

**Universidade de Brasília  
Instituto de Química**

**Síntese de fluido magnético à base de maghemita  
para produção de nanocápsulas magnéticas de  
albumina bovina**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**Bruno Marques Lacava**

Orientador: Prof. Dr. Paulo César de Moraes

**Brasília - 2009**



## COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do aluno **Bruno Marques Lacava, Síntese de fluido magnético à base de maghemita para produção de nanocápsulas magnéticas de albumina bovina**, apresentada no Instituto de Química da Universidade de Brasília em 15 de janeiro de 2010.

Prof. Dr. Paulo César de Moraes  
Presidente (IF – UnB)

Prof. Dr. Marcello Moreira Santos  
Membro Titular (IQ – UnB)

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa  
Membro Titular (Ceilândia – UnB)

Brasília, 15 de janeiro de 2010.

## **Dedico**

**ao meu Velho, Celso Lacava (*in memoria*), com todo o carinho que guardo,**

**a minha querida Mãe, Zulmira Lacava,**

**aos meus filhos André e Arthur, de quem me orgulho e amo imensamente.**

## **Agradecimentos**

Ao professor Paulo César de Moraes, pela amizade, convívio, incentivo e orientação desde minha iniciação científica;

A minha querida e amada Mãe, Zulmira Lacava, pelo incessante apoio, ajuda e incentivo nesta batalha. Também a sua equipe do Laboratório de Genética, do IB-UnB.

Ao Professor Cláudio Tedesco e também a sua equipe da USP, pelos dados do nanocompósitos BSA, pela colaboração e pela sua sempre cordial ajuda que engrandece o trabalho e o convívio em grupo;

A Professora Emília Lima e sua equipe, pela caracterização de difração de raios X e também pela colaboração e apoio desde o tempo da minha graduação;

Ao Professor Marcelo Henrique Sousa, pelo grande incentivo e ajuda no aprendizado da química dos colóides.

Ao físico Leandro Figueiredo pelos dados de birrefringência e microscopia eletrônica e também pela sua ajuda;

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica/CEL/UnB por possibilitar o uso dos equipamentos necessários ao desenvolvimento do trabalho;

Ao professor Kalil Skeff Neto e sua equipe, sempre apoiando e contribuindo para a formação do conhecimento na área;

À física Patrícia Gravina pela caracterização por birrefringência magnética, compartilhar de informações e sempre fluida e produtiva colaboração no espaço dos laboratórios;

Ao físico Tiago Melo da mesma forma pela intensa troca de informações e crescimento mútuo.

Ao químico Marcelo Parise pela grande ajuda, colaboração e companheirismo no Laboratório de Manipulação de Amostras. Pelos papos e grande apoio;

Aos Professores do IQ que me apoiaram nos estudos, em especial ao Professor Marcello Moreira Santos, pelo suporte, incentivo e amizade.

Aos colegas do IQ especialmente a aqueles frequentadores do “banquinho” pelo companheirismo

Aos colegas Mônica, Mariana e Francisco Alexandre, pela amizade que desde sempre me possibilitou ir adiante;

A equipe de Pós graduação do IQ, incluindo Rogério, Junior, e o coordenador Prof Sebastião pela solícita ajuda neste processo;

Aos meus amados filhos que nem sempre imaginam a imensa força que me dão;

A minha família como um todo pela força e apoio que nunca me faltou;

Ao Pessoal do meu trabalho atual que sempre ofereceu ajuda e força, destacando Jorge Lacerda, Ana Carla Albuquerque Barbosa, Sueli Akemi, Felipe Cardoso, Cláudia Ribeiro, Márcia Khalil, Cláudio Ziglio;

A Sayuri Mendes, Marlos Santos e Lucas de Carvalho pelo grande apoio e coleguismo.

A minha chefe atual Gina Vazquez Sebastian, pelo apoio.

A minha namorada Inayá pelo carinho, compreensão e atenção neste processo, que me ajudou imensamente;

A todos os demais colaboradores pela fluida troca de informações e sólida colaboração;

A Rede de Nanobiomagnetismo (MCT/CNPq), CNANO (IB/UnB), FAP-DF, Finatec, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

## Resumo

Este trabalho descreve a preparação de um fluido magnético iônico, em meio ácido, com base em nanopartículas de maghemita, sintetizadas pelo método de coprecipitação, usando uma rota química aprimorada para prover um material monomodal, em uma única etapa, ou seja, sem necessitar de etapas específicas para seleção de diâmetros. O fluido magnético produzido foi caracterizado usando técnicas de difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), que comprovaram a presença da fase maghemita e revelaram nanopartículas com diâmetro médio de  $8,15 \pm 0,09$  nm e dispersão de  $0,30 \pm 0,01$  via descrição por uma função de distribuição log-normal. A técnica de birrefringência magnética estática foi utilizada na caracterização magneto-óptica do material preparado e indicou a presença de aglomerados de nanopartículas (mais provavelmente cadeias lineares), mostrando que o sinal de birrefringência depende do valor do campo aplicado, da fração volumétrica de partículas e da morfologia dos aglomerados. O fluido magnético preparado foi utilizado como precursor na produção de um nanocompósito magnético para aplicações biomédicas. Neste caso, as nanopartículas de maghemita foram encapsuladas em nanocápsulas de albumina bovina (diâmetro médio de  $73 \pm 3$  nm), preparadas pelo método de desnaturação térmica. Este nanocompósito magnético tem sido utilizado em diversos estudos; em investigações de propriedades físicas básicas e em investigações de características biológicas.

## Abstract

This work describes the preparation of an ionic magnetic fluid in acidic medium based on maghemite nanoparticles, the latter synthesized by coprecipitation via a chemical route developed to provide, in a single step, monomodal samples with no extra procedure for size selection. The prepared magnetic fluid was characterized by X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM), indicating the maghemite phase consisting of nanosized particles with average diameter of  $8.15 \pm 0,09$  nm and diameter dispersion of  $0.30 \pm 0.01$  under a log-normal distribution function. Static magnetic birefringence technique was used to characterize the magneto-optical properties of the as-produced sample, revealing the influence of particle agglomerates (more likely linear chains of particles) and indicating that the birefringence signal scales with the applied magnetic field, with the particle volume fraction, and with the morphology of the agglomerates. The produced magnetic fluid was used as a precursor in the preparation of a magnetic nanocomposite for biomedical applications. In this case, the maghemite nanoparticles were encapsulated within nanosized bovine serum albumin (BSA) nanospheres (average diameter of  $73 \pm 3$  nm), prepared by the thermal denaturation route. This magnetic nanocomposite has been used in several studies; investigating the basic physical properties and the biological characteristics.

## Índice

<b>Lista de Tabelas</b> .....	XI
<b>Lista de Figuras</b> .....	XII
<b>Capítulo 1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Introdução.....	2
1.2 Fluidos magnéticos.....	3
1.3 Breve histórico.....	4
1.4 Nanopartículas magnéticas.....	5
1.4.1 Composição.....	5
1.4.2 Estrutura Cristalina .....	6
1.5 Propriedades Magnéticas dos Fluidos Magnéticos.....	8
1.5.1 Superparamagnetismo .....	9
1.6 Motivação .....	11
1.7 OBJETIVO GERAL.....	14
1.7.1 Objetivos específicos.....	14
<b>Capítulo 2 ROTAS DE SÍNTESE E TIPOS DE FLUIDOS MAGNÉTICOS</b> .....	15
2.1 Rotas de síntese .....	16
2.1.1 Rotas físicas.....	16
2.1.2 Rotas químicas.....	18
2.1.2.1 Coprecipitação em meio aquoso.....	18
2.1.2.2 Coprecipitação em microemulsão .....	19
2.1.2.3 Decomposição de composto de coordenação.....	19
2.1.2.4 Decomposição por sonicação.....	20
2.1.2.5 Redução de íons metálicos.....	21
2.1.2.6 Considerações gerais sobre as rotas de síntese.....	21
2.2 Tipos e preparo de fluidos magnéticos.....	22



<b>Capítulo 3 SÍNTESE DE FLUIDOS MAGNÉTICO IÔNICO</b> .....	26
3.1 Introdução.....	27
3.2 Reagentes.....	27
3.3 Metodologia.....	28
3.3.1 Preparo das Soluções .....	28
3.3.2 Coprecipitação.....	28
3.3.3 Isolamento /Lavagem do precipitado.....	29
3.3.4 Oxidação/Passivação.....	29
3.3.5 Tratamento Ácido e Peptização .....	30
3.3.6 Propriedades gerais do fluido magnético obtido.....	30
3.4 Considerações sobre a síntese.....	31
3.4.1 Obtenção de partículas magnéticas.....	31
3.4.2 Considerações sobre Oxidação da Magnetita.....	33
3.4.3 Considerações sobre o processo de passivação.....	34
3.4.4 Considerações sobre o tratamento ácido.....	35
<b>Capítulo 4 CARACTERIZAÇÃO DE FLUIDO MAGNÉTICO IÔNICO</b> .....	37
4.1 Introdução .....	38
4.2 Caracterização das nanopartículas de maghemita por difração de Raios X.....	38
4.2.1 Metodologia .....	39
4.2.2 Resultados e Discussão.....	39
4.3 Caracterização das nanopartículas de maghemita por Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	40
4.3.1 Metodologia.....	41
4.3.2 Resultados e Discussão.....	41
4.4 Caracterização das nanopartículas de maghemita por Birrefringência Magnética Estática.....	43
4.4.1 Birrefringência - definição.....	43
4.4.1.1 Fluidos Magnéticos e Birrefringência Magnética .....	44
4.4.2 Metodologia .....	48
4.4.3 Resultados e Discussão.....	49

<b>Capítulo 5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS MAGNÉTICAS DE ALBUMINA:</b>	
aplicações de fluidos magnético iônico.....	51
5.1 Nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas.....	52
5.2 Metodologia.....	53
5.2.1 Reagentes.....	53
5.2.2 Síntese das nanocápsulas magnéticas de albumina.....	53
5.2.3 Caracterização de nanocápsulas magnéticas de albumina por. Microscopia Eletrônica de Transmissão ..(MET).....	56
5.3 Resultados e Discussão.....	57
5.4 Outras caracterizações das nanocápsulas magnéticas de albumina .....	58
5.5 Perspectivas – aplicações biomédicas.....	59
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>62</b>
<b>8 ANEXOS – Artigos Publicados.....</b>	<b>68</b>

## Lista de Tabelas

Tabela 1.1	Propriedades físicas e magnéticas da magnetita e da maghemita.....	06
Tabela 4.1	Posição dos picos de difratograma de raios X comparados com a ficha padrão ASTM.....	40

## Lista de Figuras

Figura 1.1	Estrutura cúbica de face centrada	7
Figura 1.2	Estrutura de ferrita do tipo espinélio.....	7
Figura 1.3	Alinhamento de momentos magnéticos atômicos individuais em diferentes tipos de materiais.....	10
Figura 1.4	Domínios magnéticos em um material de volume macroscópico (bulk).....	10
Figura 2.1	Comparação das rotas físicas ( <i>top-down</i> ) e químicas ( <i>bottom-up</i> ) na obtenção de nanopartículas magnéticas .....	17
Figura 2.2	Estratégia de preparo de nanopartículas de óxido de ferro monodispersas dentro de gotas de micromulsão água-em-óleo.....	20
Figura 2.3	Esquema de preparação de fluido magnético surfactado e iônico.....	23
Figura 2.4	Tipos de estabilidade coloidal.....	24
Figura 3.1	Esquema geral de síntese de fluido magnético iônico.....	28
Figura 3.2	Esquema de oxidação da magnetita em maghemita em suspensão ácida.....	35
Figura 4.1	Difratograma de raios X das nanopartículas de maghemita em pó.....	40
Figura 4.2	MET em nanopartículas de maghemita	42
Figura 4.3	Histograma de polidispersão das nanopartículas de maghemita	43
Figura 4.4	Esquema de birrefringência.	44
Figura 4.5	Representação dos ângulos relativos a orientação do polarizador, analisador, e campo magnético	48
Figura 4.6	Aparato experimental para realização de medidas de birrefringência magnética estática	48
Figura 4.7	Birrefringência magnética estática do FM iônico em função da diluição das amostras.....	49
Figura 5.1	Esquema geral de síntese das nanocápsulas magnéticas de albumina bovina a partir do fluido magnético iônico (FM)	54
Figura 5.2	Estrutura esquemática das nanocápsulas magnéticas de albumina.....	56
Figura 5.3	Micrografia obtida por MET das nanocápsulas de albumina magnéticas. ....	57
Figura 5.4	Histograma de diâmetro das nanocápsulas de albumina magnéticas.	58

**Capítulo I**  
**INTRODUÇÃO**

## 1.1 Introdução

Materiais em dimensões nanométricas apresentam propriedades inusitadas, bastante diferentes das propriedades do mesmo material em escala macroscópica. O estudo e as estratégias de manipular os mais diversos materiais nesta escala, com fim de explorar e apropriar-se das suas propriedades atraiu diversas áreas do conhecimento humano numa confluência que hoje é comumente chamada de nanotecnologia.

A estratégia de manipular os materiais em escala atômica para alterar suas propriedades foi prevista pela primeira vez em 1959, pelo físico Richard Feynman <sup>1</sup>, que o fez ser considerado um dos fundadores do paradigma da nanotecnologia. As mudanças nos comportamentos dos materiais na nanoescala estão relacionadas não apenas à ordem de magnitude de redução da dimensão, mas também ao diferente papel das forças naturais fundamentais (gravidade, atrito, eletrostática) quando em escala reduzida <sup>2</sup>. Muitas das novas propriedades observadas à medida em que as dimensões dos materiais são reduzidas são atribuídas ao confinamento quântico, confinamento de fônons, diminuição de simetria de coordenação dos átomos da superfície ou quebra de simetria de translação do nanocristal <sup>3</sup>. São também relevantes os efeitos de superfície, devido à grande relação área/volume, uma vez que o número de átomos que estão na superfície do material é muito maior do que aqueles dispersos por seu volume, o que explica o aumento significativo na sua reatividade. Um exemplo bastante elucidativo das propriedades inusitadas de materiais nanoestruturados é encontrado nas nanopartículas magnéticas, que são superparamagnéticas (apresentam magnetização efetiva apenas na presença de campo magnético externo), podendo ser manipuladas à distância por gradientes de campos magnéticos e dissipando calor quando submetidas a campos magnéticos alternados (AC). Em consequência destas propriedades nanopartículas magnéticas possibilitam aplicações tecnológicas, como selos e tintas magnéticas, meios de gravação magnéticos, catálise, fluidos magnéticos <sup>4</sup>,

remediação ambiental <sup>5</sup>, transformadores <sup>6</sup> e aplicações biomédicas diversas, como agentes de contraste em imagens por ressonância magnética nuclear, carregamento de drogas alvo-específicas ou promotores de magnetohipertermia para tratamento do câncer <sup>4</sup>.

O uso efetivo das nanopartículas magnéticas nas diferentes aplicações, entretanto, depende, em um primeiro plano, das características físicas e físico-químicas, tais como sua morfologia, composição, especificidades superficiais que garantam as interações desejadas e eficiência nas aplicações. Apresentar faixa estreita de tamanho, por exemplo, é imprescindível para que as partículas tenham as propriedades físicas e químicas uniformes exigidas para algumas aplicações especiais. Nesse contexto vale lembrar que na escala nanométrica diferenças de 1 nm (1 bilionésimo do metro) podem levar a características e funções diferentes, como é bem conhecido em relação aos pontos quânticos (*quantum dots*) <sup>7</sup>. É importante considerar que para atingir as propriedades físicas e químicas desejáveis para uma determinada função as rotas de síntese de nanopartículas demandam precisão e cuidados em todas as etapas envolvidas.

Em consonância com esta idéia o objetivo neste trabalho foi preparar um fluido magnético iônico estável, concentrado, com características que possibilitem aprofundar os conhecimentos sobre as nanopartículas magnéticas e o comportamento coloidal e que também atendam aos requisitos de serem precursores de compósitos para uso em aplicações biomédicas.

## **1.2 Fluidos magnéticos**

Fluidos magnéticos (FM) ou ferrofluidos são sistemas coloidais ultra-estáveis que consistem de nanopartículas magnéticas (monodomínio) suspensas em líquidos carreadores de natureza orgânica ou inorgânica em que as nanopartículas podem apresentar valores elevados (10 a 15 %) da fração volumétrica <sup>8</sup>. Nessas suspensões, as interações partícula-líquido são fortes o bastante para que o comportamento magnético seja transmitido para todo o

líquido <sup>9</sup>, uma das características que explicam o interesse que os FM têm despertado no meio científico e nas aplicações industriais e biomédicas.

### 1.3 Breve histórico

Os primeiros relatos de produção de fluidos magnéticos por dispersão de partículas de ferro metálico em um líquido carreador, atribuída a Wilson, datam do século XVIII (1779), como descrito por Charles, Popplewell e Wohlfahrt <sup>10</sup>. O fluido obtido, entretanto, não apresentava estabilidade coloidal, característica essencial dos fluidos, nem sequer a estabilidade química: as partículas eram grandes, pouco resistentes à oxidação, se aglomeravam e precipitavam em poucas horas. Em 1932, usando ainda o mesmo procedimento de Wilson, Bitter<sup>11</sup> produziu um colóide que consistia de uma suspensão de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) em água, contendo partículas com diâmetros da ordem de 1  $\mu\text{m}$ . Este tamanho de partículas ainda não proporcionava estabilidade ao fluido magnético, mas ainda assim eram usados em sistemas de embreagens. Neste colóide as partículas se movimentavam na presença de um gradiente de campo e à medida que o tempo passava se aglomeravam.

Seis anos depois, suspensões contendo partículas na escala nanométrica (20 nm) começaram a ser preparadas <sup>12</sup>. Em 1958, os fluidos magnéticos preparados eram bastante similares aos preparados atualmente <sup>13</sup>, mas demandava o uso de processos de ultracentrifugação para separar as partículas maiores.

Os primeiros fluidos magnéticos que conquistaram certo patamar de estabilidade foram obtidos em 1965 <sup>14</sup> e consistiam de nanopartículas de ferritas recobertas com ácido oléico dispersas em querosene. O ácido oléico era empregado para evitar a aglomeração das partículas e garantir a interação partícula-líquido carreador em meios apolares (óleos e combustíveis). Usados para controlar o fluxo de combustíveis na ausência de gravidade, estes fluidos consolidaram sua importância tecnológica. A partir desta data outros agentes dispersantes, como água, fluorocarbono e ésteres começaram a ser usados,



mas até então as partículas eram obtidas por processos de moagem <sup>15</sup>. Foi apenas a partir da década de 70 que teve início a síntese química das nanopartículas ferrimagnéticas, por meio de um processo mais rápido, barato e versátil: Khalafalla e Reimers propuseram método de produção de fluidos magnéticos surfactados à base de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) <sup>16</sup>. Por outro lado, Massart propôs um novo método de estabilização, o de preparação de fluidos magnéticos iônicos <sup>17</sup>. Nestes últimos, as nanopartículas de magnetita podiam ser dispersas em um solvente polar, sem a necessidade de surfactante. Entretanto, ainda apresentavam problemas quanto à estabilidade química, pois as partículas de magnetita eram oxidadas e se transformavam em maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Para sanar este problema, em 1987, Cabuil <sup>18</sup> forçou a oxidação da magnetita em maghemita, produzindo fluidos magnéticos iônicos bastante estáveis.

Devido à grande demanda por fluidos magnéticos para aplicações tecnológicas e biomédicas, que caracterizou os últimos 20 anos, a tecnologia de preparo obteve grandes avanços. Mesmo assim, o desenvolvimento de métodos que permitam total controle das características como tamanho, forma e propriedades físico-químicas da superfície das nanopartículas e conseqüentemente, sua maior eficiência nas aplicações ainda representa um desafio aos pesquisadores.

As diferentes rotas de síntese, estabilidade e tipos de fluidos magnéticos são temas a serem abordados mais detalhadamente no próximo capítulo.

## **1.4 Nanopartículas magnéticas**

### **1.4.1 Composição**

Nanopartículas magnéticas podem ser sintetizadas a partir de diferentes tipos de ferritas férricas, que tem a fórmula geral  $\text{M}^{+2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ , originando os óxidos mistos, onde  $\text{M}^{+2}$  simboliza um cátion divalente de um elemento metálico ( $\text{M} = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Mn}, \text{Cu}, \text{Zn}$  ou  $\text{Cd}$ ) ou óxidos puros com  $\text{M} = \text{Fe}$ . A escolha da ferrita

depende da aplicação pretendida. Na área biomédica, por exemplo, as nanopartículas utilizadas com maior frequência são as compostas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ )<sup>19-21</sup>. Algumas de suas principais propriedades estão sumarizadas na Tabela 1.1. Entre todas as ferritas metálicas, a magnetita apresenta o maior valor de magnetização de saturação<sup>4</sup>, enquanto a maghemita é metastável em relação à magnetita<sup>4</sup>.

Tabela 1.1 – Propriedades físicas e magnéticas da magnetita e da maghemita

Propriedades	Óxidos	
	Magnetita	Maghemita
Fórmula molecular	$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Densidade ( $\text{g/cm}^3$ )	5,18	4,87
Ponto de fusão ( $^\circ\text{C}$ )	1583-1597	-
Dureza	5,5	5,0
Tipo de magnetismo	Ferrimagnetismo	Ferrimagnetismo
Temperatura Curie (K)	850	820-986
Sistema cristalográfico	Cúbico	Cúbico
Tipo estrutural	Espinélio (invertido)	Espinélio (defeitos)

Adaptado (Teja e Koh, 2009)<sup>4</sup>.

#### 1.4.2 Estrutura Cristalina

As nanopartículas magnéticas à base de ferritas cúbicas apresentam estrutura do tipo espinélio, assim denominada devido à similaridade com a estrutura do mineral espinélio ( $\text{MgAl}_2\text{O}_4$ ). Esta estrutura é formada por uma rede cúbica unitária de face centrada (fcc), o que significa que apresentam sítios de ocupação no centro das faces do cubo (ver figuras 1.1 e 1.2).

A estrutura cristalina das ferritas cúbicas tem uma malha elementar com empacotamento de 32 átomos de oxigênio (aresta de cerca de 8 Å), com 64 interstícios circundados por quatro íons de oxigênio que definem os sítios de simetria tetraédrica (A) e 32 interstícios circundados por seis íons de oxigênio que definem os sítios de simetria octaédrica (B), conforme indicado na figura 1.2<sup>23</sup>. Destes sítios apenas 8 tetraédricos (A) e 16 octaédricos (B) são preenchidos.

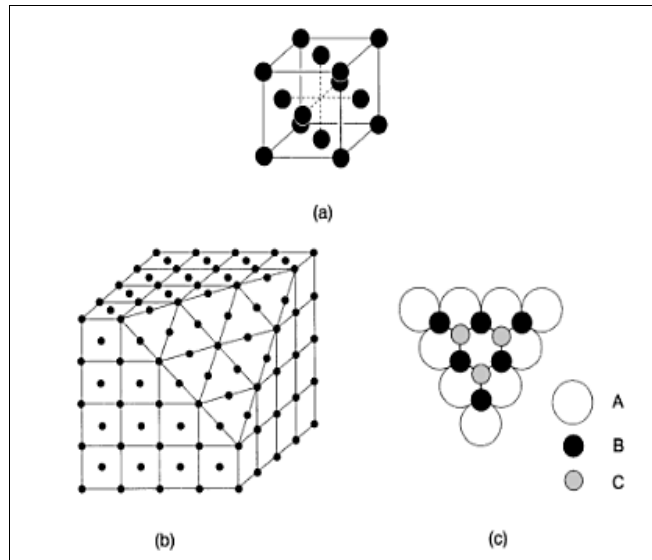


Figura 1.1 Estrutura cúbica de face centrada: (a) célula unitária, (b) arranjo de átomos em um plano de empacotamento (111), (c) sequência de empilhamento de planos {111} <sup>22</sup>.

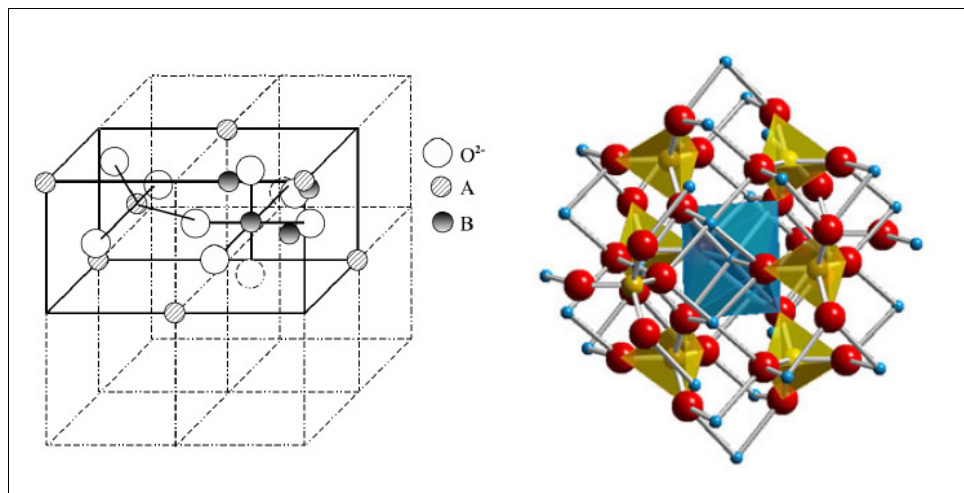


Figura 1.2 Estrutura de ferrita do tipo espinélio. Disponível em <http://e-agps.info/angelus/cap18/espinelio.htm>

De acordo com a distribuição de íons nos sítios tetraédricos e octaédricos a estrutura cristalina pode ser classificada como espinélio direto (metal divalente

nos sítios tetraédricos e  $\text{Fe}^{3+}$  nos octaédricos), inverso (apenas  $\text{Fe}^{3+}$  nos sítios tetraédricos, enquanto nos sítios octaédricos distribuem-se tanto o metal divalente quanto o  $\text{Fe}^{3+}$ ) ou misto (ambos os sítios com proporções variadas dos metais relacionados).

A maghemita tem em sua estrutura cristalina apenas íons  $\text{Fe}^{3+}$ , divididos igualmente entre os sítios tetraédricos e octaédricos. Ambas exibem ferrimagnetismo (Tabela 1) tendo a magnetita maior magnetização de saturação que a maghemita, o que tem relação com a ocupação das sub-redes.

A estrutura cristalina das ferritas é tradicionalmente investigada por difração de raios X, uma das técnicas usadas para caracterizar as nanopartículas sintetizadas neste trabalho.

## **1.5 Propriedades magnéticas dos fluidos magnéticos**

O átomo de ferro tem quatro elétrons não pareados em seu orbital 3d, o que é responsável por um forte momento magnético. Cristais formados a partir de átomos de ferro podem apresentar estados magnéticos diferentes, como mostrado na Fig. 1.3. No estado paramagnético os momentos magnéticos atômicos individuais estão randomicamente alinhados uns em relação aos outros de tal forma que o cristal apresenta um momento magnético nulo. Se for exposto a um campo magnético externo os momentos magnéticos se alinharão com o campo aplicado e, em consequência, o momento magnético resultante da amostra será não nulo.

Diferentemente, em um cristal ferromagnético, todos os momentos magnéticos individuais estão alinhados, mesmo na ausência de campo externo (Fig. 1.3). Por outro lado, o cristal ferrimagnético (como a maghemita) tem momento magnético efetivo oriundo de sub-redes distintas, com diferentes valores de magnetização, porém arranjados de maneira antiparalela (Fig. 1.3).

Nos casos em que os momentos magnéticos antiparalelos têm a mesma magnitude o cristal é antiferromagnético e, no todo, não apresenta magnetização efetiva. No material ferromagnético em macroescala, a magnetização resulta da

soma dos momentos magnéticos dos átomos do material por unidade de volume do material. A magnetização final é geralmente menor do que quando todos os momentos magnéticos estão perfeitamente alinhados uma vez que o material de volume macroscópico (bulk) consiste de vários domínios (ver Fig. 1.4). Cada um destes domínios tem sua própria magnetização resultante do alinhamento dos momentos magnéticos atômicos do próprio domínio. Se as direções de magnetização de todos os domínios do material não estiverem alinhadas, haverá um decréscimo na magnetização do material de volume macroscópico. Entretanto, à medida que o tamanho do material diminui, o número de domínios diminui até que um único domínio seja responsável pela magnetização do material, como observado nas nanopartículas magnéticas de que trata este trabalho.

### **1.5.1 Superparamagnetismo**

Nanopartículas magnéticas constituem monodomínios magnéticos quando apresentam dimensões abaixo de um diâmetro crítico ( $D_c$ ) que para materiais típicos está usualmente, entre 10 e 100 nm<sup>3</sup>. O diâmetro crítico pode ser definido por:

$$D_c = 2A^{1/2}/M_s,$$

onde  $A$  é a constante de troca e  $M_s$  o momento magnético por unidade de volume.

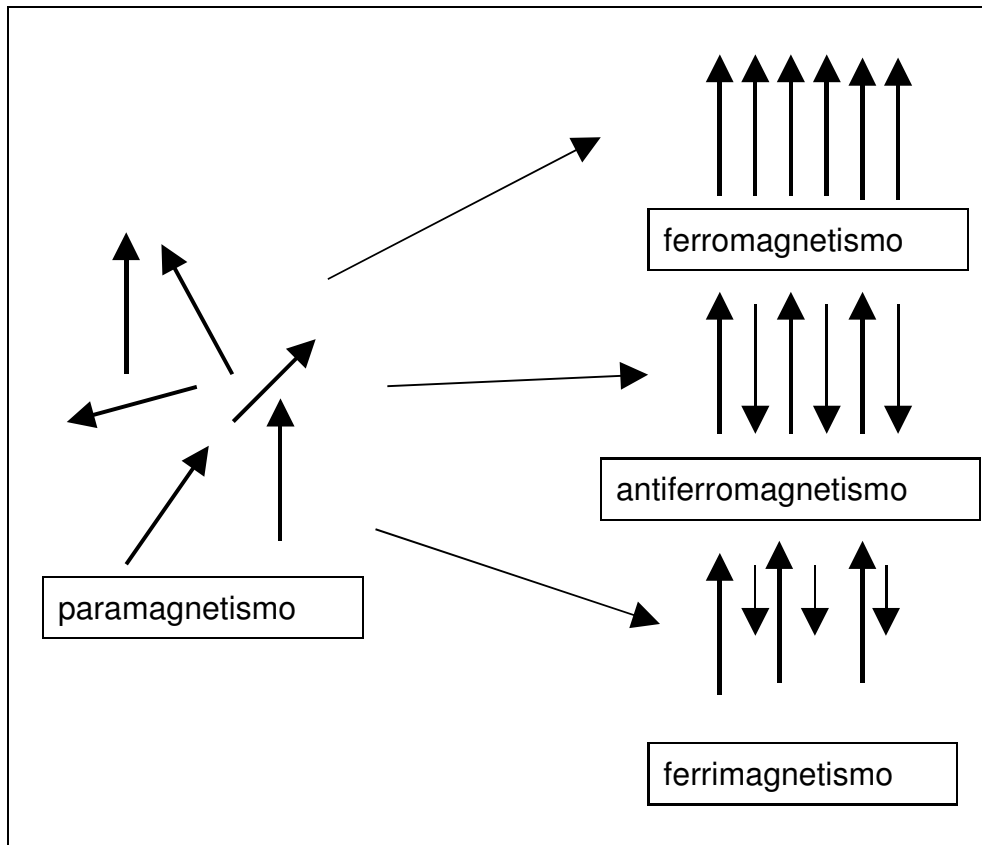


Figura 1.3. Alinhamento de momentos magnéticos atômicos individuais em diferentes tipos de materiais <sup>4</sup>.

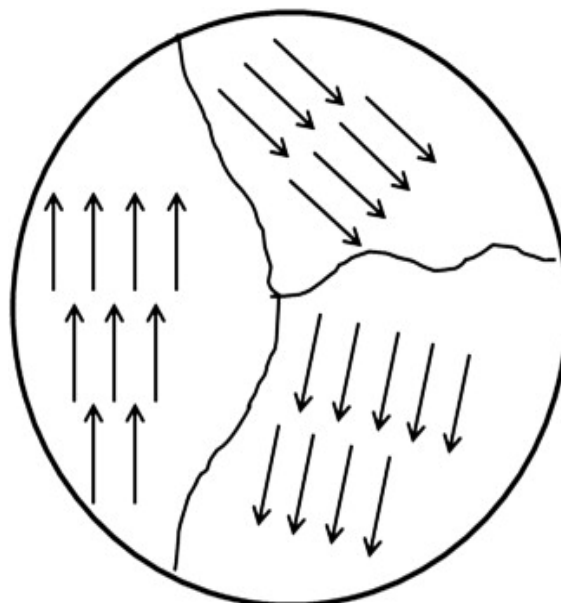


Figura 1.4. Domínios magnéticos em um material de volume macroscópico (bulk) <sup>4</sup>.

Assume-se que no interior dos monodomínios magnéticos os momentos atômicos estão alinhados na direção do eixo de fácil magnetização, levando à formação de um momento magnético gigante, conhecido por supermomento. Quando aplicado às nanopartículas, o supermomento é denominado superparamagnetismo, devido à sua semelhança com o paramagnetismo, onde há orientação dos spins sob a ação de um campo magnético externo.

A maghemita é ferrimagnética à temperatura ambiente, instável em altas temperaturas e perde sua susceptibilidade com o tempo <sup>4</sup>. As partículas de maghemita menores do que 10 nm são superparamagnéticas à temperatura ambiente <sup>24</sup>. A agregação de partículas de maghemita pode levar ao acoplamento magnético entre as partículas e ordenação de seu momento magnético, o que é chamado superferromagnetismo <sup>4</sup>.

As propriedades magnéticas das nanopartículas magnéticas são bastante influenciadas por efeitos de superfície <sup>25</sup>. Em consequência, a magnetização final decresce a uma taxa maior com o aumento da temperatura do que o correspondente material de volume macroscópico porque uma grande fração de átomos está próxima da superfície onde o campo de troca é menor <sup>4</sup>.

Modificações da superfície por tratamentos químicos afetam a coercividade das nanopartículas <sup>26</sup>. Em consequência desta dependência de tamanho e tratamento superficial, a nanoestruturação dos materiais magnéticos, via método de preparação, pode ser usada para aprimorar as propriedades magnéticas.

## **1.6 Motivação**

As propriedades magnéticas das nanopartículas magnéticas têm estimulado uma ampla série de aplicações tecnológicas. Entre elas, uma propriedade importante é a de que os fluidos magnéticos concentrados são fortemente atraídos por magnetos permanentes, ao mesmo tempo em que preservam sua característica líquida. A atração é forte o suficiente para sobrepujar a força de gravidade levando a muitas aplicações. Por exemplo,

submetidos a gradiente de campo magnético, a condição para que as nanopartículas superparamagnéticas tenham momento magnético, podem ser eficientes em selar compartimentos ainda que os mesmos estejam sujeitos a pressões diferentes. Foi exatamente para esta função que o fluido magnético baseado em magnetita foi originalmente proposto para aplicações espaciais <sup>14</sup>.

Além desta aplicação em selos e selos para alto vácuo <sup>27</sup>, nanopartículas magnéticas são também empregadas em transdutores acústicos, inclinômetros (birrefringência), sistemas que isolam vibrações, suspensões ativas (propriedades magnetoreológicas), tintas magnéticas, meios de gravação, catalisadores, sondas de ressonância magnética nuclear para prospecção de óleo <sup>28</sup>.

Entre as aplicações tecnológicas uma a ser ressaltada é a elevada eficiência em trocas térmicas que uma suspensão de partículas (nanofluido) possui em relação a um fluido trocador convencional, o que pode melhorar a eficiência energética em diversos tipos de sistemas, desde microprocessadores (computação) até grandes sistemas de geração e distribuição de energia <sup>29</sup>. A eficiência energética destes é ponto de inegável importância na redução de emissões atmosféricas e na segurança energética <sup>6</sup>, ressaltando as especificidades do fluido magnético frente a um nanofluido não magnético.

A possibilidade de manipular as nanopartículas de magnetita com gradientes de campo magnético tem possibilitado exploração muito eficaz na área dos bio-ensaios, onde sensores ferromagnéticos têm sido usados para desenvolver sistemas de microarranjos magnéticos extremamente sensíveis na detecção de ligação a DNA e proteínas alvo, viabilizando diagnósticos por imunocaptura <sup>24</sup>. A mesma propriedade possibilita marcação e separação de células <sup>30-32</sup> ou de contaminantes em meios aquosos <sup>33,34</sup>, evidenciando seu potencial importante na biorremediação ambiental.

Nanopartículas de magnetita e maghemita têm sido particularmente importantes para as aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade e baixa toxicidade nos seres humanos <sup>4</sup>. Envolvem desde cirurgias de olho para reparar danos à retina, até uso como agentes de contraste em imagens de



ressonância magnética, veículos para entrega de fármacos alvo-específicos e hipertermia magnética <sup>4,21,35</sup>. No procedimento de hipertermia, quando expostas a um campo magnético de frequência alternada, as nanopartículas superparamagnéticas podem dissipar calor que é usado para destruir especificamente células tumorais.

Todas estas aplicações requerem nanopartículas de tamanhos, formas, características superficiais e propriedades magnéticas específicas. Além disso, as aplicações biomédicas requerem partículas que tenham comportamento superparamagnético à temperatura corporal porque a magnetização remanente levaria à aglomeração das partículas e conseqüente bloqueio de vasos sanguíneos. As partículas magnéticas devem ainda ser estáveis em meios aquosos, em pH neutro e condições fisiológicas, como abordado com mais detalhe no capítulo 5 deste trabalho <sup>28</sup>.

A importância das aplicações tecnológicas e biomédicas das nanopartículas magnéticas nos motivou a produzir uma amostra de fluido magnético à base de maghemita concentrado e estável, via reação de coprecipitação, uma metodologia simples, não dispendiosa, que proporcione oportunidade de aprofundar conhecimentos sobre estes materiais e que também seja precursor para outros materiais que possam realizar aplicações tecnológicas e biomédicas.

## **1.7 OBJETIVO GERAL**

Preparar e caracterizar fluido magnético à base de maghemita estável e concentrado a ser usado como precursor da síntese de materiais compósitos visando aplicações biomédicas.

### **1.7.1 Objetivos específicos:**

- a. Preparar amostra de fluido magnético à base de maghemita estabilizado em meio aquoso ácido usando o método de síntese de coprecipitação em meio alcalino com partículas com diâmetro médio menor que 10 nm.
- b. Caracterizar as partículas por difração de raios X (DRX) para confirmação e avaliação da estrutura cristalina das nanopartículas.
- c. Caracterizar as partículas do fluido em microscopia eletrônica de transmissão (MET) para avaliar a morfologia das partículas e dispersão em diâmetro.
- d. Realizar medidas de birrefringência magnética do fluido de forma a inferir sobre propriedades magnéticas e coloidais.
- e. Produzir um nanocompósito magnético a partir da decomposição térmica de proteína sérica albumina.

## **Capítulo II**

# **ROTAS DE SÍNTESE E TIPOS DE FLUIDO MAGNÉTICO**

A síntese de fluidos magnéticos envolve, basicamente, três etapas, realizadas simultânea ou sequencialmente: (1) síntese de nanopartículas magnéticas (abordada no tópico 2.1); 2) tratamento da superfície das nanopartículas para promover a estabilidade da solução coloidal e (3) peptização ou seja, dispersão das nanopartículas na fase líquida (abordados no tópico 2.2).

## 2.1 Rotas de síntese

O amplo emprego de nanopartículas magnéticas em aplicações tecnológicas e/ou biomédicas tem incentivado o aprimoramento de suas rotas de síntese. O assunto tem, em consequência, sido foco de revisões na literatura <sup>4,20,36</sup>, teses <sup>37,38</sup>, capítulos de livros <sup>3,39</sup>.

O preparo de nanopartículas magnéticas pode ser realizado por uma variedade de métodos físicos e químicos ou combinação destes <sup>40,41</sup>. A diferença essencial entre estes métodos está ilustrada na figura 2.1. Enquanto as rotas físicas são denominadas *top-down* (redução de tamanho), as rotas químicas são conhecidas por *bottom-up* (de baixo para cima). De maneira geral, as técnicas *top-down* são mais dispendiosas energeticamente e produzem mais desperdícios que as técnicas *bottom-up*.

### 2.1.1 Rotas físicas

As rotas físicas clássicas envolvem a preparação de sóis coloidais em que a redução do tamanho é atingida por moagem de partículas (desagregação) <sup>9,42</sup> e as mais recentes incluem a deposição por vapor <sup>43,44</sup> e a do arco de carbono <sup>45,46</sup>.

De acordo com a rota pioneira, as nanopartículas são obtidas por meio de processo de moagem de partículas magnéticas micrométricas na presença de agentes químicos (solvente e surfactante) <sup>9,47</sup>. As características dos materiais

precursores (metal ou óxido metálico), tais como a cristalinidade, dureza, microfissuras e plasticidade, influenciam tanto no processo de moagem quanto nas propriedades das nanopartículas magnéticas obtidas. O surfactante, por sua vez, além de facilitar a fragmentação por agir nas microfissuras das micropartículas, leva à estabilização das nanopartículas em suspensão por adsorver em sua superfície e assim promover repulsão estérica. Ao final do processo, a suspensão de nanopartículas magnéticas precisa ser separada das partículas maiores remanescentes por centrifugação. A rota é morosa, demandando longos períodos de tempo na obtenção das nanopartículas.

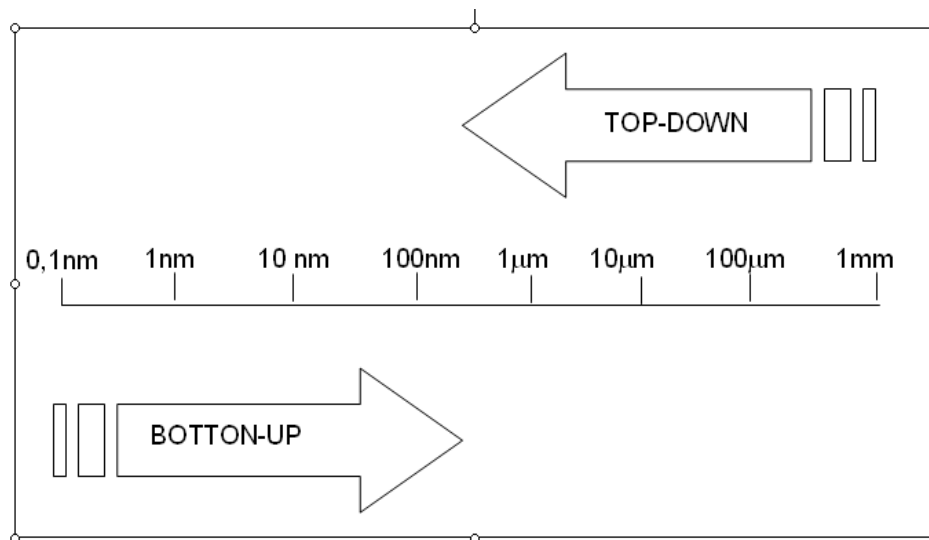


Figura 2.1 Comparação das rotas físicas (*top-down*) e químicas (*bottom-up*) na obtenção de nanopartículas magnéticas.

O método de redução do tamanho por moagem ou micronização foi empregado com sucesso na produção de fluido magnético, pela primeira vez em 1965, quando Papell reduziu o tamanho de partículas micrométricas de magnetita e dispersou-as em heptano na presença de ácido oléico <sup>14</sup>. Posteriormente, Kaiser <sup>48,49</sup>) e Rosensweig <sup>49</sup> empregaram a mesma metodologia no preparo de fluidos magnéticos à base de nanopartículas de magnetita estabilizadas em querosene, parafina e água.

## 2.1.2 Rotas químicas

### 2.1.2.1 Coprecipitação em meio aquoso

Entre os métodos químicos, a coprecipitação de íons metálicos via hidrólise alcalina em meio aquoso é o método mais amplamente usado, além de barato e simples<sup>50-54</sup>. A coprecipitação de íons metálicos tem sido realizada também em microemulsões<sup>55,56</sup> e micelas reversas<sup>57-59</sup> e decomposição térmica<sup>60,61</sup>. Embora os métodos de coprecipitação sejam os mais comumente usados no preparo de nanopartículas magnéticas, a redução química via método de Rieke<sup>62</sup> ou via borohidretos<sup>63-65</sup>, a decomposição de compostos coordenados, usando o efeito térmico<sup>66-69</sup> ou a sonificação<sup>70,71</sup>, têm sido usados recentemente.

A produção de nanopartículas de óxidos de ferro puras (magnetita e maghemita) e das ferritas que além do ferro utilizam também metais divalentes, é feita usualmente via coprecipitação em meio aquoso. A literatura relata várias formas de reações de condensação para preparo destas nanopartículas: formação de magnetita em meio aquoso à temperatura ambiente<sup>72</sup> ou a 70 °C<sup>73</sup>, formação de ferritas a 95-99 °C<sup>9</sup> ou ainda o preparo de nanopartículas de maghemita por oxidação da magnetita<sup>72</sup>.

De maneira geral, a etapa de coprecipitação é realizada pela adição de hidróxido à solução de íons metálicos sob agitação e, com frequência, na temperatura de ebulição da solução. Esta etapa é importante na definição do tamanho das nanopartículas cujo controle é dependente da concentração e tipo de base usada, velocidade de agitação, temperatura da reação e tempo de envelhecimento do precipitado<sup>3</sup>. A variação e controle do tamanho das nanopartículas, assim como sua polidispersão e cristalinidade, podem também ser mediados pela presença de íons orgânicos ou inorgânicos. A estratégia de complexação superficial das partículas, logo que nucleadas para inibir o crescimento posterior, é uma técnica usual, realizado por exemplo, por Bee e colaboradores (1995), que se vale de íons citrato no meio reacional para obter partículas de maghemita com diâmetro menor<sup>74</sup>.

### **2.1.2.2 Coprecipitação em microemulsão**

Segundo Gupta & Gupta <sup>20</sup>, a microemulsão pode ser definida como uma dispersão isotrópica termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis, desde que o microdomínio de um ou ambos os líquidos tenha sido estabilizado por um surfactante. Em outras palavras, as microemulsões envolvem pelo menos três componentes, dois líquidos imiscíveis e um surfactante. Nestes casos, quando a quantidade de fase orgânica é muito menor que a da fase aquosa, o sistema é denominado micela normal e no caso contrário, micela inversa. Em microemulsões de água-em-óleo, a fase aquosa é dispersa como nanogotas (tipicamente 1–50 nm em tamanho) circundadas por uma monocamada de moléculas surfactantes <sup>55,56</sup>.

Quando um sal metálico solúvel é incorporado na fase aquosa da microemulsão ele ficará situado nas nanogotas aquosas circundadas por óleo. Estas nanogotas colidirão continuamente, coalescerão e quebrarão novamente. Conceitualmente, quando sais de ferro um divalente e o outro trivalente são dissolvidos em uma microemulsão água-em-óleo e adicionada uma solução de base, poderá se formar um precipitado. O crescimento das partículas nas microemulsões pode ser conceitualizado como um processo de troca intergotas e agregação de núcleos. O precipitado disperso finalmente produzido pode ser extraído dos surfactantes por centrifugação ou com um magneto, lavado em álcool, seco e disperso em solvente orgânico. O tamanho das nanopartículas pode ser modulado com variações na quantidade e concentração da fase aquosa, quantidade do surfactante e temperatura do sistema <sup>3</sup>. A figura 2.2 ilustra o uso de micelas para obter nanopartículas magnéticas monodispersas.

### **2.1.2.3 Decomposição de compostos de coordenação**

Em acordo com revisão de Moraes e Lima (2006)<sup>3</sup>, o preparo de nanopartículas magnéticas por meio da decomposição de composto de coordenação de metais de transição é feito por metodologias conhecidas como rotas não hidrolíticas e consistem na decomposição de compostos como

$\text{Fe}(\text{CO})_5$  em solventes orgânicos, na presença de surfactante (para evitar a oxidação das nanopartículas) e de polímero, em atmosfera inerte <sup>60,67-69</sup>. A oxidação controlada de materiais obtidos pela decomposição de  $\text{Fe}(\text{CO})_5$  levou à obtenção de nanopartículas de maghemita monodispersas, uma característica desta metodologia. Outra característica interessante da mesma é que o fluido magnético pode ser obtido em uma única etapa <sup>3</sup>. As características das nanopartículas e do fluido obtido podem ser controladas por vários dos parâmetros da reação, como temperatura, concentração e natureza do polímero, do surfactante e do reagente a ser decomposto.

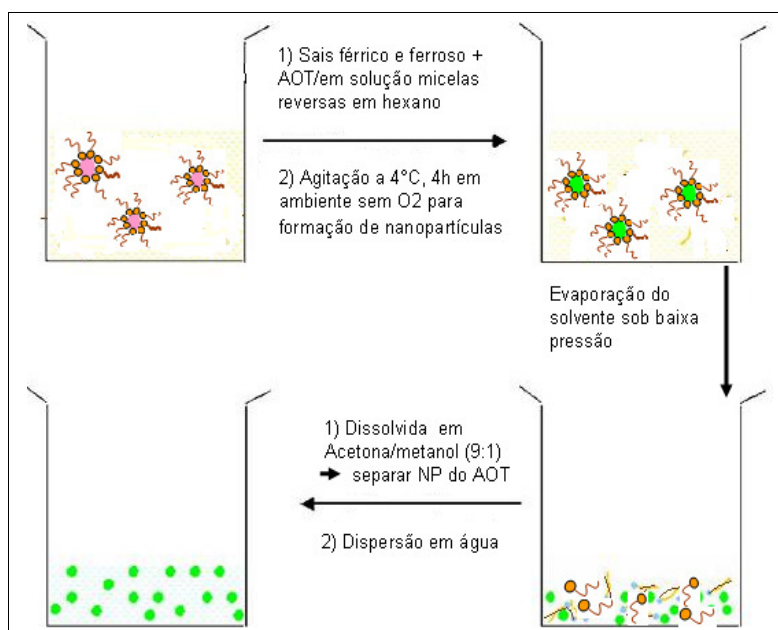


Figura 2.2. Estratégia de preparo de nanopartículas de óxido de ferro monodispersas dentro de gotas de microemulsão água-em-óleo. Sais de ferro foram dissolvidos dentro de fases aquosas das micelas reversas e precipitadas por soluções alcalinas para obter partículas de tamanho controlado (adaptado da ref <sup>20</sup>).

#### 2.1.2.4 Decomposição por sonicação

A sonicação a altas frequências pode levar a temperaturas superiores a 1000 °C e pressão de centenas de atmosferas em microssegundos, desta forma



promovendo a nucleação, crescimento e colapso de bolhas de vapor de um líquido volátil <sup>3</sup>. Da mesma forma que a decomposição térmica, permite o preparo de fluidos magnéticos em uma única etapa. A técnica tem sido usada para obtenção de fluidos magnéticos à base de nanopartículas amorfas e cristalinas de metais, óxidos, ferritas e apresenta, como vantagem especial, a possibilidade de obtenção de nanopartículas em larga escala, o que abre perspectivas de utilização industrial.

#### **2.1.2.5 Redução de íons metálicos**

Nas rotas de síntese por redução de íons metálicos são conhecidos dois procedimentos. No primeiro, o método de Rieke <sup>62</sup>, as partículas são preparadas por meio da redução de sais metálicos dissolvidos em um solvente orgânico, tendo como agente redutor um metal alcalino.

O segundo envolve a redução de íons de metais de transição por borohidreto em meios aquosos e não aquosos. A síntese envolve a produção de compostos de coordenação intermediários e leva à obtenção de nanopartículas metálicas de 10 a 100 nm, dependendo do procedimento utilizado <sup>64,65,75</sup>.

#### **2.1.2.6 Considerações gerais sobre as rotas de síntese**

Como salientado por Gupta & Gupta <sup>20</sup>, partículas magnéticas obtidas por diferentes rotas podem apresentar propriedades magnéticas muito diferentes. Estas diferenças podem refletir desde desordens estruturais até a presença de camadas não magnéticas na superfície da partícula. Os valores de magnetização de saturação ( $M_s$ ), por exemplo, são usualmente menores nos materiais nanoestruturados que nos correspondentes materiais em macroescala (bulk). As curvaturas na superfície das nanopartículas são muito maiores nas partículas menores, o que seria responsável por desordens na orientação do cristal do que advém o decréscimo de  $M_s$  proporcional à redução de tamanho das nanopartículas.

Atualmente, buscam-se rotas de preparo de nanopartículas magnéticas que permitam o controle fino do tamanho e da dispersão em tamanho da partícula, a forma da partícula, características do interior da partícula, e propriedades físicas e químicas da superfície. O conhecimento do papel exercido pelos parâmetros de síntese e o controle fino sobre os mesmos permite um melhor controle sobre as características das nanopartículas magnéticas, tais como fase, cristalinidade, perfil de tamanho e forma e estabilidade química. Estas características, por sua vez, irão determinar as propriedades magnéticas das nanopartículas magnéticas, como a magnetização de saturação comentada acima, e, em consequência, suas aplicações tecnológicas.

## **2.2 Tipos e preparo de fluidos magnéticos**

Após a síntese, nanopartículas magnéticas devem ser tratadas a fim de atingirem a estabilidade coloidal imprescindível aos fluidos magnéticos. Diferenças nas formas com que a estabilidade coloidal é promovida levam, como ilustrado na figura 2.3, a diferentes tipos de fluidos magnéticos, tais como os iônicos e os surfactados.

Conforme revisto por Morais e colaboradores, em 2006 <sup>79</sup> nos fluidos magnéticos iônicos a estabilidade coloidal é atingida principalmente por meio da repulsão eletrostática entre as nanopartículas carregadas negativa ou positivamente (Ver Fig. 2.3). Nestes fluidos, a densidade de carga superficial e a força iônica do meio devem ser precisamente controladas de tal forma que a repulsão eletrostática seja mais intensa que a atração magnética dipolar a qual favorece a agregação das nanopartículas.

Nos fluidos magnéticos iônicos baseados em ferritas, o meio aquoso de baixo pH estabelece uma densidade de carga positiva que resulta da transferência de prótons do meio para a superfície da nanopartícula (Fig. 2.4). Em contraste, a densidade de carga superficial negativa é obtida em altos

valores de pH devido a transferência de prótons da superfície da nanopartícula para o meio, deixando átomos de oxigênio carregados negativamente na superfície da nanopartícula. Um modelo microscópico para o processo de carga-descarga superficial dependente de pH em fluidos magnéticos iônicos baseados em óxidos metálicos envolve o tunelamento do próton através de uma camada de água fortemente ligada na superfície da nanopartícula <sup>77</sup>.

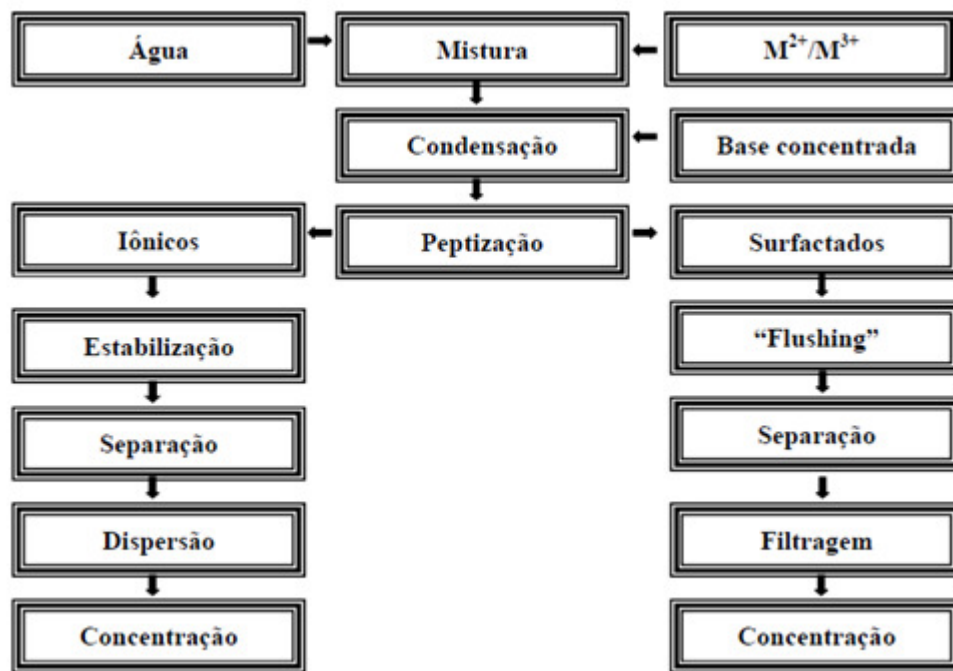


Figura 2.3 Esquema de preparação de fluido magnético surfactado e iônico <sup>80</sup>

A metodologia de estabilização de fluidos magnéticos por repulsão eletrostática foi introduzida por Massart em 1981 <sup>78</sup>, conseguindo-se colóides com fração volumétrica de partículas superiores a 10% <sup>77</sup>. Pode-se preparar um fluido magnético em meio básico colocando-se as nanopartículas em solução diluída de hidróxido de tetrametil amônio, sob agitação. Um fluido magnético

estável é obtido após centrifugação da suspensão. Para o preparo do fluido magnético em meio ácido, as nanopartículas são colocadas em soluções diluídas de ácido nítrico ou perclórico, sob agitação, seguido de centrifugação. Neste caso, entretanto, como as nanopartículas são quimicamente instáveis em meio ácido, é recomendado o tratameto hidrotérmico das nanopartículas com nitrato férrico, na temperatura de ebulição, por 30 minutos. Após resfriadas, as nanopartículas são coaguladas em meio alcalino, lavadas com água para remoção dos contra-íons e dispersas em solução ácida <sup>78</sup>.

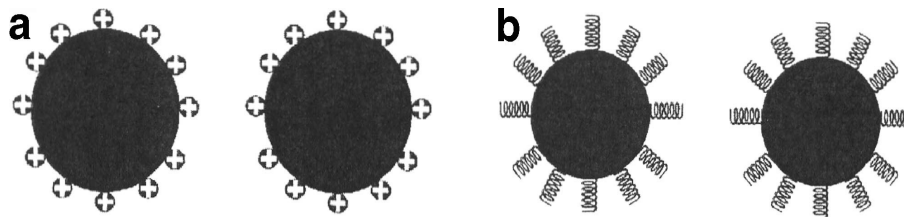


Figura 2.4. Tipos de estabilidade coloidal: (a) Partículas estabilizadas por camada eletrostática; (b) Partículas estabilizadas por repulsão estérica. <sup>81</sup>

No caso dos fluidos magnéticos surfactados, as espécies moleculares ligadas à superfície da nanopartícula são as responsáveis pela estabilidade coloidal, já que a repulsão estérica entre as nanopartículas magnéticas recobertas sobrepuja a atração dipolar magnética (ver Fig. 2.4). As extremidades externas da cobertura molecular superficial nos fluidos magnéticos surfactados podem ser polares ou apolares, resultando, respectivamente, em fluidos magnéticos estáveis em meio aquoso ou em fluidos magnéticos estáveis em hidrocarbonetos.

Além da repulsão eletrostática entre as nanopartículas e a competição por atração dipolar, a energia térmica e as interações de Van der Waals têm também importante função na estabilidade dos colóides magnéticos. Enquanto a energia térmica favorece a estabilidade coloidal mantendo afastadas as

nanopartículas magnéticas, as forças de Van der Waals tendem a aproximá-las, favorecendo a agregação.

Uma outra forma de preparar fluidos magnéticos em meio aquoso envolve a complexação de ligantes de menor massa molecular com mais de um grupo funcional ionizável, à superfície das partículas. Enquanto um dos grupos funcionais é usado para a complexação à superfície, os outros se voltam para o meio líquido, contribuindo para a estabilidade via repulsão eletrostática. Em seu preparo, as nanopartículas são dispersas sob agitação e ajuste apropriado de pH na solução aquosa do ligante. As nanopartículas complexadas ao ligante são coaguladas com um não-solvente, separadas por centrifugação e secas. A seguir, as nanopartículas são dispersas em água deionizada, com pH e força iônica ajustadas para as condições pretendidas. Após centrifugação da dispersão obtida, coleta-se o fluido sobrenadante. Este tipo de fluido magnético denominado às vezes de biocompatível é particularmente interessante para aplicações biomédicas porque pode ser estável em meio aquoso e pH fisiológico e permite a complexação de moléculas de interesse biomédico, como aminoácidos <sup>76</sup>, dextrana <sup>21</sup>, proteínas, anticorpos, entre outras <sup>4,20,36</sup>.

## **Capítulo III**

# **SÍNTESE DE FLUIDO MAGNÉTICO IÔNICO**

### 3.1 Introdução

A amostra de fluido magnético (FM) iônico baseada em nanopartículas de maghemita foi preparada de acordo com procedimento publicado em 1995 <sup>74</sup>. O método pode ser separado em três etapas: síntese das partículas, oxidação-passivação e peptização.

Os procedimentos da primeira etapa – coprecipitação de solução de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  em meio alcalino e da segunda etapa – tratamento com nitrato férrico a quente - foram seguidos praticamente de forma idêntica ao método referido acima, alterando-se somente a escala da síntese.

Na terceira etapa – a peptização das nanopartículas como FM iônico estável foi obtida pelo controle da densidade de carga superficial e ajuste da força iônica do meio aquoso, realizando-se um tratamento com ácido nítrico para estabilizar o produto final em pH baixo. Os detalhes deste procedimento estão apresentados na Figura 3.1 e descritos a seguir.

### 3.2 Reagentes

Neste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes:

- Ácido Clorídrico grau PA da marca VETEC
- Ácido Nítrico grau PA da marca MERCK
- Água destilada e deionizada – com tratamento para remoção de ar (borbulhando-se nitrogênio por 30 minutos).
- Cloreto Férrico Hexahidratado grau PA da marca VETEC
- Cloreto Ferroso Hidratado grau PA da marca Carlo Erba
- Solução de Amônia concentrada grau PA da marca VETEC - foi titulada com solução de ácido clorídrico padronizada por biftalato.

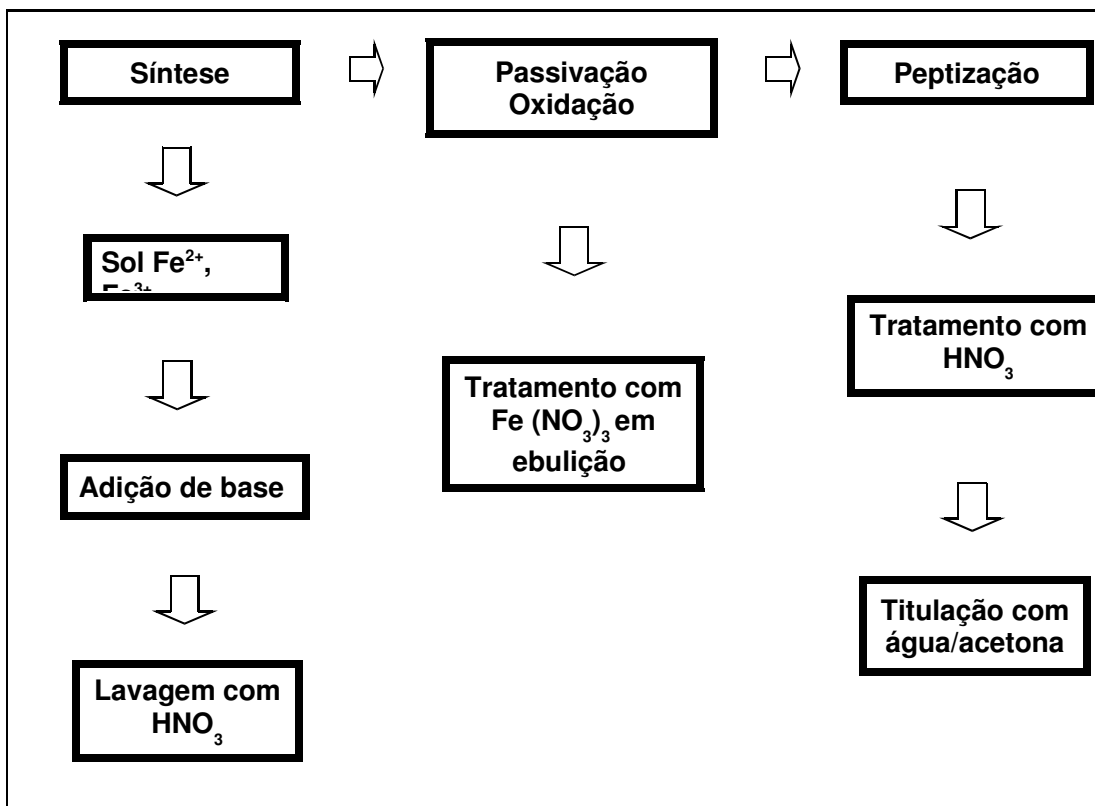


Figura 3.1 – Esquema geral de síntese de fluido magnético iônico, mostrando as etapas de síntese, passivação e peptização e os procedimentos envolvidos em cada um delas.

### 3.3 Metodologia

#### 3.3.1 Preparo das Soluções

A solução de metais ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) na proporção estequiométrica da magnetita (1:2) foi preparada diluindo-se primeiramente o Cloreto Ferroso (24,666 g) em 30 mL de água e em seguida misturando-se ao Cloreto Férrico (70,282 g) previamente dissolvido com 20 mL de HCl concentrado. A solução foi levada a 2,8 L e transferida para um béquer de 4 L de capacidade nominal.

#### 3.3.2 Coprecipitação



Após ser transferida para o béquer de quatro litros (4 L), a solução de metais ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) foi colocada em um agitador mecânico com pá de inox revestida por fita de Teflon onde, submetida a uma agitação vigorosa, formou-se um *vortex* estável que iniciava na base do béquer. A adição de solução de amônia foi então feita manualmente, com uma proveta de um litro (1L) entre a extremidade e o centro do *vortex*, durante o tempo cronometrado de dez (10) segundos. A reação ocorria quase que instantaneamente e era evidenciada por meio da formação de uma fase escura decorrente da precipitação ocasionada. A seguir, a agitação na mistura reacional era mantida por 30 minutos.

### **3.3.3 Isolamento /Lavagem do precipitado**

Após a etapa de coprecipitação, o precipitado formado foi decantado com a ajuda de um magneto colocado sob o béquer e a solução sobrenadante retirada por sucção com a ajuda de uma trompa a vácuo. Dois litros (2 L) de água foram adicionados e a suspensão agitada por 10 minutos. Procedeu-se novamente à retirada do sobrenadante e outro processo completo de lavagem foi repetido.

A seguir, ácido nítrico 316 mL (2 mol/L) foi adicionado e a solução agitada por cinco minutos. O precipitado obtido foi isolado e o sobrenadante retirado, da mesma forma que a descrita acima.

### **3.3.4 Oxidação/Passivação**

Um volume de 473 mL de solução de Nitrato Férrico (0,34 mol/L) foi adicionado, enquanto o béquer com a mistura era aquecido até 93°C em placa com agitação magnética. Após resfriar naturalmente e retirar o sobrenadante, o precipitado resultante foi fracionado em duas partes volumétricas aproximadamente iguais. O procedimento de tratamento hidrotérmico com nitrato férrico e a peptização foi realizado com cada uma delas.

### **3.3.5 Tratamento Ácido e Peptização**

Antes da etapa de peptização, o precipitado foi tratado pela adição de solução de ácido nítrico (2 mol/L), seguida de agitação por 20 segundos e permanência em repouso por trinta e seis horas (36 h).

Após este tratamento ácido foi iniciado um processo de retirada de íons excedentes e indesejáveis, como o  $\text{Fe}^{3+}$  da solução sobrenadante, feitos os ajustes de pH e força iônica para finalmente ocorrer a peptização.

Após decantação completa do material, auxiliada por um magneto de geometria circular na base do béquer, a solução sobrenadante foi drenada e retirada por sucção. Após cada etapa de lavagem ou titulação com água, foi utilizado esse procedimento de sucção, com decantação assistida pelo magneto.

O precipitado foi lavado com 200 mL de acetona e após agitação por trinta segundos (30 s), drenado da mesma forma.

Após, foram adicionados 150 mL de acetona, seguindo-se a titulação com água. O meio era submetido à agitação magnética, quer após a adição de acetona, quer após a adição de alguns mililitros de água, garantindo-se a decantação posterior a cada agitação. A titulação com água foi realizada até a iminência da peptização das partículas, processo que envolveu trinta mililitros (30 mL) de água. Após drenagem realizou-se novamente uma lavagem com 200 mL de acetona. A seguir, todo o processo foi repetido mais uma vez, ou seja, feitas a adição de acetona e titulação com água seguidas de lavagem com acetona.

Por fim, a acetona residual foi removida com ajuda de um fluxo de nitrogênio e a peptização concluída por adição de água. O material foi submetido à centrifugação a 5000 rpm durante cinco minutos para realizar a remoção de eventuais aglomerados.

### **3.3.6 Propriedades Gerais do Fluido Magnético Obtido**

O fluido gerado é concentrado, fortemente ácido, apresentando pH 1,52, e tem massa específica de 1,31 g/cm<sup>3</sup>, como determinado pela medida da massa de um mililitro da amostra. Segundo resultados de absorção atômica após digestão em ácido nítrico, a amostra possui um teor de ferro de 6,7 % (m/m) e, considerando a massa específica da maghemita em escala macroscópica de 4,87 g/cm<sup>3</sup><sup>82,83</sup>, uma fração volumétrica de 2,4 %. De fato é possível obter amostras ainda mais concentradas simplesmente reduzindo-se a quantidade de água adicionada na etapa final de peptização. Essa concentração relatada apresenta densidade e viscosidade que permitem fácil manipulação em laboratório.

### **3.4 Considerações Sobre a Síntese**

#### **3.4.1 Obtenção de partículas magnéticas**

A obtenção de óxidos metálicos em meio aquoso por métodos tradicionais (como precipitação alcalina ou método hidrotérmico) envolve os processos de hidrólise e condensação das espécies.

O processo de formação de óxidos consiste na condensação de complexos metálicos previamente coordenados por água, com desprotonação seguida de condensação em um processo de olação ou oxolação, resultando em espécies com mais de um centro metálico, que ao final do processo podem resultar na precipitação em sólidos<sup>83</sup>.

O processo geral de formação de óxidos é explicado de maneira bem didática por Jolivet (2002,2006)<sup>84,85</sup>, que afirma que a razão de hidroxilas dos monômeros tem grande influência sobre o processo de condensação, determinando também o tipo e a estrutura formada. Obviamente essa razão de hidroxilação é fortemente influenciada pelo pH do meio, mas é função também da acidez e eletronegatividade do cátion. Ainda segundo Jolivet<sup>84,85</sup>, espécies carregadas positiva ou negativamente condensam em maior ou menor extensão, deixando espécies discretas carregadas em solução, policátions ou poliânions. Por sua vez, os monômeros neutros sofrem condensação indefinidamente até a

precipitação de um sólido que pode ser um hidróxido, oxihidróxido ou um óxido com hidratação variada, ou seja, em última instância, a condensação de espécies neutras que resultará em um sólido.

As não-homogeneidades do meio reacional influenciam sobremaneira para que haja grande dispersão nos diâmetros e em outras características do precipitado, como a própria cristalinidade. Quando formadas, as partículas precipitadas têm forte tendência de aglomeração e fusão, no sentido de diminuir sua energia livre de superfície, contribuindo fortemente para que não haja um sistema de partículas finas e muito menos que estas sejam bem distribuídas em diâmetro.

Pelas razões mencionadas, alguns processos são induzidos para que se atinja o controle de algumas propriedades. Submeter as partículas recém formadas a condições (pH principalmente) onde tenham solubilidade apreciável, pode levar a partículas com estrutura cristalina mais estáveis e diâmetros e morfologias bem definidos por meio de processos de redissolução-cristalização<sup>86</sup>. Por outro lado, fazer o mesmo em condições onde não há solubilidade apreciável do precipitado, leva a processos onde a troca de massa entre partículas e meio não é fator preponderante, mas sim transformações *in situ*, como difusão de íons, desidratação e cristalizações em pequenas escalas<sup>86</sup>.

No caso da coprecipitação da magnetita, as especificidades dos íons ferro divalente e trivalente, bem como fenômenos relativos à sua estrutura cristalina, apresentam singularidades e permitem estratégias de controle distintas<sup>83</sup>.

Primeiro, a forte acidez do  $\text{Fe}^{3+}$ , evidenciada pelo fato de não formar hidróxido ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ). Segundo, a independência da estrutura condensada em relação à estrutura do complexo aquoso  $\text{Fe}^{2+}$ . Terceiro, há um interessante fenômeno de transferência de elétrons entre os cátions, que proporciona rearranjos estruturais locais, direcionando o crescimento cristalino na estrutura espinélio. Isto é evidenciado pelo fato de que a maghemita geralmente não se forma somente a partir de uma solução de  $\text{Fe}^{3+}$ , mas uma pequena fração de  $\text{Fe}^{2+}$  (10 %) pode induzir a precipitação na estrutura espinélio<sup>86</sup>. A coexistência dos dois íons faz com que a formação seja extremamente favorecida<sup>83</sup>.

Entretanto, a faixa da proporção deve ser muito próxima da estequiometria da maghemita para que não haja competição entre os dois mecanismos de crescimento (dissolução e recristalização), da qual resultaria menor controle das propriedades das partículas<sup>83</sup>.

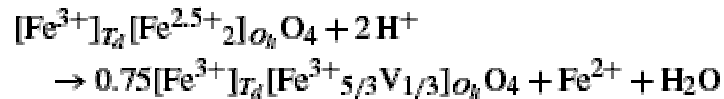
É importante observar que uma estratégia amplamente usada para controlar a síntese de partículas muito finas é inserir um complexante no meio reacional, para que ocorra nucleação das partículas com complexação superficial, inibindo o crescimento dos nanocristais, conforme descrito por Bee e colaboradores (1995)<sup>74</sup>.

Além disso, é importante notar que nos processos aquosos de obtenção de óxidos, as cinéticas de formação de hidróxidos, condensação, nucleação e crescimento competem e interagem, compondo um processo altamente complexo que influenciará fortemente as morfologias e diâmetros das partículas formadas. Em virtude dessa complexidade, o método de coprecipitação em meio alcalino, não é de fácil controle e nem permite o controle da dispersão dos diâmetros e geometria com qualidade factível por meio de outras técnicas, como a de decomposição de complexos em meios não-aquosos em presença de surfactantes, estratégia que possibilita a obtenção de partículas metálicas ou óxidos diretamente<sup>87,88</sup>.

### **3.4.2 Considerações Sobre Oxidação da Magnetita**

Nanopartículas de magnetita são muito propensas à oxidação e se transformam em maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) por ação do oxigênio atmosférico, por exemplo, tanto no precipitado úmido como em suspensão coloidal. Essa alta reatividade é consequência de altos valores na razão superfície-volume. Porém, a razão superfície-volume não é o único aspecto interessante nesse processo de oxidação da magnetita para maghemita. Devido a uma alta mobilidade de elétrons no retículo cristalino, as nanopartículas de magnetita apresentam reações químicas superficiais interessantes. A transformação pode ocorrer, então, por transferências de íons e/ou de elétrons interfaciais de maneira

dependente do pH da suspensão. Em meio básico, a oxidação da magnetita ocorre por redução do oxigênio na superfície das partículas, ou seja, apenas por transferência de elétrons e coordenação de íons óxidos. Por outro lado, em meio ácido e condições anaeróbicas, ocorre a dessorção dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  superficiais como complexos hexa-aquo em solução, havendo transferência de elétrons e íons (Jolivet and Tronc 1988)<sup>89</sup>.



Em ambos os casos a oxidação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  está correlacionada com a migração de cátions através do retículo cristalino, criando vacâncias catiônicas a fim de manter o balanço da carga, como representado no esquema da Figura 3.2.

Desta forma, os processos envolvendo transferência de cargas dentro da estrutura espinélio que contém íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  e reestruturação cristalina ficam evidenciados mais uma vez, quando comparados com a formação e transformações de outros óxidos metálicos.

### 3.4.3 Considerações Sobre o Processo de Passivação

É possível preparar um fluido magnético aquoso em meio ácido ou básico a partir de partículas de maghemita ou magnetita obtidas por coprecipitação, apenas ajustando-se, de maneira adequada, o pH e a força iônica do meio. Porém, para o caso de fluidos magnéticos iônicos ácidos o resultado é um ataque gradual do ácido às partículas, o que leva à perda de estabilidade e floculação do fluido com o tempo. Como metodologia para resolver esta perda de estabilidade é usual a realização da etapa de passivação da superfície das partículas, obtida por tratamento com solução de nitrato férrico a quente, o que possibilita a estabilização do fluido ácido por tempo longo, podendo chegar a alguns anos. O diferencial de estabilidade química ao meio ácido promovido pelo

tratamento com nitrato férrico tem sido atribuído à formação de uma camada de óxido de ferro amorfo na superfície das partículas <sup>91</sup>. Entretanto, em trabalho recente realizado com ferritas de cobalto, estudadas por espectroscopia Raman e difração de raios X, foi sugerido um aumento da qualidade cristalina das partículas além de um enriquecimento de ferro na superfície <sup>92</sup>.

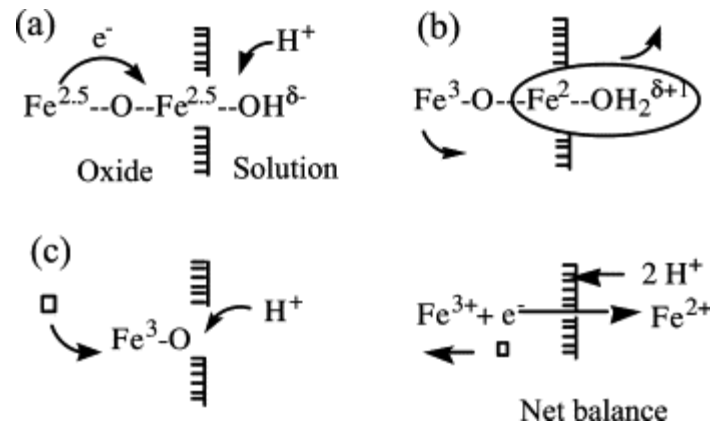


Figura 3.2 Esquema de oxidação da magnetita em maghemita em suspensão ácida: (a) por protonação do átomo de oxigênio superficial onde um elétron móvel está localizado na superfície octaédrica do íon de ferro; (b) em condições ácidas (pH em torno de 2) o íon  $\text{Fe}^{2+}$  formado é liberado como um hexaquocátion solúvel deixando um excesso de carga positiva dentro da partícula; (c) o excesso de carga é compensado pelo movimento de um íon férrico para a superfície visando criar uma vacância catiônica no retículo. O novo balanço de eliminação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  é obtido pela oxidação do material e difusão de vacâncias catiônicas para o interior das partículas (Adaptado da ref. <sup>90</sup>).

### 3.4.4 Considerações Sobre o Tratamento Ácido

O tratamento com ácido nítrico realizado com o precipitado das partículas possibilita aproveitar as propriedades anfotéricas da maghemita, fazendo com que a superfície das nanopartículas adquira carga positiva que garante repulsão eletrostática entre estas.

No caso deste trabalho foi usada concentração de ácido suficientemente grande para promover precipitação através da contração da dupla camada elétrica devido ao efeito da alta força iônica do meio. A força iônica foi ajustada

pela retirada de íons com metodologia que emprega acetona, solvente que possibilita o ajuste dos íons do meio sem ocasionar a peptização, etapa que foi realizada no final pela adição de água. Em outras palavras, foi usada concentração de ácido excessiva, ajustada fora da estabilidade coloidal, em alta concentração de partículas, para finalmente promover a peptização. Essa estratégia de uso de excesso de ácido e “retorno” permite a obtenção de suspensões coloidais bastante concentradas, como a preparada no presente trabalho.



## **Capítulo IV**

# **CARACTERIZAÇÃO DE FLUIDO MAGNÉTICO IÔNICO**

## 4.1 Introdução

A eficiência de um fluido magnético nas mais diversas aplicações é altamente dependente das características de suas nanopartículas magnéticas, demandando investigação acurada das mesmas: composição, formato, dimensão e dispersão de tamanho, carga, natureza da cobertura, propriedades magnéticas, estabilidade química e estrutural, propriedades de superfície, propriedades físico-químicas da camada molecular adsorvida em sua superfície, formação de aglomerados.

Uma grande variedade de técnicas experimentais tem sido empregada na investigação das propriedades fundamentais de fluidos magnéticos, sejam eles iônicos ou surfactados. Entre essas destacavam-se principalmente a microscopia eletrônica de transmissão <sup>93</sup>, a difração de raios X<sup>94</sup>, a birrefringência magnética estática <sup>93,95</sup>, e a magnetometria <sup>96</sup>. Nos últimos anos, outras técnicas têm contribuído substancialmente nos conhecimentos de fluidos magnéticos: (i) a ressonância magnética <sup>97-100</sup> nos efeitos da concentração de partículas <sup>101</sup>, força iônica <sup>102</sup>, tamanho da partícula e temperatura <sup>103</sup>; (ii) a espectroscopia Raman em estudos quantitativos e qualitativos das espécies quimiossorvidas na superfície das nanopartículas <sup>104,105</sup>; (iii) a espectroscopia fotoacústica<sup>106</sup> revelando importantes detalhes relacionados às propriedades do núcleo das nanopartículas <sup>107</sup>, a estrutura da superfície das nanopartículas <sup>108</sup>, e características da cobertura das mesmas <sup>109</sup> e (iv) ainda a microscopia de força atômica <sup>93</sup>.

No presente capítulo serão abordadas as técnicas de caracterização utilizadas na investigação do fluido magnético iônico sintetizado: difração de raios X, microscopia eletrônica de transmissão e birrefringência magnética.

## 4.2 Caracterização das nanopartículas de maghemita por difração de Raios X

A difração de raios X é usada para confirmar a natureza cristalina das nanopartículas ao se comparar os picos de difração obtidos no difratograma aos valores da ficha padrão ASTM (*American Society for Testing Materials*). A técnica fornece também uma estimativa do diâmetro médio das nanopartículas.

#### **4.2.1 Metodologia**

Para caracterizar as nanopartículas de maghemita por difração de raios X, a amostra de FM iônico foi desidratada em ambiente de baixo vácuo e armazenada em pó de forma a evitar contato atmosférico. As medidas foram realizadas em um difratômetro Shimadzu modelo 6000, com radiação  $\text{CuK}\alpha$  de  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ , sob a supervisão da Profa. Emília Celma de Oliveira Lima no laboratório de Química, Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Para identificar a estrutura cristalina do material investigado, os picos de reflexão obtidos foram comparados aos de materiais conhecidos. O diâmetro médio das nanopartículas foi determinado a partir da largura a meia altura do pico de reflexão mais intenso usando a equação de Scherrer <sup>5</sup>.

#### **4.2.2 Resultados e Discussão**

O difratograma de raios X obtido das nanopartículas do fluido magnético iônico sintetizado está mostrado na Figura 4.1. A similaridade dos picos de difração aos da ficha padrão ASTM evidencia a estrutura cristalina da maghemita (ver Tabela 4.1). É importante lembrar, entretanto, que alguns difratogramas são muito similares, sendo difícil distinguir apenas pela técnica de difração de raios X entre amostras como a magnetita e a maghemita <sup>8</sup>.

Usando os dados de difração de raios X obtidos e considerando que a cristalinidade da amostra foi mantida, ou seja, que o espaçamento interplanar entre os conjuntos de planos [h, k, l] era constante, determinou-se que o diâmetro médio das nanopartículas magnéticas é 9,3nm.

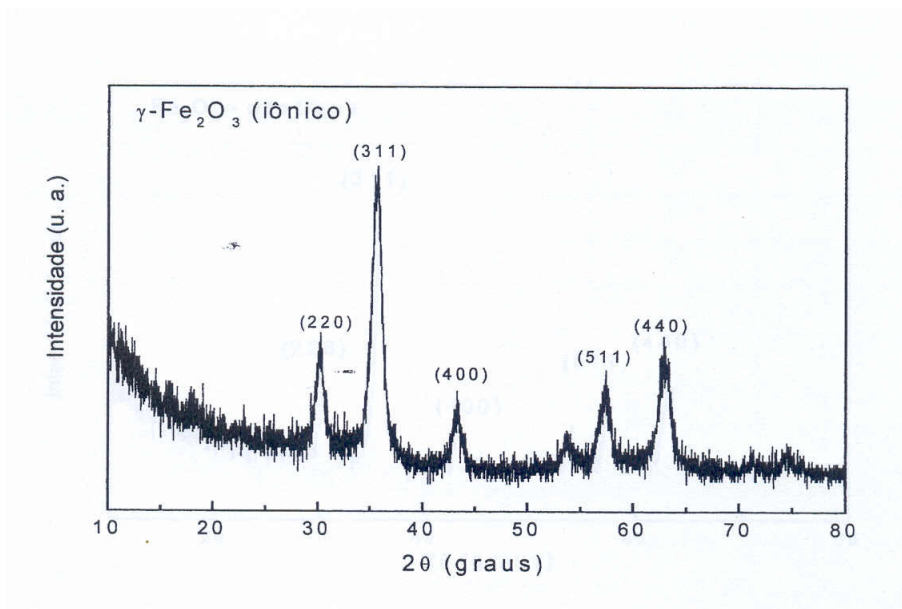


Figura 4.1 – Difratoograma de raios X das nanopartículas de maghemita em pó

Tabela 4.1 – Posição dos picos de difração de raios X comparados com a ficha padrão ASTM

NP de maghemita investigada		ASTM		
Intensidade	2θ	hkl	Intensidade	2θ
44	30,278	220	30	30,122
100	35,719	311	100	35,455
24	43,322	400	20	43,099

### 4.3 Caracterização das nanopartículas de maghemita por Microscopia Eletrônica de Transmissão

A determinação do diâmetro das nanopartículas constitui etapa importante na área de materiais, tendo em vista que este parâmetro determina várias das propriedades das nanopartículas e suas funções potenciais. Além disto, os valores do diâmetro médio obtidos por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) são importantes no cálculo dos parâmetros de outras técnicas, como a de birrefringência<sup>37</sup>.

### 4.3.1 Metodologia

Para proceder à análise do tamanho das nanopartículas de maghemita do FM iônico e da dispersividade de tamanho das mesmas, uma gota da amostra de FM iônico diluída em água contendo cerca de 0.00003% de fração volumétrica foi colocada sobre telas para microscopia de transmissão eletrônica (MET) de 300 *meshs* recobertas com Formvar<sup>93</sup>. Após secarem à temperatura ambiente, as telas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio eletrônico JEOL 1011 no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

O diâmetro médio de 2000 nanopartículas de maghemita investigadas foi obtido por análise em computador, utilizando-se o programa ImagePro 5.1. A distribuição das partículas foi conseguida utilizando-se o melhor ajuste log normal, conforme descrito previamente<sup>93</sup> e dado pela equação 4.1.

$$P(D) = \left[ \frac{\exp\left(-2\sigma^2\right)}{\bar{D}\sigma\sqrt{2\pi}} \right] \left[ \exp\left(\frac{-\ln^2\left(\frac{D}{\bar{D}}\right)}{2\sigma^2}\right) \right] \quad (4.1)$$

Onde

$\sigma$  = desvio padrão

$\bar{D}$  = diâmetro médio

### 4.3.2 Resultados e Discussão

A técnica de MET apresenta resolução adequada para observar estruturas com dimensões próximas a 0,1nm, ajustando-se perfeitamente ao estudo de nanoestruturas. No entanto, ao serem investigados por MET, os materiais devem estar em ambiente de alto vácuo o que exige que sistemas

como os coloidais sejam previamente secos, tratamento que pode levar a uma representação alterada da amostra <sup>110</sup>. De qualquer forma, a observação por MET revelou que as nanopartículas apresentam, em sua maioria, formato esférico.

A Fig. 4.2 mostra uma micrografia típica obtida de MET e a Fig.4.3, o histograma de tamanho de nanopartículas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  correspondente (B) obtido a partir da mensuração de 2000 nanopartículas em fotomicrografias eletrônicas. Os dados experimentais foram ajustados usando a função de distribuição log normal que permitiu calcular o diâmetro modal (8,15 nm) e o desvio padrão logaritmo de ordem zero (0,30).

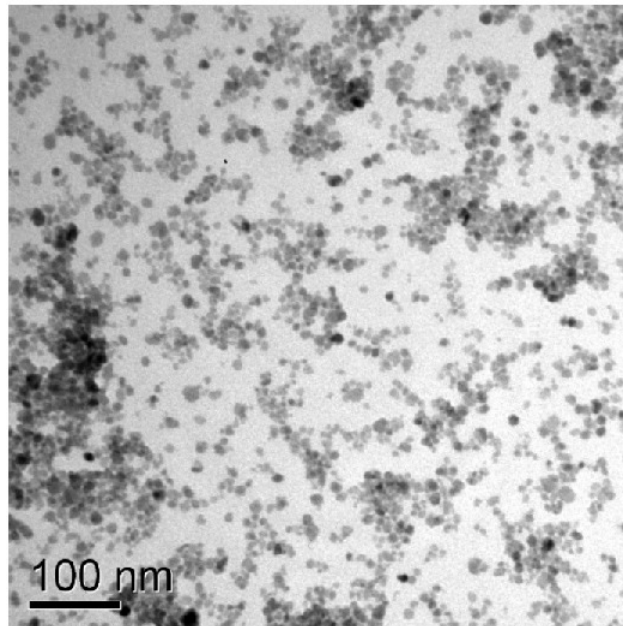


Fig. 4.2 MET em nanopartículas de maghemita. A figura representa micrografia MET típica das nanopartículas de maghemita.

Comparando-se o tamanho médio da nanopartícula obtido por MET (8,15 nm) ao resultado da técnica de raios X (9,3 nm) constata-se que a dimensão variou com a técnica experimental utilizada para sua estimativa. Diferentes técnicas avaliam diferentes aspectos das dimensões das partículas, como ilustram relatos prévios em que são comparados os resultados obtidos com

MET, microscopia de força atômica e birrefringência magnética<sup>93</sup> ou destas com ressonância magnética<sup>99</sup>, além daquelas que comparam a dimensão física do núcleo, dimensão com propriedades magnéticas e dimensão hidrodinâmica que inclui os efeitos de cobertura da nanopartícula<sup>83</sup>. De qualquer forma, a MET é considerada a técnica referencial na caracterização de nanoestruturas.

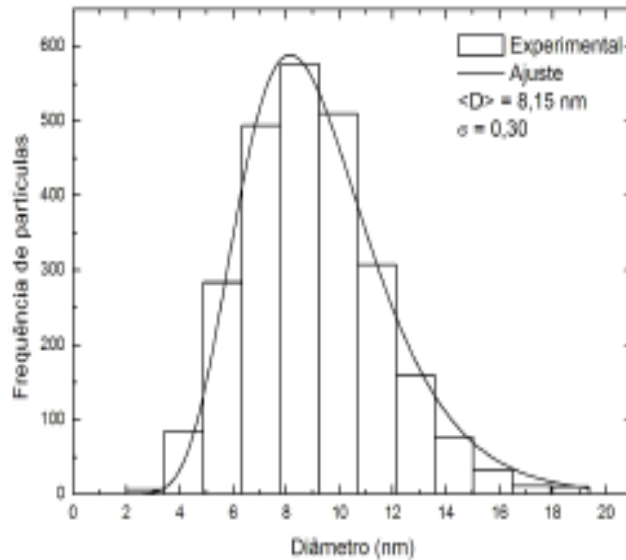


Fig. 4.3 Histograma de polidispersão das nanopartículas de maghemita ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Barras verticais representam os histogramas de tamanhos obtidos por análise de dados MET mostrados na Fig. 4.2. A linha contínua representa o melhor ajuste de acordo com a função de distribuição log-normal<sup>93</sup>.

## 4.4 Caracterização das nanopartículas de maghemita por Birrefringência Magnética Estática

### 4.4.1 Birrefringência - definição

Um material é considerado birrefringente se apresenta diferentes índices de refração quando a luz que o atravessa incide em diferentes eixos ou, em outras palavras, a birrefringência é um tipo de anisotropia óptica de um determinado material. Devido a esta propriedade o material altera o plano de polarização da luz, inclinando-o no sentido horário ou anti-horário, característica também referida como atividade óptica. A figura 4.4 ilustra o fenômeno.

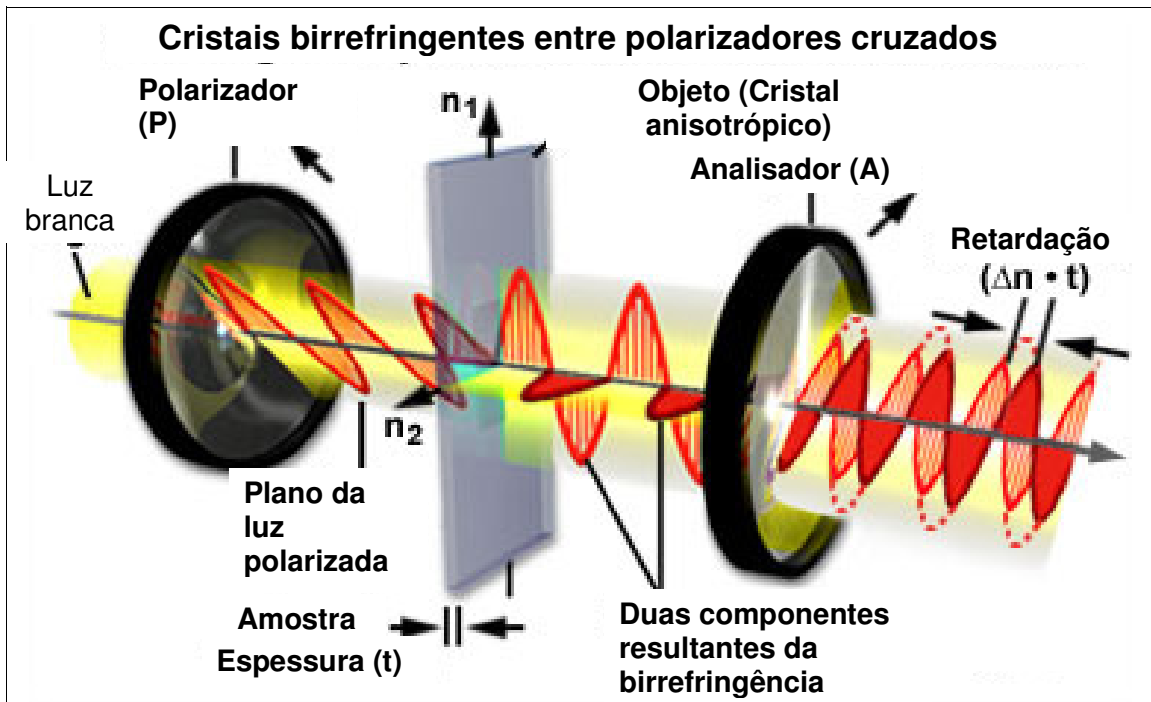


Figura 4.4- Esquema de birrefringência. A figura representa o desvio do plano da luz polarizada da luz incidente ocasionado pela passagem através do material birrefringente.

#### 4.4.1.1 Fluidos Magnéticos e Birrefringência Magnética

Fluidos Magnéticos (FM) em geral possuem atividade óptica nula. Porém, quando submetidos a um campo magnético contínuo (DC) apresentam diferentes índices de refração para a luz transmitida perpendicular ou paralelamente a esse campo aplicado, ou seja, os fluidos magnéticos tornam-se birrefringentes na presença de um campo magnético externo. Essa propriedade referida como Birrefringência Magnética também é observada em alguns cristais<sup>111</sup> porém a fenomenologia presente no caso dos fluidos magnéticos é bem distinta, devido às peculiaridades do sistema.

Neste trabalho, a medida da birrefringência magnética (BM) foi realizada com o campo magnético DC, após tempo suficiente para o sinal medido se estabilizar, em cada intensidade de campo magnético. Portanto, não se buscou



observar fenômenos de relaxação durante a tomada de um ponto, característica que define a técnica como birrefringência magnética estática (BME). O estudo do fenômeno de relaxação pode ser realizado em medidas de birrefringência magnética dinâmica e não é tratado neste trabalho.

Algumas considerações importantes relativas à birrefringência magnética estática em fluidos magnéticos devem ser feitas, com implicações tanto na experimentação como no desenvolvimento do formalismo teórico. Primeiro, fluidos magnéticos apresentam dicroísmo quando submetidos a um campo magnético, ou seja, seu coeficiente de absorção de luz em uma direção paralela a um campo aplicado é diferente do coeficiente de absorção medido perpendicularmente ao campo. Este efeito, porém, é comumente desprezado em estudos de BME, pois é tipicamente uma ordem de grandeza menor que o efeito da birrefringência magnética estática<sup>109</sup>. Segundo, amostras de fluido magnético gelificadas ou congeladas em ausência de campo não apresentam fenômeno de birrefringência<sup>110</sup>. Esse fato sugere que o fenômeno é fortemente dependente de processos físicos peculiares à suspensão coloidal, em especial a orientação de agregados de partículas e a formação de cadeias de partículas.

Segundo o Modelo Tradicional, a birrefringência magnética estática é explicada através da anisotropia de forma das partículas. Neste caso, a diferença dos índices de refração é depende da susceptibilidade elétrica relativa por unidade de comprimento ( $\chi$ ), da permissividade elétrica do líquido ( $\epsilon$ ) e da fração volumétrica ( $\Phi$ ) das partículas no líquido. Esta relação pode ser representada pela equação 4.2,

$$\Delta n = \Delta n_S - 3\xi \coth \xi + 3\xi^2 \quad , \quad (4.2)$$

onde  $\Delta n_S = \Phi \chi_{\parallel} - \chi_{\perp} \epsilon$  e  $\xi = m H / k_B T$ , com  $m$  representando o momento magnético da partícula,  $H$  o campo magnético externo,  $T$  a temperatura absoluta e  $k_B$  a constante de Boltzmann.

A explicação corrente da birrefringência magnética estática pode ser apresentada por meio da interação entre as partículas e a anisotropia que os aglomerados formados geram. Neste caso, tem-se uma correção da equação 4.2 e esta pode ser reescrita com base na dependência das interações das partículas com o campo magnético externo e das interações partícula-partícula e aglomerados <sup>37</sup>:

Na equação 4.3 tem-se:

$$\Delta n(D, H) = \Delta n_S \int_0^{\infty} \left[ L'(X_p) Y_p + L'(X_a) Y_a + L'(X_b) Y_b \right] P(D) dD \quad (4.3)$$

onde  $\Delta n_S \propto D^3$ ,

$L_0(X_i) = 1 - (3/X_i) \coth(X_i) + 3/X_i^2$  é a função de Langevin de segunda ordem,

$X_p = \mu H/k_B T$  para partículas não interagentes,

$T$  = temperatura,

$H$  = o campo magnético aplicado,

$k_B$  = a constante de Boltzmann,

$\mu = M^p_S D^3/6$  é o momento magnético de cada partícula,

$M^p_S$  = magnetização das partículas em unidade de densidade, que pode ser escrita como  $M^p_S = M^S_S \rho$ , onde  $\rho$  é a densidade (4,87 g/cm<sup>3</sup>) para  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  <sup>81-82</sup>.

$M^S_S$  = magnetização de saturação da amostra  $Y_i$  para  $i = p, a$  e  $b$ , tal que a contribuição total é  $Y_p + Y_a + Y_b = 1$ ,  $p$  representando monômeros,  $a$  dímeros do tipo *coherent* e  $b$  dímeros tipo *fannin*.

A maneira mais usual de realizar os experimentos de birrefringência magnética estática é medir a intensidade luminosa de um feixe de luz polarizada que incide em fina camada da amostra, passando por um filtro polarizador (analisador) e finalmente incidindo em um detector.

O sistema usado para a medida da birrefringência estática é bastante simples e consiste basicamente em uma fonte de luz laser de 632 nm que incide no plano normal a um filtro polarizador (polarizador) em um porta amostras de quartzo situado entre os pólos de um eletroímã com campo uniforme perpendicular ao feixe de luz, um analisador e um detetor de luz do tipo diodo semiconductor. O caminho óptico efetivo da amostra é de 1mm e os filtros polarizadores (polarizador e analisador) são montados em duas estruturas tipo goniômetro de maneira que permite girar livremente a direção da polarização entre estes. O sistema é configurado de forma que o ângulo de polarização entre os filtros sejam de 90 graus e ambos tenham 45 graus em relação à orientação do campo magnético. Um *chopper* modula a luz e está conectado a um amplificador onde o sinal é obtido em volts, em uma configuração do tipo *lock-in* clássica. O campo magnético uniforme é medido por uma sonda de efeito Hall junto ao porta amostras.

De acordo com a literatura <sup>111</sup>, a intensidade medida no detector associa-se segundo a equação 4.4, para um arranjo de 90° entre o polarizador e analisador e 45° entre estes e o alinhamento do campo magnético (Fig. 4.5).

$$I \cong E_0^2 t \sin^2(\Delta n S^2) \quad (4.4)$$

onde  $E_0$  e  $t \sin^2$  representam a intensidade do campo elétrico do laser incidente e a componente paralela do tensor de transmissividade, respectivamente.

Para argumentos de seno suficientemente pequenos considera-se  $\sin(x)$  aproximadamente igual à  $x$  fazendo com que a birrefringência seja proporcional a raiz do sinal que chega no detector após passagem no restante do sistema experimental.

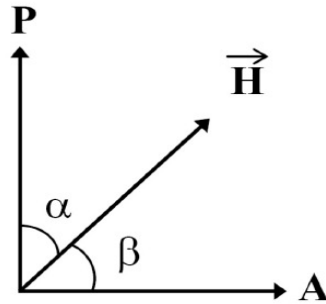


Figura 4.5– Representação dos ângulos relativos a orientação do polarizador, analisador, e campo magnético. No arranjo experimental adotado neste trabalho  $\alpha=\beta=45^\circ$

#### 4.4.2 Metodologia

As medidas obtidas foram realizadas no laboratório de Birrefringência Magnética, IF, UnB por Leandro Figueiredo<sup>37</sup> em aparato experimental ilustrado na figura 4.6.

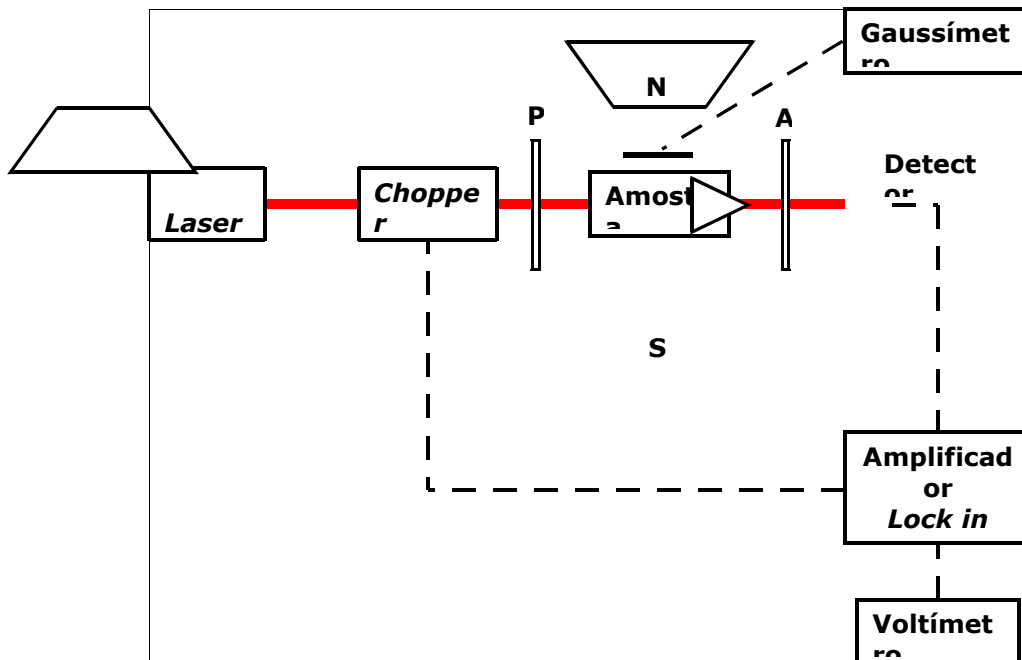


Figura 4.6 – Aparato experimental para realização de medidas de birrefringência magnética estática. Fonte referência<sup>112</sup>.

Várias diluições em água foram preparadas a partir da amostra de concentração original  $2,7 \times 10^{17}$  partícula/cm<sup>3</sup> sendo as medidas realizadas logo após as diluições para evitar o efeito de envelhecimento. Diluições de 1:6 até 1:64, num total de vinte diluições foram realizadas. A concentração em partículas por centímetro cúbico foi obtida a partir da análise do teor de ferro da amostra por absorção atômica, da distribuição do diâmetro obtido por MET e a partir do valor da massa específica para maghemita ( $4,87 \text{ g/cm}^3$ )<sup>81-82</sup>

#### 4.4.3 Resultados e Discussão

Os dados mostrados na Figura 4.7 são referentes às diluições de 1:8, 1:16, 1:32, 1:48, 1:64. O fator N expressa a concentração de partículas levando em conta a distribuição do diâmetro calculada previamente a partir dos dados de MET.

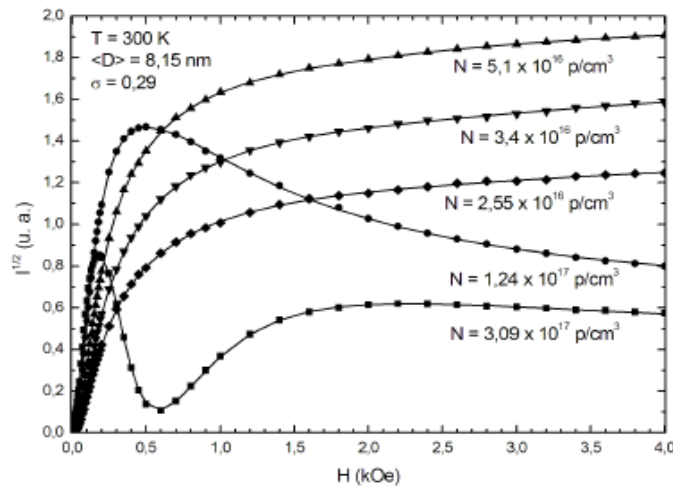


Figura 4.7 .Birrefringência magnética estática do FM iônico em função da diluição das amostras <sup>37</sup>.

As linhas traçadas no gráfico da Figura 4.7 resultam do ajuste dos dados obtidos pela equação [4.2]. A linha sólida resulta no ajuste da equação 4.5

$$I_s = E + C/Fv + A \tanh(B/Fv) \quad (4.5)$$

onde E, C, A e B são constantes de ajuste e Fv é a fração volumétrica de partículas no fluido.

É importante observar nos resultados que apenas para as concentrações maiores demonstradas no gráfico, a saber  $3,09 \times 10^{17}$  e  $1,24 \times 10^{17}$  partículas/cm<sup>3</sup> apresentam a forma de sino (nas regiões de baixo campo), o que não é notado para as demais concentrações. Essa fenomenologia está associada à formação de aglomerados (cadeias) de partículas em regimes de altas concentrações e, desta forma, a aproximação da equação 4.3 onde a birrefringência se torna proporcional à raiz quadrada do sinal de intensidade no detector não é mais aplicável, tendo que se levar em conta o quadrado do seno na expressão <sup>79</sup>.

Além disso, as medidas de birrefringência podem ser usadas para estimar, por meio de modelos, parâmetros como diâmetro médio das partículas, sua dispersão em diâmetro, magnetização de saturação das partículas e permeabilidade magnética do fluido <sup>113</sup>.

## **Capítulo V**

# **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS MAGNÉTICAS DE ALBUMINA**

**APLICAÇÕES DO FLUIDO MAGNÉTICO IÔNICO**

## 5.1 Nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas

Nanopartículas magnéticas apresentam grande potencial para inúmeras aplicações biomédicas. Uma rápida revisão da literatura permite detectar a investigação de seu uso em aplicações tão variadas quanto aumentar o contraste nos exames de imagem por ressonância magnética, induzir hipertermia como forma de tratamento do câncer <sup>35</sup>, promover melhor direcionamento de drogas, terapia gênica e separação magnética, além de marcar células alvo <sup>21,114-117</sup>.

Nanopartículas de magnetita e maghemita são as mais comumente empregadas nas aplicações biomédicas <sup>4</sup>. Quando funcionalizadas com drogas, proteínas, anticorpos ou enzimas e submetidas a um campo magnético externo permitem que fármacos sejam entregues especificamente ao tecido alvo, fazendo com que sua concentração no organismo como um todo seja menor e, em consequência, tenha efeitos adversos minimizados <sup>25,117</sup>.

Um aspecto importante nas aplicações biomédicas está relacionado à estabilidade dos fluidos magnéticos, dependente das dimensões das partículas, que devem ser suficientemente pequenas e permanecerem isoladas quando em suspensão. Por sua vez, a biocompatibilidade das nanopartículas magnéticas, requisito essencial para viabilizar seu uso biomédico, é diretamente dependente da composição química do núcleo e da cobertura, da intensidade das cargas superficiais. Portanto, qualquer alteração em um desses fatores pode alterar os efeitos no organismo e especificidade em relação a diferentes órgãos <sup>115,118</sup>.

O fluido magnético iônico desenvolvido neste trabalho foi estabilizado em uma solução com pH 1,52 e, portanto, as nanopartículas de maghemita que o compõem têm carga superficial positiva, as quais, de maneira geral, são rapidamente retiradas da circulação sanguínea e induzem mais reações inflamatórias do que as carregadas negativamente ou as que possuem carga neutra <sup>118</sup>, não satisfazendo as condições para biocompatibilidade do material. Para minimizar este efeito adverso e aproveitar as propriedades magnéticas vantajosas do fluido magnético iônico, as nanopartículas de maghemita podem



constituir sistemas magnéticos biocompatíveis se forem funcionalizadas ou encapsuladas em estruturas produzidas a partir de substâncias biocompatíveis, como nanocápsulas, inclusive as nanocápsulas poliméricas.

Em consonância com esta idéia e dando prosseguimento ao trabalho iniciado com a geração do fluido magnético iônico, as nanopartículas de maghemita foram encapsuladas em nanocápsulas de albumina bovina, escolhida por ser a mais abundante dentre as proteínas séricas. Além disso, a albumina possui carga negativa em pH neutro, é hidrofílica e reveste superfícies imunogênicas, o que pode diminuir o reconhecimento pelo sistema imunológico, aumentando seu tempo de circulação e permitindo que as nanopartículas encapsuladas cheguem ao sítio biológico de interesse <sup>118</sup>.

O objetivo desta parte do trabalho foi sintetizar as nanocápsulas de albumina bovina magnética e fazer sua caracterização básica por microscopia eletrônica de transmissão. Simultaneamente, a biocompatibilidade e/ou toxicidade potencial desta amostra foi verificada no âmbito de outros trabalhos de pós-graduação.

## **5.2 Metodologia**

### **5.2.1 Reagentes**

Albumina sérica bovina foi obtida da Calbiochem. Óleo de girassol e Span-80 - da Aldrich Chemical Company.

### **5.2.2 Síntese das nanocápsulas magnéticas de albumina**

As nanopartículas de albumina sérica bovina (BSA) usadas neste estudo foram preparadas em acordo com o método de desnaturação térmica representado na figura 5.1 <sup>119</sup>. Para otimizar o preparo das nanopartículas foi usado o processo de agitação mecânica em alta velocidade usando um sistema ultra-turrax. O fluido magnético iônico, material encapsulado neste estudo, foi inicialmente disperso em solução aquosa de albumina.

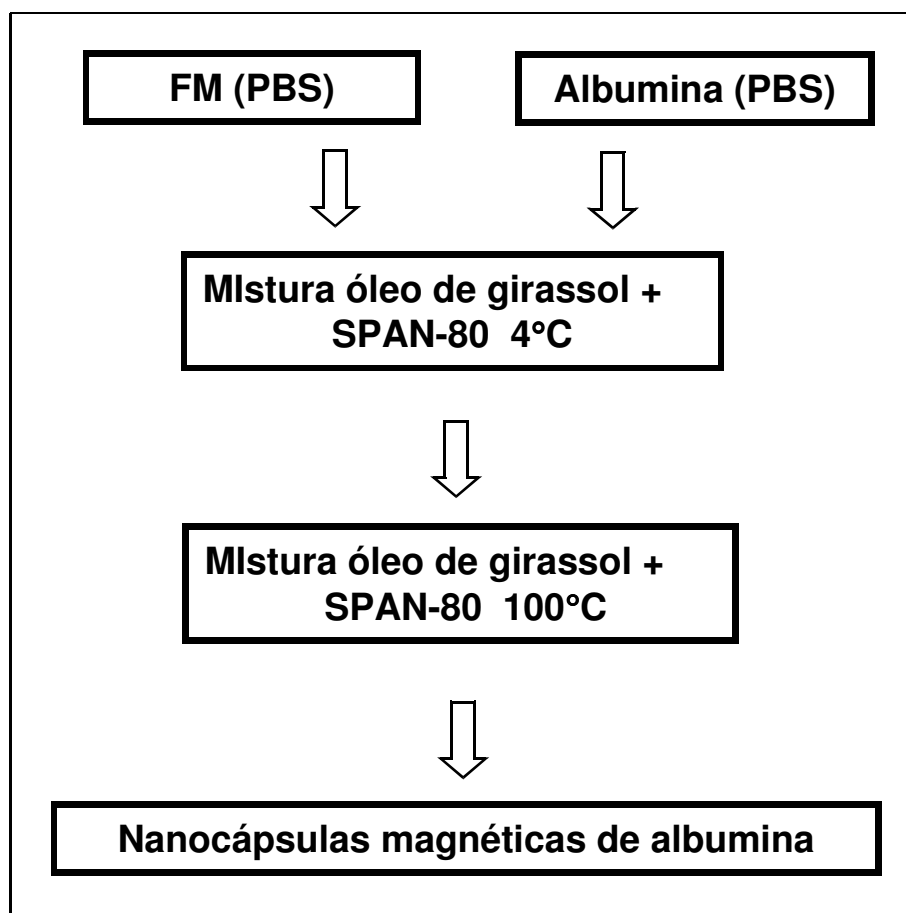


Figura 5.1 Esquema geral de síntese das nanocápsulas magnéticas de albumina bovina a partir do fluido magnético iônico (FM) <sup>119</sup>.

As soluções aquosas de BSA (250 mg/mL) e cinco diferentes amostras de fluido contendo  $2,3 \times 10^{17}$ ,  $1,2 \times 10^{17}$ ,  $4,6 \times 10^{16}$ ,  $2,3 \times 10^{16}$  e  $1,2 \times 10^{16}$  partícula/mL, foram preparadas em tampão fosfato (PBS), pH = 7,4. No preparo da solução inicial foram gotejados 250  $\mu$ L de cada amostra de fluido magnético em 250  $\mu$ L de solução de BSA sob agitação constante durante 60 minutos, à temperatura ambiente.

Ao mesmo tempo, 30 mL de óleo de girassol (contendo 1% of Span-80, v/v) inicialmente resfriados a 4 °C foram adicionados a um frasco de ebulição de 100 mL. A solução fluido magnético/albumina inicial foi gotejada no frasco a uma velocidade de 6 gotas/minuto com agitação constante usando o sistema ultraturrax (13000 rpm) por 10 minutos enquanto a temperatura do sistema foi

mantida em 4°C. A mistura foi a seguir emulsificada por ultra-som por 30 minutos a 125 W e 4°C.

Em outro frasco de ebulição, 70 mL de óleo de girassol contendo 1% de Span-80 foram pré-aquecidos a 100°C sob agitação constante durante 30 minutos. A emulsão inicial obtida como descrita acima foi vagarosa e diretamente gotejada no frasco de ebulição contendo o óleo de girassol pré-aquecido em um tempo total de 15 minutos. Após a formação da emulsão inicial todo o sistema foi agitado a 13000 rpm por 20 minutos a 100°C. A suspensão final foi a seguir resfriada até a temperatura ambiente sob agitação magnética constante. As nanopartículas obtidas foram lavadas com éter etílico (3×30 mL) para a separação do óleo, seguindo-se a centrifugação a 10000 rpm por 30 minutos. Após essa lavagem, o sedimento contendo as nanopartículas foi liofilizado para retirar qualquer traço de água remanescente e estocado a 4°C. As cinco amostras magnéticas de albumina nanoestruturadas foram denominadas BSA1 a BSA5 de acordo com a concentração de nanopartículas do fluido magnético iônico usado em sua preparação. BSA1, BSA2, BSA3, BSA4, e BSA5 continham, respectivamente,  $2,3 \times 10^{17}$ ,  $1,2 \times 10^{17}$ ,  $4,6 \times 10^{16}$ ,  $2,3 \times 10^{16}$  e  $1,2 \times 10^{16}$  partícula/mL.

A figura 5.2 mostra um esquema ilustrativo das nanocápsulas obtidas. O material liofilizado foi estocado de forma a estar protegido da luz e, por um período de 3 meses, não apresentou qualquer alteração morfológica. As nanocápsulas preparadas foram em seguida caracterizadas e posteriormente usadas para estudos *in vitro* e *in vivo*, usando, respectivamente linhagens celulares e modelos animais.

A encapsulação das nanopartículas de maghemita em nanocápsulas de albumina foi realizada em laboratório do Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina, Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP) sob a supervisão do Dr. Antônio Cláudio Tedesco. A metodologia usada, juntamente com testes de toxicidade *in vitro*, foi descrita por Simioni e colaboradores (2006)<sup>119</sup> (ver anexo).

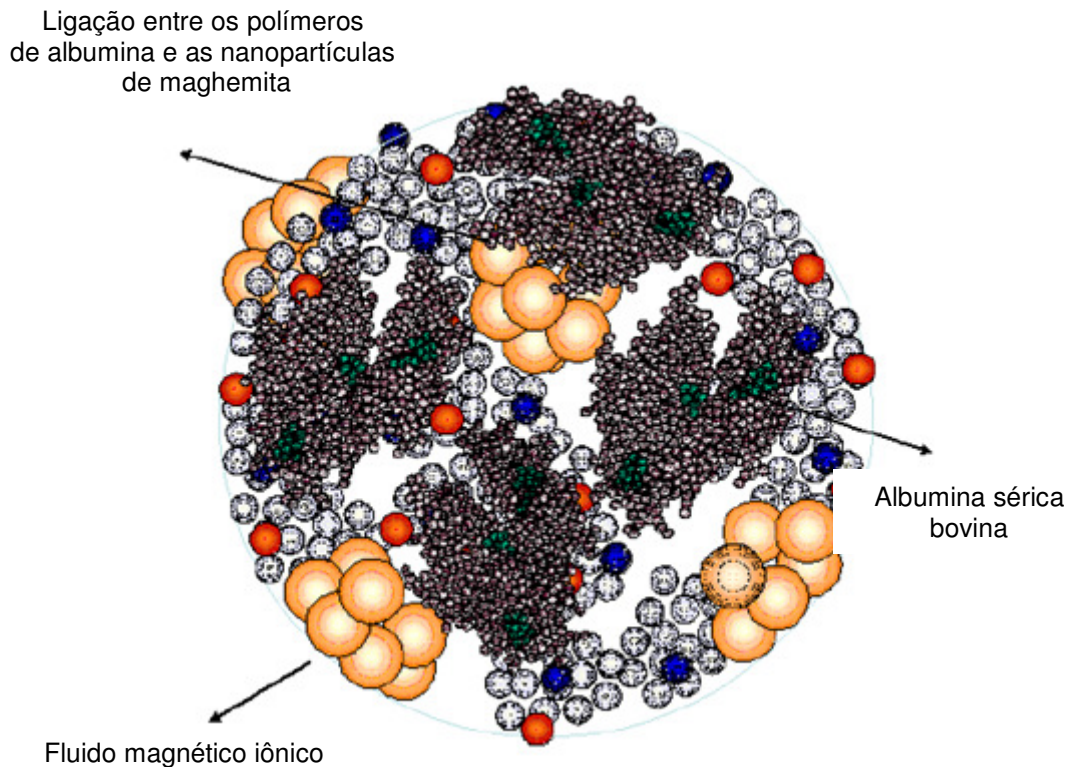


Figura 5.2 – Estrutura esquemática das nanocápsulas magnéticas de albumina (Fonte: Ref. <sup>119</sup>).

### 5.2.3 Caracterização de nanocápsulas magnéticas de albumina por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Algumas das técnicas empregadas na caracterização das nanopartículas de maghemita do fluido magnético iônico foram também empregadas na caracterização das nanocápsulas magnéticas citadas neste trabalho.

A amostra de nanocápsulas magnéticas de albumina liofilizada foi diluída em água destilada e, posteriormente, assim como a amostra de fluido magnético iônico, colocada sobre telas para MET de 300 *meshs* recobertas com Formvar. Após secagem as telas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio eletrônico JEOL 1011 no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

O diâmetro das nanocápsulas magnéticas de albumina foi obtido por análise em computador, utilizando-se o programa ImagePro 5.1. A descrição da polidispersão das nanocápsulas foi obtida utilizando-se uma distribuição log-normal, conforme descrito por Lacava e colaboradores em 2000<sup>93</sup> e detalhado no item 4.3.

## 5.2 Resultados e Discussão

A análise das nanocápsulas de albumina ao microscópio eletrônico de transmissão mostrou que as mesmas possuem morfologia esférica (Fig. 5.3). A análise do histograma descrevendo os diâmetros obtidos (Fig. 5.4) revelou um diâmetro médio de  $73 \pm 3$  nm, com dispersão de  $0,37 \pm 0,04$ .

As amostras de nanocápsulas BSA1 a BSA5 foram paralelamente investigadas em culturas de células. Os resultados mostraram toxicidade proporcional à concentração de nanopartículas magnéticas<sup>119</sup>. (ver anexo).

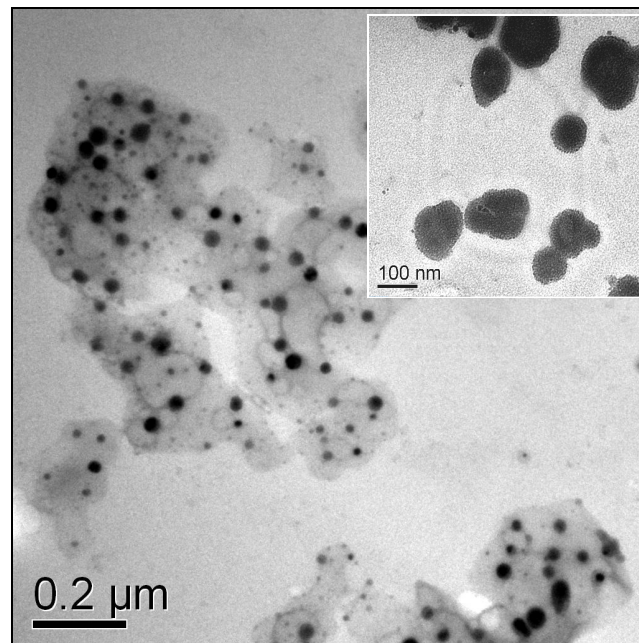


Figura 5.3 - Micrografia obtida por MET<sup>37</sup> das nanocápsulas de albumina magnéticas. A figura representa micrografia MET típica das nanocápsulas; o detalhe mostra as nanopartículas que compõem as nanocápsulas.

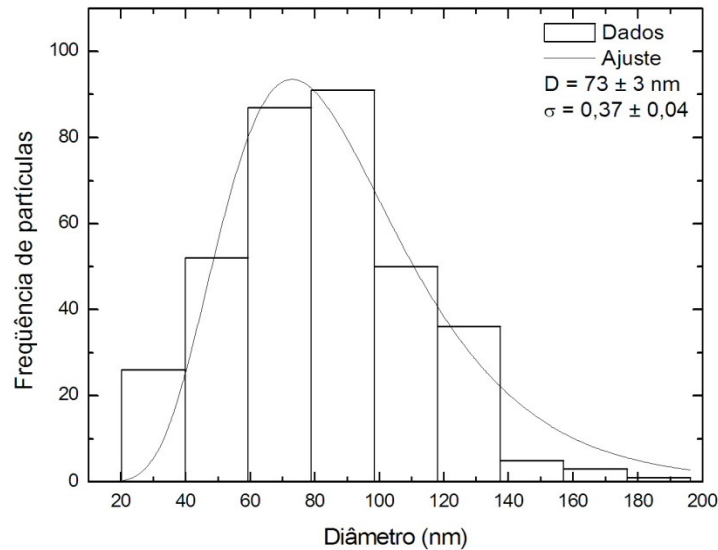


Figura 5.4 - Histograma de diâmetro das nanocápsulas de albumina magnéticas. Barras verticais representam as frequências em cada faixa de diâmetro obtidas por análise de dados MET mostrados na Fig, 5.3. A linha contínua é o melhor ajuste de acordo com a função de distribuição log-normal <sup>93</sup>.

### 5.3 Outras caracterizações das nanocápsulas magnéticas de albumina

Além de ser caracterizada por MET, a amostra de nanocápsulas de albumina magnéticas foi alvo de investigação nos trabalhos de tese de Luciene Batista da Silveira <sup>38</sup> e de Leandro Figueiredo <sup>37</sup>. Nestes trabalhos a amostra de nanocápsulas foi caracterizada pelos métodos de Difração de Raios X, Espectroscopia Mössbauer, Espectroscopia Fotoacústica, Susceptibilidade Magnética Dinâmica e Ressonância Magnética. Os resultados de difração de raios X confirmaram a presença de nanopartículas de maghemita na amostra de nanocápsulas de albumina magnética com estruturas cristalinas comparáveis aos valores contidos na ficha padrão da ASTM. As medidas de espectroscopia Mössbauer também confirmaram a presença de nanopartículas de maghemita na amostra de nanocápsulas de albumina magnéticas e evidenciaram a presença de fase superparamagnética à temperatura ambiente <sup>38</sup>.

## 5.4 Perspectivas – aplicações biomédicas

A amostra de nanocápsulas de albumina magnéticas, em conformidade com os requisitos imprescindíveis para aplicações biomédicas, foi testada em vários trabalhos de dissertação, onde foram realizados testes *in vitro*<sup>119,120</sup> e *in vivo*<sup>121,122</sup>. Os resultados revelaram biocompatibilidade adequada para aplicações biomédicas. Revelaram ainda que as nanocápsulas magnéticas foram capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica com especificidade para o sistema nervoso central.

Devido a estas características, a amostra de nanocápsulas de albumina magnética está no momento sendo avaliada em sistemas de entrega de drogas e de magnetohipertermia para tratamento de tumores de mama e de cérebro em modelos animais no âmbito da Rede de P&D&I e Nanobiotecnologia do Centro-Oeste e Norte - CON-NANO (CAPES) e do INCT em Nanobiotecnologia (CNPq/MCT).

**Capítulo VI**  
**CONCLUSÃO**



Neste trabalho, o uso da rota de síntese via coprecipitação permitiu o preparo de uma amostra de fluido magnético iônico, em meio aquoso ácido, à base de nanopartículas de óxido de ferro (III), com excelente estabilidade coloidal em relação ao tempo de estocagem. O diâmetro médio das nanopartículas de  $8,15 \pm 0,09$  nm com dispersão de  $0.30 \pm 0.01$  foi obtido pela análise de micrografias de microscopia eletrônica de transmissão e ajuste dos dados usando uma distribuição log-normal. A estrutura cristalina das nanopartículas, identificada com a estrutura do espinélio maghemita, foi revelada através de medidas de difração de raios X após comparação com as fichas ASTM.

A caracterização magneto-óptica do material, usando birrefringência magnética estática, sugere a tendência de formação de aglomerados, mais provavelmente cadeias de nanopartículas, em regime de alta fração volumétrica de partículas e na presença de campo magnético.

O fluido magnético iônico preparado foi utilizado na síntese de compósito magnético nanoparticulado, à base de albumina bovina, com enorme potencial na área biomédica, particularmente na produção de sistemas carreadores de drogas com liberação controlada.

## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] Feynman, R. P. Patente. USA. 1959.
- [2] Medeiros, E. S.; Paterno, L. G.; Mattoso, L. H. Y. C. In *Nanotecnologia – Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*; Ed., A., Ed. São Paulo, 2006, p 13-29.
- [3] Morais, P. C.; Lima, E. C. O. In *Nanotecnologia - Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*; Artliber, Ed. São Paulo, 2006.
- [4] Teja, A. S.; Koh, P.-Y. *Progr. Crystal Growth Charac.Mater.* **2009**, *55*, 22-45.
- [5] Morais, P. C.; Lima, E. C. D.; Rabelo, D.; Reis, A. C.; Pelegrini, F. *IEEE Trans. Magn.* **2000**, *36*, 3038-3040.
- [6] Segal, V.; Rabinovich, A.; Natrass, D.; Raj, K.; Nunes, A. *J. Magn. Magn. Mater.* **2000**, *215-216*, 513-515.
- [7] Medintz, I. L.; Tetsuo, H.; Yeda, U.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. *Nature Mater.* **2005**, *4*, 435.
- [8] Berkovski, B.; Bashtovoy, V. *Begel House, New York* 1996.
- [9] Rosensweig, R. E. *Ferrohydrodynamics*; Cambridge University: Cambridge 1985.
- [10] Charles, S. W.; Popplewell, J.; Wohfarth, E. P. *Ferromagnetic materials*; North-Holland Publishing company: Amsterdam, 1982; Vol. 2.
- [11] Bitter, F. *Phys. Rev* **1932**, *4*, 507.
- [12] Elmore, W. C. *Phys. Rev.* **1938**, *54*, 1092.
- [13] Craik, D. J.; Griffiths, P. M. *Brit. J. Appl. Phys.* **1958**, *9*, 276.
- [14] Papell, S. S. Patent. USA, 1965; Num. 3 215 572.
- [15] Rosensweig, R. E. USA, **1969**; Num. 3700595
- [16] Kalafalla, S. E.; Reimers, G. W. USA, **1973**; Num. 3 764 540
- [17] Massart, R. USA, **1982**; Num. 4 329 241.
- [18] Cabuil, V., Tese. Université Pierre et Marie Curie, 1987.
- [19] Halbreich, A.; Roger, J.; Pons, J. N.; Geldwerth, D.; Silva, M. F. D.; Roudier, M.; Bacri, J. C. *Biochimie* **1998**, *80*, 379 - 390.
- [20] Gupta, A. K.; Gupta, M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995-4021.
- [21] Berry, C. C.; Curtis, A. S. G. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, R198-R206.
- [22] Hull, D.; Bacon, D. J. *Introduction to dislocations*; 4 ed., 2001.
- [23] Hargrove, R. S.; Kündig, W. *Sol. State Commun.* **1970**, *8*, 303-308.
- [24] Neuberger, T.; Schopf, B.; Hofmann, H.; Hofmann, M.; Rechenberg, B. v. *J. Magn. Magn. Mater* **2005**, *293*, 483-496.
- [25] Tronc, E.; Ezzir, A.; Cherkaoui, R.; Chaneac, C.; Nogue, M.; Kachkachi, H.; Fiorani, D.; Testa, A. M.; Greneche, J. M.; Jolivet, J. P. *J. Magn. Magn. Mater* **2000**, *221*, 63 -79.
- [26] Spada, F. E.; Parker, F. T.; Nakakura, C. Y.; Berkowitz, A. E. *J. Magn. Magn. Mater.* **1993**, *120*, 129-153.
- [27] Vekas, L.; Bica, D.; Avdeev, M. V. *China Particuol.* **2007**, *5*, 43-49.
- [28] Teja, A. S.; Holm, L. J. In *Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering: Synthesis, Properties, and Applications*; Sun, Y.-P., Ed.; Elsevier: **2002**, p 327-349.
- [29] Blums, E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, *252*, 189-193.

- [30] Safarik, I.; Safarikova, M. *Monatshefte fur Chemie* **2002**, *133*, 7370759.
- [31] Azevedo, R. B.; Silva, L. P.; Lemos, A. P. C.; Bão, S.; Lacava, Z. G. M.; Safarik, I.; Safarikova, M.; Morais, P. C. *IEEE Trans. Magn.* **2003**, *39*, 2660.
- [32] Safarik, I.; Safarikova, M. *J. Chromat. B* **1999**, *722*, 33-53.
- [33] Morais, J. M. G.; Azevedo, R. B.; Silva, L. P.; Lacava, Z. G. M.; Bão, S. N.; Silva, O.; Pelegrini, F.; Gansau, C.; Buske, N.; Safarik, I.; Safarikova, M.; Morais, P. C. *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, *272*, 2400 - 2401.
- [34] Rabelo, D.; Lima, E. C. D.; Reis, A. C.; Nunes, W. C.; Novak, M. A.; Garg, V. K.; Oliveira, A. C.; Morais, P. C. *Nano Letters* **2001**, *1*, 105–108.
- [35] Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T. *J.Biosc. Bioeng.* **2005**, *100*, 1-11
- [36] Tartaj, P.; Morales, M. P.; Gonzalez-Carreno, T.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Serna, C. J. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *290-291*, 28-34.
- [37] Figueiredo, L. C., Sistemas Magnéticos Nanoparticulados à base de maghemita. Pós-graduação em Física, Tese, Universidade de Brasília, 2009.
- [38] Silveira, L. B., Estudo de propriedades magnéticas de fluidos e nanocompósitos magnéticos biocompatíveis. Pós-graduação em Física, Universidade de Brasília, 2006.
- [39] Lacava, Z. G. M.; Tedesco, A. C.; Azevedo, R. B.; Morais, P. C. In *Handbook of particulate drug delivery. Vol1: Materials and Technologies*; American Scientific Publishers: California, USA,, 2008; Vol. 1.
- [40] Leslie-Pelecky, D. L.; Rieke, R. D. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 1770-1783.
- [41] Blums, E.; Cebers, A.; M, M. M. *Magnetic Fluids*; Walter de Gruyter: Berlin, 1997.
- [42] Blums, E.; Cebers, A. O.; Maiorov, M. M. *Magnetic fluids*; de Gruyter, 1997.
- [43] Glavee, G. N.; Kernizan, C. F.; Klabunde, K. J.; Sorensen, C. M.; Hadjipanayis, G. C. *Chem. Mater.* **1991**, *3*, 967-976.
- [44] Kernizan, C. F.; Klabunde, K. J.; Sorensen, C. M.; Hadjipanayis, G. C. *J. Phys. Chem.* **1990**, *2*, 1.
- [45] Scott, J. H. J.; Majetich, S. A. *Phys. Rev. B* **1995**, *52*, 12564-12571.
- [46] McHenry, M. E.; Majetich, S. A.; Artman, J. O.; DeGraef, M.; Staley, S. W. *Phys. Rev. B* **1994**, *49*, 11358-11363.
- [47] Chinnasamy, C. N.; Narayanasamy, A.; Ponpandian, N.; Chattopadhyay, K.; Shinoda, K.; Jeyadevan, B.; Tohji, K.; Nakatsuka, K.; Furubayashi, T.; Nakatani, I. *Physical Review B* **2001**, *63*, 184108.
- [48] Kaiser, R.; Miskolczy, G. *J. Appl. Phys.* **1970**, *41*, 1064.
- [49] Rosensweig, R. E.; USA Patents: 1970.
- [50] Tourinho, F.; Franck, R.; Massart, R.; Perzynski, R. *Prog. Colloid. Polymer. Sci* **1989**, *79*, 126.
- [51] Sousa, M. H.; Tourinho, F. A.; Depeyrot, J.; Silva, G. J.; Lara, M. C. F. L. *J. Phys. Chem. B.* **2001**, *105*, 1168.
- [52] Rejandran, M.; Pullar, R. C.; Bhattacharya, A. K.; Das, D.; Chintalapud, S. N.; Majundar, C. K. *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *232*, 71.
- [53] Morais, P. C.; Garg, V. K.; Oliveira, A. C.; Silva, L. P.; Azevedo, R. B.; Silva, A. M. L.; Lima, E. C. D. *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, *225*, 37.

- [54] Kang, Y. S.; Risbud, S.; Stroev, P.; Rabolt, J. F. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 2209.
- [55] Rondinone, A. J.; Samia, A. C. S.; Zhang, Z. J. *J. Phys. Chem. B.* **2000**, *104*, 7919.
- [56] Pileni, M. P.; Moumen, N. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 1128.
- [57] Péres, J. A. L.; Quintela, M. A. L.; Mira, J.; Riva, J.; Charles, S. W. *J. Phys. Chem. B.* **1997**, *101*, 5659.
- [58] Lin, X. M.; Sorensen, C. M.; Klabund, K. J.; Hadjipanayis, G. C. *Langmuir* **1998**, *14*, 7140.
- [59] Li, S.; John, V. T.; O'Connor, C.; Harris, V. E. C. *J. Appl. Phys.* **2000**, *87*.
- [60] Thomas, J. R. *J. Appl. Phys.* **1966**, *37*, 2914-2915.
- [61] Hyeon, T.; Lee, S. S.; Park, J.; Chung, Y.; Na, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12798-12801.
- [62] Rieke, R. D.; Burns, T. P. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4323.
- [63] Rieke, R. D.; Burns, T. P. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4323.
- [64] Glavee, G. N.; Klabund, K. J.; Sorensen, C. M.; Hadjipanayis, C. G. *Langmuir* **1993**, *9*, 162.
- [65] Dragieva, I.; Stoeva, S.; Stoimenov, P.; Pavlikianov, E.; Klabund, K. J. *Nanostruct. Mater.* **1999**, *12*, 267.
- [66] Thomas, J. R. *J. Appl. Phys.* **1966**, *37*, 1310.
- [67] Thomas, J. R. Patente USA, **1966**; Num. 3.228.881
- [68] Pathmamanoharan, C.; Philipse, A. P. *J. Colloid. Interf. Sci.* **1998**, *205*.
- [69] Hess, P. H.; Jr, P. H. P. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *10*, 1915.
- [70] Suslick, K. S. *Science* **1990**, *247*, 1439.
- [71] Shafi, K. V. P. M.; Ulman, A.; Yan, X.; Yang, N.; Estourns, W. H.; Rafailovich, M. *Langmuir* **2001**, *17*, 5093.
- [72] Kang, Y. S.; Risbud, S.; Stroev, P.; Rabolt, J. F. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 2209-2211.
- [73] Mann, S.; Couling, S. B. *J. Chem. Soc. Chem Commun.* **1985**, 17-13-1715.
- [74] Bee, A.; Massart, R.; Neveu, S. *J. Magn. Magn. Mater.* **1995**, *149*, 6-9
- [75] Glavee, G. N.; Klabund, K. J.; Sorensen, C. M.; Hadjipanayis, C. G. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*.
- [76] Sousa, M. H.; Rubim, J. C.; Sobrinho, P. G.; Tourinho, F. A. *J. Magn. Magn. Mater* **2001**, *225*, 67-72.
- [77] Fanyao, Q.; Morais, P. C. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 5232-5236.
- [78] Massart, R. *IEEE Trans, Magn*, **1981**, *17*, 1247-1248.
- [79] Morais, P. C.; Gravina, P. P.; Neto, K. S.; Lacava, B. M. *Thin Solid Films* **2006**, *515*, 226.
- [80] Morais, P. C. In *III Escola Brasileira de Magnetismo Jorge André Swieca*, RS, 2001.
- [81] Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064-2110.
- [82] Dutta, P.; Manivannan, A.; Seehra, M. S.; Shah, N.; Huffman, G. P. In *Phys. Rev. B* **2004**; *70*, 174428.
- [83] Cornell, R. M.; Schwertmann, U. *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences*; Wiley-VCH, 2003.

- [84] Jolivet, J.-P.; Tronc, É.; Chanéac, C. *C. R. Geoscience* **2006**, 338 488-497.
- [85] Jolivet, J.-P.; Tronc, É.; Chanéac, C. *C. R. Chimie* **2002**, 5, 659-664.
- [86] Jolivet, J.-P.; Cassaignon, S.; Chanéac, C.; Chiche, D.; Tronc, E. *J. Sol-Gel Sci. Techn.* **2008**, 46, 299-305.
- [87] Sun, S.; Murray, C. B.; Weller, D.; Folks, L.; Moser, A. *Science* **2000**, 287, 1989 - 1992.
- [88] Sun, S.; Zeng, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8204.
- [89] Jolivet, J.-P.; Tronc, E. *J. Colloid Interf Sci* **1988**, 125, 688-701.
- [90] Jolivet, J.-P.; Tronc, E.; Chaneac, C. *Comptes rendus-Géoscience* **2006**, 338, 488-497.
- [91] Tourinho, F. A.; Frank, R.; Massart, R. *J. Mater. Sci.* **1990**, 25, 3249.
- [92] Melo, T. F. O.; Silva, S. W. d.; Soler, M. A. G.; Lima, E. C. D.; Morais, P. C. *Surf. Sci.* **2006**, 600, 3642-3645.
- [93] Lacava, B. M.; Azevedo, R. B.; Silva, L. P.; Lacava, Z. G. M.; Neto, K. S.; Buske, N.; Bakuzis, A. F.; Morais, P. C. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 77, 1876.
- [94] Zins, D.; Cabuil, V.; Massart, R. *J. Mol. Liq.* **1999**, 83, 217.
- [95] Wilson, S. R.; Ridler, P. J.; Jennings, B. R. *J. Phys., D, Appl. Phys* **1996**, 29, 885.
- [96] Davies, H. W.; Llewellyn, J. P. *J. Phys., D, Appl. Phys.* **1979**, 12, 311.
- [97] Tronconi, A. L.; Morais, P. C.; Pelegrini, F.; Tourinho, F. A. *J. Magn. Magn. Mater.* **1993**, 122.
- [98] Bakuzis, A. F.; Morais, P. C.; Tourinho, F. A. *J. Magn. Reson. A* **1996**, 122, 100.
- [99] Lacava, L. M.; Lacava, B. M.; Azevedo, R. B.; Lacava, Z. G. M.; Buske, N.; Tronconi, A.; Morais, P. C. *J. Magn. Magn. Mater.* **2001**, 225, 79.
- [100] Morais, P. C.; Silva, O.; Alonso, A.; Buske, N. *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, 252, 52.
- [101] Morais, P. C.; Lara, M. C. F. L.; Tronconi, A. L.; Tourinho, F. A.; Pereira, A. R.; Pelegrini, F. *J. Appl. Phys.* **1996**, 79, 70.
- [102] Morais, P. C.; Tourinho, F. A.; Gonçalves, G. R. R.; Tronconi, A. L. *J. Magn. Magn. Mater.* **1995**, 149, 19.
- [103] Bakuzis, A. F.; Morais, P. C.; Pelegrini, F. *J. Appl. Phys.* **1999**, 85, 7480.
- [104] Morais, P. C.; Silva, S. W. d.; Soler, M. A. G.; Sousa, M. H.; Tourinho, F. A. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, 201.
- [105] Morais, P. C.; Silva, S. W.; Soler, M. A. G.; Buske, N. *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 105.
- [106] Oliveira, A. C.; Tronconi, A. L.; Buske, N.; Morais, P. C. *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, 252, 56.
- [107] Santos, J. G.; Silveira, L. B.; Oliveira, A. C.; Morais, P. C. *J. Phys. IV* **2005**, 125.
- [108] Morais, P. C.; Oliveira, A. C.; Tronconi, A. L.; Gansau, C.; Goetze, T.; Buske, N. *IEEE Trans. Magn.* **2003**, 39.
- [109] Morais, P. C.; Tronconi, A. L.; Oliveira, A. C.; Santos, R. L.; Lima, E. C. D. *J. Phys. IV* **2005**, 125, 27.
- [110] Hunter, R. J. *Foundations of Colloid Science* Oxford 1986.
- [111] Ferre, J.; Gehring, G. A. *Rep. Progr. Phys.* **1984**, 47, 513-611.

- [112] Gravina, P. P., Estudo de fluidos magnéticos concentrados por birrefringência magnética estática. Pós-graduação em Física, Universidade de Brasília, 2005.
- [113] SkeffNeto, K.; Bakuzis, A. F.; Morais, P. C.; Pereira., A. R.; Azevedo, R. B.; Lacava, L. M.; Lacava, Z. G. M. *J. Appl. Phys.* **2001**, *89*, 3362.
- [114] Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. *J Phys D Appl Phys* **2003**, *36*, R167-R181.
- [115] Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. *FASEB J* **2005**, *19*, 311-330.
- [116] Nie, S.; Xing, Y.; Kim, G. J.; Simons, J. W. *Annu Ver Biomed Eng* **2007**, *9*, 257-288.
- [117] Neuberger, T.; Schopf, B.; Hofmann, H.; Hofmann, M.; Rechenberg, B. v. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293* 483-496.
- [118] Dobrovolskaia, M. A.; McNeil, S. E. *Nat Nanotechnol* **2007**, *2*, 469-478.
- [119] Simioni, A. R.; Martins, O. P.; Lacava, Z. G. M.; Azevedo, R. B.; Lima, E. C. D.; Lacava, B. M.; Morais, P. C.; Tedesco, A. C. *J. Nanosci. Nanotech.* **2006**, *6*, 2413-2415.
- [120] Saldanha, C. A., Avaliação in vitro da citotoxicidade e genotoxicidade dos polímeros de albumina magnéticos. Pós-graduação em Biologia Animal. Universidade de Brasília, 2007.
- [121] Estevanato, L. L. C., Investigação da biocompatibilidade de polímeros de albumina magnéticos. Pós-graduação em Biologia Animal. Universidade de Brasília, 2008.
- [122] Silva, D. C. Polímeros de albumina magnéticos em sistema nervoso de camundongos: análise histológica e ultra-estrutural. Pós-graduação em Biologia Celular. Universidade de Brasília, 2007.

**ANEXOS**  
**ARTIGOS PUBLICADOS**



# Birefringence of maghemite-based magnetic fluid in the highly concentrated regime

P.C. Morais\*, P.P. Gravina, K. Skeff Neto, B.M. Lacava

*Universidade de Brasília, Instituto de Física, Núcleo de Física Aplicada, 70919-970, Brasília-DF, Brazil*

Available online 18 January 2006

## Abstract

The transmitted light intensity of a series of ionic magnetic fluid samples based on maghemite nanoparticles was investigated using the typical birefringence experimental setup. The field dependence of the transmitted light intensity evolves from a peak-like profile to a typical second-order Langevin profile as the nanoparticle volume fraction reduces from 2.4% to 0.9% volume fraction. The onset of the peak-like profile as the nanoparticle volume fraction increases is accounted for by two points, namely the transmitted light first scales with a sine function and second the birefringence signal appears in the argument of the sine function. The observed negative differential transmitted light is explained as one brings the above-mentioned sine dependence into the nowadays used model for the analysis of birefringence in magnetic fluids.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Magnetic fluids; Ferrofluids; Birefringence; Negative differential transmitted light

## 1. Introduction

Magnetic fluids (MFs) are ultra-stable colloidal systems consisting of monodomain magnetic nanoparticles suspended in organic or inorganic liquid carrier, while the nanoparticle concentration may go up to 10% volume fraction [1]. In ionic MFs the colloidal stability is mainly achieved through the electrostatic repulsion among the positively or negatively charged nanoparticles [2]. In that case the surface charge density and the ionic strength of the medium need to be precisely controlled in such a way that electrostatic repulsion does overcome the magnetic dipolar attraction that favors nanoparticle aggregation. In the usual ionic ferrite-based MF low pH aqueous medium sets in a positive charge density, due to proton transfer from the medium to the nanoparticle surface. By contrast, negative surface charge density is obtained at high pH values as a result of the proton transfer from the nanoparticle surface out to the aqueous medium, thus leaving behind negatively charged oxygen atoms at the nanoparticle surface. A microscopic model for the pH-dependent surface charge–discharge process in metal oxide-based ionic MFs

involves the proton tunneling across a strongly bonded water layer around the nanoparticle surface [3]. In surface-coated MFs, however, molecular species attached to the nanoparticle surface maintain colloidal stability, once steric repulsion among the coated magnetic nanoparticles overcomes the magnetic dipolar attraction [4]. The outer ends of the surface molecular coating in surface-coated MFs may be either polar or non-polar, thus resulting for instance in stable aqueous-based MFs or stable hydrocarbon-based MFs, respectively. In addition to the nanoparticle electrostatic repulsion and dipolar attraction competition between thermal energy and Van der Waals interaction plays an important role in the magnetic colloidal stability as well. While thermal energy favors colloidal stability by taking magnetic nanoparticles apart Van der Waals interaction tend to stick nanoparticles together favoring aggregation.

A wide variety of experimental techniques has been used to investigate the fundamental properties of ionic and surface-coated MFs. The traditional techniques used in the investigations are the high-resolution microscopy [5], X-ray diffraction [6], static magnetic birefringence [7], and magnetometry [8]. Since the last decade magnetic resonance has been systematically used as a valuable tool in the investigation of several properties of MFs [9]. The magnetic resonant center used in the

\* Corresponding author. Tel.: +55 61 32736655; fax: +55 61 32723151.

E-mail address: [pcmor@unb.br](mailto:pcmor@unb.br) (P.C. Morais).

investigation of MFs is either the magnetic nanoparticle itself [10] or a paramagnetic probe intentionally introduced as a dopant in the carrier fluid [11]. Effects of particle concentration [12], ionic strength [13], particle size and temperature [14] have been investigated using the nanoparticle itself as the resonant probe. More recently Raman spectroscopy emerged as a powerful technique to investigate qualitatively as well as quantitatively nanoparticle surface chemisorbed species. Raman spectroscopy has been used to investigate the interactions of the molecular species chemisorbed at the nanoparticle surface of copper and zinc-ferrite ionic MFs [15]. Also, the single surface-coated MF based on dodecanoic acid (first coating) and diluted in hydrocarbon and the double surface-coated MF based on dodecanoic acid (first coating) following an ethoxylated polyalcohol (second coating) and peptized in water were investigated using Raman spectroscopy [16]. Even more recently, photoacoustic spectroscopy has been introduced as a very promising experimental technique for investigation of MF samples [17]. Despite the simplicity of the photoacoustic spectroscopy the experimental data taken from thin MF films revealed important details regarding the core nanoparticle properties [18], the surface nanoparticle structure [19], and the nanoparticle coating layer characteristics [20].

Static magnetic birefringence (SMB) measurements have been long used as a standard way to investigate magnetic fluid samples [21–25]. This is simply because when polarized light is shining normal to a thin film of magnetic fluid with its electric polarization parallel to the magnetic field one observes a higher refractive index (positive birefringence) than the one experienced by light polarized perpendicular to the field. Though static magnetic birefringence in MFs has been described by many authors over the last five decades there are still many open points regarding the origin and the physical description of the effect. Yet, the observation of the effect in the limit of very concentrated MF samples has been made possible only recently after the synthesis of highly transparent samples [26]. In this study we present static magnetic birefringence measurements as a function of the nanoparticle concentration close to the upper limit of concentrations. The first approach for the interpretation of the SMB experimental data is presented as well.

## 2. Static magnetic birefringence

Orientation of a slightly non-spherical isolated nanoparticle accounts for very small SMB signal only, while large SMB signal experimentally observed in MFs is more likely due to field orientation of preexisting aggregates [24]. Though nanoparticle aggregation also influences the dichroism of MF samples the effect is typically one order of magnitude smaller than birefringence [24]. This means that dichroism usually adds little deviations in the birefringence data. Evidences that nanoparticle aggregation (chain-like structure) respond for the optical birefringence in MFs have been long available both from theoretical considerations [27] as well as from experimental observations [28,29]. Monte Carlo simulation showed that the large SMB signal is mainly caused by the combined

effects of field-dependent chain-like formation and field-induced orientation of chains [30]. Xu and Ridler [31] have succeeded in explaining the SMB data obtained by Sakhnini and Popplewell [32] based on the oscillating dipole-interaction anisotropy concept, which includes contributions of isolated nanoparticles (monomers) and nanoparticle aggregates (dimers, trimers, ...). The temperature, particle size, and concentration dependence of the zero-field birefringence observed in ionic MFs were explained assuming preexisting dimers in the sample [33]. Irreversibility of the zero-field birefringence in MFs upon temperature reversal was also explained through the picture of a thermal disruption of dimers [34]. In fact, earlier SMB experiments performed in the low-field region have showed the signature of the zero-field birefringence [35].

On the other hand evidences that the field ( $H$ ) dependence of the magnetic permeability ( $\mu$ ) in a multi-domain ferrimagnetic-based material follows a sort of asymmetric bell-shaped curve have been long available in the literature [36]. Likewise, the field dependence of the magnetic susceptibility ( $\chi$ ) follows an asymmetric bell-shaped diagram [36]. The permeability curve peaks at the field value corresponding to the knee of the  $B-H$  diagram, i.e., at the field where magnetization reaches its maximum value. In fact, the linear relationship between magnetic permeability and magnetic field, in the very low-field regime, is the well-known Rayleigh law [37]. From the microscopic viewpoint, however, the field dependence of the magnetic permeability depends upon two distinct mechanisms, namely domain wall motion and domain magnetic moment rotation [38]. Nevertheless, it has been found experimentally that a more generalized dependence of the relative magnetic permeability upon the magnetic field would be written as  $\mu_r = \alpha + f(H)$  [39]. Note that domain magnetic moment rotation does take place in a chain-like structure containing single-domain ferrimagnetic nanoparticles. In fact, chain-like structures can be seen as extrinsic multi-domain effective particles, i.e., interaction domains. Therefore, it is quite obvious that rotational magnetic permeability ( $\mu_Q^r$ ) as well as rotational magnetic susceptibility ( $\chi_Q^r$ ) may be associated to a linear chain of monodomain magnetic nanoparticles consisting of  $Q$  single units ( $Q > 1$ ). In addition, it is quite reasonable to assume that a bell-shaped function would describe the rotational magnetic susceptibility of the chain-like structure, i.e.,  $\chi_Q^r = M_Q / H_A^Q$ , where  $M_Q$  and  $H_A^Q$  are the magnetization and anisotropy field associated to the chain-like structure consisting of  $Q$  single units ( $Q$ -chain), respectively. Among the asymmetric functions used to describe the field dependence of the reduced rotational susceptibility the log-normal one is a good candidate. Note that the log-normal function has been successfully used to describe the anisotropy field distribution associated to uniaxial nanomagnetic particles [40]. Indeed, the magnetization associated to the  $Q$ -chain will be taken as  $M_Q = [1 + \beta C_Q P_Q(H)] M_S$ , with  $P_Q(H)$  given by the log-normal function,  $C_Q$  representing the fraction related to each  $Q$  component, and  $\beta$  a constant obtained from the fitting of the SMB data. Complete determination of  $P_Q(H)$  is obtained from the modal field ( $\langle H_Q \rangle$ ) and zeroth-order logarithmic standard deviation ( $\sigma_Q$ ) associated to the particular  $Q$ -chain.

The two key aspects discussed above, namely the magnetic texture of particle agglomerates and the field dependence of the magnetic permeability were brought into the oscillating dipole-interaction anisotropy concept to produce the actual description of the SMB signal observed from magnetic fluid samples. These two key aspects have been extensively discussed in the literature [41]. At this point we should emphasize that particle diameter dispersion, described through the modal diameter ( $\langle D \rangle$ ) and the zero-order logarithmic standard deviation ( $\sigma$ ) of the log-normal distribution, is also included in the actual description of the SMB signal recorded from magnetic fluid samples. The normalized SMB signal ( $\Delta\bar{n} = \Delta n/n_s$ ) is written as [41]

$$\Delta\bar{n}(H; \langle H_Q \rangle, \sigma_Q, \langle D \rangle, \sigma) = A \frac{\int \left[ \sum_Q C_Q \Delta n_Q(H, D) \right] D^3 P(D) dD}{\int D^3 P(D) dD}, \quad (1)$$

with

$$\Delta n_Q(H, D) = \left[ 1 - \frac{3}{\xi_Q} \coth \xi_Q + \frac{3}{\xi_Q^2} \right], \quad (2)$$

where  $\xi_1 = (\pi/6)\mu_0 M_S D^3 H/kT$  and  $\xi_Q = Q\xi_1 [1 + \beta C_Q P_Q(H)]$  for  $Q > 1$ . In Eq. (1)  $A = (\pi/12)(\chi_{||} - \chi_{\perp})n_0\phi$ , where  $n_0$  is the refraction index of the carrier liquid,  $\chi_{||}(\chi_{\perp})$  is the effective dielectric susceptibility of the magnetic nanoparticle parallel (perpendicular) to the anisotropy axis and  $\phi$  is the nanoparticle volume fraction in the MF sample [31]. The integral in Eq. (1) is carried out over the particle diameter distribution while the summation takes into account the particle aggregation with  $C_Q$  constrained by  $\sum_Q C_Q = 1$ .

### 3. Results and discussion

The maghemite-based ionic MF sample used in this study was prepared according to the standard three-step procedure described in the literature [42]. In the first step, the nanoparticles were synthesized by precipitating Fe(III) in

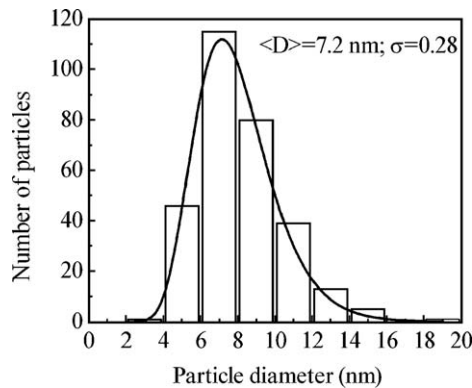


Fig. 1. The particle size distribution of the  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles obtained from the TEM pictures. Vertical bars represent the experimental data whereas the solid line represents the best fit of the particle diameter histogram with a log-normal distribution function.

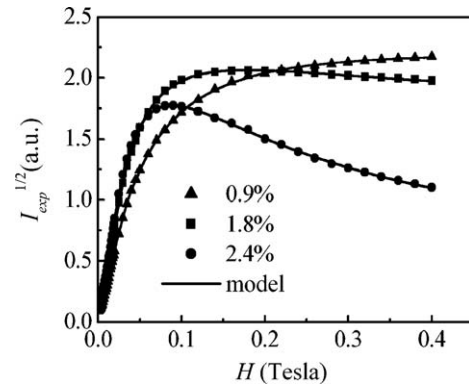


Fig. 2. Square root of the transmitted light intensity ( $I_{\text{exp}}^{1/2}$ ) versus field ( $H$ ) for the maghemite-based magnetic fluid samples. Solid circles represent the sample with particle volume fraction  $\phi = 2.4\%$ , solid squares represent data from sample with  $\phi = 1.8\%$ , and solid triangles represent data from sample with  $\phi = 0.9\%$ . The solid lines are the best curve fitting using Eqs. (1) and (2) and the relationship  $I_{\text{exp}} \propto I_{\text{exp}}^0 \sin^2(\pi L \Delta n / \lambda)$ .

alkaline medium. In the second step, passivation of the nanoparticle surface is performed by Fe(III) enrichment, after treatment with ferric nitrate at boiling temperature. In the third step, peptization of the nanoparticle as stable ionic MF was obtained by controlling the surface charge density while reducing the ionic strength of the aqueous medium. Perchloric acid was used to set the low pH of the final product. The nanoparticle size and size dispersity were obtained from the transmission electron microscopy (TEM) micrographs using a Jeol JEM-1010 electron microscope. A drop of the MF sample containing about 0.00003% volume fraction was deposited on the sample holder (a 300 mesh copper grid covered with formvar) and dried at room temperature, in ambient air, before the TEM pictures were taken. Fig. 1 shows the particle size histogram for the  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles obtained from about 300 counts using the TEM pictures. The experimental data were curve fitted using a log-normal distribution function and allowed us to obtain the modal diameter (7.2 nm) and the zeroth-order logarithmic standard deviation (0.28).

The room-temperature static magnetic birefringence data were obtained using the traditional lock-in detection technique. The experimental setup consists of a chopped laser beam ( $\lambda = 632 \text{ nm}$ ) crossing perpendicularly the sample cell before illumination of the photodetector. The sample cell consists of a quartz-made flat sample holder attached to a double goniometer-like device that allows full angular rotation of both polarizer and analyzer. The sample cell is mounted in the gap of an electromagnet so that the laser beam and the external magnetic field are perpendicular to one another. The effective sample thickness is  $L = 1 \text{ mm}$  and the axes of the polarizer and analyzer are set perpendicular to each other during SMB measurements. Symbols in Fig. 2 shows the square root of the transmitted light intensity ( $I_{\text{exp}}^{1/2}$ ) versus applied field ( $H$ ) recorded from the MF samples containing 2.4% (solid circles), 1.8% (solid squares), and 0.9% (solid triangles) nanoparticle volume fraction. Even for the highest nanoparticle volume fraction ( $\phi = 2.4\%$ ) it is important to point out that no visible induce phase separation was observed in the magnetic field range of our experiment, so light scattering from induced

droplets could be ruled out. In Fig. 2 the solid lines going through the experimental points represent the best curve fitting according to the model described below.

The static magnetic birefringence ( $\Delta n$ ) in MFs has been successfully described through Eqs. (1) and (2), including here the sample polydispersity profile, the onset of nanoparticle agglomeration, and the field dependence of the magnetic permeability. At this point one should remind that in the conventional SMB experimental setup the transmitted light intensity ( $I_{\text{exp}}$ ) scales with the birefringence signal ( $\Delta n$ ) according to  $\Delta n \approx \sqrt{I_{\text{exp}}}$ . More precisely, the transmitted light intensity scales with the birefringence signal through  $I_{\text{exp}} \propto I_{\text{exp}}^0 \sin^2(\frac{\pi L}{\lambda} \Delta n)$  [1]. Note that under the usual experimental conditions ( $\pi L \Delta n / \lambda \ll 1$ ) the birefringence is proportional to the square root of the intensity signal. In the present study, however, the nanoparticle volume fraction spans in the upper concentration limit, from 0.9% to 2.4% nanoparticle volume fraction, and therefore  $\pi L \Delta n / \lambda \ll 1$  is no longer fulfilled. This means that the birefringence signal has to be analyzed under the sine function argument. The excellent agreement between the experimental data (solid symbols) and the fitting (solid lines), as shown in Fig. 2 for the nanoparticle volume fraction range of 0.9% to 2.4%, strongly supports the effect of the nanoparticle concentration upon the MF birefringence signal. In the present study the onset of the low-field maximum observed in the  $I_{\text{exp}}^{1/2}$  versus  $H$  curve, associated to the concentrated MF sample (2.4%), is more likely due to the modulation introduced by the birefringence in the argument of the sine function. Fig. 2 shows that as the nanoparticle volume fraction reduces from 2.4% down to 1.8% the low-field maximum in the  $I_{\text{exp}}^{1/2} \times H$  curve is almost washed away. In the lowest nanoparticle volume fraction used in this study (0.9%) the  $I_{\text{exp}}^{1/2} \times H$  curve shows the typical Langevin-like profile. Note that the same argument has been recently used to explain the optical transmittivity of a highly concentrated cadmium ferrite-based magnetic fluid sample [26]. Important to note that magnetic resonance experiments performed with surface-coated MF samples support the picture of disruption of chain-like structures upon sample dilution [43]. Indeed, the fitting procedure performed in the present study provides the  $C_Q$  values, i.e. the fraction related to each  $Q$  component of a particular MF sample. From the analysis of the  $I_{\text{exp}}^{1/2} \times H$  curve, for instance related to the  $\phi=2.4\%$  MF sample, one obtains the following values for  $C_1=0.57$ ,  $C_2=0.32$ , and  $C_3=0.11$ .

#### 4. Conclusion

In summary, we have investigated the birefringence of a maghemite-based ionic magnetic fluid sample in the concentration range of 0.9% to 2.4% nanoparticle volume fraction. The onset of a maximum in the low-field end of the  $I_{\text{exp}}^{1/2} \times H$  curve associated to the highest nanoparticle concentration (2.4% volume fraction) was explained by the modulation introduced due to the presence of the birefringence signal in the argument of the sine function connected to the transmitted light intensity. As the volume fraction reduces the sine function may

be approximated by its argument and the modulation behaviour washes away, thus explaining the Langevin-like behaviour of the typical  $\Delta n \times H$  curve. Indeed, the present study reveals a simple way to control the observed negative differential characteristic in the  $I_{\text{exp}}^{1/2} \times H$  curve, which may be used as a key property for optical device applications.

#### Acknowledgments

This work was partially supported by the Brazilian agencies FINATEC and CNPq.

#### References

- [1] B. Berkovski, V. Bashtovoy, *Magnetic Fluids and Applications Handbook*, UNESCO Series of Learning Materials, New York, NY, 1996.
- [2] R. Massart, *IEEE Trans. Magn.* 17 (1981) 1247.
- [3] Q. Fanyao, P.C. Morais, *J. Chem. Phys.* 111 (1999) 8588.
- [4] N. Buske, *Prog. Colloid & Polym. Sci.* 95 (1994) 175.
- [5] B.M. Lacava, R.B. Azevedo, L.P. Silva, Z.G.M. Lacava, K. Skeff Neto, N. Buske, A.F. Bakuzis, P.C. Morais, *Appl. Phys. Lett.* 77 (2000) 1876.
- [6] D. Zins, V. Cabuil, R. Massart, *J. Mol. Liq.* 83 (1999) 217.
- [7] S.R. Wilson, P.J. Ridler, B.R. Jennings, *J. Phys., D, Appl. Phys.* 29 (1996) 885.
- [8] H.W. Davies, J.P. Llewellyn, *J. Phys., D, Appl. Phys.* 12 (1979) 311.
- [9] A.L. Tronconi, P.C. Morais, F. Pelegrini, F.A. Tourinho, *J. Magn. Magn. Mater.* 122 (1993) 90.
- [10] A.F. Bakuzis, P.C. Morais, F.A. Tourinho, *J. Magn. Reson. A* 122 (1996) 100.
- [11] P.C. Morais, O. Silva, A. Alonso, N. Buske, *J. Magn. Magn. Mater.* 252 (2002) 53.
- [12] P.C. Morais, M.C.F.L. Lara, A.L. Tronconi, F.A. Tourinho, A.R. Pereira, F. Pelegrini, *J. Appl. Phys.* 79 (1996) 7931.
- [13] P.C. Morais, F.A. Tourinho, G.R.R. Gonçalves, A.L. Tronconi, *J. Magn. Magn. Mater.* 149 (1995) 19.
- [14] A.F. Bakuzis, P.C. Morais, F. Pelegrini, *J. Appl. Phys.* 85 (1999) 7480.
- [15] P.C. Morais, S.W. da Silva, M.A.G. Soler, M.H. Sousa, F.A. Tourinho, *J. Magn. Magn. Mater.* 201 (1999) 105.
- [16] P.C. Morais, S.W. da Silva, M.A.G. Soler, N. Buske, *J. Phys. Chem. A* 104 (2000) 2894.
- [17] A.C. Oliveira, A.L. Tronconi, N. Buske, P.C. Morais, *J. Magn. Magn. Mater.* 252 (2002) 56.
- [18] J.G. Santos, L.B. Silveira, A.C. Oliveira, P.C. Morais, *J. Phys. IV* 125 (2005) 27.
- [19] P.C. Morais, A.C. Oliveira, A.L. Tronconi, C. Gansau, T. Goetze, N. Buske, *IEEE Trans. Magn.* 39 (2003) 2654.
- [20] P.C. Morais, A.L. Tronconi, A.C. Oliveira, R.L. Santos, E.C.D. Lima, *J. Phys. IV* 125 (2005) 505.
- [21] H.W. Davies, J.P. Llewellyn, *J. Phys., D, Appl. Phys.* 12 (1979) 311.
- [22] H.W. Davies, J.P. Llewellyn, *J. Phys., D, Appl. Phys.* 12 (1979) 1357.
- [23] J.P. Llewellyn, *J. Phys., D, Appl. Phys.* 16 (1983) 95.
- [24] P.C. Scholten, *IEEE Trans. Magn.* 16 (1980) 221.
- [25] Y.N. Skibin, V.V. Chekanov, Y.L. Raikher, *Sov. Phys. JETP* 45 (1977) 496.
- [26] A.F. Bakuzis, K. Skeff Neto, P.P. Gravina, L.C. Figueiredo, P.C. Morais, L.P. Silva, R.B. Azevedo, O. Silva, *Appl. Phys. Lett.* 84 (2004) 2355.
- [27] P.G. de Gennes, P. Pincus, *Phys. Kondens. Mater.* 11 (1970) 189.
- [28] N.A. Yusuf, D.A. Manasrah, M.A. Abdallah, H. Abu-Safia, I. Abu-Aljarayesh, *J. Magn. Magn. Mater.* 138 (1994) 173.
- [29] C.Y. Hong, *J. Appl. Phys.* 85 (1999) 5962.
- [30] Y.T. Pan, C.W. Du, X.D. Liu, Z.G. Li, R. Birngruber, *J. Appl. Phys.* 73 (1993) 6142.
- [31] M. Xu, P.J. Ridler, *J. Appl. Phys.* 82 (1997) 326.
- [32] L. Sakhnini, J. Popplewell, *J. Magn. Magn. Mater.* 122 (1993) 142.



- [33] A.F. Bakuzis, M.F. da Silva, P.C. Morais, L.S.F. Olavo, K. Skeff Neto, *J. Appl. Phys.* 87 (2000) 2497.
- [34] A.F. Bakuzis, M.F. da Silva, P.C. Morais, K. Skeff Neto, *J. Appl. Phys.* 87 (2000) 2307.
- [35] S. Taketomi, N. Inaba, H. Takahashi, H. Miyajima, *J. Phys. Soc. Jpn.* 59 (1990) 3077.
- [36] A.S. Boxer, J.F. Ollom, R.F. Rauchmiller, *Handbook of Microwave Ferrite Materials*, Academic Press, New York, NY, 1965.
- [37] B.D. Cullity, *Introduction to Magnetic Materials*, Addison-Wesley, Reading, MA, 1972.
- [38] J.E. Knowles, *J. Physique C1 (Suppl. 4)* (1977) 27.
- [39] G. Bertotti, F. Fiorillo, M. Pasquale, *J. Appl. Phys.* 69 (1991) 5930.
- [40] G. Bottoni, D. Candolfo, A. Cecchetti, *J. Magn. Magn. Mater.* 195 (1999) 754.
- [41] K. Skeff Neto, A.F. Bakuzis, P.C. Morais, A.R. Pereira, R.B. Azevedo, L.M. Lacava, Z.G.M. Lacava, *J. Appl. Phys.* 89 (2001) 3362.
- [42] P.C. Morais, V.K. Garg, A.C. Oliveira, L.P. Silva, R.B. Azevedo, A.M.L. Silva, E.C.D. Lima, *J. Magn. Magn. Mater.* 225 (2001) 37.
- [43] P.C. Morais, G.R.R. Gonçalves, K. Skeff Neto, F. Pelegrini, N. Buske, *IEEE Trans. Magn.* 38 (2002) 3225.

# Cell Toxicity Studies of Albumin-Based Nanosized Magnetic Beads

A. R. Simioni<sup>1</sup>, O. P. Martins<sup>1</sup>, Z. G. M. Lacava<sup>2</sup>, R. B. Azevedo<sup>2</sup>, E. C. D. Lima<sup>3</sup>,  
B. M. Lacava<sup>4</sup>, P. C. Morais<sup>4</sup>, and A. C. Tedesco<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Química, Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto-SP, Brazil*

<sup>2</sup>*Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, 70910-900, Brasília-DF, Brazil*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, 74001-970, Goiânia-GO, Brazil*

<sup>4</sup>*Universidade de Brasília, Instituto de Física, Núcleo de Física Aplicada, 70919-970, Brasília-DF, Brazil*

The aim of this study was to prepare bovine serum albumin-based beads containing maghemite nanoparticles incorporated via ionic magnetic fluid and to evaluate the cell toxicity of this biocompatible system using the J774-A1 cell line. Transmission electron micrographs obtained from the magnetic fluid sample were used to estimate the average particle diameter around 7.6 nm and diameter dispersion of 0.22. The BSA-based magnetic beads were prepared using the heat protein denaturation route. The nanoparticle concentration in the magnetic fluid sample used for the synthesis of the magnetic beads was in the range of  $1.2 \times 10^{16}$  to  $2.3 \times 10^{17}$  particle/ml. The methodology used to investigate the cell toxicity of the magnetic beads was the classical MTT assay. Our observation showed that the toxicity against the J774-A1 cell line depends upon the amount of magnetic material incorporated into the magnetic nanobeads and was found to be 14, 11, 9, 5, and 3% for  $2.3 \times 10^{17}$ ,  $1.2 \times 10^{17}$ ,  $4.6 \times 10^{16}$ ,  $2.3 \times 10^{16}$ , and  $1.2 \times 10^{16}$  particle/ml, respectively.

**Keywords:** Magnetic Nanobeads, Magnetic Fluid, Cell Toxicity, Nanobiotechnology.

## 1. INTRODUCTION

The interest in nanoparticle-based systems as drug delivery system (DDS) has been growing exponentially in the last decade. Their applications have been considered and suitable in several areas, as for instance in medicine, dentistry, and esthetics.<sup>1–4</sup> The development of nanoparticle-based systems for drug delivery has demonstrated that such formulations present appropriate stability, higher absorption rates by the biological tissues, and excellent targeting specificity, all these properties associated to controlled release, quantitative transfer, and high pharmacodynamic activity inside the organism, as expected from new generations of drugs. The extremely reduced size of the particles (50–300 nm) has been associated to the increase in the incorporation rates, transfer and tolerance to the targeted tissues. The preparation, characterization, and isolation of these nanostructured materials are based on classic technologies, thoroughly described in several works and book chapters.<sup>5</sup>

As the nanostructured DDS research work increased in the last few years there has been an increasing interest in using aqueous and non-aqueous magnetic fluids (MFs) as an intermediate material in the production of biocompatible nanocomposites, particularly as magnetic micron and submicron-beads. Considering the impact the use of such systems may cause onto several biological aspects the studies of specific, non-covalent binding of molecular-coated magnetic nanoparticles (MCMNs) to serum and lipoproteins and other biological macromolecules have been recently described, opening up a new research area.<sup>6</sup> The binding characteristic of serum albumins and low density lipoproteins determines the drug biodistribution throughout the systemic circulation and are responsible for the pharmacological effects upon the organism.<sup>7</sup> This is a key aspect for the development of biomacromolecules-based complexes directing their localization to a specific biological site.

The aim of this study was to prepare bovine serum albumin-based nanosized beads containing maghemite nanoparticles incorporated them via ionic magnetic fluids and to evaluate the cell toxicity of this biocompatible system in the J774-A1 cell line.

\*Author to whom correspondence should be addressed.

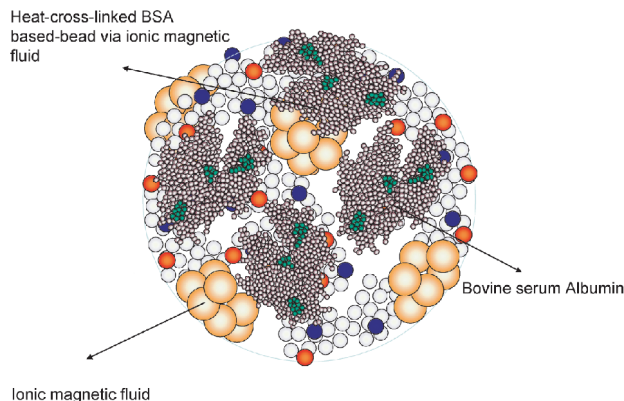
## 2. EXPERIMENTAL DETAILS

The ionic magnetic fluid sample used in this study is based on maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) nanoparticles stabilized as a low-pH aqueous colloid. The morphological characterization of the as produced maghemite nanoparticles has been carried out using transmission electron microscopy (TEM). The stability of the preparation is in agreement with the average stability of BMF. The ionic fluid was used to prepare the serum albumin nanobeads.

The sunflower oil and the Span-80 were obtained from Aldrich Chemical Company whereas the bovine serum albumin was obtained from Calbiochem. The 2-propanol, analytical grade, was used as received. The BSA nanoparticle used in this study was prepared according to the method of heat denaturation using mechanical stirring process at high-speed from an ultra-turrax setup to optimize the preparation of the nanoparticles. The entrapped material (in this case the ionic magnetic fluid) was initially dispersed in the albumin aqueous phase. The aqueous solutions of BSA (250 mg/ml) and five different magnetic fluid samples containing  $2.3 \times 10^{17}$ ,  $1.2 \times 10^{17}$ ,  $4.6 \times 10^{16}$ ,  $2.3 \times 10^{16}$ , and  $1.2 \times 10^{16}$  particle/ml, were prepared in saline phosphate buffer (PBS) at pH = 7.4. Two hundred and fifty  $\mu\text{L}$  of each magnetic fluid sample was dropped over 250  $\mu\text{L}$  solution of BSA under constant stirring for 60 minutes at room temperature, to prepare the initial solution.

At the same time 30 ml of the sunflower oil (containing 1% of Span 80, v/v) was initially cooled down to 4 °C and added to a boiling flask of 100 ml. The magnetic fluid/albumin initial solution was dropped to the flask (at a rate of 6 drops per minute) with continuous stirring using the ultra-turrax setup (13000 rpm) for 10 minutes while the temperature of the system was fixed at 4 °C. The mixture was then emulsified by ultrasound for 30 minutes at 125 W and 4 °C, using an ultra-sound device.

In another boiling flask 70 ml of sunflower oil (containing 1% of Span 80) was pre-heated at 100 °C under continuous agitation for 30 minutes. The initial emulsion obtained as described above was gently dropped directly to the pre-heated sunflower oil in the boiling flask in a total time of 15 minutes. After the formation of the initial emulsion the whole system was stirred at 13000 rpm for 20 minutes at 100 °C. The final suspension was then cooled down to room temperature under continuous magnetic stirring. The obtained nanoparticles were washed with ethyl ether ( $3 \times 30$  ml) for oil separation, following centrifugation at 10000 rpm for 30 minutes. After washing the "pellet" containing the nanoparticles was lyophilized to remove any remaining water trace and stocked at 4 °C. The five albumin-based nanosized magnetic bead samples were labeled BSA1 to BSA5 according to the nanoparticle concentration of the ionic magnetic fluid used in their preparation. For the preparation of the BSA1, BSA2, BSA3, BSA4, and BSA5 beads the



**Fig. 1.** Schematic representation of the serum albumin nanobeads useful for a DDS setup.

magnetic fluid concentration was  $2.3 \times 10^{17}$ ,  $1.2 \times 10^{17}$ ,  $4.6 \times 10^{16}$ ,  $2.3 \times 10^{16}$ , and  $1.2 \times 10^{16}$  particle/ml, respectively. Figure 1 shows the schematic representation of the nanobeads structure obtained. The lyophilized material was stocked protected by light for a period of 3 months, without any morphological alteration. The prepared nanosized beads can be used for *in vitro* as well as for *in vivo* studies, using cell lines and animal models.

The cell line used in this study was the mouse macrophage carcinoma J774-A1 supplied by ATCC. J774-A1 cells was grown in 60 cm<sup>2</sup> flasks and maintained in RPMI-1640 medium (Gibco) complemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 1% L-glutamine, and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). The cells were used in the logarithmic phase of growth and cultured in a humidified incubator at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. The methodology used to evaluate the albumin-based nanosized magnetic beads toxicity was the classical MTT assay. The absorbance was measured at 560 and 690 nm with Molecular Devices VersaMax Tunable Microplate Reader (ELISA). The percentage of cell viability was calculated with respect to the control cells incubated without the nanosized magnetic beads.

The J774-A1 cells were incubated with the nanosized magnetic beads (BSA1, BSA2, BSA3, BSA4, and BSA5) in Hank's for 30 minutes. After incubation, the cells were washed twice and the volume was completed with the addition of 200  $\mu\text{L}$  RPMI-1640 in each well, for 24 h. The 0.5 mg/mL MTT solution (100  $\mu\text{L}$  per well) was added to the cells on 96-well plates, followed by incubation for 4 h, at 37 °C. So, the crystals formed due to the interaction between the mitochondrial dehydrogenases and the MTT reagent were dissolved with 2-propanol. And the samples were shaken until complete dissolution of the formed product. After this step, the absorbance was measured and the viability was calculated as described above. All experiments were done in duplicate and the statistical significance (*p*-value) was determined using Student's *t*-test. *P*-values <0.05 mean the results are significant. After this

time the cells were washed and realized the MTT assay, for determination the toxicity of the microparticles MF.

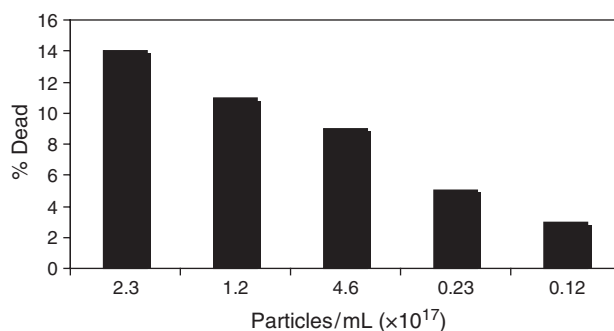
### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The morphological characterization of the produced maghemite nanoparticles by transmission electron microscopy (TEM) showed that the particle size histogram of the  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles obtained present size and diameter size dispersion in the range of 7.6 nm and 0.22 nm, respectively (Fig. 2). The solid line in Figure 2 corresponds to the log-normal distribution function usually employed in the analysis of the particle size profile.<sup>8</sup>

The *in vitro* dark toxicity assay by MTT for the albumin-based nanosized magnetic bead samples (complex in Hank's) was investigated using the J774 A-ATTC cell line as a biological model. The dark toxicity found for the nanosized beads showed a toxicity of 14, 11, 9, 5, and 3% for the BSA1, BSA2, BSA3, BSA4, and BSA5 samples, as shown in Figure 3.

The results of the cytotoxicity evaluation showed the low toxicity of the nanostructured devices against the J774-A1 cells, evidencing the increase in the cellular death as the concentration of the maghemite nanoparticle increases in the nanosized beads. These results are in very good agreement with the basal level allowed for *in vitro* studies.

Indeed, in this study the preparation of albumin-based nanosized magnetic beads was described whereas maghemite nanoparticles were added to the BSA-based



**Fig. 3.** Dark toxicity of the nanosized magnetic beads using the J774-A1 cell line.

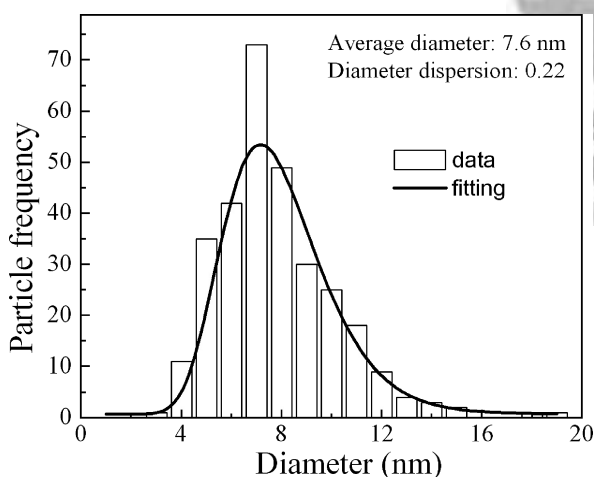
beads via ionic magnetic fluids. The cytotoxicity of the synthesized beads was evaluated using macrophage (J774-A1) cells. The low pH-used to prepare some of ionic material, are completely neutralized after the nanobeads preparation, make feasible it use in biological medium. The *in vitro* dark toxicity of the magnetic nanobeads against J774-A1-ATTC cells showed a low dark toxicity, confirming the hypothesis that the prepared nanostructured device represents an excellent vehicle for the administration of drugs to biological systems.

**Acknowledgments:** The authors acknowledge the financial support of the Brazilian agencies CNPq, FAPESP, CAPES, and FINATEC. Andreza R Simioni (04/00860-0) was the recipients of FAPESP fellowships. The authors also acknowledge the designer Marcos Ribeiro Souza.

### References and Notes

1. D. F. Emerich and C. G. Thanos, *Expert Opin. Biol. Ther.* 3, 655 (2003).
2. Stuart L. Marcus and William R. McIntyre, *Expert Opin. Emerging Drugs* 7, 321 (2002).
3. A. Town, A. Sanchez, M. Tobio, P. Bald, and M. J. Alonso, *J. Control. Rel.* 78, 15 (2002).
4. D. J. Brayden and A. W. Baird, *Microbes. Infect.* 3, 867 (2001).
5. D. F. Emerich and C. G. Thanos, *Expert Opin. Biol. Ther.* 3, 655 (2003).
6. A. C. Tedesco, D. M. Oliveira, Z. G. M. Lacava, R. B. Azevedo, E. C. D. Lima, C. Gansau, N. Buske, and P. C. Morais, *J. Appl. Phys.* 93, 6704 (2003).
7. B. P. Kamat and J. Seetharamappa, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 35, 655 (2004).
8. B. M. Lacava, R. B. Azevedo, L. P. Silva, Z. G. M. Lacava, K. Skeff Neto, N. Buske, A. F. Bakuzis, and P. C. Morais, *Appl. Phys. Lett.* 77, 1876 (2000).

Received: 14 October 2005. Revised/Accepted: 2 January 2006.



**Fig. 2.** Particle size histogram obtained from the TEM data. Solid line is the best fit according to the log-normal distribution function.