



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS**



THIBÉRIO MUNDIM FERREIRA PIRES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÓXIDOS DE FERRO VISANDO SUA
UTILIZAÇÃO COMO AGENTES DE CONTRASTE PARA
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

**Campina Grande
2014**

THIBÉRIO MUNDIM FERREIRA PIRES

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÓXIDOS DE FERRO VISANDO SUA
UTILIZAÇÃO COMO AGENTES DE CONTRASTE PARA
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Engenharia de Materiais
como requisito parcial à obtenção
do título de MESTRE EM
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE
MATERIAIS.

Orientador: Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes

Campina Grande

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFPA

P667: Pires, Thibério Mundim Ferreira.
Síntese e caracterização de óxidos de ferro visando sua utilização como agentes de contraste para ressonância magnética / Thibério Mundim Ferreira. - Campina Grande, 2014.
36 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2014.

"Orientação: Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes".
Referências.

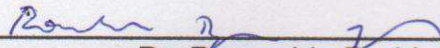
1. Ressonância Magnética. 2. Meios de Contraste. 3. Nano-Partículas.
I. Menezes, Romualdo Rodrigues. II. Título.

CDU 62:543.429.2(043)

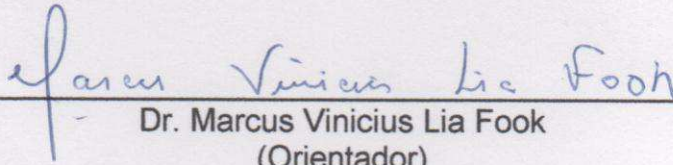
**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÓXIDOS DE FERRO VISANDO SUA
UTILIZAÇÃO COMO AGENTES DE CONTRASTE
PARA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA.**

Thibério Mundim Ferreira Pires

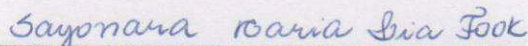
Dissertação Aprovada em 18/07/2014 pela banca examinadora constituída dos
seguintes membros:



Dr. Romualdo Rodrigues Menezes
(Orientador)
UAEMa/UFCG



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
(Orientador)
UAEMa/UFCG



Dra. Sayonara Maria Lia Fook
(Examinadora Externa)
UEPB



Dra. Patrícia Tatiana Araújo dos Santos
(Examinadora Externa)

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, a meus pais, esposa, filhas, amigos que me incentivaram e a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente, iluminando meus caminhos e me dando sabedoria para as escolhas certas.

À minha esposa e companheira para toda a eternidade, Vilma, pelo amor, companheirismo, incentivo e compreensão.

Às minhas filhas Bruna Beatriz e Ana Clara, pelo amor e inspiração para a vida.

Aos meus pais Maria Rita e Gildo Antônio pelo enorme amor, carinho e dedicação.

Ao meu ex-chefe e grande amigo Márcio Luiz Varani, maior incentivador para o meu ingresso no mestrado.

Aos amigos Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa e Prof. Dr. Rosemberg Cardoso Barbosa, pela imensa contribuição para o início e desenvolvimento da dissertação.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook, pelos conselhos durante para o desenvolvimento do mestrado e para toda a vida.

A todos os professores do mestrado, pelos ensinamentos.

Aos amigos colegas de mestrado e de profissão, pela amizade e pela ajuda nos estudos.

Aos grandes amigos do grupo de Biomateriais, pela amizade e companheirismo.

À Prof^a Dr^a Patrícia Tatiana Araújo dos Santos pela ajuda e orientação, e colaboração na realização dos testes e caracterizações.

Ao meu orientador Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes, pelos ensinamentos, colaboração com a sintetização do material, realização dos testes e caracterizações.

A todos os demais que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Agentes de contraste são materiais de grande relevância para a qualidade das imagens obtidas por ressonância magnética, acentuando o contraste das imagens e facilitando o diagnóstico de patologias. As nanopartículas têm sido bastante utilizadas como agentes de contraste para ressonância magnética, sendo que as mais utilizadas são as nanopartículas de óxido de ferro. A segurança e toxicidade das nanopartículas tem sido objeto de uma preocupação cada vez maior, pois o conhecimento sobre os efeitos biológicos de materiais deste tipo ainda não é suficiente. As propriedades das nanopartículas, por sua vez, dependem do tamanho, microestrutura e revestimento da superfície, controlados pelas condições de síntese e processamento das nanopartículas. O objetivo deste trabalho foi obter óxido de ferro pelo Método Pechini, para utilização como agentes de contraste para uso em ressonância magnética, de modo a caracterizá-los. Nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas pelo Método Pechini, com razão entre o ácido cítrico em relação aos cátions metálicos de 3:1, sendo posteriormente calcinadas em temperaturas de 400°C e 900°C, pelos períodos de 1h ou 2h. Logo após foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS), Difração de Raios X - (DRX), Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Também foi realizado Ensaio de Citotoxicidade – Viabilidade Celular. Os resultados de DRX revelaram a formação da fase hematita e presença de segunda fase magnetita. A morfologia é constituída de aglomerados de aspecto rígido com partículas de formato irregular, com tamanho menor e maior que 10 µm. A temperatura de calcinação de 400°C não foi suficiente para se obter nanopartículas de óxido de ferro estáveis termicamente. Os pós obtidos pelo Método Pechini não apresentaram viabilidade celular.

Palavras-chave: meios de contraste, imagem por ressonância magnética, nanopartículas.

ABSTRACT

Contrast agents are materials of great relevance to the quality of the images obtained by magnetic resonance imaging, accentuating the contrast of images and facilitating the diagnosis of pathologies. Nanoparticles have been widely used as contrast agents for magnetic resonance imaging, and the most used are nanoparticles of iron oxide. The safety and toxicity of nanoparticles has been the subject of increasing concern, because knowledge about the biological effects of such materials is not enough. The properties of the nanoparticles, in turn, depend on the size, microstructure and surface coating, all of them controlled by the conditions of synthesis and processing of nanoparticles. The aim of this study was to obtain iron oxide by Pechini method, for use as contrast agents in diagnostic magnetic resonance imaging, in order to characterize them. Iron oxide nanoparticles were synthesized by Pechini method with ratio of citric acid to metal cations in relation 3:1, subsequently calcined at temperatures of 400 ° C and 900 ° C, for periods of 1h or 2h. Soon after were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy X-ray (EDS), X-Ray Diffraction - (XRD), Differential Scanning Calorimetry analysis (DSC) , Thermogravimetry (TG), and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Was also performed Cytotoxicity Assay - Cell Viability. The XRD showed the formation of phase of hematite and presence of second phase of magnetite. The morphology consists of rigid aspect of agglomerates with particles of irregular shape and with a smaller size greater than 10 µm. The calcination temperature of 400 ° C was not sufficient to obtain iron oxide nanoparticles thermally stable. The powders obtained by the Pechini method showed no cell viability.

Keywords: contrast agents, magnetic resonance imaging, nanoparticles.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura das amostras de óxido de ferro obtidas por Método Pechini.....	28
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma da Sintetização de Hematita pelo Método Pechini ..	28
Figura 2 - Placa de cultura de tecidos de 96 poços utilizada para ensaio de citotoxicidade.....	32
Figura 3 – Difractogramas de óxido de ferro obtida pelo Método Pechini para as amostras (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, e (e) 5.....	33
Figura 4 – Imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura da Amostra 1: a) Aumento de 100x; b) Aumento de 500x; c) Aumento de 1000x; d) Aumento de 2000x	36
Figura 5 – Imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura da Amostra 2: a) Aumento de 100x; b) Aumento de 500x; c) Aumento de 1000x; d) Aumento de 2000x	37
Figura 6 – Imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura da Amostra 3: a) Aumento de 100x; b) Aumento de 500x; c) Aumento de 1000x; d) Aumento de 2000x	38
Figura 7 – Imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura da Amostra 4: a) Aumento de 100x; b) Aumento de 500x; c) Aumento de 1000x; d) Aumento de 2000x	39
Figura 8 – Imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura da Amostra 5: a) Aumento de 100x; b) Aumento de 500x; c) Aumento de 1000x; d) Aumento de 2000x	40
Figura 9 – Gráfico de barras com os percentuais de cada elemento químico obtidos na Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X para as Amostras 1 a 5, figuras a) a e), respectivamente.....	42
Figura 10 - Curvas Termogravimétricas para a amostra 1.....	43
Figura 11 - Curvas Termogravimétricas para a amostra 2.....	44
Figura 12 - Curvas Termogravimétricas para a amostra 3.....	44
Figura 13 - Curvas Termogravimétricas para a amostra 4.....	45
Figura 14 - Curvas Termogravimétricas para a amostra 5.....	45
Figura 15– Espectro na região do infravermelho para a amostra 1.....	47

Figura 16– Espectro na região do infravermelho para a amostra 2.....	47
Figura 17– Espectro na região do infravermelho para a amostra 3.....	48
Figura 18– Espectro na região do infravermelho para a amostra 4.....	48
Figura 19– Espectro na região do infravermelho para a amostra 5.....	49
Figura 20 - Viabilidade de macrófagos de camundongos Swis na presença das amostras obtidas e CONTROLE = controle negativo.....	50

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

C – Celsius

$C_2H_8O_2$ - Etileno glicol

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ - Ácido cítrico monohidratado

Co - Cobalto

DRX - Difração de Raios X

DSC - Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial

EDS - Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X

FDA – Food and Drug Administration

Fe - Ferro

$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ - Nitrato de ferro

Fe_3O_4 – magnetita

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

Gd – Gadolínio

ISO - International Organization for Standardization

MEIO – Magnetism-Engineered Iron Oxide (Partículas de Óxido de Ferro Projetadas para Magnetismo)

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

mg – miligrama

min – minuto

mm – milímetro

Mn - Manganês

MnMEIO – (Partículas de Óxido de Ferro dopadas com Manganês Projetadas para Magnetismo)

MNP – Magnetic NanoParticles

MRI – Magnetic Resonance Imaging (Exame de Ressonância Magnética)

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

Ni - Níquel

$NiFe_2O_4$ - ferrita de níquel

PET – Positron Emission Tomography (Tomografia por Emissão de Póstrons)

PVA - álcool polivinil

PVP - PoliVinilPirrolidona ou povidona

SPIO – Super Paramagnetic Iron Oxide

T1 – tempo de relaxamento no plano longitudinal ao campo magnético induzido

T2 – tempo de relaxamento no plano transversal ao campo magnético induzido

TG – Termogravimetria

VSM - Vibrating Sample Magnetometry (Magnetometria de Amostra Vibrante)

γ -Fe₂O₃ – maghemita

μ m – micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	DIAGNÓSTICO DE IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	18
2.2	AGENTES DE CONTRASTE.....	18
2.3	NANOPARTICULAS USADAS COMO AGENTES DE CONTRASTE	19
2.4	ÓXIDOS DE FERRO	21
2.4.1	Ferrita.....	21
2.4.2	Magnetita	21
2.4.3	Maguemita	22
2.4.4	Goetita	22
2.4.5	Hematita.....	22
2.4.6	Métodos de síntese.....	22
2.4.7	Método Pechini	23
2.5	TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS.....	24
2.6	REGULAMENTAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	LOCAL DA PESQUISA.....	26
3.2	MATERIAIS.....	26
3.3	MÉTODOS.....	26
3.4	SINTETIZAÇÃO.....	27
3.5	CARACTERIZAÇÕES.....	29
3.5.1	Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV/EDS	29
3.5.2	Difração de Raios X - (DRX)	29
3.5.3	Análise Termogravimétrica (TG)	30
3.5.4	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	30
3.5.5	Ensaio de Citotoxicidade – Viabilidade Celular	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1	CARACTERIZAÇÕES.....	33
4.1.1	Difração de Raios X (DRX)	33

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
4.1.3 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS).....	Erro!
Indicador não definido.	
4.1.4 Termogravimetria (TG)	42
4.1.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)⁴⁶	
4.1.6 Ensaio de Citotoxicidade – Viabilidade Celular	49
5 CONCLUSÕES.....	51
6 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico de imagem por ressonância magnética (MRI - Magnetic Resonance Imaging) é um importante método de diagnóstico médico, visto que pode fornecer imagens anatômicas de tecidos moles com alta resolução. Seu funcionamento se dá pela aplicação de um campo magnético de alta intensidade, o qual provoca a orientação magnética dos prótons dos núcleos atômicos da região de contorno dos tecidos a serem observados. As imagens são formadas após a retirada do campo magnético, durante o relaxamento dos prótons de volta ao seu estado original de baixa energia (LOUIE et al., 2000; NA et al., 2009; SUN et al., 2008).

Os agentes de contraste podem ser introduzidos para melhorar a visibilidade da imagem, acentuando o contraste da visualização dos tecidos de interesse. Atualmente existem duas categorias de contrastes para uso em MRI, de acordo com tempos de relaxação dos prótons após a retirada do campo magnético induzido pelo equipamento de ressonância magnética: T1, que são os agentes de contraste que acentuam o relaxamento no plano longitudinal ao campo magnético induzido; e T2, que são os agentes de contraste que acentuam o relaxamento no plano transversal ao campo magnético induzido (LOUIE et al., 2000, NA et al., 2009).

Entre os tipos de agentes de contraste para MRI disponíveis no mercado encontramos os complexos paramagnéticos, geralmente quelatos de gadolínio (Gd^{3+}), que acentuam o contraste de imagem dos sinais ponderados em T1 (BULTE & KRAITCHMAN, 2004; FLACKE et al., 2001; KIRCHER et al., 2003; KRISHNAN, 2010) e os óxidos de ferro superparamagnéticos (SPIO - Superparamagnetic Iron Oxide), que são nanopartículas utilizadas como agente de contraste para ressonância magnética que fornecem um contraste acentuado dos sinais ponderados em T2 (BULTE & KRAITCHMAN, 2004; COROT et al., 2006; GUPTA & GUPTA, 2005; LU et al., 2009; NA et al., 2009; NEUBERGER et al., 2005; PATEL et al., 2011; THOENY et al., 2009; YANG et al., 2009).

A preocupação quanto à segurança e toxicidade das nanopartículas tem aumentado, ainda que haja um grande interesse científico e potenciais promissores para diversas aplicações (AHAMED et al., 2011; PATEL et al., 2011; SHARIFI et al., 2012; YIN et al., 2005). As propriedades das nanopartículas dependem de seu tamanho e também da estrutura, microestrutura e revestimento da superfície. Estes,

por sua vez, são controlados pelas condições de síntese e processamento das nanopartículas (YIN et al., 2005).

O desenvolvimento recente do diagnóstico por imagem molecular e celular, que permite a visualização dos biomarcadores de doenças específicas nos níveis molecular e celular, levou a um maior reconhecimento de nanopartículas como agentes de contraste para ressonância magnética, sendo que as nanopartículas de óxido de ferro têm sido o agente nanoparticulado mais utilizado (BULTE & KRAITCHMAN, 2004; COROT et al., 2006; GUPTA & GUPTA, 2005; LU et al., 2009; NA et al., 2009; NEUBERGER et al., 2005; PATEL et al., 2011; THOENY et al., 2009; YANG et al., 2009).

Por outro lado, não se observa detalhamentos do tipo e características dos agentes de contraste fornecidos/utilizados comercialmente, o que tem sérias implicações em dois sentidos. Primeiro, um risco potencial a saúde da população por não se conhecer tecnicamente os materiais utilizados, haja vista todo o debate sobre perigos potenciais do uso de materiais nanoparticulados, especialmente quando não há protocolo ou procedimento para sua retirada do corpo humano. Segundo, o rápido desenvolvimento tecnológico desses materiais provocou uma certa desatualização das agências de regulação, que estão buscando atualmente, seja na Europa, nos Estados Unidos ou no Japão, a maneira mais adequada de regulação desses materiais (Food and Drug Administration, 2014). Assim, objetivando contribuir neste sentido, esta pesquisa tem por fim a síntese e análise de óxido de ferro, obtido em laboratório, para uso em diagnóstico de imagem por ressonância magnética, incluir mais um entre os poucos estudos de citotoxicidade de nanopartículas, e ser objeto de auxílio para o desenvolvimento de um modelo regulatório nacional para este tipo de material.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar partículas de óxido de ferro, visando sua utilização em diagnóstico de imagem por ressonância magnética, sintetizados em laboratório pelo Método Pechini.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar óxido de ferro por Método Pechini;
- Avaliar o efeito da temperatura de calcinação e tempo sobre as propriedades estruturais;
- Caracterizar o óxido de ferro obtido por Método Pechini, de modo a obter suas características físicas, químicas, estruturais e biológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DIAGNÓSTICO DE IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

O diagnóstico de imagem por ressonância magnética é um método que permite a investigação de tecidos e organismos em três dimensões em resolução da ordem de aproximadamente 10 μm . A intensidade do sinal é uma função da concentração de água em redor do objeto de interesse e dos tempos de relaxação T1 e T2. Os tempos de relaxação estão relacionados ao tempo que os elétrons levam para retornar de uma situação de excitação por um campo magnético para uma situação de repouso. Os agentes de contraste atuam nos tempos de relaxação, intensificando o contraste e melhorando significativamente as imagens obtidas por ressonância magnética (LOUIE et al., 2000).

2.2 AGENTES DE CONTRASTE

O diagnóstico por ressonância magnética é uma ferramenta de imagem não invasiva, de alta resolução espacial e capacidades tomográficas, mas sua baixa sensibilidade de sinal tem sido uma grande limitação. Os agentes de imagem amplificam o contraste entre as imagens de interesse, possibilitando a detecção de doenças em fase inicial, a monitorização das respostas às terapias medicamentosas e o rastreamento das migrações celulares (LEE et al., 2007).

O estudo de Simonetti et al. (2001) mostrou que, com o uso de contraste em ressonância magnética, pode ser obtido uma intensidade de sinal muito maior em um miocárdio enfartado do que em um miocárdio normal, num valor de 1080% para experimento com cães e 485% para experimento com pacientes humanos.

Os agentes de contraste para ressonância magnética: devem facilmente alterar os parâmetros que determinam um melhor contraste de imagem, com a mínima dose possível, de modo a prevenir a toxicidade; devem ter características que facilitem em ser direcionados a um órgão específico do corpo; devem permanecer no órgão pretendido por um tempo suficiente para a aquisição da imagem, porém devem ser excretados assim que possível, de modo a prevenir a

toxicidade; e devem ter uma validade razoável enquanto estiverem armazenados *in vitro*, antes de serem introduzidos no corpo (KRISHNAN, 2010).

2.3 NANOPARTICULAS USADAS COMO AGENTES DE CONTRASTE

Com o advento da nanotecnologia, novos objetos ainda não explorados por pesquisadores de décadas passadas, começaram a ser investigados, incluindo fulerenos, pontos quânticos, nanotubos, nanofilmes e nanofios. Os nanoobjetos apresentam efeitos devidos ao “tamanho quântico”, apresentando propriedades físicas e químicas que não são comuns em objetos de outras escalas de tamanho. No caso das nanopartículas magnéticas, estas apresentam características tais como enorme magnetorresistência e altíssimo efeito magneto-calórico. As propriedades magnéticas de tais nanopartículas são determinadas por inúmeros fatores, incluindo composição química, características das falhas da estrutura cristalina, tamanho e forma das partículas, interação da partícula com a matriz circundante e com partículas vizinhas (GUBIN et al., 2005).

Uma grande vantagem das nanopartículas é que elas podem ser injetadas e ficar durante muito tempo no sistema circulatório, possibilitando o acesso a regiões do corpo não alcançadas por outros meios (KRISHNAN, 2010).

As nanopartículas são bastante indicadas para uso como contraste em métodos de diagnóstico por imagem, incluindo ressonância magnética, até mesmo como agentes de imagem molecular, tendo em vista seu tamanho reduzido e o desempenho de múltiplas funções, tais como a permeabilidade para introdução no tecido alvo e a aplicação de medicamentos (LEE et al., 2007; KRISHNAN, 2010).

O núcleo das nanopartículas magnéticas (MNP – Magnetic NanoParticles) pode ser fabricado com diferentes materiais, como por exemplo, ferro e cobalto puros, ligas de ferro e cobalto e óxidos de ferro, incluindo a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Também são utilizados óxidos de ferro dopados, em estruturas do tipo MFe_2O_4 , onde M é um cátion de valência +2, como por exemplo Mn, Fe, Co ou Ni. Apesar de serem ótimos materiais para agentes de contraste em ressonância magnética, as nanopartículas que contêm Co, Ni e Mn são potencialmente tóxicas, inviabilizando o seu uso em seres humanos. Já os óxidos de

ferro não dopados degradam em ferro e oxigênio não tóxicos. O óxido preferido é a magnetita, devido a suas melhores propriedades magnéticas (VEISEH, 2010).

Nanopartículas de óxido de ferro, geralmente sintetizadas em meios aquosos, melhoram o contraste de imagem de ressonância magnética quando utilizados como agentes de imagem para visualização da transposição celular, expressão genética, angiogênese, apoptose e detecção de câncer. O aumento de sinal provocado por nanopartículas de óxido de ferro convencionais, no entanto, não é satisfatória em relação ao obtido com outras modalidades de diagnóstico por imagem, tais como fluorescência e PET (Tomografia por Emissão de Pósitrons). Sistemas de agentes ultrasensíveis por MRI baseados em nanopartículas de óxido de ferro projetadas para magnetismo (MEIO), em particular, os agentes moleculares baseados em nanopartículas dopadas com manganês $MnFe_2O_4$ (MnMEIO), que têm fortes propriedades magnéticas, tem maior sensibilidade para a detecção de células de câncer e pequenos tumores in vivo, e podem melhorar consideravelmente a visualização em tempo real de eventos biológicos, tais como o tráfico celular, metástase cancerígena, a sinalização celular e interações ao nível molecular e celular (LEE et al., 2007).

Recentemente, as nanopartículas magnéticas têm sido avaliadas clinicamente para uso como contrastes para ressonância magnética, como por exemplo na visualização de tumor cerebral pré-operatório e, em combinação com nanopartículas fluorescentes na zona próxima ao infra-vermelho, permitem uma boa visualização do tecido afetado e um corte bastante preciso para a retirada do tumor (KIRCHER et al., 2003).

Mas para que as Nanopartículas Magnéticas (MNP) sejam utilizadas clinicamente, precisa-se de conhecimentos básicos da natureza da nanoestrutura, como por exemplo: como a nanopartícula irá ser transportada pela corrente sanguínea até atingir o órgão de interesse, transpondo as barreiras do organismo; forma; tamanho; superfície; administração de fármacos; toxicidade; biocompatibilidade; agente de contraste para o sistema de imagem utilizado. As nanopartículas magnéticas, entre elas as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIO), podem ser modificadas de modo a funcionarem como agentes de imagem multimodais, como por exemplo, ser incorporadas com fluoróforos, para criar agentes de contraste de imagem que oferecem a alta resolução espacial e temporal e penetração profunda da ressonância magnética,

aliadas à rápida resposta e sensibilidade dos métodos de diagnóstico de imagem por fenômenos ópticos (como por exemplo, infravermelho) (VEISEH, 2010).

2.4 ÓXIDOS DE FERRO

Os óxidos de ferro são compostos comuns distribuídos por todo o globo. Em geral são de fácil síntese em laboratório, com propriedades físicas e químicas favoráveis para aplicação em diversos campos da tecnologia. São óxidos de ferro os compostos formados por ferro (Fe) e oxigênio (O) como, por exemplo, a magnetita (Fe_3O_4), a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). São reconhecidos como hidróxi e óxido hidróxi de ferro os compostos formados por ferro com íon hidroxila como, por exemplo, a goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$) (SOUSA NETO, 2012).

2.4.1 Ferrita

Ferrita é uma mistura de óxido de ferro combinado com óxidos de outros metais, cuja representação química é, $\text{M}^{2+}\text{Fe}_2^3+\text{O}_4$ ou $\text{MO.Fe}_2\text{O}_3$, onde M são cátions divalentes tais como: Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} . São divididas em quatro tipos, dependendo da estrutura cristalina: espinélio, magnetoplumbita, granadas e perovskita, sendo o espinélio o tipo mais estudado cientificamente, devido às suas aplicações na indústria eletroeletrônica como dispositivo magnético de alta resistividade (SOUSA NETO, 2012).

2.4.2 Magnetita

A magnetita (Fe_3O_4) é um importante óxido de ferro de coloração preta responsável pelo magnetismo nas rochas.

Nanopartículas magnéticas de magnetita têm sido bastante estudadas por apresentar excelentes aplicações em fluídos magnéticos, catalises, aplicações biotecnológicas e outros. Recentemente tem sido aplicada também em como agente terapêutico antitumoral (SOUSA NETO, 2012).

2.4.3 Maguemita

A maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) é um mineral marrom-avermelhado, possui estrutura cristalina cúbica de face centrada (CFC), é metaestável, oriundo da oxidação da magnetita, naturalmente ou induzido da redução da hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). A maguemita apresenta propriedades físicas e estruturais similares às da magnetita.

Devido à sua estrutura, a maguemita têm uso em: tintas de proteção anticorrosivas, bio-separação, sensores de gás (SOUSA NETO, 2012).

2.4.4 Goetita

A Goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$) é um mineral do grupo dos oxi-hidróxi. Ela possui uma estrutura ortorrômbica com cada Fe^{3+} coordenados com três O^{2-} e três OH^- , formando octaedros.

A Goetita é encontrada no solo terrestre em amplas condições climáticas e condições hidrológicas, sendo um óxido termodinamicamente estável. Pode controlar a capacidade de sorção dos metais tóxicos nos solos (SOUSA NETO, 2012).

2.4.5 Hematita

A hematita ocorre em vários tipos de rochas e apresenta composição química de Fe_2O_3 , correspondendo a 69,94 % em massa de ferro e 30,06 % em massa de oxigênio; é de cor cinza azulado a vermelho, brilhante a fosca, podendo ser terrosa, compacta ou cristalina. Também ocorre associada a depósitos de veios, rochas ígneas, metamórficas e sedimentares e também como produto de alteração da magnetita (ROSA, 2008).

2.4.6 Métodos de síntese

Existem diversos métodos de síntese para a preparação de óxidos de ferro estudadas, como por exemplo: método da mistura de óxidos, método de reação por

combustão, método de moagem de alta energia, método de descarga pulsante, método hidrotermal, método de co-precipitação e método Pechini (XAVIER, 2006).

2.4.7 Método Pechini

Um método de síntese de óxidos de ferro que tem sido usado cada vez mais é o método Pechini. O método foi inicialmente desenvolvido por Pechini em 1967, e, em seguida, amplamente divulgado por H. Anderson para fabricação de pós de perovskita (XAVIER, 2006).

O método consiste na formação de um quelato entre os cátions metálicos e um ácido carboxílico. O quelato é então polimerizado com a ajuda de um poliálcool, formando poliéster, com íons metálicos homoganeamente distribuídos (XAVIER, 2006).

Geralmente, o ácido cítrico é usado como agente quelante e o etilenoglicol como agente polimerizante. A reação de condensação entre o ácido cítrico e o etilenoglicol, ocorre em aproximadamente 100 °C (XAVIER, 2006).

Por fim, a resina é calcinada à temperatura de aproximadamente 300 °C, para a pirólise do polímero eliminando a matéria orgânica residual. Em seguida, o pó é mais uma vez calcinado à temperatura adequada à obtenção da fase e da cristalinidade desejada (XAVIER, 2006).

O método Pechini apresenta como vantagens:

- Homogeneidade química dos multicomponentes em escala molecular;
- Maior controle da estequiometria em temperaturas relativamente baixas;
- Baixo custo, com reagentes usados em maior quantidade.

Aplicação na obtenção de diversos óxidos, com diferentes estruturas por simples ajuste de variáveis (XAVIER, 2006).

Como desvantagens têm a grande perda de massa ou formação de fortes aglomerados durante a calcinação. A decomposição do material orgânico durante a calcinação pode produzir um maior aquecimento devido à combustão, ocasionando a formação de aglomerados. O controle da decomposição térmica do precursor é fundamental para o melhoramento deste método (XAVIER, 2006).

2.5 TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

As variações no tamanho, forma, superfície, composição química e biopersistência são fatores que exigem a avaliação dos possíveis impactos ambientais e de saúde para cada tipo de nanomaterial, individualmente. Compostos muito semelhantes podem induzir efeitos toxicológicos substancialmente diferentes, como visto, por exemplo, para agentes metálicos. Agentes inócuos quando administrados pelas vias oral ou dérmica podem ser tóxicos para os pulmões. As nanopartículas, mesmo quando agregadas, podem exercer efeitos biológicos diferentes daqueles causados por partículas de dimensão micrométrica. O risco à saúde depende não somente do agente, mas também da exposição ao agente. Como os nanomateriais, novos ou em grupo de partículas miniaturizadas, estão prontos para entrar no mercado, é provável que as autoridades e legisladores apoiem pesquisas que fundamentem a elaboração de baterias de testes de toxicidade cientificamente válidas para detectar a toxicidade e tempo de permanência no corpo dos nanomateriais (HOET et al., 2004).

A rápida remoção das nanopartículas do corpo pode reduzir em muito suas funções biomédicas. Esta rápida remoção é devida principalmente ao seu reconhecimento pelos macrófagos do sistema fagocitário mononuclear. Ainda que o polímero utilizado no revestimento da nanopartícula e o material da nanopartícula sejam, individualmente, não tóxicos, o método do revestimento pode alterar a citotoxicidade da nanopartícula revestida resultante. A baixa toxicidade do Fe faz com que as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIO – Superparamagnetics Iron Oxide Nanoparticles) sejam atrativas para uso como agentes de contraste, pois a quantia geralmente administrada (50-100 mg) é baixa quando comparada à quantia existente no corpo humano (KRISHNAN, 2010).

2.6 REGULAMENTAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Atualmente não existe um modelo regulatório nacional para tratar das nanopartículas utilizadas em produtos que possam afetar a saúde de seres humanos, havendo apenas um modelo regulatório internacional.

Nanopartículas magnéticas, em aspectos regulatórios, são classificadas como produtos para saúde (ou dispositivos médicos na tradução literal do termo em inglês “medical devices”) e, segundo a agência regulatória norte-americana FDA (Food and Drug Administration), devem estar em conformidade com as determinações da norma técnica ISO 10993 (KRISHNAN, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Materiais (CERTBIO), da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/PB.

3.2 MATERIAIS

- Água destilada;
- Ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$);
- Etileno glicol ($C_2H_8O_2$);
- Nitrato de ferro $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$;
- Todos de elevada pureza e de fabricação Aldrich.

3.3 MÉTODOS

A metodologia ocorreu em duas etapas. Na primeira etapa foi feita a sintetização do óxido de ferro pelo Método Pechini. Na segunda etapa foi feita a caracterização dos materiais, por meio dos métodos de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Difração de Raios X - (DRX), Termogravimetria (TG), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Ensaio de Citotoxicidade – Viabilidade Celular.

3.4 SINTETIZAÇÃO

Foi sintetizada magnetita (Fe_3O_4) e hematita (Fe_2O_3) em pó pelo Método Pechini. Nesta pesquisa foram utilizados os seguintes reagentes: Água destilada; Ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$); Etileno glicol ($\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_2$) e Nitrato de ferro $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$. Todos de elevada pureza e de fabricação Aldrich.

A síntese foi realizada da seguinte maneira: Foram adicionados 100 ml de água destilada em um béquer a uma temperatura de aproximadamente 70°C (temperatura controlada por termômetro) em uma placa de aquecimento. Então o ácido cítrico foi adicionado de forma fracionada para que o mesmo se dissolvesse totalmente. Nesta rota de síntese, a razão usada entre o ácido cítrico em relação aos cátions metálicos foi de 3:1. O sistema foi mantido sob agitação constante auxiliada por um agitador magnético. Posteriormente, o precursor, nitrato de ferro foi adicionado, também de forma fracionada para melhor homogeneização. O agente polimerizante, etileno glicol, foi adicionado após homogeneização desta mistura prévia, sob agitação contínua, e então foi aumentada a temperatura da placa até 120°C de forma a dar início, às reações de esterificação e poliesterificação e formação da resina. A resina obtida foi então pirolisada (submetida a uma pré-calcinação) à $400^\circ\text{C}/1$ hora, com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, para eliminação da matéria orgânica. Em seguida, o pó obtido foi desaglomerado em um almofariz e passado em peneira malha #200, abertura 0,074 mm, segundo a classificação da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). E então, o pó foi calcinado na temperatura de 900°C , durante 1 e 2 horas, com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, para obtenção da fase desejada. A Figura 1 apresenta um fluxograma com a sequência de etapas da síntese. Na Tabela 1 encontram-se as condições de calcinação e síntese para cada uma das cinco amostras.

Figura 1 – Fluxograma da Sintetização de Hematita pelo Método Pechini.

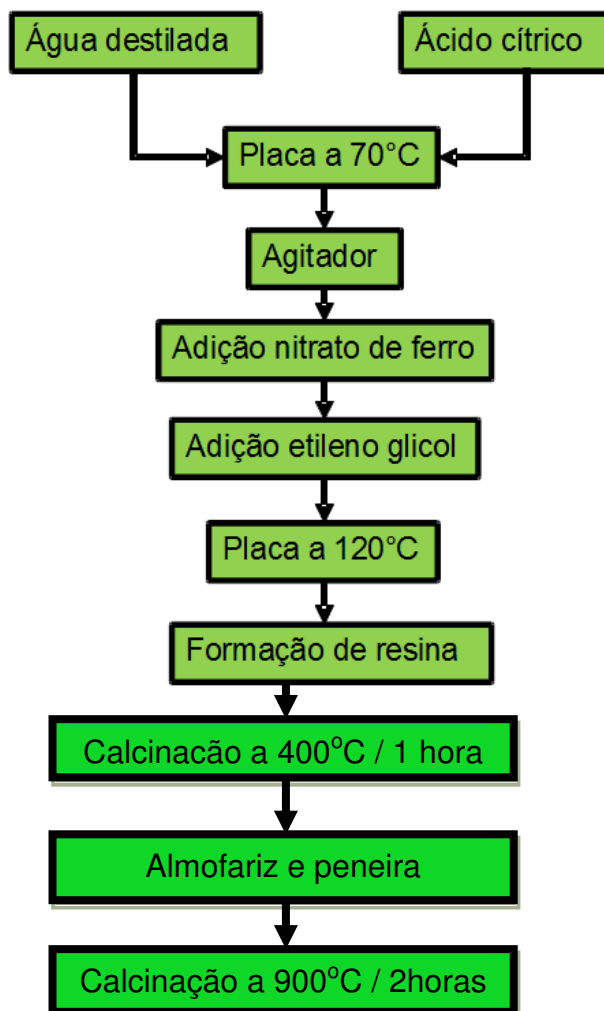


Tabela 1: Nomenclatura das amostras de óxido de ferro obtidas por Método Pechini

Designação das Amostras	Condições de Calcinação e Síntese
Amostra 1	Calcinação a 900°C por 1h
Amostra 2	Calcinação a 900°C por 2h
Amostra 3	Calcinação a 900°C por 2h, seguida por Redução em Ambiente Saturado com C a 400°C
Amostra 4	Calcinação a 900°C por 2h, contendo maior teor de carbono na síntese
Amostra 5	Calcinação a 400°C por 2h

3.5 CARACTERIZAÇÕES

A caracterização das partículas foi feita por meio das técnicas de Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Análise Termogravimétrica (TG), Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Citotoxicidade-Viabilidade Celular.

3.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV/EDS

A caracterização por MEV é uma técnica utilizada para análise microestrutural da morfologia e da topografia sobre superfícies dos sólidos e foi utilizada para esta pesquisa o equipamento da marca PHENOM, modelo MEV PROX, fabricante PHENOM WORD aumento máximo de 40000x, profundidade de foco 1mm, resolução de 30nm, tensão de 5, 10 e 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras. As imagens foram obtidas nos aumentos de 100x, 500x, 1000x e 2000x.

O Detector de EDS (Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X) é interno no microscópio eletrônico de bancada PHENOM, no qual os elementos químicos presentes numa amostra podem ser identificados através do espectro de raios X emitido pela amostra. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição mineral em amostras de tamanhos muito reduzidos (<5 μm), permitindo uma análise quase que pontual. O ensaio foi realizado no mesmo aumento e local da micrografia.

3.5.2 Difração de Raios X - (DRX)

A caracterização por Difração de Raios X identificou as fases cristalinas presentes na matéria prima, através de análise em temperatura ambiente no aparelho da marca Shimadzu modelo 7000 Shimadzu, utilizando-se de radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40kV e corrente 30mA em um intervalo de 2θ numa varredura entre 5 e 70 graus a uma velocidade de 2°/min.

3.5.3 Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica (TG) foi realizada em um aparelho modelo SDT Q600, (TA Instruments, EUA), com uma quantidade de material de aproximadamente 5,0 mg. O material foi aquecido a uma razão de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50mL min⁻¹. As curvas de TG foram registradas de 30 a 900°C.

3.5.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises utilizando a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do pó de magnetita e hematita foram realizadas em temperatura ambiente e o equipamento utilizado foi um Spectrum 400 da Perkin Elmer. A técnica FTIR foi usada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas matérias primas utilizada nesta pesquisa, utilizando a faixa de varredura de 4000 a 400 cm⁻¹.

Esta técnica tem grande valor para a análise orgânica qualitativa e compreende a faixa do espectro eletromagnético que vai do limite superior da faixa de microondas até o começo da região visível, com comprimento de onda entre 14000 cm⁻¹ e 20 cm⁻¹, porém considera que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, as quais correspondem a níveis vibracionais da molécula.

Considerando que a frequência da radiação infravermelha e que, quando radiação infravermelha incide em uma substância, a radiação de mesma frequência que as frequências vibracionais das ligações são absorvidas, é possível deduzir as frequências de vibração de uma molécula, observando as frequências que são seletivamente removidas de vibração infravermelhas.

3.5.5 Ensaio de Citotoxicidade – Viabilidade Celular

Com o objetivo de atender a norma ISO 10993 que recomenda ensaios *in vitro* de citotoxicidade como testes iniciais para materiais que ficarão em contato com a pele, escolheu-se o teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio].

Foram pesadas 0,3g de amostra, as quais foram esterilizadas em autoclave vertical modelo Phoenix, a uma temperatura de 120° C por vinte minutos, para eliminação de toda vida microbiana ou viral, e em seguida foram secas em estufa FANEM 315 SE, a uma temperatura de 120° C por uma hora.

3.5.5.1 Obtenção das Células do Exsudato Peritoneal

Para a realização desta etapa, fez-se necessário a obtenção das células do exsudato peritoneal utilizando-se 5 camundongos *Swiss*, previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de Tioglicolato de Sódio (Difco Lab. LTDA) a 3,0 %, três dias antes da coleta de células. Após esse período, os animais foram eutanasiados por inalação em câmara de CO₂. Na câmara de fluxo laminar, os animais foram colocados em suporte e imobilizados pelas patas com o abdômen voltado para cima para retirada da pele na parte peritoneal com o auxílio de pinças dente de rato, expondo o peritônio.

Em seguida foi injetado na cavidade abdominal do animal 5,0 mL de uma solução salina tamponada de fosfato (PBS), estéril, com pH 7,2, a 4° C. Após uma massagem vigorosa na região abdominal, os macrófagos aderidos ao tecido são liberados para o líquido peritoneal, que foi coletado para preparação da suspensão celular. Estas células coletadas foram lavadas três vezes com 5 mL de PBS, e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos a 4° C em centrífuga refrigeradora modelo Universal 32R, marca Hettich Zentifugen.

Após a centrifugação as células sedimentadas foram ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2β-mercaptoetanol (2×10^{-5} M) (Sigma), penicilina (100 U/ml) (Sigma), estreptomicina (100 U/ml) (Sigma), L-glutamina (2mM) (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cultilab), sendo o meio assim composto designado por RPMI-1640-C. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) em uma diluição 1:100 do líquido de Lázarus. As células foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células em meio RPMI-1640-C.

Em uma placa estéril de 96 poços de fundo plano (Corning, Inc.), ilustrada na Figura 2, foram distribuídas 1,0 mL da suspensão celular do exsudato peritoneal de camundongos, e incubadas a 37° C por 60 minutos em estufa contendo tensão constante de 5% CO₂ (Forma Scientific, EUA). Após a incubação, as células não aderentes foram retiradas e os macrófagos que ficaram aderidos a placa foi

adicionado um volume igual ao inicial de RPMI-1640-C em presença das amostras a serem analisadas.

Em outras cavidades da referida placa, com as mesmas condições anteriores, foram adicionadas 100 μ L de LPS (lipopolissacarídeo bacteriano derivado de *E. coli*, adquirido da Sigma Aldrich a uma concentração de 10 μ g/mL como controle positivo, ou apenas meio de cultura RPMI-1640-C (controle negativo). As placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C, em estufa contendo tensão constante de 5 % de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Após esse período, sobre a cultura celular foram adicionados 100 μ L de uma solução de MTT (*Across Organics*) a 1,0 mg/mL em RPMI-1640.

A placa foi então incubada por mais 3 horas, nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 μ L de isopropanol (*Mallinckrodt Chemical*) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (*Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland*) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620 nm (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100 % de viabilidade.

Figura 2 - Placa de 96 poços utilizada para ensaio de citotoxicidade.



Fonte: Furtado, 2013

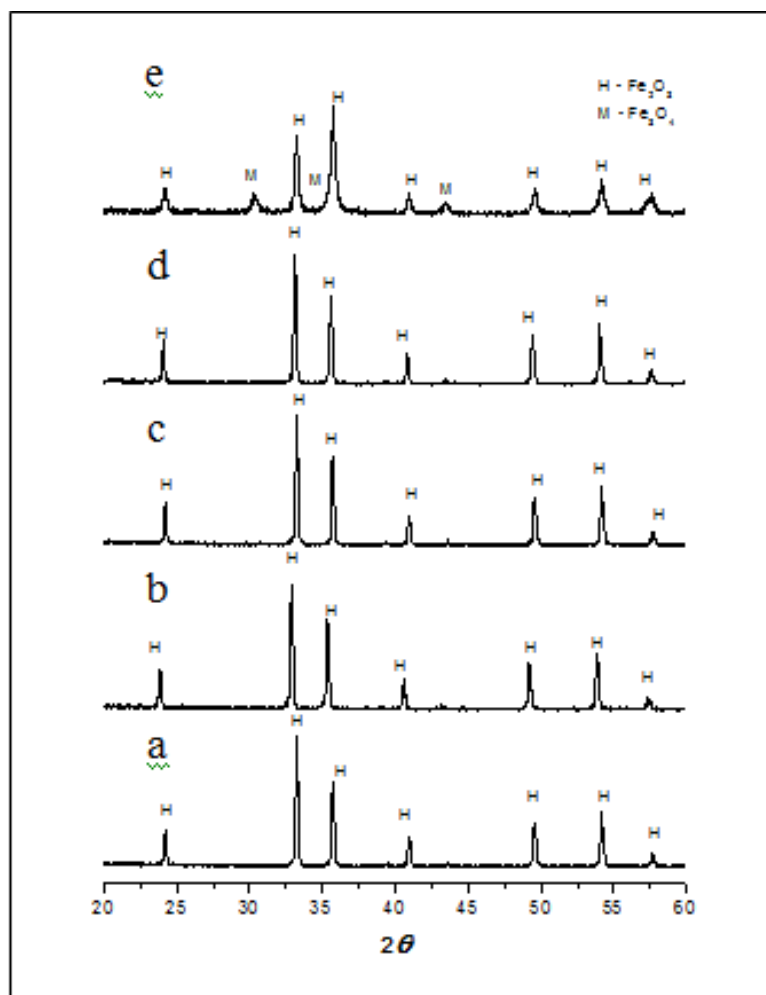
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÕES

4.1.1 Difração de Raios X - (DRX)

As amostras obtidas em pó foram caracterizadas por difração de raios X com a finalidade de identificar as fases cristalinas do material. Os difratogramas estão apresentados na Figura 3.

Figura 3 – Difratogramas de óxido de ferro obtida pelo Método Pechini para as amostras (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4, e (e) 5.



Fonte: Própria

Observa-se através da Fig. 3e a formação da fase majoritária da fase de hematita de acordo com a ficha cristalográfica (JCPDS 33-0664) e presença de

segunda fase da Fe_3O_4 de acordo com a ficha cristalográfica (JCPDS 88-0315). Conforme pode ser visto no difratograma da Figura (3a - 3d), foi possível obter a hematita como fase majoritária, de acordo com a ficha JCPDS 33-0664, a hematita (H) possui maior cristalinidade do que a magnetita (M). Portanto, pela análise de DRX, conclui-se que a temperatura de calcinação a 400°C por 2h, foi mais efetiva para a Amostra 5 (Fig. 3e), onde observa-se a obtenção da fase magnetita. Para as demais amostras (Fig. 3a-3d) observa-se que a temperatura de calcinação não foi a desejada para obtenção de magnetita.

A não formação da magnetita pode ter se dado em função da ausência de uma atmosfera controlada, onde há a oxidação do ferro. A síntese de óxido de ferro em atmosfera não controlada pode ocasionar a oxidação parcial da magnetita para hematita (DEBRASSI, 2011).

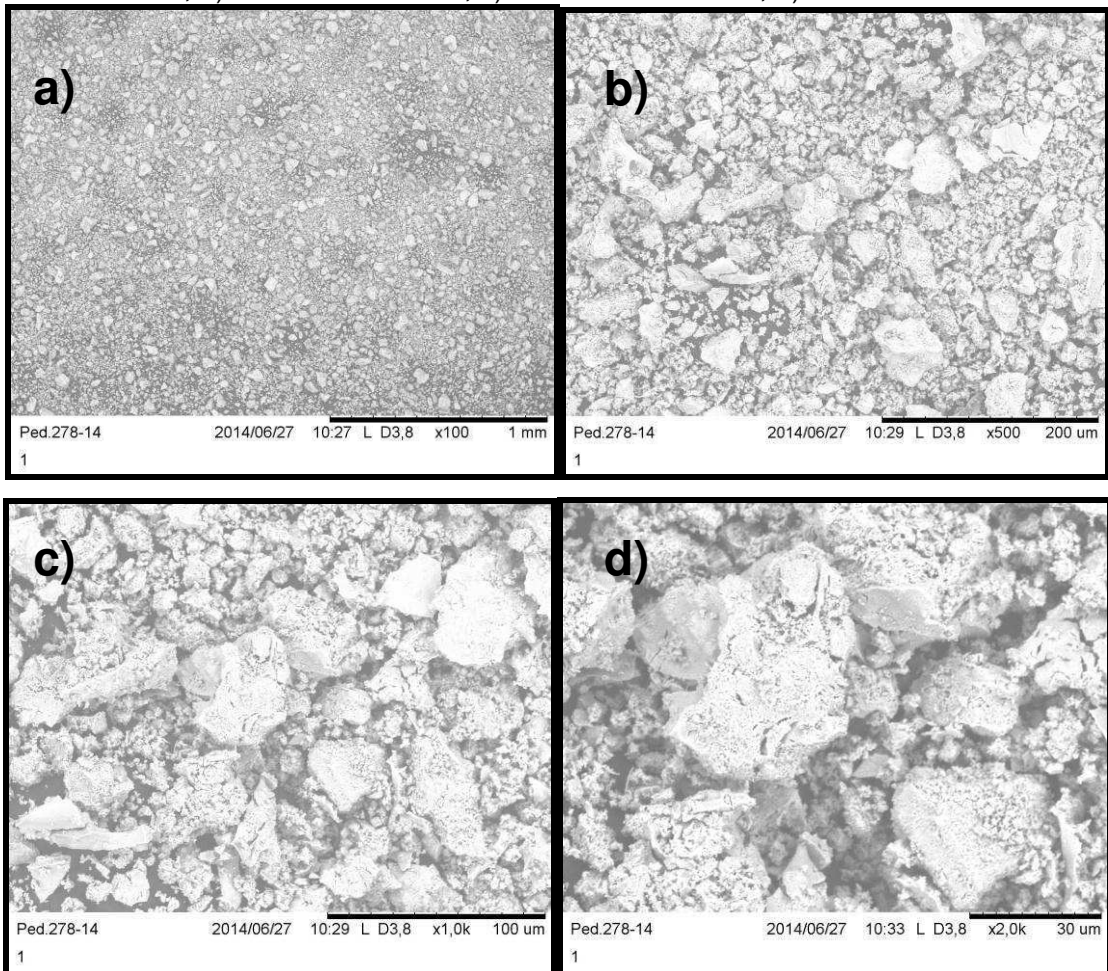
Magalhães, (2008), com o objetivo de obter óxidos de ferro, sintetizou hematita e magnetita. A hematita foi obtida a partir da goethita. A goethita foi obtida pela adição de 36 mL de solução de KOH 5 mol L^{-1} , lentamente e sob forte agitação, a 20 mL de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mol L^{-1} . A mistura foi transferida para um béquer de 1000 mL e em seguida foram adicionados 400 mL de água destilada. Logo após, a mistura foi deixada em estufa a 70°C durante 60 horas. Posteriormente a goethita foi filtrada e lavada com água destilada até a neutralização do pH. Para obter a hematita, a goethita foi aquecida a 400°C em ar durante 3 horas (MAGALHÃES, 2008).

A magnetita foi preparada através do método de precipitação do precursor hidroxacetato de ferro (HAF). O precipitado HAF foi secado em estufa por 12 horas a 80°C e posteriormente triturado. A magnetita foi obtida através de tratamento térmico do precursor hidroxacetato de ferro $[\text{Fe}(\text{CH}_3\text{COO}^-)_x(\text{OH})_{3-x}]$ amorfo, sob aquecimento a 400°C em fluxo de N_2 (30 mL min^{-1}) por um período de 2 horas. Com o aquecimento a 400°C , ocorre a decomposição do hidroxacetato de ferro, levando à formação de CO_2 e H_2O e pequenas quantidades de acetona e ácido acético, promovendo a redução de parte do Fe^{3+} para Fe^{2+} (MAGALHÃES, 2008). O autor obteve difratogramas que mostram a formação de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sem a presença de impurezas e formação da magnetita com linhas características da fase Fe_3O_4 . Portanto, a hematita formou-se submetendo a mistura a altas temperaturas por um tempo maior do que o tempo para a formação da magnetita (MAGALHÃES, 2008).

4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi efetuada para cinco amostras diferentes, com aumento de 100x (escala = 1 mm, tamanho do pixel = 1953,13 nm), 500x (escala = 200 μm , tamanho do pixel = 390,63 nm), 1000x (escala = 100 μm , tamanho do pixel = 195,31 nm) e 2000x (escala = 30 μm , tamanho do pixel = 97,66 nm), para os seguintes parâmetros: resolução de imagem = 1280x1100 pixels; DPI = 130,05; tensão de 15 kV; distância de trabalho = 7,5 a 7,7 mm; corrente = 24,2 a 24,7 mA. As Figuras 4 a 8 ilustram as imagens obtidas para as cinco amostras, nas quatro amplitudes de visualização. Observando as amostras em uma amplitude menor (100x) percebe-se que há uma distribuição homogênea dos grãos de maior tamanho. Aumentando a amplitude de visualização (500x, 1000x e 2000x), percebe-se que os grãos têm tamanhos variados e formatos irregulares e diversificados.

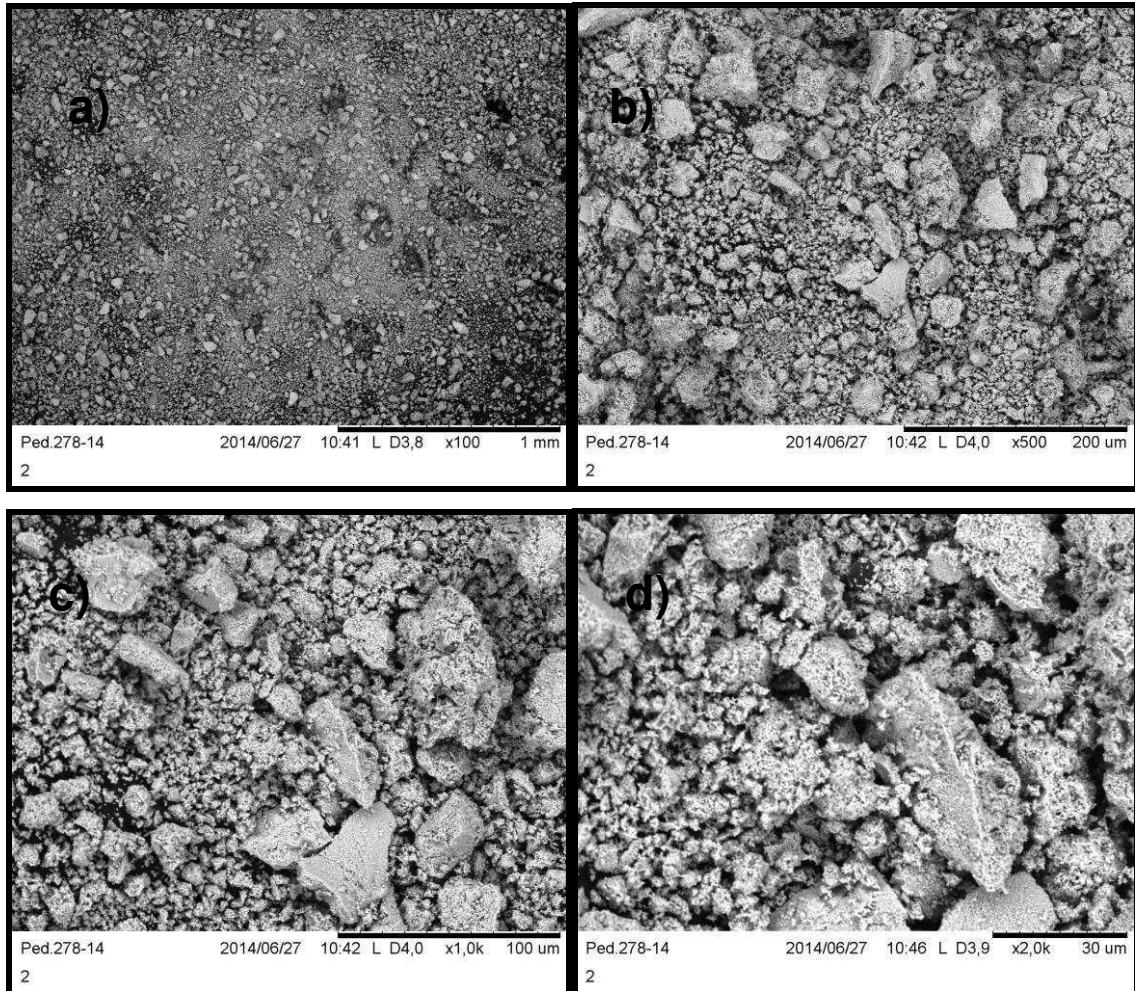
Figura 4 – Imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura da Amostra 1: a) Aumento de 100x; b) Aumento de 500x; c) Aumento de 1000x; d) Aumento de 2000x



Fonte: Própria

A Figura 4 ilustra a micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para amostra 1. Observamos que para todas as micrografias há a formação de aglomerados com formato irregular, e com uma estreita distribuição de tamanho de partículas. Estes aglomerados são constituídos de partículas com tamanho variando de 7,4 a 53 μm e tamanho médio de 16,6 μm , e com baixa porosidade interpartícula.

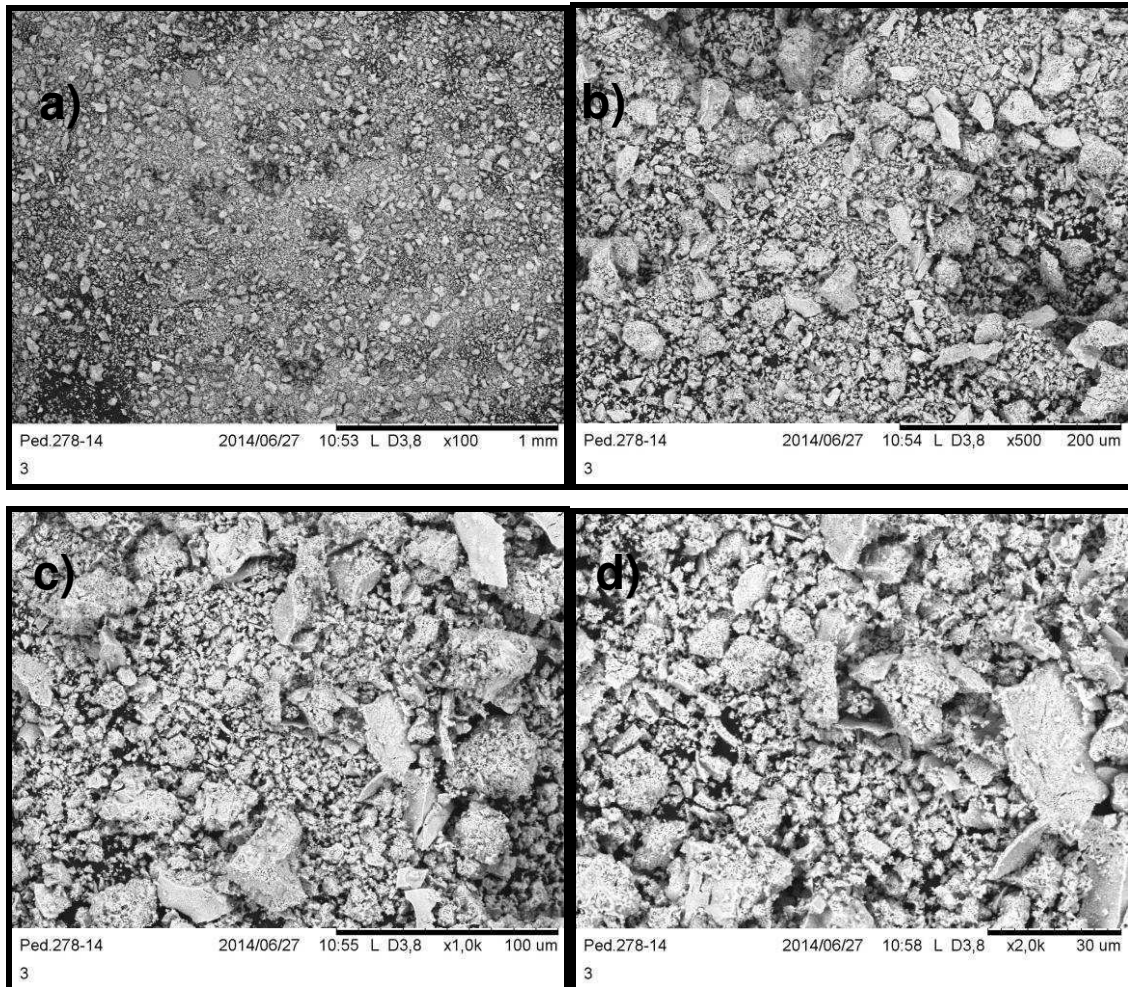
Figura 5 – Imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra 2: a) Aumento de 100x; b) Aumento de 500x; c) Aumento de 1000x; d) Aumento de 2000x.



Fonte: Própria

A Figura 5 ilustra a micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para amostra 2. Observamos que para todas as micrografias há a formação de aglomerados com formato irregular, e com uma distribuição de tamanho de partículas heterogênea. Estes aglomerados são constituídos de partículas com tamanho variando de 7,7 a 43,1 μ m e tamanho médio de 18,9 μ m, e com baixa porosidade interpartícula.

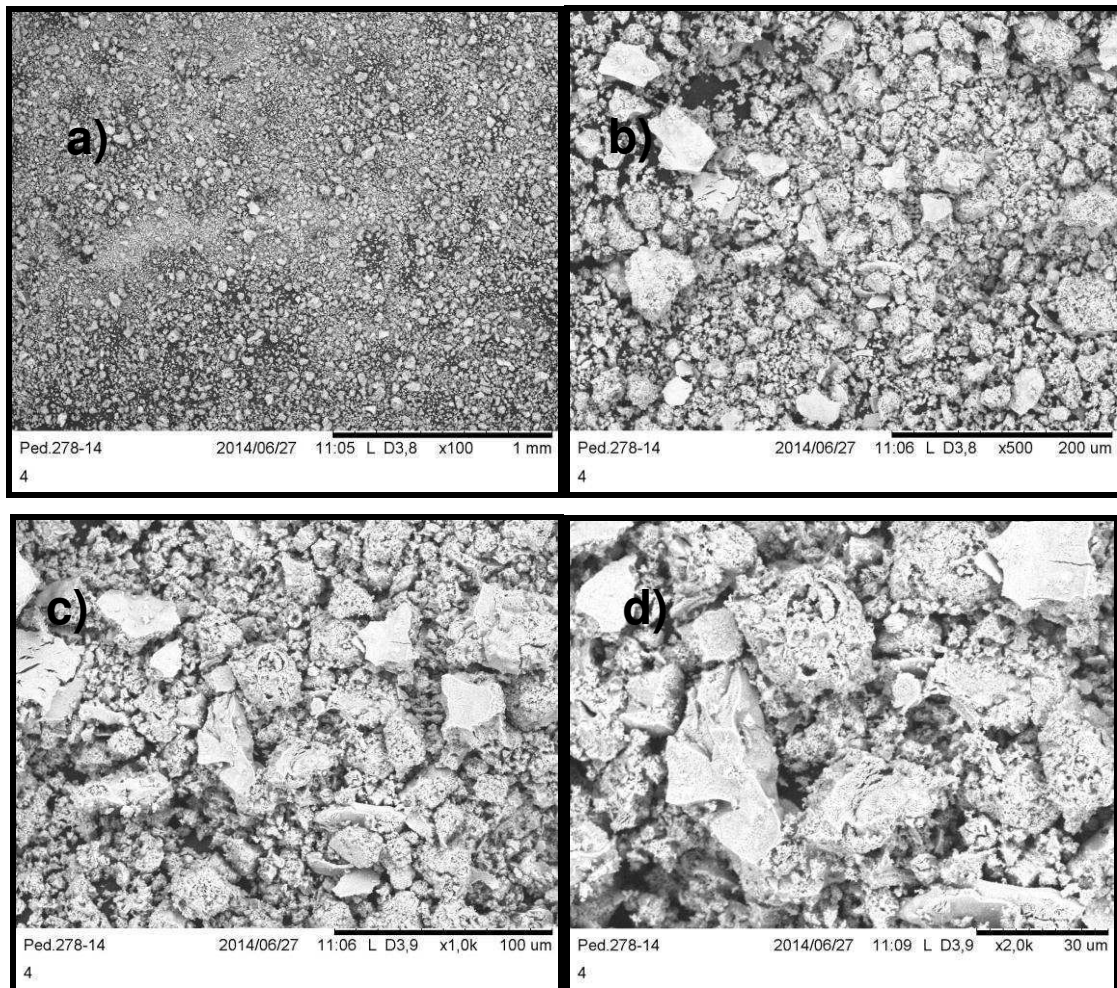
Figura 6 – Imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura da Amostra 3: a) Aumento de 100x; b) Aumento de 500x; c) Aumento de 1000x; d) Aumento de 2000x.



Fonte: Própria

A Figura 6 ilustra a micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para amostra 3. Observamos que para todas as micrografias há a formação de aglomerados com formato irregular, e com uma estreita distribuição de tamanho de partículas. Estes aglomerados são constituídos de partículas com tamanho variando de 9,4 a 37,5 μm com tamanho médio de 18,13 μm , e com baixa porosidade interpartícula.

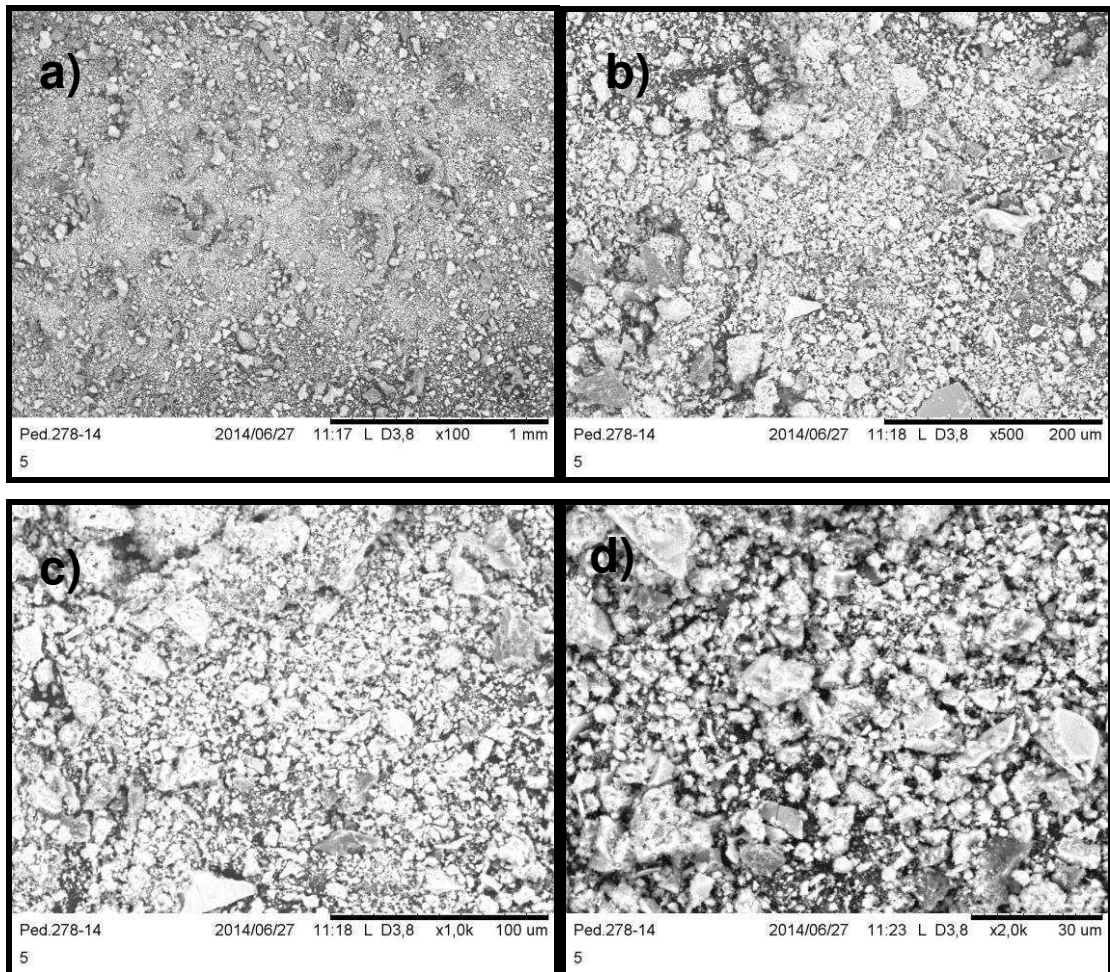
Figura 7 – Imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura da Amostra 4: a) Aumento de 100x; b) Aumento de 500x; c) Aumento de 1000x; d) Aumento de 2000x.



Fonte: Própria

A Figura 7 ilustra a micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para amostra 4. Observamos que para todas as micrografias há a formação de aglomerados com formato irregular, e com uma estreita distribuição de tamanho de partículas. Estes aglomerados são constituídos de partículas com tamanho variando de 11,2 a 57,6 μm e tamanho médio de 22,56 μm , e com baixa porosidade interpartícula.

Figura 8 – Imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura da Amostra 5: a) Aumento de 100x; b) Aumento de 500x; c) Aumento de 1000x; d) Aumento de 2000x.



Fonte: Própria

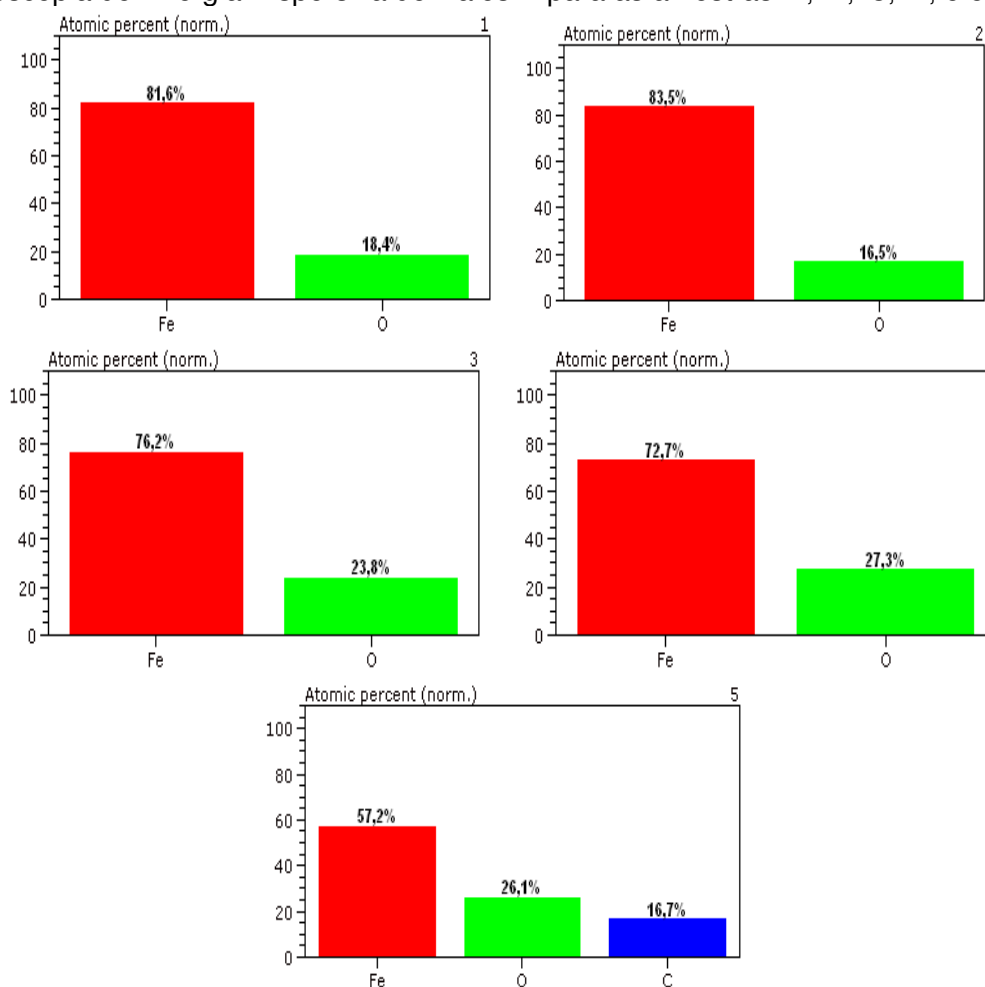
A Figura 8 ilustra a micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para amostra 5. Observamos que para todas as micrografias há a formação de aglomerados com formato irregular, e com uma estreita distribuição de tamanho de partículas. Estes aglomerados são constituídos de partículas com tamanho variando de 8,9 a 43,3 μm e tamanho médio de 16,42 μm , e com baixa porosidade interpartícula.

4.1.3 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X apresenta a composição das amostras, variando o percentual de cada elemento químico, com valores próximos para as quatro primeiras amostras, com o Ferro variando de 72,7% a 83,5% e o Oxigênio variando de 16,5% a 27,3%. Já na quinta amostra, o percentual de composição dos elementos apresentou uma grande alteração, com 57,2% de Ferro, 26,1% de Oxigênio e incluindo um novo elemento, o Carbono, com 16,7%.

A Figura 9 ilustra os resultados obtidos por Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios X.

Figura 9 – Gráfico de barras com os percentuais de cada elemento químico obtidos na Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X para as amostras 1, 2, 3, 4, e 5.



Fonte: Própria

Nos resultados de EDS para as amostras 1 a 4 (Fig. 9a-9d), são observadas a presença dos elementos ferro e oxigênio, que são elementos pertencentes a

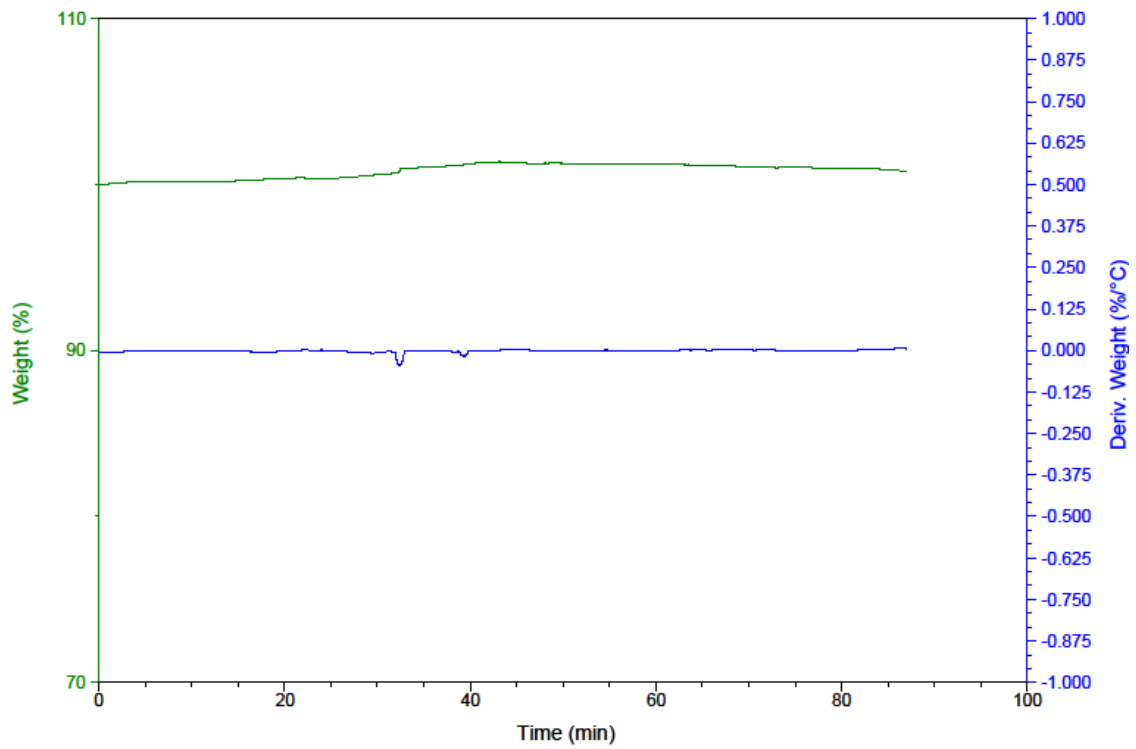
estrutura do hematita. A amostra 2 apresentou maior percentual do íon ferro (83,5%), quando comparado com as demais amostras. A amostra 1 apresentou uma redução no percentual de ferro de 2,27%; a amostra 3, 8,74%; a amostra 4, 12,94%; e a amostra 5, 31,49%, quando comparado a amostra 2. Conforme verificado na Figura 9e, a temperatura de calcinação de 400°C por 2 horas não foi suficiente para a decomposição do Carbono presente na amostra.

Henriques, 2012, em estudo para caracterizar amostras de hematita obtidas do Quadrilátero Ferrífero (hematita compacta – Mina de Casa de Pedra, hematita martítica – Mina de Alegria e hematita especular – Mina do Andrade) e uma amostra coletada na Serra de Carajás, quanto à mineralogia, composição química, área superficial específica, densidade, volume de poros e variação de massa com o aumento da temperatura, obteve caracterização por EDS com valores percentuais de Oxigênio de 19,38% e a de Ferro de 80,62%, portanto, próximos aos valores obtidos neste estudo (HENRIQUES, 2012).

4.1.4 Termogravimetria (TG)

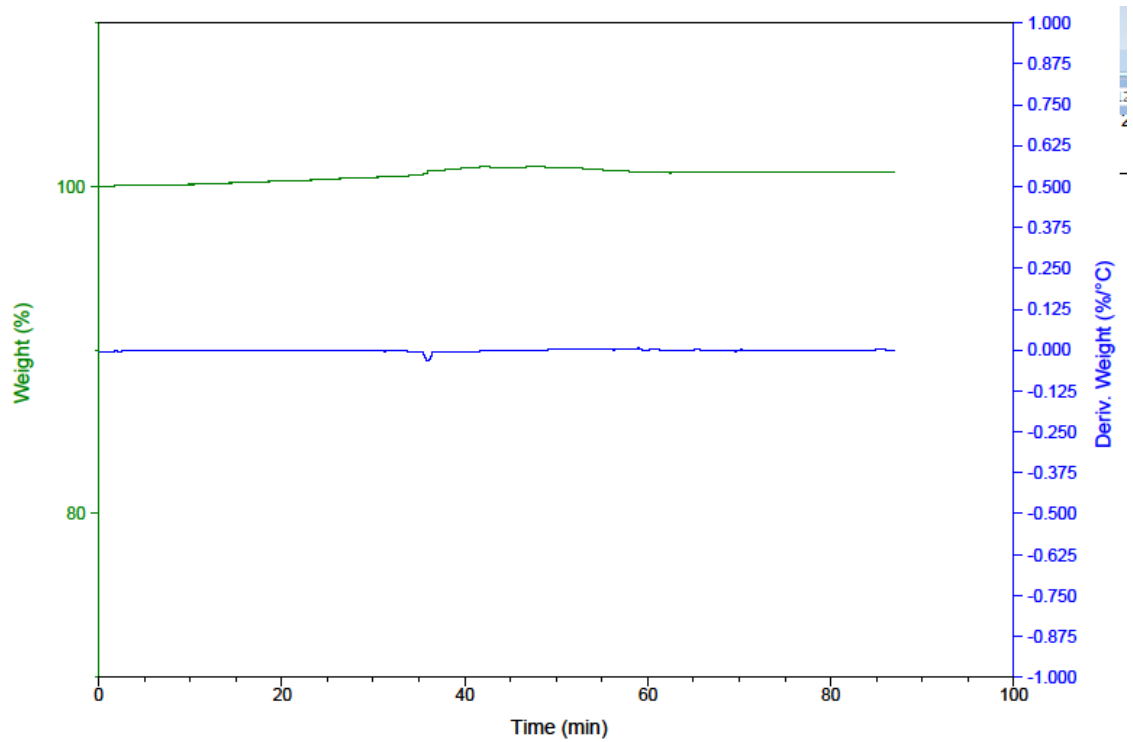
As análises das curvas de termogravimetria das Figuras 10 a 13, identificam que as amostras 1 a 4 possuem comportamento térmico estável, conforme esperado para a magnetita e hematita.

Figura 10 - Curvas Termogravimétricas para a amostra 1.



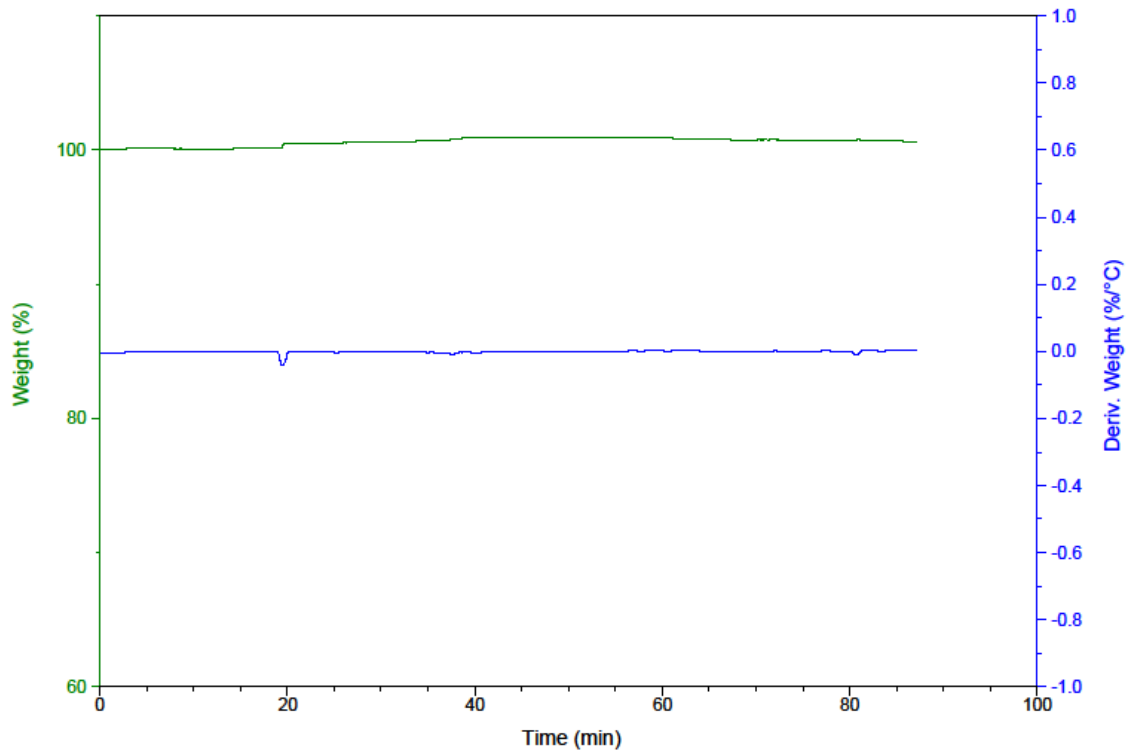
Fonte: Própria

Figura 11 - Curvas Termogravimétricas para a amostra 2.



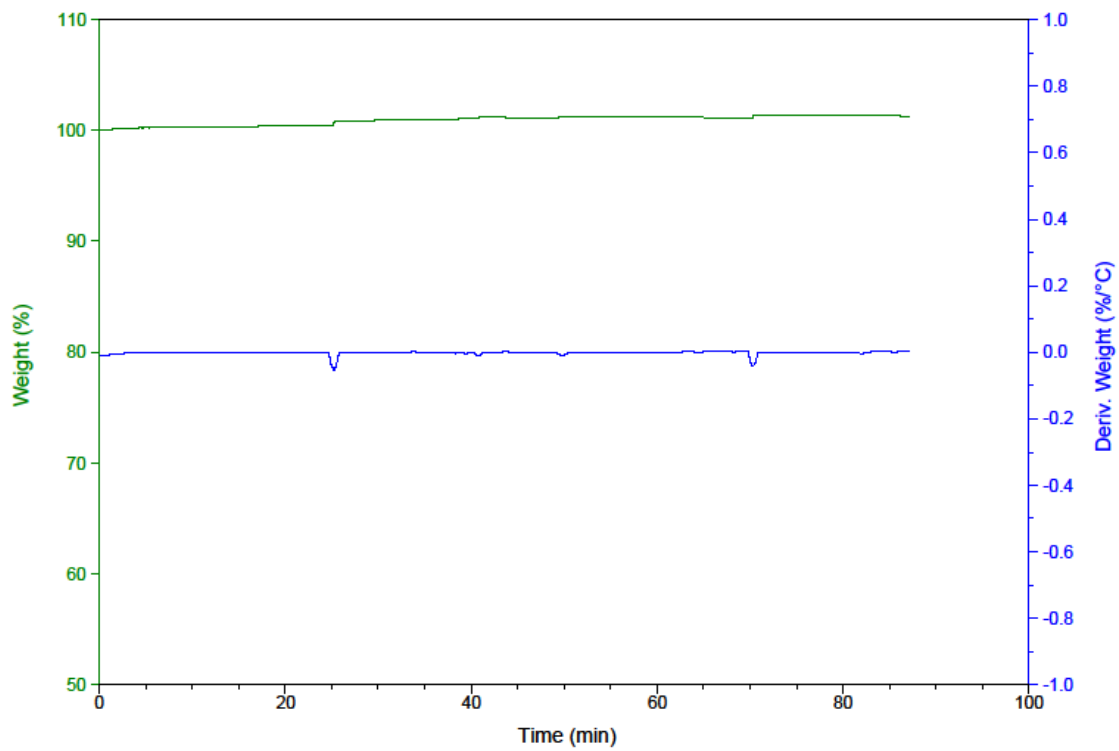
Fonte: Própria

Figura 12 - Curvas Termogravimétricas para a amostra 3.



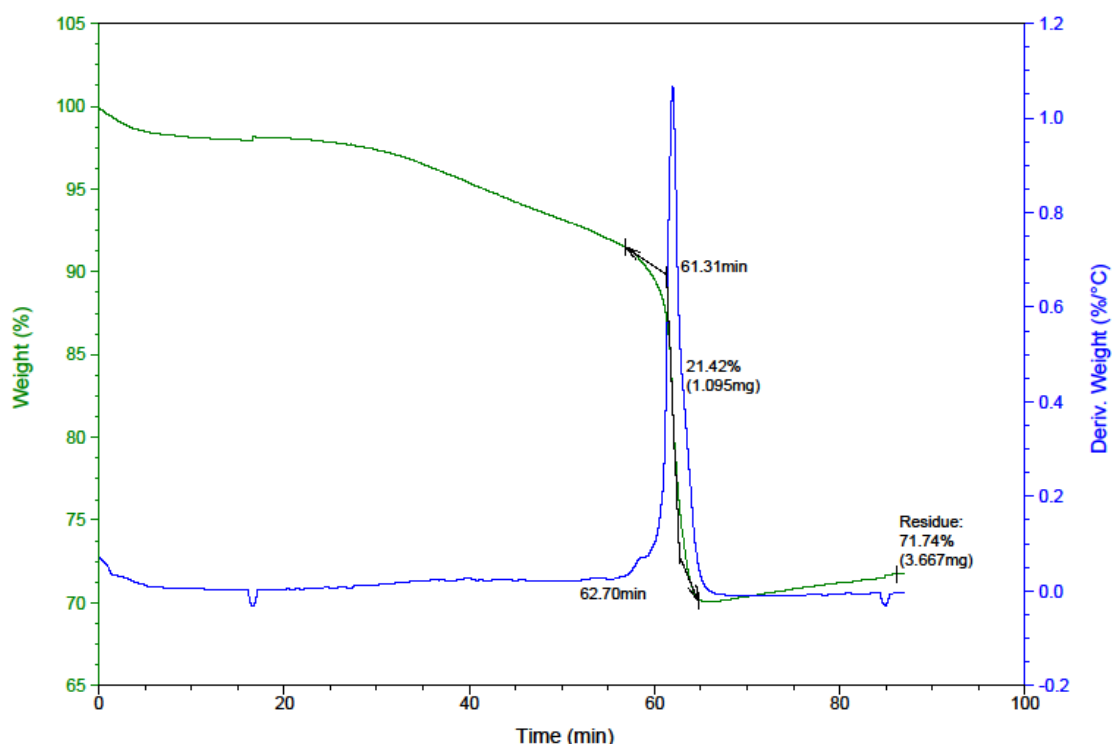
Fonte: Própria

Figura 13 - Curvas Termogravimétricas para a amostra 4



Fonte: Própria

Figura 14 - Curvas Termogravimétricas para a amostra 5.



Fonte: Própria

Por observação da Figura 14, nota-se que as nanopartículas de óxido de ferro apresentaram uma perda de massa. Verifica-se que esta perda ocorreu em 550-627°C com perda de massa de 1,095 mg, equivalente a uma perda de massa percentual de 21,42%. Acima de 627°C observa-se que as nanopartículas apresentaram um ganho de massa equivalente a um ganho de massa percentual de 7,52%.

Observando as Figuras 10 a 14 observa-se que a amostra que apresentou perda de massa foi a Amostra 5. Isso deve ter se dado em função da temperatura não ter sido suficiente pra eliminar a matéria orgânica.

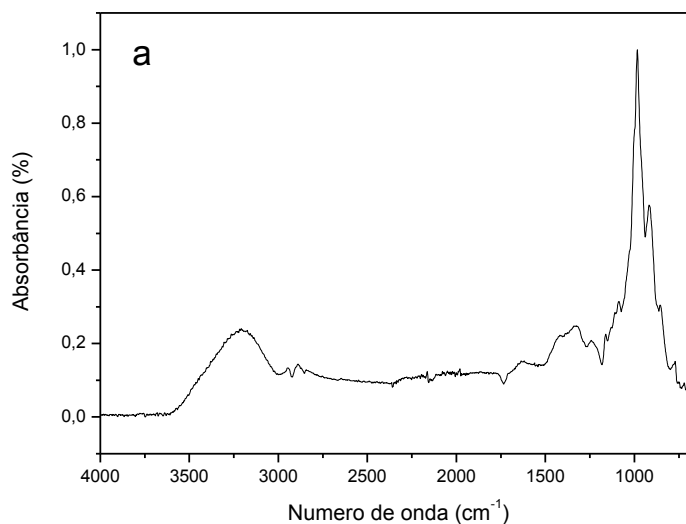
Magalhães, 2008, quando obteve o óxido de ferro pelo método de precipitação do precursor hidroxiacetato de ferro (HAF), a atmosfera de ar sintético e calcinado a 400°C, observou através da análise termogravimétrica que a magnetita apresentou um ganho de massa de apenas 2,5 %, numa faixa de temperatura de 150 °C a 290 °C, devido à possível oxidação da magnetita se transformado na fase da hematita por reação de desidroxilação. Observou um evento endotérmico que associou à dessorção de água. Próximo a 180 °C, verificou uma perda de massa

gradual e pequena até o final da análise, possivelmente relacionada à desidroxilação de grupos Fe-OH localizados na superfície da hematita.

4.1.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

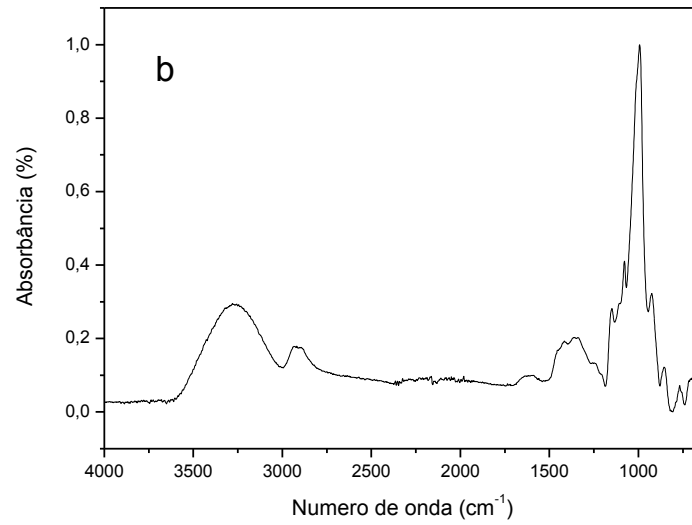
A técnica de FTIR foi utilizada com o objetivo de demonstrar os espectros (bandas características dos grupos funcionais) obtidos do pó de magnetita, conforme mostrado nas Figuras 15 a 19.

Figura 15– Espectro na região do infravermelho para a amostra 1.



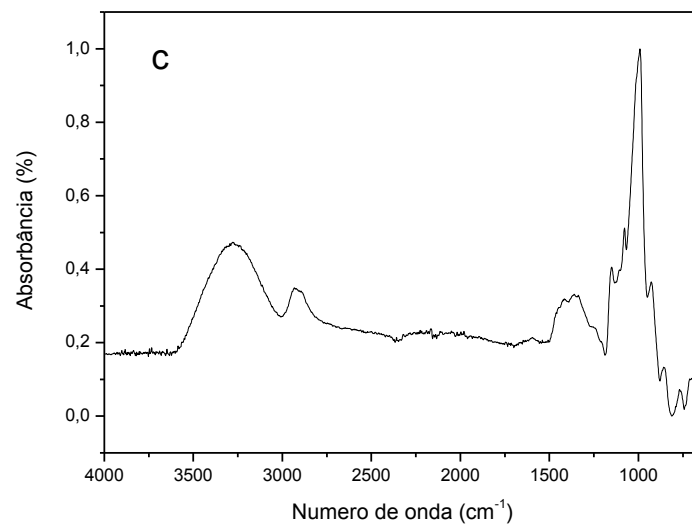
Fonte: Própria

Figura 16– Espectro na região do infravermelho para a amostra 2.



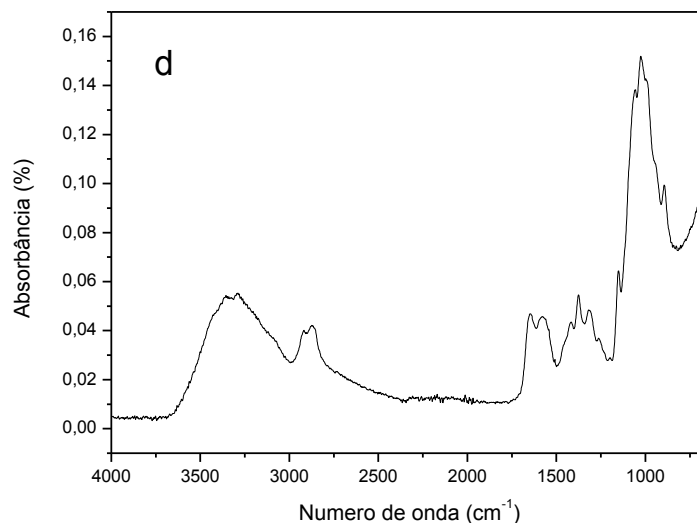
Fonte: Própria

Figura 17– Espectro na região do infravermelho para a amostra 3.



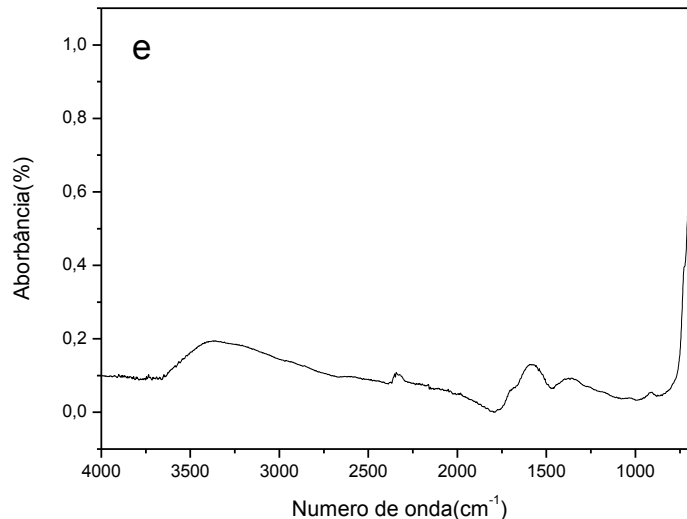
Fonte: Própria

Figura 18– Espectro na região do infravermelho para a amostra 4.



Fonte: Própria

Figura 19– Espectro na região do infravermelho para a amostra 5.



Fonte: Própria.

Observa-se através das Figuras 15 a 19 que as amostras de óxido de ferro apresentaram comportamento semelhante. Observa-se uma banda na faixa de 3200 cm^{-1} característico de ligações O–H–O, proveniente da presença de água na amostra, a qual pode ser proveniente de adsorção superficial pela umidade do ar atmosférico e também devido o KBr utilizado para a preparação da mesma, o qual é higroscópico, tendo grande facilidade de absorver umidade. Observa-se bandas de

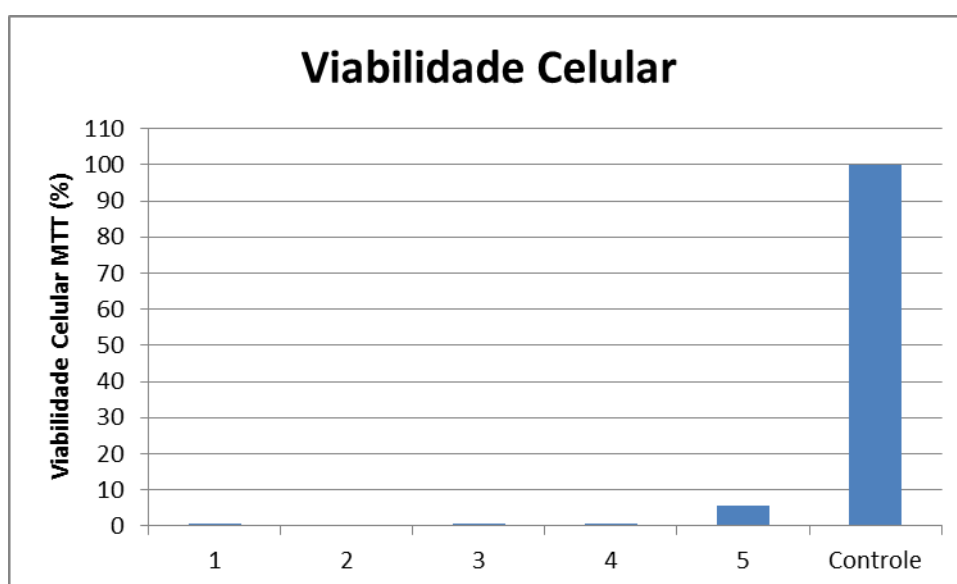
estiramento na região de 2940 cm^{-1} atribuídas a $\nu(\text{C-H})$ alifáticos tipo sp^3 , C=O em 2363 cm^{-1} e bandas N-H em 1424 cm^{-1} a 1240 cm^{-1} . Em 1634 cm^{-1} observa-se uma banda correspondente às vibrações de estiramento do grupo O-H , que se referem à água livre e/ou fisicamente adsorvida, grupos hidroxilas, resultantes da reação de pechini. Bandas abaixo de 1000 cm^{-1} são observadas, que são atribuídas às vibrações intrínsecas dos sítios tetraédricos e octaédricos característicos do espinélio.

O estudo de Yamaura et al. (2008), encontrou para o espectro da magnetita bandas de absorção características em 634 cm^{-1} e 560 cm^{-1} que podem ser atribuídas às vibrações das ligações Fe-O e bandas em 3410 cm^{-1} e 1624 cm^{-1} que podem ser atribuídas às vibrações das moléculas de H_2O livres ou adsorvidas.

4.1.6 Ensaio de Citotoxicidade – Viabilidade Celular

4.1.6.1 Viabilidade Celular

Figura 20 - Viabilidade de macrófagos de camundongos Swis na presença das amostras obtidas e CONTROLE = controle negativo.



Fonte: Própria.

O objetivo deste ensaio foi avaliar a viabilidade das células em face do material produzido para uso em organismos vivos. Se o material testado no ensaio não for citotóxico as células irão permanecer aderidas as cavidades de avaliação e irão proliferar ao longo do tempo, contudo se o material for citotóxico as células param de crescer, apresentando características citoplásticas ou se descartam da cavidade (CRAIG e POWER, 2004).

A Figura 20 ilustra os resultados percentuais da viabilidade celular das amostras testada e calculada pelo ensaio de MTT. As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade e estão representadas na última coluna (CONTROLE = controle negativo).

Para as amostras obtidas observa-se uma viabilidade celular menor que 10%, sendo este resultado inferior aos 50% necessários para ser considerada como biocompatível. O desvio padrão para o controle foi de 6,623538 %. As demais amostras apresentaram um desvio padrão muito elevado.

As características biológicas apresentadas pelas amostras realizadas neste trabalho mostraram que, não apresentou comportamento adequado *in vitro*, quando em ambiente fisiológico e em contato com as células, como pode ser observado pela presença de citotoxicidade. Estes resultados indicam que o material não é um possível candidato à aplicação como suporte para o crescimento celular na regeneração tecidual.

5 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos verificou-se que o Método Pechini é eficaz para a obtenção de magnetita e hematita, com pós com elevada estabilidade térmica.

Pelas condições de temperatura e tempo de calcinação não foi possível obter a magnetita como fase majoritária. Este material não pode ser utilizado como biomaterial, pois o mesmo não apresentou viabilidade celular.

6 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

Para pesquisas futuras sugerimos que seja feita uma busca de produtos utilizados no mercado nacional, fazer as caracterizações de modo a confrontar os dados informados para os produtos pelo fabricante e os dados obtidos nas caracterizações.

REFERÊNCIAS

AHAMED, M.; AKHTAR, M. J.; SIDDIQUI, M. A.; AHMAD, J.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; ALSALHI, M. S.; ALROKAYAN, S. A. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. **Toxicology**, v. 283, ed. 2-3, pp. 101-108, 2011.

BULTE, J. W. M.; KRAITCHMAN, D. L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. **NMR in Biomedicine**, v. 17, ed. 7, pp. 484-499, 2004.

COROT, C.; ROBERT, P.; IDEE, J. M.; PORT, M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, ed. 14, pp. 1471-1504, 2006.

CRAIG, R. G., POWER, J. M. **Materiais dentários restauradores**. São Paulo, 11° Ed. Livraria Santos Editora Ltda, pp. 125-128, 2004.

DEBRASSI, A. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de derivados da quitosana para aplicação como sistemas de liberação de indometacina**. 2011, 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas – Área de Concentração em Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas – Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2011.

FLACKE, S; FISCHER, S; SCOTT, M. J.; FUHRHOP, R. J.; ALLEN, J. S.; MCLEAN, M.; WINTER, P.; SICARD, G. A.; GAFFNEY, P. J.; WICKLINE, S. A.; LANZA, G. M. Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin implications for detecting vulnerable plaques. **Circulation**, v. 104, ed. 11, pp. 1280-1285, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA's Approach to Regulation of Nanotechnology Products**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm301114.htm>>. Acesso em 15/05/2014.

FURTADO, C. M. **Efeito da funcionalização com quitosana e glutaraldeído para obtenção de materiais híbridos a partir do $ZnAl_{1,95}(Yb:Er)_{0,05}O_4$, visando aplicações biotecnológicas**. Doutorado em Engenharia de Processos (Tese) da Universidade Federal de Campina Grande, 2013.

GUBIN, S. P.; KOKSHAROV, Y. A.; KHOMUTOV, G. B.; YURKOV, G. Y. Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. **Russian Chemical Reviews**, v. 74, ed. 6, pp. 489-520, 2005.

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

HENRIQUES, A. B. **Caracterização e estudo das propriedades eletrocinéticas dos minerais de ferro: hematita, goethita e magnetita**. 2012, 223f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, MG, 2012.

HOET, P. H. M.; NEMMAR, A.; NEMERY, B. Health impact of nanomaterials? **Nature Biotechnology**, v. 22, ed. 1, pp. 19, 2004.

KIRCHER, M. F.; MAHMOOD, U.; KING, R. S.; WEISSLEDER, R.; JOSEPHSON, L. A multimodal nanoparticle for preoperative magnetic resonance imaging and intraoperative optical brain tumor delineation. **Cancer Research**, v. 63, ed. 23, pp. 8122-8125, 2003.

KRISHNAN, K. M. Biomedical Nanomagnetism: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 46, ed. 7, pp. 2523-2558, 2010.

LEE, J. H.; HUH, Y. M.; JUN, Y.; SEO, J.; JANG, J.; SONG, H. T.; KIM, S.; CHO, E. J.; YOON, H. G.; SUH, J. S.; CHEON, J. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. **Nature Medicine**, v. 13, ed. 1, pp. 95-99, 2007.

LOUIE, A. Y.; HÜBER, M. M.; AHRENS, E. T.; ROTHBACHER, U.; MOATS, R.; JACOBS, R. E.; FRASER, S. E.; MEADE, T. J. In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. **Nature Biotechnology**, v. 18, ed. 3, pp. 321-325, 2000.

LU, J.; MA, S. L.; SUN, J. Y.; XIA, C. C.; LIU, C.; WANG, Z. Y.; ZHAO, X. N.; GAO, F. B.; GONG, Q. Y.; SONG, B.; SHUAI, X. T.; AI, H.; GU, Z. W. Manganese ferrite nanoparticle micellar nanocomposites as MRI contrast agent for liver imaging. **Biomaterials**, v. 30, ed. 15, pp. 2919-2928, 2009.

MAGALHÃES, F. **Síntese e Caracterização de Óxidos de Ferro e Compósitos para Aplicações no Tratamento Redox de Efluentes Aquosos**. 2008. 215f. Tese (Doutorado em Ciências – Química). Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, MG, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, pp.55-63, 1983.

NA, H. B.; SONG, I. C.; HYEON, T. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. **Advanced Materials**, v. 21, ed. 21, pp. 2133-2148, 2009.

NEUBERGER, T.; SCHOPF, B.; HOFMANN, H.; HOFMANN, M.; VON RECHENBERG, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. v. 293, ed. 1, ed. especial SI, pp. 483-496, 2005.

PATEL, D.; KELL, A.; SIMARD, B.; XIANG, B.; LIN, H. Y.; TIAN, G. H. The cell labeling efficacy, cytotoxicity and relaxivity of copper-activated MRI/PET imaging contrast agents. **Biomaterials**, v. 32, ed. 4, pp. 1167-1176, 2011.

ROSA, M. **Segmentação de grãos de hematita em amostras de minério de ferro por análise de imagens de luz polarizada**. 2008. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) – Centro de Tecnologia. Santa Maria, RS, 2008.

SHARIFI, S.; BEHZADI, S.; LAURENT, S.; FORREST, M. L.; STROEVE, P.; MAHMOUDI, M. Toxicity of nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, ed. 6, pp. 2323-2343, 2012.

SIMONETTI, O. P.; KIM, R. J.; FIENO, D. S.; HILLENBRAND, H. B.; WU, E.; BUNDY, J. M.; FINN, J. P.; JUDD, R. M. An improved MR imaging technique for the visualization of myocardial infarction. **Radiology**, v. 218, ed. 1, pp. 215-223, 2001.

SOUZA NETO, F. N. de. **Preparação e caracterização de óxidos de ferro magnéticos revestidos com polidimetilsiloxano**. 2012. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares). Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás (UEG) - Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas. Anápolis, GO, 2012.

SUN, C.; LEE, J. S. H.; ZHANG, M. Q. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, ed.11, pp. 1252-1265, 2008.

THOENY, H. C.; TRIANTAFYLLOU, M.; BIRKHAUSER, F. D.; FROEHLICH, J. M.; TSHERING, D. W.; BINSER, T.; FLEISCHMANN, A.; VERMATHEN, P.; STUDER, U. E. Combined ultras-small superparamagnetic particles of iron oxide-enhanced and diffusion-weighted magnetic resonance imaging reliably detect pelvic lymph node metastases in normal-sized nodes of bladder and prostate cancer patients. **European Urology**, v. 55, ed. 4, pp. 761-769, 2009.

VEISEH, O.; GUNN, J. W.; ZHANG, M. Q. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, ed. 3, pp. 284-304, 2010.

XAVIER, C. S. **Pigmentos nanométricos, constituídos por ferritas, obtidos pelo método dos precursores poliméricos**. 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza – Departamento de Química, João Pessoa, 2006.

YAMAURA, M.; HORITA, A.S.; ODA, H.T.Y.; STOPA, L.C.B. **Caracterização das partículas magnéticas de quitosana**. In: 18º CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. Porto de Galinhas, PE, 2008.

YANG, F.; LI, Y. X.; CHEN, Z. P.; ZHANG, Y.; WU, J. R.; GU, N. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-embedded encapsulated microbubbles as dual contrast agents of magnetic resonance and ultrasound imaging. **Biomaterials**, v. 30, ed. 23-24, pp. 3882-3890, 2009.

YIN, H.; TOO, H. P.; CHOW, G. M. The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite. **Biomaterials**, v. 26, ed. 29, pp. 5818-5826, 2005.