1**, 293 (2007).
- [45] X. Zhou, W. Xu, Y. Wang, Q. Kuang, Y. Shi, L. Zhong & Q. Zhang. Fabrication of cluster/shell Fe₃O₄/Au nanoparticles and application in protein detection via a SERS Method, *J. Phys. Chem. C*, **114**, 19607 (2010).
- [46] H.-Y. Xie, R. Zhen, B. Wang, Y. J. Feng, P. Chen & J. Hao. Fe₃O₄/Au Core/Shell Nanoparticles Modified with Ni²⁺-Nitrilotriacetic Acid Specific to Histidine-Tagged Proteins. *J. Phys. Chem. C*, **114**, 4825 (2010).
- [47] Yi-Cheun Yeh, B. Creran & V. M. Rotello. Gold nanoparticles: preparation, properties and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*, **4**, 1871 (2012).

- [48] X. Zhao, Y. Cai, T. Wang, Y. Shi & G. Jiang. Preparation of Alkanethiolate-functionalized core/shell Fe₃O₄@Au nanoparticles and its interaction with several typical target molecules. *Anal. Chem.*, **80**, 9091 (2008).
- [49] Y. H. Tan, Sh. E. Terrill, G. S. Paranjape, K. J. Stine & M. R. Nichols. The influence of gold surface texture on microglia morphology and activation. *Biomater. Sci.*, **2**, 110 (2014).
- [50] B. P. Shah, N. Pasquale, Gejing De, T. Tan, J. Ma & Ki-Bum Lee. Core/shell nanoparticle-based peptide therapeutics and combined hyperthermia for enhanced cancer cell apoptosis. *ACS Nano*, **8**, 9379 (2014).
- [51] V. Sebastian, M. P. Calatayud, G. F. Goya & J. Santamaria. Magnetically-driven selective synthesis of Au clusters on Fe₃O₄ nanoparticles. *Chem. Commun.*, **49**, 716 (2013).
- [52] J. L. Roti Roti. Cellular responses to hyperthermia (40–46°C): Cell killing and molecular events. *Int. J. Hyperthermia*, **24**, 3 (2008).
- [53] H. Khurshid, M. Phan, P. Mukherjee & H. Srikanth. Tuning exchange bias in Fe/ γ -Fe₂O₃ core-shell nanoparticles: Impacts of interface and surface spins. *J. Appl. Phys.*, **104**, 072407 (2014).
- [54] R. Kodama, A. Berkowitz, E. Mc Niff & S. Foner. Surface Spin Disorder in NiFe₂O₄ Nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.*, **77**, 394 (1996).
- [55] B. Martínez, X. Obradors, L. I. Balcells, A. Rouanet & C. Monty. Low temperature surface Spin-Glass transition in γ -Fe₂O₃ nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.*, **80**, 181 (1998).
- [56] G. Salazar, J. Sort, S. Surinach, M. Baró & J. Nogués. Synthesis and Size-Dependent Exchange Bias in Inverted Core-Shell MnO|Mn₃O₄ Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 9102 (2007).
- [57] V. Skumryev, S. Stoyanov, Y. Zhang, G. Hadjipanayis, D. Givod & J. Nogués. Beating the superparamagnetic limit with exchange bias. *Nature*, **423**, 850 (2003).
- [58] T. Yamauchi, Y. Tsukahara, T. Sakata, H. Mori, T. Yanagida, T. Kawai & Y. Wada. Magnetic Cu-Ni (core-shell) nanoparticles in a one-pot reaction under microwave irradiation. *Nanoescape*, **2**, 515 (2010).
- [59] E. V. Shevchenko, M. I. Bodnarchuk, M. V. Kovalenko, D. V. Talapin, R. K. Smith, S. Aloni, W. Heiss & A. P. Alivisatos. Gold/Iron oxide core/hollow-shell nanoparticles. *Adv. Mat.*, **20**, 4323 (2008).
- [60] D. Peddis, C. Cannas, G. Piccaluga, E. Agostinelli & D. Fiorani. Spin-glass-like freezing and enhanced magnetization in ultrasmall CoFe₂O₄ nanoparticles. *Nanotechnology* **21**, 125705 (2010).
- [61] K. Maaz, M. Usman, S. Karim, A. Mumtaz, S. K. Hasanain & M. F. Bertino. Magnetic response of core-shell cobalt ferrite nanoparticles at low Temperature. *J. App. Phys.*, **105**, 113917 (2009).
- [62] V. Dimitriadis, D. Kechrakos, O. Chubykalo & V. Tsiantos. Shape-dependent exchange bias effect in magnetic nanoparticles with core-shell morphology. *Phys. Rev. B*, **92**, 064420 (2015).

- [63] Z. Nemati, H. Khurshid, J. Alonso, M. H. Phan, P. Mukherjee & H. Srikanth. From core/shell to hollow Fe/ γ -Fe₂O₃ nanoparticles: evolution of the magnetic behavior. *Nanotechnology*, **26**, 405705 (2015).
- [64] W. Baaziz, B. P. Pichon, Ch. Lefevre, C. U. Bouillet, J. M. Greneches, M. Toumi, T. Mhiri & S. Bérgin C.. High Exchange Bias in Fe_{3- δ} O₄@CoO Core Shell Nanoparticles Synthesized by a One-Pot Seed-Mediated Growth Method. *J. Phys. Chem. C*, **117**, 11436 (2013).
- [65] L. Léon Félix. Síntese e caracterização de nanopartículas de Fe₃O₄ recobertas com ouro Dissertação (2013).
- [66] B. Cullity & C. Graham. Introduction to Magnetic Materials (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, second edition, 2009).
- [67] T. Jonsson, J. Mattsson, C. Djurberg, F. A. Khan, P. Nordblad & P. Svedlindh. Aging in a Magnetic Particle System. *Phys. Rev. Lett.*, **75**, 4138 (1995).
- [68] S. Yoon & K. M. Krishnan. Temperature dependence of magnetic anisotropy constant in manganese ferrite nanoparticles at low temperature. *J. Appl. Phys.*, **109**, 07B534 (2011).
- [69] G. Mihajlovic, K. Aledealat, P. Xiong, S. Molnár, M. Field & G. J. Sullivan. Magnetic characterization of a single superparamagnetic bead by phase-sensitive micro-Hall magnetometry. *Appl. Phys. Lett.*, **91**, 172518 (2007).
- [70] E. F. Ferrari, F.C.S. da Silva & M. Knobel. Influence of the distribution of magnetic moments on the magnetization and magnetoresistance in granular alloys. *Phys. Rev. B*, **56**, 6086 (1997).
- [71] G. C. Lavorato, D. Peddis, E. Lima Jr., H. E. Troiani, E. Agostinelli, D. Fiorani, R. D. Zysler & E. L. Winkler. Magnetic Interactions and Energy Barrier Enhancement in Core/Shell Biomagnetic Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, **119**, 15755 (2015).
- [72] W. Nunes, W. Folly, J. Sinnecker & M. Novak. Temperature dependence of the coercive field in single-domain particles systems. *Phys. Rev. B*, **70**, 014419 (2004).
- [73] K. Nadeem, H. Krenn, T. Traussnig, R. Würschum & D. V. Szabó. Spin-glass freezing of maghemite nanoparticles prepared by microwave. *J. Appl. Phys.*, **111**, 113911 (2012).
- [74] Chandra, S., Khurshid, H., Phan, M. & Srikanth, H. Asymmetric hysteresis loops and its dependence on magnetic anisotropy in exchange biased Co/CoO core-shell nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.*, **101**, 232405 (2012).
- [75] W. C. Nunes, F. Cebollada, M. Knobel & D. Zanchet. Effects of dipolar interactions on the magnetic properties of α -Fe₂O₃ nanoparticles in the blocked state. *J. Appl. Phys.*, **99**, 08N705 (2006).

- [76] N. Pérez, P. Guardia, A. G. Roca, M. P. Morales, C. J. Serna, O Iglesias, F. Bartolomé, L. M. García, X. Batlle & A. Labarta. Surface anisotropy broadening of the energy barrier distribution in magnetic nanoparticles. *Nanotechnology*, **19**, 475704 (2008).
- [77] A. B. Salunkhe, V. M. Khot & S. H. Pawar. Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: a status review. *Curr. Top. Med. Chem.*, **14**, 572 (2014).
- [78] S. A. Majetich & M. Sachan. Magnetostatic interactions in magnetic nanoparticle assemblies: energy, time and length scales. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **39**, R407 (2006).
- [79] S. Mørup, E. Brok & C. Frandsen. Spin structures in magnetic nanoparticles. *J. Nanomater.*, **2013**, 720629 (2013).
- [80] M. F. Hansen & S. Mørup. Models for the dynamics of interacting magnetic nanoparticles. *J. Mag. Mag. Mater.*, **184**, 262 (1998).
- [81] D. Caruntu, G. Caruntu & C. J O'Connor. Magnetic properties of variable-sized Fe₃O₄ nanoparticles synthesized from non-aqueous homogeneous solutions of polyols. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **40**, 5801 (2007).
- [82] J. P. Chen, C. M. Sorensen, K. J. Klabunde, G. C. Hadjipanayis, E. Devlin & A. Kostikas. Size-dependent magnetic properties of MnFe₂O₄ fine particles synthesized by coprecipitation. *Phys. Rev. B*, **54**, 9288 (1996).
- [83] V. Russier, C. Petit, J. Legrand & M. P. Pileni. Collective magnetic properties of cobalt nanocrystals self-assembled in a hexagonal network: Theoretical model supported by experiments. *Phys. Rev. B*, **62**, 3910 (2000).
- [84] L. León Félix, J. A. H. Coaquira, M. A. R. Martínez, G. F. Goya, J. Mantilla, M. H. Sousa, L. de los Santos Valladares, C. H. W. Barnes & P. C. Morais. Structural and magnetic properties of core-shell Au/Fe₃O₄ nanoparticles. *Sci. Rep.*, **7**, 41732 (2017).
- [85] S. Mørup, M. F. Hansen & C. Frandsen. Magnetic interactions between nanoparticles. *Beilstein J. Nanotechnol.*, **1**, 182 (2010).
- [86] J. L. Dormann, L. Bessaist & D. Fiorani. A dynamic study of small interacting particles: superparamagnetic model and spin-glass laws. *J. Phys. C: Solid State Phys.*, **21** 2015 (1988).
- [87] Ò. Iglesias, A. Labarta & X. Batlle. Exchange Bias Phenomenology and Models of Core/Shell Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **8**, 2761 (2008).
- [88] B. Issa, I. M. Obaidat, B. A. Albiss & Y. Haik. Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 21266 (2013).
- [89] A. Ceylan, C. C. Baker, S. K. Hasanain & S. Ismat Shah. Effect of particle size on the magnetic properties of core-shell structured nanoparticles. *J. Appl. Phys.*, **100**, 034301 (2006).

- [90] E. Lima, Jr., E. L. Winkler, D. Tobia, H. E. Troiani, R. D. Zysler, E. Agostinelli & D. Fiorani, Bimagnetic CoO core/CoFe₂O₄ shell nanoparticles: synthesis and magnetic properties. *Chem. Mater.*, **24**, 512 (2012).
- [91] H. Khurshid, M. H. Phan, Pritish Mukherjee & H. Srikanth. Tuning exchange bias in Fe/ γ -Fe₂O₃ core-shell nanoparticles: Impacts of interface and surface spins. *Appl. Phys. Lett.*, **104**, 072407 (2014).
- [92] L.T. Coutrim, E.M. Bittar, E. Baggio-Saitovitch & L. Bufaiçal. The Influence of temperature and applied magnetic field on the exchange bias effect of La_{1.5}Ca_{0.5}Co₂O₆. *J. Mag. Mag. Mat.*, **428**, 70 (2017).
- [93] A. Malozemoff. Random-field model of exchange anisotropy at rough ferromagnetic-antiferromagnetic interfaces. *Phys. Rev. B*, **35**, 3679 (1987).
- [94] A. P. Malozemoff. Heisenberg-to-Ising crossover in a random-field model with uniaxial anisotropy. *Phys. Rev. B*, **37**, 7673 (1988).
- [95] Miguel Kiwi. Exchange bias theory. *J. Mag. Mag. Mat.*, **234**, 584 (2001).
- [96] F. Keffer & T. Oguchi. Ferromagnetic Anisotropy in Cubic Crystals. *Phys. Rev.*, **117**, 718 (1960).
- [97] R. M. Cornell & U. Schwertmann. The iron oxides. VCH Press, Weinheim, Germany, 1996.
- [98] Hyon-Min S. Jeffrey I. Zink & N. M. Khashab. Seeded growth of ferrite nanoparticles from Mn oxides: observation of anomalies in magnetic transitions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**, 18825 (2015).
- [99] R. Prozorov, T. Prozorov, S. K. Mallapragada, B. Narasimhan, T. J. Williams & D. A. Bazylinski. Magnetic irreversibility and the Verwey transition in nanocrystalline bacterial magnetite. *Phys. Rev. B*, **76**, 054406 (2007).
- [100] Y. Arum, Y. Song & Junghwan Oh. Controlling the optimum dose of AMPTS functionalized-magnetite nanoparticles for hyperthermia cancer therapy. *Appl. Nanosci.*, **1**, 237 (2011).
- [101] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones & J. Dobson. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **36**, R167 (2003).
- [102] B. Sanz, M. P. Calatayud, E. De Biasi, E. Lima Jr., M. V. Mansilla, Roberto D. Zysler, M. R. Ibarra & G. F. Goya. In silico before in vivo: how to predict the heating efficiency of magnetic nanoparticles within the Intracellular Space. *Sci. Rep.*, **6**, 38733 (2016).
- [103] A. K. Gupta & M. Gupta. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, **26**, 3995 (2005).

- [104] A. M. Dias, A. Hussain, A. S. Marcos & A. C. Roque. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. *Biotechnol. Adv.*, **29**, 142 (2011).
- [105] Rosensweig R. E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *J. Magn. Magn. Mater.*, **252**, 370 (2002).
- [106] S. Ota, T. Yamada & Y. Takemura. Magnetization Reversal and Specific Loss Power of Magnetic Nanoparticles in Cellular Environment Evaluated by AC Hysteresis Measurement. *J. Nanomater.*, **2015**, ID 836761 (2015).
- [107] G. F. Goya, V. Grazú & M. R. Ibarra. Magnetic nanoparticles for cancer therapy. *Curr. Nanosci.*, **4**, 1 (2008).
- [108] J.-H. Lee, J.-t. Jang, J.-S. Choi, S. Ho Moon, S.-H. Noh, J.-W. Kim, J.-G. Kim, Il-Sun Kim, K. In Park & J. Cheon. Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. *Nature nanotechnology*, **6**, 418 (2011).
- [109] M. P. Calatayud, C. Riggio, V. Raffa, B. Sanz, T. E. Torres, M. R. Ibarra, C. Hoskins, A. Cuschieri, L. Wang, J. Pinkernelle, G. Keilhoff & G. F. Goya. Neuronal cells loaded with PEI-coated Fe₃O₄ nanoparticles for magnetically guided nerve regeneration. *J. Mater. Chem. B*, **1**, 3607 (2013).
- [110] T. Sugimoto & E. Matijevic. Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels. *J. Colloid Interface Sci.*, **74**, 227 (1980).
- [111] N. A. Frey, M. H. Phan, H. Srikanth, S. Srinath, C. Wang & S. Sun. Interparticle interactions in coupled Au-Fe₃O₄ nanoparticles. *J. Appl. Phys.*, **105**, 07B502 (2009).
- [112] H. Yu, M. Chen, P. M. Rice, Shan X. Wang, R. L. White & Shouheng Sun. Dumbbell-like Bifunctional Au-Fe₃O₄ Nanoparticles. *Nano Lett.*, **5**(2), 379 (2005).
- [113] K. R. Brown, D. G. Walter & M. J. Natan. Seeding of colloidal Au nanoparticle solutions. 2. Improved control of particle size and shape. *Chem. Mater.*, **12**, 306 (2000).
- [114] Jenkins, R., Snyder. R. L. Introduction to X-ray Powder Diffractometry. Eds.; Wiley: New York, 1996.
- [115] B. D. Cullity, Elements of X-ray Diffraction, Addison-Wesley Publishing Company, Inc. (1956).
- [116] W. Luo, Sidney R. Nagel, T. F. Rosenbaum & R. E. Rosensweig. Dipole Interactions with Random Anisotropy in a Frozen Ferrofluid. *Phys. Rev. Lett.*, **67**, 2721 (1991).
- [117] J. M. Vargas, W. C. Nunes, L. M. Socolovsky, M. Knobel & D. Zanchet. Effect of dipolar interaction observed in iron-based nanoparticles. *Phys. Rev. B*, **72**, 184428 (2005).

- [118] B. Mehdaoui, A. Meffre, L.-M. Lacroix, J. Carrey, S. Lachaize, M. Respaud, M. Gougeon & B. Chaudret. Large specific absorption rates in the magnetic hyperthermia properties of metallic iron nanocubes. *J. Magn. Magn. Mater.*, **322**, L49 (2010).
- [119] L. Bordonali, Y. Furukawa, M. Kraken, F. J. Litterst, C. Sangregorio, M. F. Casula & A. Lascialfari. ¹H-NMR study of the spin dynamics of fine superparamagnetic nanoparticles. *Phys. Rev. B*, **85**, 174426 (2012).
- [120] Yosun Hwang, S. Angappane, J. Park, K. An, T. Hyeon & Je-Geun Park. Exchange bias behavior of monodisperse Fe₃O₄/γ-Fe₂O₃ core/shell nanoparticles. *Curr. App. Phys.*, **12**, 808 (2012).
- [121] T. N. Shendruk, R. D. Desautels, B. W. Southern & J. Van Lierop. The effect of surface spin disorder on the magnetism of γ-Fe₂O₃ nanoparticle dispersions. *Nanotechnology*, **18**, 455704 (2007).
- [122] K. L. L. Maldonado, P. de la Presa, E. F. Tavizon, J. R. F. Mancilla, J. A. M. Aquino, A. H. Grande & J. T. E. Galindo. Magnetic susceptibility studies of the spin-glass and Verwey transitions in magnetite nanoparticles. *J Appl. Phys.*, **113**, 17E132 (2013).
- [123] G. F. Goya, T. S. Berquó, F. C. Fonseca & M. P. Morales. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *J. Appl. Phys.*, **94**, 3520 (2003).
- [124] M. P. Arachchige, H. Nemala, V. M. Naik & R. Naik. Effect of magnetic dipolar interactions on temperature dependent magnetic hyperthermia in ferrofluids. *J. Appl. Phys.*, **121**, 023901 (2017).
- [125] E. Lima Jr., E. De Biasi, R. D. Zysler, M. V. Mansilla, M. L. Mojica-Pisciotti, T. E. Torres, M. P. Calatayud, C. Marquina, M. R. Ibarra & G. F. Goya. Relaxation time diagram for identifying heat generation mechanisms in magnetic fluid hyperthermia. *J. Nanopart. Res.*, **16**, 2791 (2014).
- [126] S. Bae & S. W. Lee. Applications of NiFe₂O₄ nanoparticles for a hyperthermia agent in biomedicine. *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 252503 (2006).
- [127] C. Haase & U. Nowak. Role of dipole-dipole interactions for hyperthermia heating of magnetic nanoparticle ensembles. *Phys. Rev. B*, **85**, 045435 (2012).
- [128] J. C. Denardin, A. L. Brandl, M. Knobel, P. Panissod, A. B. Pakhomov, H. Liu, & X. X. Zhang. Thermoremanence and zero-field-cooled/field-cooled magnetization study of Co_x(SiO₂)_{1-x} granular films. *Phys. Rev. B*, **65**, 064422 (2002).
- [129] Arijit Mitra, J. Mohapatra, S. S. Meena, C. V. Tomy & M. Aslam. Verwey Transition in Ultrasmall-Sized Octahedral Fe₃O₄ Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, **118**, 19356 (2014).
- [130] J. Lee, S. G. Kwon, J.G. Park, T. Hyeon. Size Dependence of Metal-Insulator Transition in Stoichiometric Fe₃O₄ Nanocrystals. *Nano Lett.*, **15**, 4337 (2015).

- [131] L. Zheng, W. Su, Z. Qi, Y. Xu, M. Zhou & Y. Xie. First-Order Metal-Insulator Transition and Infrared Identification of Shape Controlled Magnetite Nanocrystals. *Nanotechnology*, **22**, 485706 (2011).
- [132] Jianchao Ma, Lingling Wang, Yanli Wu, Xianshu Dong, Qingliang Ma, Chen Qiao, Qingfang Zhang & Jilong Zhang. Facile Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles with a High Specific Surface Area. *Mater. Trans.*, **55**, 1900 (2014).
- [133] M. Morales, M. Phan, S. Pal, N. Frey & H. Srikanth. Particle blocking and carrier fluid freezing effects on the magnetic properties of Fe₃O₄-based ferrofluids. *J. Appl. Phys.*, **105**, 07B511 (2009).
- [134] S. Morup & E. Tronc. Superparamagnetic Relaxation of Weakly Interacting Particles. *Phys. Rev. Lett.*, **72** 3278 (1994).
- [135] C. Moya, Ó. Iglesias, X. Batlle & A. Labarta. Quantification of Dipolar Interactions in Fe_{3-x}O₄ nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*, **119**, 24142 (2015).
- [136] 31. G. Lopes, J. M. Vargas, S. K. Sharma, F. Béron, K. R. Pirota, M. Knobel, C. Rottori & R. D. Zysler. Ag-Fe₃O₄ Dimer colloidal nanoparticles: synthesis and Enhancement of Magnetic properties. *J Phys Chem. C*, **114**, 10148 (2010).
- [137] E. Jr. Lima, J. M. Vargas, R. D. Zysler, R. Cohen, J. Arbiol, G. F. Goya, A. Ibarra & M. R. Ibarra. Single-step chemical synthesis of ferrite hollow nanospheres. *Nanotechnology*, **20**, 045606 (2009).
- [138] N. Fontaina, B. Rivas, B. Rodríguez & V. Salgueirino. Exchange Bias Effect in CoO@Fe₃O₄ Core-Shell Octahedron-Shaped Nanoparticles. *Chem. Mater.*, **26**, 5566 (2014).
- [139] E. De Biasi, E. Lima Jr., J. M. Vargas, R. D. Zysler, J. Arbiol, A. Ibarra, G. F. Goya & R. Ibarra. Exchange bias in ferrite hollow nanoparticles originated by complex internal magnetic structure. *Mater. Res. Express*, **2**, 105001 (2015).
- [140] K. Nadeem, H. Krenn, T. Traussnig, R. Würschum, D. V Szabó & I. L. Papst. Effect of dipolar and exchange interactions on magnetic blocking of maghemite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mat.*, **323**, 1998 (2011).
- [141] J. Dormann, D. Fiorani & E. Tronc. Magnetic Relaxation in Fine-Particles Systems. *Adv. Chem. Phys.*, **98**, 283 (1997).
- [142] H. Khurshid, P. L. Kelley, Ó. Iglesias, J. Alonso, M. H. Phan, Cheng-jun Sun, Marie-Louise Saboungi & H. Srikanth. Spin-glass-like freezing of inner and outer surface layers in hollow γ -Fe₂O₃ nanoparticles. *Sci. Rep.*, **5**, 15054 (2015).
- [143] T. E. Torres, E. Lima Jr., A. Mayoral, A. Ibarra, C. Marquina, M. R. Ibarra & G. F. Goya, Validity of the Néel-Arrhenius model for highly anisotropic Co_xFe_{3-x}O₄ nanoparticles. *J. App. Phys.*, **118**, 183902 (2015).

- [144] B. Aslibeiki, P. Kameli & H. Salamati. The effect of dipole-dipole interactions on coercivity, anisotropy constant, and blocking temperature of MnFe_2O_4 nanoparticles. *J. Appl. Phys.*, **119**, 063901 (2016).
- [145] M. P. Calatayud, B. Sanz, V. Raffa, C. Riggio, M. R. Ibarra & G. F. Goya. The effect of surface charge of functionalized Fe_3O_4 nanoparticles on protein adsorption and cell uptake. *Biomaterials*, **35**, 6389 (2014).
- [146] F. Hu, H. Lin, Z. Zhang, F. Liao, M. Shao, Y. Lifshitz & Shuit-Tong Lee. Smart liquid SERS substrates based on $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanoparticles with reversibly tunable enhancement factor for practical quantitative detection. *Sci. Rep.*, **4**, 7204 (2014).
- [147] J. Rivas, M. Bañobre-López, Y. Piñeiro-Redondo, B. Rivas & M.A. López-Quintela. Magnetic nanoparticles for application in cancer therapy. *J. Mag. Mag. Mater.*, **324**, 3499 (2012).
- [148] Y. P. Redondo, M. B. López, I. P. Blanco, G. Goya, M. A. L. Quintela & José Rivas. The influence of colloidal parameters on the specific power absorption of PAA-coated magnetite nanoparticles. *Nanoscale Research Lett.*, **6**, 383 (2011).
- [149] M. Ma, Y. Wu, J. Zhou, Y. Sun, Y. Zhang & N. Gu. Size dependence of specific power absorption of Fe_3O_4 particles in AC magnetic field. *J. Mag. Mag. Mat.*, **268**, 33 (2004).
- [150] B. Sanz, M. P. Calatayud, N. Cassinelli, M. R. Ibarra & G. F. Goya. Long-term stability and reproducibility of magnetic colloids are key issues for steady values of specific power absorption over time. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **27**, 4524 (2015).
- [151] Sanz, B., Calatayud, M. P., De Biasi, E., Lima Jr, E., Mansilla, M. V., Zysler, R. D. & Goya, G. F. In Silico before In Vivo: how to Predict the Heating Efficiency of Magnetic Nanoparticles within the Intracellular Space. *Sci. Rep.*, **6**, 38733 (2016).
- [152] T. Zhou, B. Wu & Da Xing. Bio-modified Fe_3O_4 core/Au shell nanoparticles for targeting and multimodal imaging of cancer cells. *J. Mater. Chem.*, **22**, 470 (2012).
- [153] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani & W. C. W. Chan. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.*, **6**, 662 (2006).
- [154] A. M. Alkilany & Catherine J. Murphy. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?. *J. Nanopart. Res.*, **12**, 2313 (2010).
- [155] M. Kumari, A. Mishra, Sh. Pandey, S. P. Singh, V. Chaudhry, M. K. R. Mudiam, Sh. Shukla, P. Kakkar & Ch. Shekhar Nautiyal. Physico-chemical condition optimization during biosynthesis lead to development of improved and catalytically efficient gold nano particles. *Sci. Rep.*, **6**, 27575 (2016).
- [156] J. L. Lyon, D. A. Fleming, M. B. Stone, P. Schiffer & M. E. Williams. Synthesis of Fe oxide core/Au shell nanoparticles by iterative hydroxylamine seeding. *Nano Lett.*, **4**, 719 (2004).

- [157] S. Palomba, L. Novotny & R. E. Palmer. Blue-shifted plasmon resonance of individual size-selected gold nanoparticles. *Opt. Commun.*, **281**, 480 (2008).
- [158] M. P. Calatayud, C. Riggio, V. Raffa, B. Sanz, T. E. Torres, M. R. Ibarra, C. Hoskins, A. Cuschieri, L. Wang, J. Pinkernelle, G. Keilhoff & G. F. Goya. Neuronal cells loaded with PEI-coated Fe₃O₄ nanoparticles for magnetically guided nerve regeneration. *J. Mat. Chem. B*, **1**, 3607 (2009).
- [159] G. F. Dawson & G. W. Halbert. The In Vitro Cell Association of Invasin Coated Polylactide-Co-Glycolide Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, **17**, 1420(2000).
- [160] Challa S.S.R. Kumar & F. Mohammad. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Ver.*, **63**, 789 (2011).