

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

*Anderson Costa da Silva*

**Estudo Magnético e Magneto-óptico do Processo de  
Internalização de Nanopartículas Magnéticas  
Biocompatíveis de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  Recobertas com Dextrana  
por Células Tumoriais de Sarcoma 180**

GOIÂNIA

2010

*Anderson Costa da Silva*

**Estudo Magnético e Magneto-óptico do Processo de  
Internalização de Nanopartículas Magnéticas  
Biocompatíveis de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  Recobertas com Dextrana  
por Células Tumoriais de Sarcoma 180**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Física  
da Universidade Federal de Goiás como parte  
dos requisitos para a obtenção do título de  
Mestre em Física.*

**ORIENTADOR:** *Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis*

GOIÂNIA

2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
GPT/BC/UFG**

S586e Silva, Anderson Costa.  
Estudo Magnético e Magneto-óptico do Processo de Internalização de Nanopartículas Magnéticas Biocompatíveis de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  Recobertas com Dextrana por Células Tumorais de Sarcoma 180 [manuscrito] / Anderson Costa da Silva. - 2010.  
xiv, 103 f., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,  
Instituto de Física, 2010.  
Bibliografia.

1. Fluidos Magnéticos. 2. Física - Células Tumorais - Sarcomas  
3. Nanopartículas Magnéticas 4. Magneto-óptica I. Título.

CDU:53:616-006.04

*Aos meus pais, à minha esposa e ao meu irmão e sua esposa.*

# Agradecimentos

- À Deus, primeiramente.
- À minha esposa Monna por toda a compreensão despendida nos momentos mais difíceis.
- Ao meu amado pai Alexandre Francisco da Silva (“*in memoriam*”) pelas horas de alegria e conforto que passamos juntos. Ao senhor meu pai, toda a felicidade que Deus possa lhe proporcionar! Muito obrigado por ter sido “meu pai”. Te amo onde quer que você esteja neste momento.
- À minha mãe Olga, por ter acreditado e ajudado sempre que precisei.
- Ao Prof. Dr. Andris F. Bakuzis por ter acreditado que poderíamos realizar este projeto
- À Prof(a). Dra. Patrícia Sartoratto do Instituto de Química da UFG coordenadora do Laboratório onde foi preparado o fluido magnético investigado.
- À Prof(a). Dra. Elisângela Lacerda coordenadora do laboratório de genética do ICB-UFG, onde foram preparadas as amostras com células tumorais de Sarcoma 180.
- Prof. Dr. Leandro Martin Socolovsky da Universidade de Buenos Aires por ter realizado as medidas de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução.
- Ao Laboratório de Microscopia do LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) pelo uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão de Alta Resolução.
- Aos amigos Emílio Ramos Cintra e Juracy Leandro Santos Jr. pelo auxílio dentro dos laboratórios.
- Aos amigos Sebastião Mendanha e Adolfo Henrique do grupo de Biofísica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás por toda a ajuda prestada.
- À mestre do ICB, Grupo de Genética, Aliny pela dedicação na preparação das amostras de Sarcoma 180.
- À colega do IQ-UFG Michelly Patrícia Santana de Almeida Fógia por ter sintetizado a amostra de fluido magnético.

- Aos amigos Udson, José Carlos, Sebastião, Bruno e Rafael pela grande ajuda prestada nos momentos mais difíceis.

*Este trabalho foi financiado pela CAPES.*

# Resumo

Neste trabalho investigamos o processo de internalização de nanopartículas magnéticas de magnetita, recobertas com dextrana, por células neoplásicas de Sarcoma 180 (S180), por meio das técnicas de magnetometria de amostra vibrante (MAV) e birrefringência magnética estática (BME). A amostra de fluido magnético, estável em pH fisiológico, foi preparada pelo método de coprecipitação. O crescimento das nanopartículas ocorreu conjuntamente com o recobrimento molecular por dextrana. A estrutura cristalina foi confirmada por difração de raios-X. As nanopartículas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução. O método de Sturges foi utilizado para obter a polidispersão de diâmetros, que foi ajustada por uma distribuição do tipo lognormal com diâmetro modal de  $5,5 \pm 0,1$  nm e dispersidade  $0,18 \pm 0,02$ . A linhagem tumoral de camundongo Sarcoma 180 foi obtida segundo protocolo estabelecido pela American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Estudos de citotoxicidade, utilizando o método MTT, foram feitos para uma fração volumétrica de nanopartículas de  $\phi = 0,00065$  após uma e cinco horas de exposição das células S180 as nanopartículas. Em particular, foi encontrada uma viabilidade celular de  $87 \pm 11\%$  após uma hora de exposição provando que não houve morte celular significativa no intervalo de tempo em que as medidas de MAV e BME foram realizadas. Medidas de magnetização foram feitas para obter a fração volumétrica de nanopartículas. Testes do efeito de centrifugação das nanopartículas suspensas em meio de cultura celular RPMI 1640 revelaram uma sedimentação de nanopartículas magnéticas extremamente baixa. Um procedimento, utilizando aceleração de  $260\times g$  por 10 minutos, foi adotado para separar células contendo nanopartículas internalizadas daquelas suspensas no meio RPMI 1640. Medidas de magnetização das células S180 contendo

nanopartículas foram realizadas numa larga faixa de tempo de exposição (100 minutos). Entre 10 e 70 minutos a quantidade de nanopartículas em unidade de massa passou de  $52 \pm 20$  pg/célula para  $110 \pm 15$  pg/célula. De fato os dados de magnetometria indicam que o processo de internalização atingiu a saturação entre 30 a 40 minutos.

A técnica de magnetoóptica de BME também foi utilizada para investigar o processo de internalização das nanopartículas. Primeiramente, medidas de BME foram feitas em amostra controle consistindo de nanopartículas magnéticas suspensas em meio RPMI 1640. Foram investigados efeitos de concentração de nanopartículas e de tempo de envelhecimento (associado a dinâmica de formação de aglomerados). Em particular, o tamanho médio do aglomerado ( $Q$ ), associado ao número de nanopartículas formando uma cadeia linear, manteve-se basicamente constante,  $Q=4,8 \pm 0,2$ , para uma faixa de tempo de 70 min. Dados de birrefringência de saturação também permaneceram estáveis neste intervalo. Adicionalmente, medidas de BME foram utilizadas para estimar a espessura da camada de cobertura (dextrana) sendo encontrado  $1,70 \pm 0,02$  nm. Diferentemente dos dados de MAV, as medidas de BME foram feitas em amostras contendo tanto células S180 quanto nanopartículas no meio RPMI 1640. Dados foram obtidos numa larga faixa de tempo (120 min.). Inicialmente observou-se que o sinal de BME decresce num intervalo de tempo e depois volta a crescer (entre 30-40 min.). O ajuste dos dados de BME indicam que a birrefringência de saturação ( $\Delta n_s$ ) decresce nos primeiros 30 minutos e depois volta a crescer de forma suave, enquanto o tamanho médio do aglomerado possui um comportamento oposto, ou seja cresce nos primeiros 30 minutos e depois volta a decrescer. Em particular, no tempo de exposição,  $t_{exp}$ , de 10 min. o tamanho médio do aglomerado (birrefringência de saturação) variou de  $4,18 \pm 0,04$  ( $\Delta n_s = 3,41 \pm 0,02 \times 10^{18} \text{cm}^{-3}$ ) para  $5,22 \pm 0,08$  ( $\Delta n_s = 2,75 \pm 0,02 \times 10^{18} \text{cm}^{-3}$ ) em  $t_{exp}=30$  min. Como a birrefringência de saturação é proporcional ao número de nanopartículas contribuindo para o sinal magnetoóptico conclui-se que o decréscimo do sinal magneto-óptico foi decorrente do processo de internalização de nanopartículas magnéticas pelas células S180. Por sua vez, a análise da dependência temporal do tamanho médio do aglomerado também sugere que o processo de internalização ocorre

primeiramente com nanopartículas anisométricas ou com nanoestruturas formando pequenos aglomerados. Finalmente, após atingir a saturação no processo de internalização, observa-se a formação de pequenos aglomerados no meio RPMI 1640, que é o responsável pelo aumento da intensidade do sinal magneto-óptico e diminuição do tamanho médio do aglomerado para tempos maiores que 30 minutos.

# Abstract

In this work we investigated the internalization process of magnetite nanoparticles, surface coated with dextran, by mice tumour cells of Sarcoma 180 (S180) through the techniques of vibrating sample magnetometer (VSM) and static magnetic birefringence (SMB). The magnetic fluid sample, stable in physiological conditions, was prepared by the coprecipitation method. The growth of nanoparticles occurred in conjunction with the nanoparticle surface coating process by dextran. The crystal structure was confirmed by X-ray diffraction. The nanoparticles were characterized by high resolution transmission electronic microscopy. The Sturges method was used to obtain the polydispersity in diameter, which was fitted by a lognormal size distribution obtaining a modal diameter of  $5.5 \pm 0.1$  nm and dispersity of  $0.18 \pm 0.02$ . The mice tumour cell sarcoma 180 was obtained using protocol established by the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Studies of cytotoxicity, using the MTT method, were obtained for a nanoparticle volumetric fraction of  $\phi = 0.00065$  after one and five hours of exposure of cells S180 to the nanoparticles. In particular, we found a cellular viability of  $87 \pm 11$  % after one hour of exposure proving that there was no appreciable cell death in the time interval in which the measurements of MAV and BME were performed. Magnetization measurements were performed to obtain the volume fraction of nanoparticles. Tests regarding the effect of centrifugation of nanoparticles suspended in cell culture medium RPMI 1640 showed a extremely low sedimentation of magnetic nanoparticles. A procedure, using a acceleration of  $260 \times g$  for 10 minutes, was used to separate cells containing internalized nanoparticles from nanoparticles suspended in RPMI 1640. Measurements of magnetization of S180 cells containing nanoparticles were performed in a wide range of exposure time (100

minutes). Between 10 and 70 minutes the amount of nanoparticles in mass unit increased from  $52 \pm 20$  pg/cell to  $110 \pm 15$  pg/cell. Indeed magnetometry data indicate that the process of internalization had achieved saturation between 30 to 40 minutes.

Magneto-optical technique of SMB was also used to investigate the process of internalization of nanoparticles. Firstly, SMB measurements were performed in control samples consisting of magnetic nanoparticles suspended in RPMI 1640. We investigated the effects of nanoparticle concentration and aging time (related to the dynamics of nanoparticle agglomeration). In particular, the average size of the agglomerate ( $Q$ ), associated with the number of nanoparticles forming a linear chain, remained basically constant,  $Q = 4.8 \pm 0.2$  for a full-time of 70 minutes. Magnetic birefringence saturation data also remained stable in this time interval. Additionally, analysis of the measurements of SMB were also used to estimate the thickness of the coating layer (dextran), from which we found  $1.70 \pm 0.02$  nm. Unlike VSM data, SMB measurements were obtained on samples containing both S180 cells and magnetic nanoparticles inside the RPMI medium 1640. Data were obtained in a wide range of time (120 min.). Initially it was observed that the SMB signal decreases in a time range and then increases again (between 30-40 min.). The fit of the experimental data indicate that the magnetic birefringence saturation ( $\Delta n_s$ ) decreases in the first 30 minutes and then increases again smoothly, while the average size of the cluster has the opposite behavior, i.e. increases in the first 30 minutes and then decreases. In particular, for a exposure time,  $t_{exp}$ , of 10 min. the average size of the agglomerate (magnetic birefringence saturation) changed from  $4.18 \pm 0.04$  ( $\Delta n_s = 3.41 \pm 0.02 \times 10^{18} \text{ cm}^{-3}$ ) to  $5.22 \pm 0.08$  ( $\Delta n_s = 2.75 \pm 0.02 \times 10^{18} \text{ cm}^{-3}$ ) at  $t_{exp} = 30$  min. As the birefringence saturation is proportional to the number of nanoparticles contributing to the magneto-optical signal one can conclude that the decrease in the magneto-optical signal was due to the process of internalization of magnetic nanoparticles by cells S180. On the other hand, the analysis of the aging time dependence of the mean size of the agglomerate also suggests that the process of internalization occurs primarily with anisometric nanoparticles or nanostructures forming small agglomerates. Finally, after reaching saturation of the process

of nanoparticle internalization we found a formation of small agglomerates in the RPMI 1640 medium, which is responsible for the increased intensity of the magneto-optical signal, as well as the decrease of the mean size of the agglomerate for times longer than 30 minutes.

# Conteúdo

<b>Lista de Figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xiii</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 Fluidos Magnéticos</b>	<b>6</b>
2.1 Histórico . . . . .	6
2.2 Características Gerais . . . . .	7
2.3 Métodos de Preparação . . . . .	7
2.4 Estabilidade . . . . .	10
2.4.1 Interação de van der Waals . . . . .	11
2.4.2 Interação Dipolar Magnética . . . . .	11
2.4.3 Repulsão Estérica . . . . .	12
2.4.4 Repulsão Eletrostática . . . . .	12
2.5 Nanopartículas Magnéticas Biocompatíveis . . . . .	13
2.5.1 Aplicações . . . . .	14
2.5.2 Separação e Seleção . . . . .	16
2.5.3 Hipertermia Magnética . . . . .	17
2.5.4 Nanocarreador de Drogas (Drug delivery) . . . . .	17
2.5.5 Aplicações Diagnósticas . . . . .	18

<b>3</b>	<b>Amostras</b>	<b>20</b>
3.1	Fluido Magnético . . . . .	20
3.1.1	Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão . . . . .	20
3.2	Células de Sarcoma 180 (S180) . . . . .	24
3.2.1	Método de Preparação . . . . .	25
3.2.2	Teste de Citotoxicidade . . . . .	26
<b>4</b>	<b>Estudo Magnético do Processo de Internalização Celular de Nanopartículas Magnéticas</b>	<b>28</b>
4.1	Magnetometria . . . . .	28
4.2	Superparamagnetismo . . . . .	31
4.2.1	Cálculo da Fração Volumétrica de NPMs . . . . .	34
4.3	Resultados de Magnetometria . . . . .	37
4.3.1	Teste de Efeito de Centrifugação . . . . .	38
4.3.2	Medidas Magnéticas de NPMs Internalizadas por Células S180 . . . . .	40
<b>5</b>	<b>Estudo Magneto-óptico da Interação das Nanopartículas Magnéticas com Células S180</b>	<b>48</b>
5.1	Birrefringência . . . . .	48
5.1.1	Birrefringência Óptica . . . . .	49
5.1.2	Birrefringência Magnética Estática (BME) . . . . .	51
5.1.3	Diagrama de Bloco do Experimento de BME . . . . .	59
5.2	Resultados de BME . . . . .	61
5.2.1	BME em Função da Concentração em meio de Cultura Celular . . . . .	61
5.2.2	BME do Fluido Magnético em meio RPMI 1640: Aging Effect . . . . .	64
5.2.3	BME do Fluido Magnético com Células S180 . . . . .	66
<b>6</b>	<b>Conclusões e Perspectivas</b>	<b>73</b>



# Lista de Figuras

1.1	Perfil de internalização de partículas por células HeLa incubados a $37^{\circ}C$ por 4h A legenda representa o diâmetro da partícula por volume da partícula onde 150nm-negro, 100nm-vermelho, 200nm-verde, 0, 5 $\mu m$ -azul escuro, 1 $\mu m$ -azul claro, 2 $\mu m$ -rosa, 3 $\mu m$ -roxo, 5 $\mu m$ -laranja [13, Gratton, DeSimone et al; 2008] . . . . .	3
1.2	Número de publicações de 1997 à 2009. Fonte: <i>web of science/10-01-2010</i> . . . . .	5
1.3	Número de citações destes trabalhos de 1998 à 2010. Fonte: <i>web of science/10-01-2010</i> . . . . .	5
2.1	Representação esquemática de um fluido magnético surfactado em três escalas de comprimento. Na escala macroscópica (esquerda), o fluido magnético aparece como um fluido comum. Na escala coloidal (meio), o fluido aparece como uma dispersão coloidal de diversas partículas sólidas. Na direita, mostra-se o revestimento das nanopartículas . . . . .	7
2.2	(a) e (b) corespondem a configurações de interação do tipo atrativas e em (c) configura-se uma interação dipolar repulsiva . . . . .	12
2.3	Representação esquemática de um fluido magnético iônico . . . . .	13
2.4	Representação esquemática do transporte magnético de drogas para uma região específica. O catéter é inserido dentro da artéria alimentadora no tumor e um suporte magnético é posicionado sobre o sítio marcado [59, Tartaj; 2003] . . . . .	18
3.1	Imagem de TEM feita pelo Prof. Dr. Leandro Socolovsky no LNLS em Campinas-SP. A barra de escala é de 5nm . . . . .	21
3.2	Distribuição de tamanhos através de imagines de TEM. A linha vermelha corresponde ao ajuste teórico pela função lognormal . . . . .	23

3.3	Imagem das células de Sarcoma 180 feitas no laboratório de Citogenética da UFG sob coordenação da Prof. Dr(a). Elisângela de Paula Silveira Lacerda do Instituto de Ciências Biológicas	25
3.4	Percentual de viabilidade celular de células de Sarcoma 180 após 1h e 5h de exposição com o fluido magnético de $\gamma - Fe_2O_3$	27
4.1	Diagrama do VSM	29
4.2	Magnetômetro de amostra vibrante do laboratório de Magnetometria do Instituto de Física da UFG. Figura 1	30
4.3	Magnetômetro de amostra vibrante do laboratório de Magnetometria do Instituto de Física da UFG. Figura 2	30
4.4	Curvas de magnetização da amostra de $\gamma - Fe_2O_3$ recoberta com dextrana: Preto-amostra em 1:0, Vermelho-diluída em 1:1 e Azul-diluída em 1:4	37
4.5	Curvas de magnetização da amostra de $\gamma - Fe_2O_3$ recoberta com dextrana diluída me meio de cultura do S180 em diluição de $100\mu l$ para $100\mu l$ : Azul-sem centrifugação, Vermelho-com centrifugação	39
4.6	Curvas de magnetização da amostra de $\gamma - Fe_2O_3$ recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180: Sobrenadante	41
4.7	Curvas de magnetização da amostra de $\gamma - Fe_2O_3$ recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180: Parte sedimentada e suspensa em solução RPMI 1640	42
4.8	Curvas de magnetização da amostra de $\gamma - Fe_2O_3$ recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180: Ajuste teórico	42
4.9	Curvas de magnetização da amostra de $\gamma - Fe_2O_3$ recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180: Sem contribuição diamagnética das células	43
4.10	Curvas de magnetização da amostra de $\gamma - Fe_2O_3$ recoberta com dextrana diluída me meio de cultura do S180 em diluição de $100\mu l$ para $100\mu l$ : Azul-sem centrifugação, Vermelho-com centrifugação	44

4.11	Curvas de magnetização da amostra de $\gamma - Fe_2O_3$ recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180 . . . . .	45
4.12	Curvas de magnetização da amostra de $\gamma - Fe_2O_3$ recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180: Sem contribuição diamagnética das células . . . . .	45
4.13	Gráfico da quantidade de massa de nanopartículas magnéticas em pg ( $1pg = 10^{-12}g$ ) por células de S180 . . . . .	46
5.1	Representação do experimento de Bartholinus. Nas figuras (a) e (c) observa-se apenas uma imagem proveniente do feixe ordinário, e do extraordinário, respectivamente. Na figura (b) observa-se a imagem dupla (sem polarizador) . . . . .	49
5.2	Separação das ondas de luz por um cristal birrefringente (a). Na figura (b) o feixe incide perpendicularmente ao eixo óptico do cristal provocando uma diferença de fase entre os feixes emergentes. Em (c), a incidência é paralela e os feixes não apresentam diferença de fase entre si. . . . .	50
5.3	Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica de uma mistura binária de partículas com diâmetros diferentes. A micrografia (a) foi tomada em campo nulo, e (b) em campo $H \neq 0$ [81, Butter <i>et al</i> ]. A barra de escala é de 200nm . . . . .	51
5.4	Esquema de orientação de um aglomerado com relação ao referencial no laboratório. . . . .	55
5.5	Representação esquemática da distância superfície a superfície entre duas nanopartículas magnéticas separadas a uma distância $r$ . . . . .	59
5.6	Diagrama de bloco das medidas de birrefringência magnética estática. . . . .	60
5.7	Montagem experimental de BME do Laboratório de Magneto-óptica do IF-UFG. . . . .	61
5.8	Medida de BME da amostra de fluido magnético diluído em meio de cultura celular . . . . .	62
5.9	Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético: diluição de 1:1 . . . . .	63
5.10	Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético diluído $1\times$ em meio de cultura: diluição 1:3 . . . . .	63
5.11	Controle da amostra de $100\mu l$ de fluido magnético diluído em $100\mu l$ de meio de cultura em função do tempo. . . . .	64

5.12	Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético diluído $1\times$ em meio de cultura em $t = 50\text{min}$ . . . . .	65
5.13	Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético diluído $1\times$ em meio de cultura em $t = 50\text{min}$ . . . . .	65
5.14	Valores experimentais do tamanho médio dos aglomerados. . . . .	66
5.15	Valores experimentais da birrefringência de saturação em tempos diferentes na mesma concentração. . . . .	66
5.16	Dados de BME da amostra de fluido magnético em meio a células de S180 nos tempos de 10min, 30min, 60min e 120min . . . . .	67
5.17	Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético com células S180. (a) 10min (b) 30min . . . . .	69
5.18	Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético com células S180. (a) 60min (b) 120min . . . . .	69
5.19	(a) Gráfico da evolução do tamanho médio dos aglomerados em relação ao tempo da amostra de fluido magnético (b) Gráfico comparativo entre os dados de BME da amostra de fluido magnético com as células de S180 e o controle . . . . .	70
5.20	Análise dos dados de BME da amostra de fluido magnético diluído em meio RPMI 1640 com células de S180 em função do tempo . . . . .	70
5.21	Análise numérica de (5.55) com valores fictícios de $Q_1 = 2$ e $Q_2 = 6$ . . . . .	71

# Lista de Tabelas

3.1	Número de contagens para construção do histograma característico da amostra de fluido magnético utilizada . . . . .	22
4.1	Teste de centrifugação visual de amostra de $100\mu l$ de fluido magnético diluídos em $100\mu l$ de meio de cultura celular do S180 . . . . .	38
4.2	Dados do teste de centrifugação por magnetometria . . . . .	39
4.3	Dados das medidas de magnetometria do primeiro experimento ( $1pg = 10^{-12}g$ e N o número de partículas por unidade de volume) . . . . .	43
4.4	Dados das medidas de magnetometria do segundo experimento ( $1pg = 10^{-12}g$ e N o número de partículas por unidade de volume) . . . . .	46
5.1	Tabela dos valores de birrefringência de saturação de tamanho médio dos aglomerados em função do tempo da amostra de fluido magnético com células de S180 . . . . .	69

# Capítulo 1

## Introdução

A nanomanipulação é uma idéia relativamente recente que ganhou maior repercussão a partir de uma palestra proferida no encontro da *American Physical Society*, em 29 de dezembro de 1959, por *Richard Feynman*, um dos mais renomados cientistas do século *XX* e ganhador de prêmio Nobel de Física em 1965.

Em sua palestra intitulada *There's plenty of room at the bottom*, Feynman discutiu que a manipulação de átomos e moléculas poderia gerar descobertas de novas propriedades resultando em diversas aplicações em todos os campos do conhecimento.

Embora a nanomanipulação não fosse factível anteriormente devido as limitações de equipamentos apropriados, a tecnologia em escala nanométrica vem sendo praticada há séculos, de forma indireta. Na realidade, o homem tem empregado nanomateriais desde tempos remotos quando os antigos artífices utilizavam argila para confecção de utensílios domésticos ou incorporavam a vidros partículas finamente divididas para criação dos mais variados tipos de utensílios em cores.

A palavra usada para denominar esta ciência em nanoescala, ou mais precisamente, o termo nanotecnologia, surgiu apenas em 1974, quando um pesquisador da Universidade de Tóquio, *Norio Taniguchi*, fez a distinção entre engenharia em escala micrométrica e o novo campo da engenharia, em escala submicrométrica, que estava começando a emergir.

Avanços significativos em nanotecnologia não foram notados até o início da década de 1980, devido a ausência de novos instrumentos que permitissem a nanomanipulação, como por

exemplo, os microscópios de varredura por sonda (SPM): tunelamento (STM) e força atômica (AFM). Esses instrumentos vêm promovendo os "olhos" e os "dedos" necessários para medir e manipular em escala nanométrica [1].

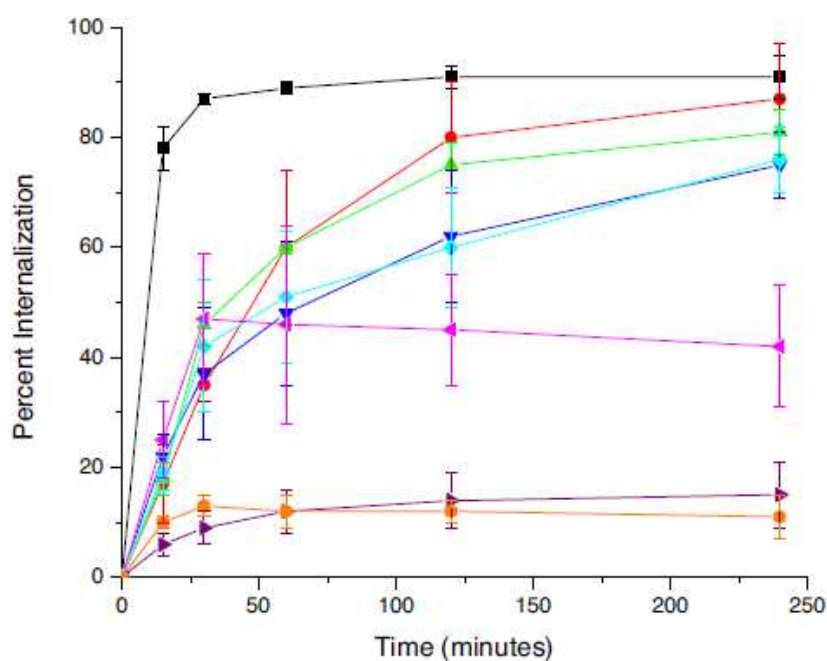
Nanoestruturas são sistemas que possuem pelo menos uma das dimensões na escala nanométrica, por exemplo, filmes finos (2D), nanotubos e nanofios (1D) e nanopartículas (0D). Nanopartículas possuem dimensões entre  $2 \sim 100nm$  ( $1nm = 10^{-9}m$ ), sendo na maioria dos casos obtidas por processos físicos e químicos. Um exemplo de processo físico consiste na moagem mecânica denominado "top-bottom", ou seja, de cima para baixo. Já que de uma amostra bulk (amostras macroscópicas) faz-se as nanoestruturas. Outra maneira é a síntese química denominada "bottom-up" que, por sua vez, é de baixo para cima onde a partir de uma solução química formam-se as nanoestruturas [2]. Basicamente, encontra-se na literatura nanopartículas metálicas (*Au, Ag*) [3], semicondutoras (*CdS, CdTe, ZnSe*) [4] e magnéticas (*Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>*) [5,6], com aplicações diversas inclusive na área biomédica.

A integração da nanotecnologia com biologia celular e a medicina tem resultado num grande desenvolvimento para uma nova área de pesquisa emergente no mundo da ciência, a nanobiotecnologia. Esta integração oferece oportunidades de descobrir novos materiais, processos e fenômenos, os quais podem ser usados em diversas áreas associadas a saúde. De fato, materiais nanoestruturados oferecem grandes vantagens e oportunidades em aplicações biomédicas como marcação magnética *in vivo* de células tronco [7], ou ainda, detecção de bactérias, vírus (patógenos) em baixa concentração por nanopartículas magnéticas biofuncionais [8]. Nestes casos, utiliza-se muitas vezes o fato da nanopartículas magnéticas serem excelentes agentes de contrastes em Ressonância Magnética Nuclear por Imageamento (RMNI). Além disso, nanopartículas magnéticas podem interagir com campo magnético externo, esta ação a distância permite vantagem tremenda para várias aplicações como, por exemplo, no tratamento de tumores malignos como gliomas via magnetohipertermia [9]. Diversas outras aplicações biomédicas têm sido relatadas atuando tanto no diagnóstico molecular de doenças, em muitos casos por meio de marcadores fluorescentes (caso dos pontos quânticos) [10] ou via

agente de contraste por ressonância magnética nuclear por imagem [11] e no tratamento de câncer por meio do processo de magnetohipertermia [12].

Em particular, o processo de internalização de nanopartículas por células através de processo de endocitose celular (processo pelo qual as células vivas activamente absorvem material moléculas, pedaços de detritos ou outras células através da membrana celular) tem sido investigado por parte da comunidade científica, em trabalhos recentes. As técnicas para verificação deste fenômeno mais usadas são imagens de Microscopia Confocal e Microscopia Eletrônica de Transmissão TEM. Resultados recentes investigaram a internalização de nanopartículas de polietilenoglicol (PEG) [13] e nanopartículas de ouro [14].

De acordo com estes artigos, a internalização depende da forma, tamanho e densidade de carga superficial (vide figura 1.1) das nanopartículas. Os resultados sugerem ainda que este processo depende da camada molecular que recobre as nanopartículas. Um exemplo de camada é a dextrana.



**Figura 1.1** : Perfil de internalização de partículas por células HeLa incubados a  $37^{\circ}C$  por  $4h$  A legenda representa o diâmetro da partícula por volume da partícula onde  $150nm$ -negro,  $100nm$ -vermelho,  $200nm$ -verde,  $0,5\mu m$ -azul escuro,  $1\mu m$ -azul claro,  $2\mu m$ -rosa,  $3\mu m$ -roxo,  $5\mu m$ -laranja [13, Gratton, DeSimone et al; 2008]

Nanopartículas recobertas com dextrana tem se mostrado eficientes em várias aplicações, principalmente por demonstrarem grande biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* quando expostas a sistemas biológicos. Podemos citar, por exemplo, a utilização de nanopartículas magnéticas recobertas com carboxil-dextrana na liberação controlada de fármacos para o tratamento de gliomas (tumor na cabeça) por apresentarem baixa toxicidade as células [15], nanopartículas magnéticas recobertas com dextrana para aplicações como agentes de contraste para ressonância magnética por imageamento (RMNI) de células tumorais do pâncreas [16].

A eficiente internalização de nanopartículas magnéticas recobertas com dextrana também foi relatado recentemente por *Berry et al* [17] e *J. H. Clement et al* [18]. *Berry et al* sugerem a utilização dessas nanoestruturas para o tratamento de neoplasias (câncer) na magnetohipertermia intracelular, enquanto *J. H. Clement et al* utilizaram nanopartículas semelhantes para a marcação seletiva e separação de células tumorais leucêmicas K5 62 associada ao câncer no sangue.

Como visto anteriormente, são várias as aplicações biomédicas de nanopartículas, em especial, utilizando as magnéticas. Como demonstração que este estudo se torna cada vez mais importante nos dias atuais, fizemos uma busca no Web of Science por trabalhos relacionados utilizando os seguintes termos “*magnetic nanoparticles and tumor cells applications*” e notamos uma quantidade expressiva de trabalhos recentes. Além disso, nota-se que o número de citações cresce exponencialmente, como mostra os gráficos das figuras (1.2) e (1.3) sugerindo o reconhecimento da comunidade internacional acerca da importância destes sistemas nanoestruturados para as aplicações neste âmbito tecnológico.

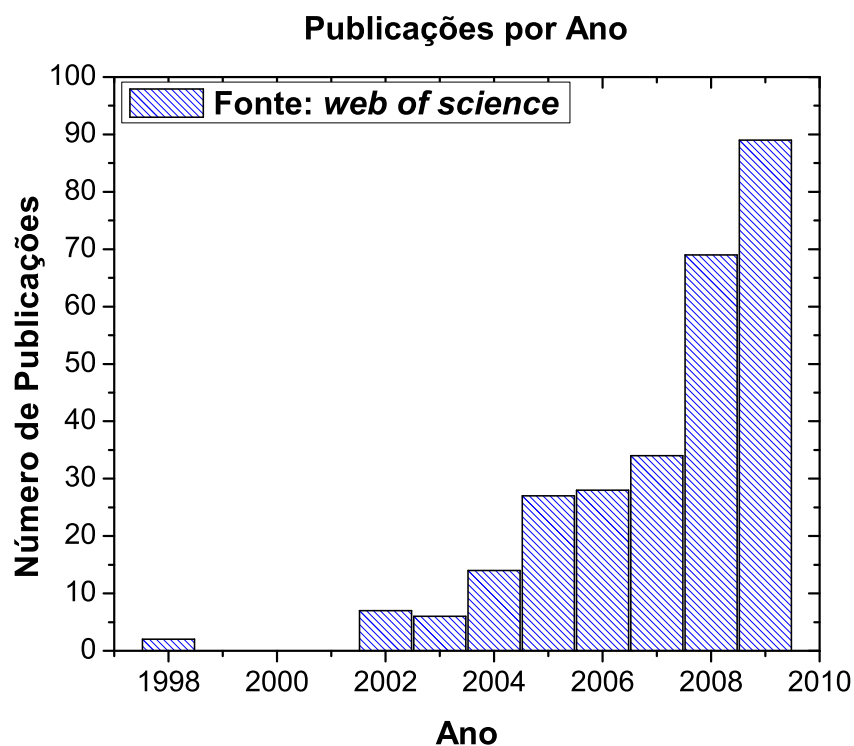


Figura 1.2 : Número de publicações de 1997 à 2009. Fonte: *web of science/10-01-2010*

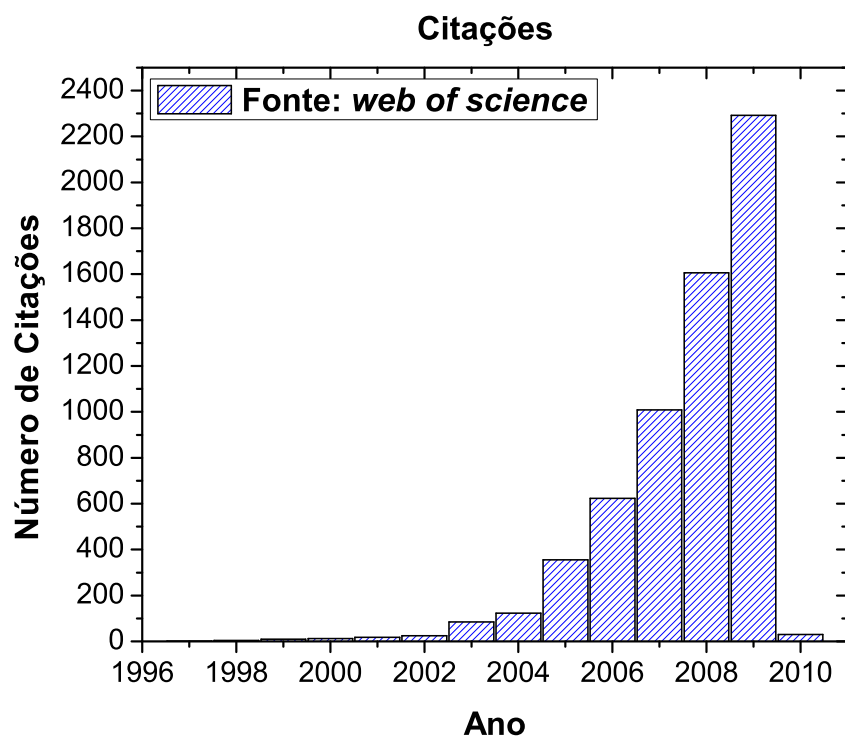


Figura 1.3 : Número de citações destes trabalhos de 1998 à 2010. Fonte: *web of science/10-01-2010*

# Capítulo 2

## Fluidos Magnéticos

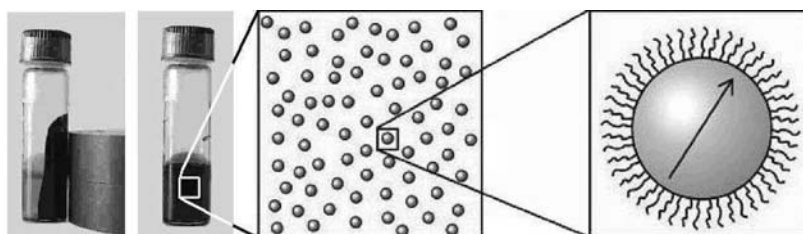
### 2.1 Histórico

Em 1779, Gowan Knight conduziu uma das primeiras tentativas de se obter fluidos com propriedades magnéticas, dispersando partículas de ferro em água. A suspensão coloidal obtida tinha pouco tempo de estabilidade e demandava muito esforço em sua produção. Por volta de 1930, Bitter conseguiu produzir um colóide formado por partículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ), com diâmetros da ordem de 10,4nm, dispersas em água. Elmore, em 1938, obteve amostras semelhantes, com partículas menores que 20nm. Estes colóides, entretanto, ainda apresentavam o problema de pouca estabilidade, problema que seria resolvido através da separação das partículas maiores por processos de centrifugação. O fluido magnético denominado ultraestável foi finalmente obtido em 1965 por Papell para a agência espacial americana NASA-National Aeronautics and Space Administration, com o objetivo de ser utilizado no controle de fluxo de combustíveis na ausência de gravidade. Logo então, vários avanços foram obtidos na produção de fluidos. Entre 1965 e 1969, Rosensweig conseguiu produzir fluidos magnéticos utilizando vários solvente apolares. Na década de 1970, Khalafalla e Reiners substituíram os processos de moagem, utilizados até então para a obtenção das nanopartículas magnéticas, por métodos de síntese química. Em seguida, 1979, Massart obteve os ditos fluidos magnéticos iônicos, cujas nanopartículas são dispersas em solventes polares. Na década de 1980, Cabuil obteve fluidos magnéticos com nanopartículas de maghemita cujo a estrutura atômica é  $\gamma Fe_2O_3$  [6].

## 2.2 Características Gerais

**Sistemas coloidais** são misturas heterogêneas formadas basicamente por duas fases, uma contínua e outra dispersa. Por exemplo, o leite é um sistema coloidal no qual a fase contínua é a água e a fase dispersa são vários tipos de partículas presentes em sua composição estrutural. Em dispersões coloidais, a fase contínua pode ser um solvente fluido e a fase dispersa partículas sólidas. Estas partículas, geralmente, tem diâmetro entre 2nm e 100nm e são chamadas de **nanopartículas** pelo fato de seu diâmetro ser da ordem do **nanometro**( $10^{-9}m$ ).

**Fluidos magnéticos**, também denominados *ferrofluidos*, são dispersões coloidais cuja fase dispersa é composta por nanopartículas ferro ou ferrimagnéticas ( $Fe_3O_4$ ,  $MnFe_2O_4$ ,  $CoFe_2O_4$  e outros), e cuja a fase contínua é um solvente líquido polar ou apolar (vide fig.2.1). As nanopartículas magnéticas são aproximadamente esféricas e geralmente são *monodomínios magnéticos*, ou seja, toda a nanopartícula magnética representa uma região onde os spins se acoplam ferro ou ferrimagneticamente.



**Figura 2.1** : Representação esquemática de um fluido magnético surfactado em três escalas de comprimento. Na escala macroscópica (esquerda), o fluido magnético aparece como um fluido comum. Na escala coloidal (meio), o fluido aparece como uma dispersão coloidal de diversas partículas sólidas. Na direita, mostra-se o revestimento das nanopartículas

## 2.3 Métodos de Preparação

Na obtenção de amostras de fluidos magnéticos, requer-se como material de partida nanopartículas magnéticas estáveis. As nanopartículas devem apresentar uniformidade de forma e dimensão de modo que possuam propriedades físicas e químicas estáveis. Estas nanoestruturas devem ter um alto controle de várias variáveis como, por exemplo, a sua dimensão, estabilidades química e estrutural possuindo, desta forma, tamanhos uniformes e que

possam transformar-se em fluidos magnéticos estáveis, sem aglomerados ou agregados. Tais características, podem influenciar as propriedades magnéticas dos materiais nas mais diversas aplicações, sejam biomédicas como drug delivery (liberação controlada de fármacos) [19] ou tecnológicas como em transformadores elétricos [20].

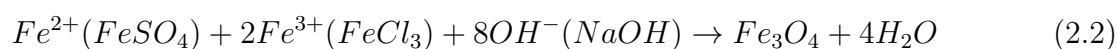
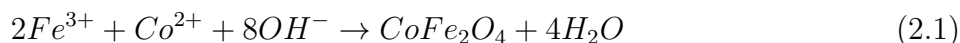
As nanopartículas de ferritas possuem diversas técnicas de preparação, sendo estas físicas, químicas ou uma combinação das duas. Nos meios físicos estão inclusos a redução de tamanho por meio de moagem de partículas micrométricas [21] e a de deposição a vapor [22], como exemplos. Entre os processos de preparação química, temos a coprecipitação por meio de hidrólise alcalina em meio aquoso [23, 24] em microemulsão [25], micelas reversas [26] e decomposição térmica [27].

No princípio, na preparação de fluidos magnéticos, as nanopartículas eram obtidas através do método de moagem de um material magnético na presença de um solvente e de um surfactante [21]. O material surfactante atua nas fissuras das micropartículas, facilitando a sua fragmentação. Sendo assim, a dureza, a cristalinidade, microfissuras e plasticidade são as características essenciais que influenciam diretamente no tamanho final do material desejado. Na obtenção de nanopartículas da ordem de 50nm ou de menor diâmetro, o processo de moagem pode perdurar por alguns dias. Dentro deste processo, um surfactante é adsorvido na superfície das nanopartículas fornecendo-lhes a estabilidade na suspensão por meio de repulsão estérica (mecanismo proveniente da camada de cobertura das partículas).

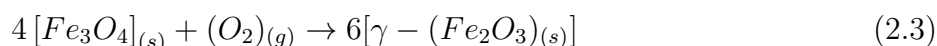
O método de coprecipitação em meio aquoso é o mais conveniente e usado, pois, caracteriza-se por ser um método de baixo custo na obtenção de nanopartículas em grandes quantidades. Este método permite-nos produzir pequenas partículas com altos índices de pureza e estequiometria. Por sua vez, o melhor ajuste de tamanhos das nanopartículas depende de algumas condições de preparação, tais como, o pH das soluções, a temperatura de reação, tempo decorrido desde o precipitado já pronto, a velocidade de agitação, a concentração de íons e o tipo de base utilizada ( $NaOH$ ,  $KOH$ ,  $NH_4OH$ ) [28]. A cristalinidade da nanopartícula, o diâmetro médio e sua dispersão podem ser ajustados fazendo-se a precipitação na presença de ligantes

iônicos tais como tartarato, fosfato e citrato ou na presença de solventes orgânicos.

Para uma melhor visualização destes processos, segue nas equações (2.1) e (2.2) métodos de precipitação de ferrita de cobalto em meio aquoso [29] e precipitação de magnetita em meio aquoso [30], respectivamente.



A maghemita, que é a nanopartícula magnética base neste estudo, pode ser obtida através da oxidação da magnetita como mostra a reação da equação (2.3).



Usualmente, a solução de hidróxido de sódio é adicionada à solução dos íons metálicos sob agitação e à temperatura de ebulição. Após o processo de precipitação, as nanopartículas são lavadas em água para remover os contra-íons que não estão ligados na superfície da amostra, obtendo-se em (2.2) um precipitado de nanopartícula de magnetita de cor preta.

A formação de pequenos aglomerados entre partículas precipitadas nestas soluções é inevitável se não houver um agente que estabilize as interações entre elas. Logo, deve-se realizar o tratamento superficial nas nanopartículas para que as mesmas venham a ter os dois tipos de repulsão entre elas, a eletrostática, que é resultado da adsorção de cargas na superfície das nanopartículas e a estérica entre as partículas provinda dos surfactantes, por exemplo, polímeros ou outras moléculas orgânicas ligadas a superfície. Conforme a aplicação a que são destinadas, elas podem ser sintetizadas com vários tipos de moléculas como ácido oléico, dextrana, entre outros [17,20]. Para aplicações biomédicas, modifica-se a superfície da nanopartícula realizando ligações de moléculas que direcionem o sistema à estabilidade coloidal em meio biológico, ou seja, em pH da ordem de 7,4 e salinidade fisiológica [31]. Além disso, é importante que possuam

grupos funcionais livres para ligarem-se a agentes biológicos.

Logo, podemos dizer que o método de síntese por coprecipitação química tem se tornado uma ferramenta relativamente simples e de baixo custo na obtenção de nanopartículas magnéticas em grande escala e, ainda, possuindo estas amostras um controle razoável de formato e dimensões de suas nanopartículas gerando, assim, fluidos magnéticos altamente estáveis e adequados para aplicações biomédicas.

A maghemita foi o material investigado neste trabalho que, por sua vez, é uma fase metaestável da magnetita e obtida a partir da oxidação da mesma. A amostra de fluido magnético utilizada em nosso estudo é constituída de nanopartículas magnéticas de  $\gamma - Fe_2O_3$  (maghemita) recobertas com dextrana e suspensas em água em pH e salinidade fisiológicas. Esta amostra foi sintetizada pela mestre do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (IQ-UFG) Michelly Patrícia Santana de Almeida Fógia sob orientação da Prof(a). Dra. Patrícia Sartoratto pelo método de coprecipitação. Tal amostra possui um diâmetro de raio X de  $6,6nm$  ( $D_{DRX} = 6,6nm$ ).

## 2.4 Estabilidade

A estabilidade do fluido magnético é de importância fundamental para qualquer aplicação tecnológica desse sistema. A mesma pode ser alterada por mecanismos intrínsecos, por exemplo, as interações via *potencial de van der Waals*, *dipolar magnética* e *dupla camada elétrica* entre partículas, ou ainda, por mecanismos extrínsecos, tais como campo gravitacional, campo magnético e temperatura.

Note que uma das condições primordiais para que as partículas continuem suspensas no líquido carreador é que as mesmas mantenham-se em suspensão devido a agitação térmica. Obviamente que as partículas não podem ser muitos massivas, caso contrário, a ação do campo gravitacional não permitirá que fiquem suspensas no líquido carreador ocasionando, portanto, a precipitação das mesmas. Por outro lado, as interações atrativas e repulsivas devem ser balanceadas, caso contrário, favorece-se a formação de aglomerados que, por sua vez, podem

destruir a estabilidade do fluido.

### 2.4.1 Interação de van der Waals

A energia de interação van der Waals entre duas partículas esféricas idênticas é dada por

$$U_v = -\frac{A}{6} \left[ \frac{2}{s^2 - 4} + \frac{2}{s^2} + \ln \left( \frac{s^2 - 4}{s^2} \right) \right] \quad (2.4)$$

onde  $A$  é o coeficiente de Hamaker e  $s = 2(x/d + 1)$  com  $x$  sendo a distância entre as superfícies das partículas e  $d$  o diâmetro de cada uma delas. O coeficiente de Hamaker, por sua vez, depende das propriedades da partícula e do solvente no qual está suspensa podendo ser escrito por

$$A = \frac{3}{4} K_B T \left( \frac{\epsilon_p - \epsilon_s}{\epsilon_p + \epsilon_s} \right)^2 + \frac{3h\nu_c (n_p^2 - n_s^2)^2}{16\sqrt{2}(n_p^2 - n_s^2)^{2/3}} \quad (2.5)$$

onde  $\epsilon_p$  é a constante dielétrica da partícula,  $\epsilon_s$  a constante dielétrica do solvente,  $h$  a constante de Plank,  $\nu_c$  a frequência característica de absorção,  $n_p$  o índice de refração da partícula e  $n_s$  o índice de refração do solvente. A interação à distância, no limite de partículas muito próximas, é proporcional a  $x^{-1}$  e proporcional a  $x^{-6}$  quando distantes uma da outra.

### 2.4.2 Interação Dipolar Magnética

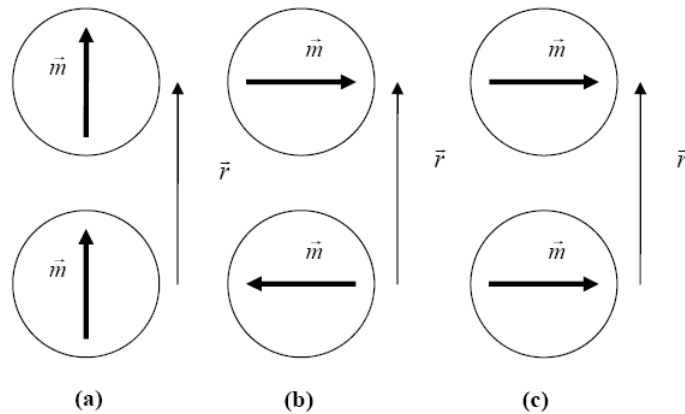
A interação dipolar magnética depende tanto da posição quanto da orientação de seus momentos magnéticos, sendo dada por

$$U_d = \frac{\mu_o}{4\pi} \left( \frac{\vec{\mu}_i \cdot \vec{\mu}_j}{r^3} - \frac{3(\vec{\mu}_i \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_j \cdot \vec{r})}{r^5} \right) \quad (2.6)$$

com  $\mu = \pi M_s d^3 / 6$  sendo o módulo do momento magnético de uma nanopartícula magnética,  $M_s$  a magnetização de saturação da amostra e  $\mu_o$  a permeabilidade magnética do meio.

A interação entre partículas magnéticas pode ser tanto repulsiva quanto atrativa como mostra a figura (2.2)

De acordo com a orientação dos momentos magnéticos pode-se favorecer a formação de aglomerados. Portanto, é necessário introduzir de alguma forma interações repulsivas en-



**Figura 2.2 :** (a) e (b) correspondem a configurações de interação do tipo atrativas e em (c) configura-se uma interação dipolar repulsiva

tre partículas. Isto pode ser feito através de repulsão estérica (*força de contato*), repulsão eletrostática ou uma combinação das duas.

### 2.4.3 Repulsão Estérica

Fluidos magnéticos que utilizam este mecanismo para manter a estabilidade coloidal são denominados, em geral, **surfactados**. A repulsão estérica entre duas partículas esféricas idênticas é dada por [21]

$$\frac{U_{re}}{K_B T} = \frac{\pi d^2 \xi}{2} \left[ 2 - \frac{l+2}{t} \ln \left( \frac{1+t}{1+l/2} - \frac{l}{t} \right) \right], \quad \text{para } x \leq 2\delta \quad (2.7)$$

ou

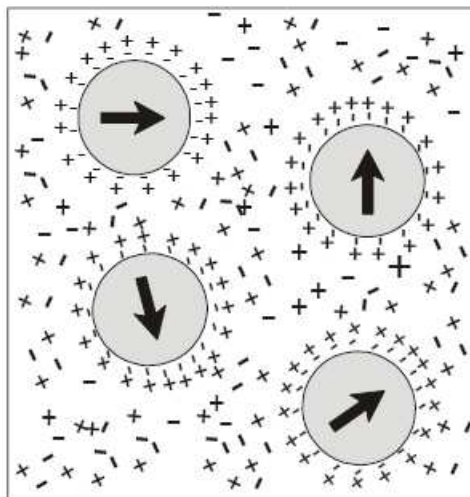
$$\frac{U_{re}}{K_B T} = 0 \quad \text{para } x > 2\delta \quad (2.8)$$

com  $l = 2x/d$  e  $t = 2\delta/d$  sendo  $\delta$  a espessura da camada de cobertura. Na equação acima,  $\xi$  é um parâmetro chamado de *grafting* que descreve a densidade superficial de moléculas absorvidas na superfície da nanopartícula.

### 2.4.4 Repulsão Eletrostática

Fluidos magnéticos que possuem este mecanismo, em geral, são denominados **iônicos** e caracterizam-se pela presença de uma densidade de cargas em torno da superfície das partículas. Formam em torno da superfície da nanopartícula uma dupla camada elétrica, que caracteriza-se

pela presença de regiões distintas, uma denominada interna formada por íons que são absorvidos na superfície da partícula magnética e outra formada por contra-íons, íons opostos que se formam na camada iônica (vide figura 2.3).



**Figura 2.3** : Representação esquemática de um fluido magnético iônico

Veja que a concentração dos íons decresce quanto maior for a camada interna. O raio de ação desta dupla camada elétrica é chamado de raio de Debye e depende tanto da força iônica quanto da temperatura. A interação eletrostática entre duas partículas idênticas com dupla camada elétrica pode ser escrita como

$$U_{el} = 4\epsilon d^2 \left( \frac{K_B T}{q} \gamma \right)^2 \frac{e^{-\kappa(r-d)}}{r} \quad (2.9)$$

onde

$$\gamma = \tanh \left( \frac{q\psi_s}{4K_B T} \right) \quad (2.10)$$

sendo  $\epsilon$ ,  $q$ ,  $\kappa$  e  $\psi_s$  a permissividade do líquido carreador, a carga do contra-íon da dupla camada elétrica, o inverso do raio de Debye e o potencial de Stern (Potencial Zeta), respectivamente. [6]

## 2.5 Nanopartículas Magnéticas Biocompatíveis

Fluidos Magnéticos biocompatíveis normalmente utilizam água em pH e salinidade fisiológicas como carreadores, por exemplo, no interior de nanocápsulas poliméricas magnéticas.

Na fase aquosa, as nanopartículas podem ser estabilizadas por interações iônicas [23, 32], em seguida, adiciona-se alguma bicamada surfactante, por exemplo, ácidos graxos [33], aspártico e glutâmico [34] ou citrato [35]. Alternativamente, a coprecipitação de íons férrico ou ferrosos podem ser realizados na presença de um biopolímero apropriado, por exemplo, a dextrana [36].

Diversos procedimentos para a preparação de ferrofluidos tem sido descritos na literatura. Sínteses de nanopartículas magnéticas usando ambientes restritos oferecidos por sistemas surfactantes assim como microemulsões água em óleo (micelas reversas), fornecem um excelente controle sobre o tamanho da partícula, espaçamento entre as partículas e a sua forma. O ambiente controlado de micela reversa também permite sínteses no qual se pode produzir uma estrutura do tipo core-shell (caroço-casca) [37, 38]. Alternativamente, nanopartículas metálicas de ferro foram sintetizadas em micelas reversas de brometo cetiltrimetilamonio usando hidrazina como agente redutor. Depois da adição de uma solução aquosa de ouro, uma camada de cobertura metálica de ouro formou-se na superfície das partículas de ferro [39].

Outra nanoestrutura magnética biocompatível bastante utilizada na atualidade são os Magnetolipossomos. Estas estruturas consistem de derivados magnéticos de lipossomos e podem ser preparados por aprisionamento das nanopartículas magnéticas dentro do caroço dos lipossomos [40]. Estas estruturas podem ser produzidas por ligação covalente dos ligantes na superfície da vesícula ou por incorporação de lipídios alvos numa matriz estrutural fosfolipídica [41].

### 2.5.1 Aplicações

Podemos classificar as aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas de acordo com a aplicação dentro (*in vivo*) ou fora (*in vitro*) do corpo. As aplicações *in vivo* podem ser separadas em terapêuticas (hipertermia) e aplicações diagnósticas (Ressonância Magnética Nuclear por Imageamento). Enquanto as aplicações *in vitro* tem sua maior utilização em diagnóstico (separação e seleção).

Para aplicações biomédicas o uso de nanopartículas que apresentam comportamento su-

perparamagnético à temperatura ambiente são preferencialmente utilizadas [42,43]. Além disso, aplicações em biologia, diagnósticos médicos e terapia requerem nanopartículas magnéticas que sejam estáveis em água em pH neutro e salinidade fisiológica. A estabilidade coloidal de um fluido magnético depende primeiro das dimensões das partículas no qual devem ser suficientemente pequenas para que a precipitações devido a força gravitacional possam ser evitadas, segundo a carga e superfície químicas no qual ambas dão o mecanismo de repulsão estérica e repulsão coulombiana.

Nas aplicações *in vivo* as nanopartículas magnéticas devem ser recobertas com um polímero biocompatível durante ou depois do processo de síntese para prevenir a formação de grandes agregados, mudanças na estrutura original e biodegradação quando expostas a um sistema biológico. O polímero vai também permitir a ligação de drogas por afinidade covalente, adsorção ou aprisionamento nas partículas [44]. Os fatores importantes no qual se determinam a biocompatibilidade e toxicidade destes materiais são a natureza dos componentes magnéticos, o tamanho final das partículas e sua camada de cobertura. Partículas de óxido de ferro como a magnetita ( $Fe_3O_4$ ) ou a sua forma oxidada de maghemita ( $\gamma - Fe_2O_3$ ) são de longe as mais comumente empregadas em aplicações biomédicas. Materiais altamente magnéticos como a ferrita de cobalto e níquel podem ser tóxicos, susceptíveis a oxidação e por isso são de menor interesse. Além disso, as maiores vantagens de se utilizar partículas de tamanhos menores que 100nm (nanopartículas) são as baixas taxas de sedimentação e improvável difusão tecidual [45]. Portanto, para aplicações biomédicas *in vivo*, nanopartículas magnéticas devem ser feitas de um material não tóxico com partículas suficientemente pequenas que possam permanecer na corrente sanguínea após a injeção e passarem pelo sistemas de capilares sem causar embolia nos vasos. As partículas devem também ter uma alta magnetização para que o movimento delas possa ser controlado por meio de campo magnético externo, além de poderem ser imobilizadas em um tecido patológico alvo [46]. Nas aplicações *in vitro* estas exigências não são fatores que atrapalham tanto em suas aplicações. Para um melhor entendimento sobre nanopartículas magnéticas biocompatíveis segue nas subseções abaixo alguns exemplos de suas aplicações.

## 2.5.2 Separação e Seleção

Diferentes tipos de micropartículas magnéticas, nanopartículas magnéticas e marcadores moleculares magnéticos tem sido usados para um grande número de aplicações em várias áreas da biociência e biotecnologia. A maior parte dos trabalhos científicos relacionados considera micropartículas magnéticas e nanopartículas magnéticas sendo igualmente importantes. De fato, em muitas áreas, micropartículas magnéticas com diâmetro em torno de  $1\mu\text{m}$  são utilizadas como, por exemplo, na separação imunomagnética de microorganismos em alimentos e em microbiologia clínica [47]. Já para outras aplicações nanopartículas magnéticas são necessárias.

Uma aplicação de nanopartículas magnéticas biocompatíveis é na imobilização e modificação de compostos biologicamente ativos como, por exemplo, enzimas, anticorpos, oligonucleotídeos e outros. Esta técnica é muito valiosa e usada em várias áreas da biociência e biotecnologia. Compostos biologicamente ativos imobilizados sobre um carreador magnético podem ser removidos do sistema através da aplicação de um campo magnético externo ou podem ser marcados no lugar desejado. Os compostos imobilizados podem ser usados para expressar suas atividades em um processo desejado e também podem ser usados como ligantes afins possibilitando a captura ou a marcação de moléculas ou células.

Suspensões coloidais de nanopartículas superparamagnéticas com diâmetro de 9nm compostas de maghemita e formando um fluido magnético iônico tem sido acoplado covalentemente com lectinas, enzimas ou anticorpos usando um específico ligante químico do grupo tiol (SH) [48]. Nanopartículas magnéticas ativadas com 3-aminopropiltrióxsilano foram usadas para a imobilização de enzimas, anticorpos e proteína A [49]. Como exemplo do vasto campo de aplicações biomédicas em marcação e separação, pode-se citar nanopartículas magnéticas biocompatíveis com diâmetro de 50nm já produzidas comercialmente pela empresa Miltenyi Biotec, Alemanha, e disponíveis com várias moléculas imobilizadas covalentemente para marcação e seleção de anticorpos, anticorpo antifibroblasto, anticorpo antígeno epitelial, proteína A e outros mais (veja <http://www.miltenyibiotec.com>).

### 2.5.3 Hipertermia Magnética

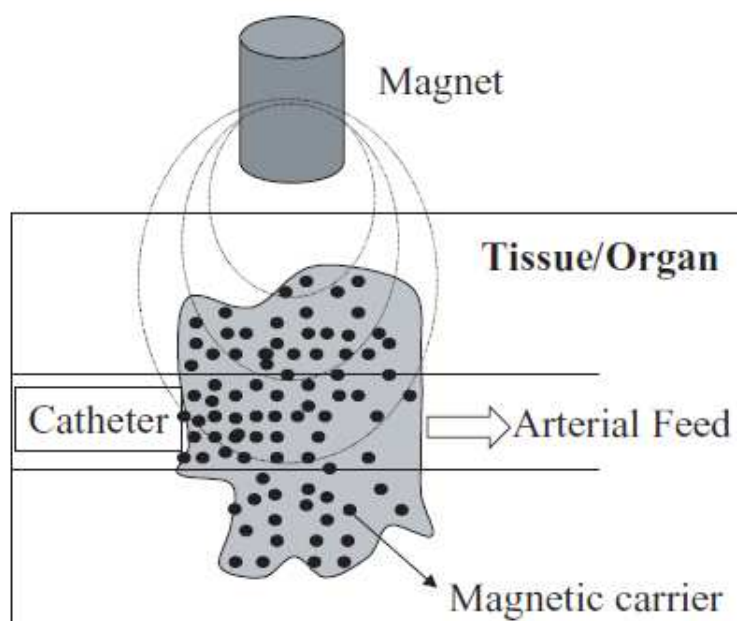
Hipertermia é um procedimento usado para elevar a temperatura em uma região do corpo afetada por algum tumor ou outros crescimentos não controlados. Esta técnica pode ser aplicada junto outros tratamentos para o câncer como, por exemplo, radioterapia ou quimioterapia. O princípio físico é baseado no efeito da morte direta das células tumorais a temperaturas em torno de 41°C a 42°C [50, 51]. Estudos recentes sobre hipertermia centram seus ensaios na otimização da homogeneidade das temperaturas no volume alvo marcado. O aumento da temperatura exigida para hipertermia pode ser alcançado, entre outros métodos, usando partículas de óxido de ferro [52]. O princípio físico para um material magnético que possa ser aquecido pela ação de um campo magnético externo alternado são a perda nos processos que ocorrerem durante a reorientação da magnetização e sua baixa condutividade elétrica.

A vantagem de hipertermia magnética é que permite o aquecimento restrito à área do tumor. Além disso, é preferido o uso de partículas magnéticas monodomínio, nanopartículas, ao invés de partículas multidomínios, partículas micrométricas, devido ao seu alto poder de resposta campos magnéticos alternados para esta aplicação [53–55]. Finalmente, podemos dizer que o potencial de aquecimento depende fortemente do tamanho e forma da partícula. Assim, as rotas bem definidas de síntese capazes de produzir partículas uniformes são necessários para um rigoroso controle da temperatura.

### 2.5.4 Nanocarreador de Drogas (Drug delivery)

Desde os pioneiros conceitos propostos por Freeman [56] que partículas finas de ferro poderiam ser transportadas pelo sistema vascular e serem concentradas em uma região particular do corpo com o auxílio de um campo magnético (vide figura 2.4). O uso de nanopartículas magnéticas na entrega controlada de fármacos ou anticorpos nos órgãos ou tecidos atingidos doentes tem se tornado um campo bem atrativo de pesquisa [57, 58].

O processo de localização de drogas usando sistema de entrega magnética controlada é baseada na competição forças exercidas sobre a partícula devido a hidrodinâmica do fluxo



**Figura 2.4 :** Representação esquemática do transporte magnético de drogas para uma região específica. O cateter é inserido dentro da artéria alimentadora no tumor e um suporte magnético é posicionado sobre o sítio marcado [59, Tartaj; 2003]

sanguíneo e forças magnéticas geradas por ação de campo magnético externo. Quando as forças magnéticas excedem a taxa do fluxo sanguíneo linear nas artérias ( $10 \text{ cm.s}^{-1}$ ) ou em capilares ( $0,05 \text{ cm.s}^{-1}$ ), as nanopartículas magnéticas são retidas no sítio alvo e talvez internalizadas por células endoteliais do tecido alvo [57]. Para esta aplicação, nanopartículas magnéticas devem permanecer no sistema sanguíneo por tempo adequado e não podem formar aglomerados, já que o mesmo pode provocar embolia dos vasos (obstrução dos vasos sanguíneos).

### 2.5.5 Aplicações Diagnósticas

Nanopartículas comerciais de óxido de ferro, mais especificamente, nanopartículas de maghemita tem sido usadas como agentes de contraste em imagens de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ou NMR) para localização e diagnósticos na cabeça, infartes cardíacos, lesões e tumores no fígado, onde há um alto nível de acúmulo de nanopartículas devido a diferentes composições nos tecidos e/ou processos de captação destas nanopartículas por endocitose celular [60].

Resultados muito promissores foram detectados na melhora da sensibilidade de detecção e delineamento de estruturas patológicas como tumores primário e metástase na cabeça, inflamações e isquemia [61]. Para este efeito, proteínas como a transferrina [62], peptídeos e oligonucleotídeos de várias sequências [63] foram usados com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para a obtenção de agentes de contrastes específicos para imagens de ressonância magnética nuclear (RMN) [64].

# Capítulo 3

## Amostras

Para este trabalho foram utilizadas duas amostras. A amostra magnética constitui de um fluido magnético com nanopartículas de  $\gamma - Fe_2O_3$  (maghemita) recobertas com dextrana e suspensas em água em pH fisiológico e uma cultura de células de Sarcoma 180 (S180) que são células tumorais de camundongos. Neste capítulo apresentaremos as características e caracterizações destas amostras e os parâmetros relevantes para avaliação de nossos resultados.

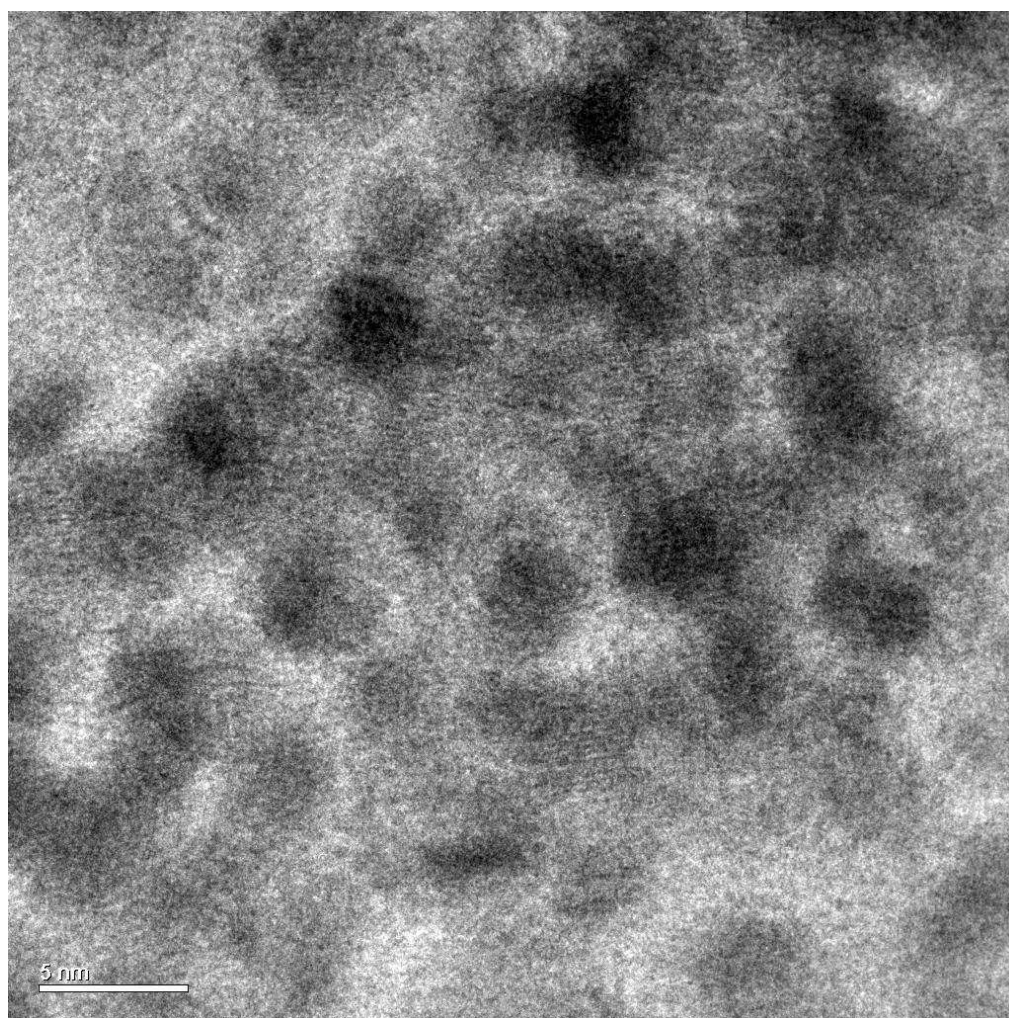
### 3.1 Fluido Magnético

#### 3.1.1 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão

A maneira mais simples, porém, muito eficiente de obter a forma e as dimensões das nanopartículas é utilizando a técnica Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). Em sua maioria, as amostras são preparadas diluindo (tipicamente na ordem 1:2000) e secando o fluido magnético em um porta amostra coberto por uma membrana de carbono. Em se tratando de partículas esféricas os histogramas são obtidos medindo os diâmetros, por meio de um software adequado, de um certo número grande de nanopartículas nas imagens obtidas por microscopia. Os parâmetros relevantes que nos fornecem perfis de tamanho das nanopartículas são obtidos utilizando o procedimento padrão da literatura que consiste em ajustar o histograma de distribuição de tamanhos com a distribuição lognormal [65–67] descrita na equação (3.1).

$$P(D) = \frac{\exp(-\sigma^2/2)}{\sqrt{2\pi}\sigma D_M} \exp\left[-\frac{\ln^2(D/D_M)}{2\sigma^2}\right] \quad (3.1)$$

Onde  $\sigma$  é o desvio-padrão ou a dispersão e  $D_M$  é o diâmetro médio de TEM da amostra. As medidas de TEM foram realizadas pelo nosso colaborador Prof. Dr. Leandro Martin Socolovsky da Universidad de Buenos Aires no Laboratório Nacional de Luz Sincontron (LNLS). O microscópio utilizado foi um Jeol JEM-3010, operando a 300KV, com resolução de  $1,7\text{\AA}$ . A figura (3.1) apresenta uma imagem da amostra utilizada. As imagens de TEM do fluido magnético utilizado em nossos estudos indicam que as nanopartículas são aproximadamente esféricas e pouco polidispersas (vide figura 3.2).



**Figura 3.1** : Imagem de TEM feita pelo Prof. Dr. Leandro Socolovsky no LNLS em Campinas-SP. A barra de escala é de  $5\text{nm}$

Para a análise estatística da distribuição de tamanhos da amostra de fluido, recorreremos a fórmula de Sturges para a construção do histograma [68]. Nesta metodologia, o primeiro passo para a montagem do histograma é encontrar o intervalo ou classes dos diâmetros observados

tal que  $D_i$  seja o diâmetro inferior e  $D_s$  o diâmetro superior. No passo seguinte, calculamos o número de classes  $K$  com base no número de contagens  $n$  de partículas contabilizadas. Este número de classes é calculado pela fórmula de Sturges que é dada por

$$K = 1 + 3,222 \log(n) \quad (3.2)$$

Então, calculamos o valor médio de cada uma das classes por

$$M_W = \frac{W}{2} \quad (3.3)$$

Logo, cada classe terá seu valor  $D_N$  dado por

$$D_N = D_i + M_W + (N - 1)W \quad (3.4)$$

onde  $N$  representa cada classe do histograma, ou seja,  $N = 1, 2, \dots, K$ . Por último, encontra-se o número de contagens ou partículas acumuladas em cada uma das classes de largura  $W$  ou, simplesmente, a frequência de contagens.

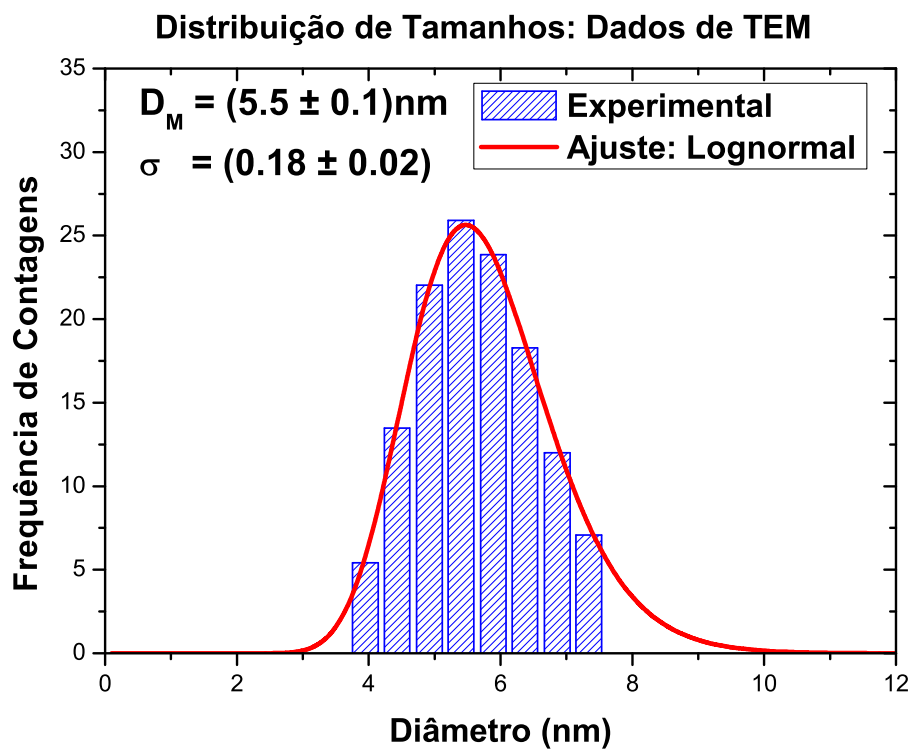
Na amostra que estudamos foi possível realizar um total de 130 contagens. A tabela (3.1) apresenta os resultados obtidos da análise das micrografias da amostra utilizando o critério de Sturges.

Caracterização por TEM			
$K$	$D_N$	Intervalo	Frequência
1	3,95	3,70 $\mapsto$ 4,19	6,15%
2	4,43	4,19 $\mapsto$ 4,67	12,30%
3	4,92	4,67 $\mapsto$ 5,16	13,07%
4	5,40	5,16 $\mapsto$ 5,64	19,23%
5	5,89	5,64 $\mapsto$ 6,13	23,07%
6	6,37	6,13 $\mapsto$ 6,61	11,53%
7	6,86	6,61 $\mapsto$ 7,10	10,76%
8	7,34	$\geq$ 7,10	3,84%

**Tabela 3.1 :** Número de contagens para construção do histograma característico da amostra de fluido magnético utilizada

Por meio do ajuste numérico do histograma da distribuição de tamanhos (figura 3.1), utilizando a função lognormal (equação 3.1) foi possível obter o valor do diâmetro modal de

$D_M = (5,5 \pm 0,1)\text{nm}$  e a polidispersão do tamanho das partículas que foi de  $\sigma = 0,18 \pm 0,02$ . Esta informação, por sua vez, é fundamental para as análises dos dados de Magnetometria (VSM) e de Birrefringência Magnética Estática (BME).



**Figura 3.2** : Distribuição de tamanhos através de imagens de TEM. A linha vermelha corresponde ao ajuste teórico pela função lognormal

## 3.2 Células de Sarcoma 180 (S180)

Dos mais diversos tipos de células tumorais utilizadas em pesquisas científicas, as células de Sarcoma 180 ou S180 (vide figura 3.3) são umas das mais agressivas. De origem específica de um camundongo suíço, cultivadas em grande número, são utilizadas em estudos sobre o câncer em todo mundo. De uma anormalidade única, estas células possuem um enorme número de cromossomos. As S180 secretam quantidades enormes de citocinas, substâncias tóxicas que causam a explosão do envoltório celular com as quais ela entra em contato. Uma vez injetadas nos ratos, as S180 multiplicam-se e o tumor dobra seu tamanho cada 10 horas. Elas invadem os tecidos e órgãos em torno do tumor e destroem tudo que está em seu caminho. Se estão na cavidade abdominal, a proliferação das S180 transpõe de maneira muito rápida a capacidade de drenagem dos vasos linfáticos (vasos que transportam as células que lutam contra infecções). Como numa caixa fechada, os fluidos acumulam-se até que o ventre entre em estado de ascite (acúmulo de toxinas no abdômem). Este fluido constitui um meio ótimo para o aumento da cultura celular das S180, que prosseguem com mais força o seu crescimento rápido e abundante até que haja a morte do camundongo [69].



**Figura 3.3 :** Imagem das células de Sarcoma 180 feitas no laboratório de Citogenética da UFG sob coordenação da Prof. Dr(a). Elisângela de Paula Silveira Lacerda do Instituto de Ciências Biológicas

### 3.2.1 Método de Preparação

Para os ensaios foi utilizada a linhagem tumoral de camundongo Sarcoma 180 (S180), obtida junto ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás coordenado pela Prof(a). Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda e preparada pela mestre Aliny Pereira Lima. Esta linhagem tumoral foi mantida *in vitro* em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal *2mML – Gnl*, 100IU/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> segundo protocolo estabelecido pela *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA).

Para fins experimentais células tumorais S180 provenientes da cultura foram lavadas por meio de centrifugação a 1500rpm (260 × g) por 10min. Ao final desta lavagem as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 e uma alíquota de células foi colocada em solução de azul tripano 0,4% para contagem em hemocitômetro. Após quantificação celular, 2 × 10<sup>5</sup> de células S180 foram colocadas na presença de 100µL:100µL de fluido magnético em microplacas

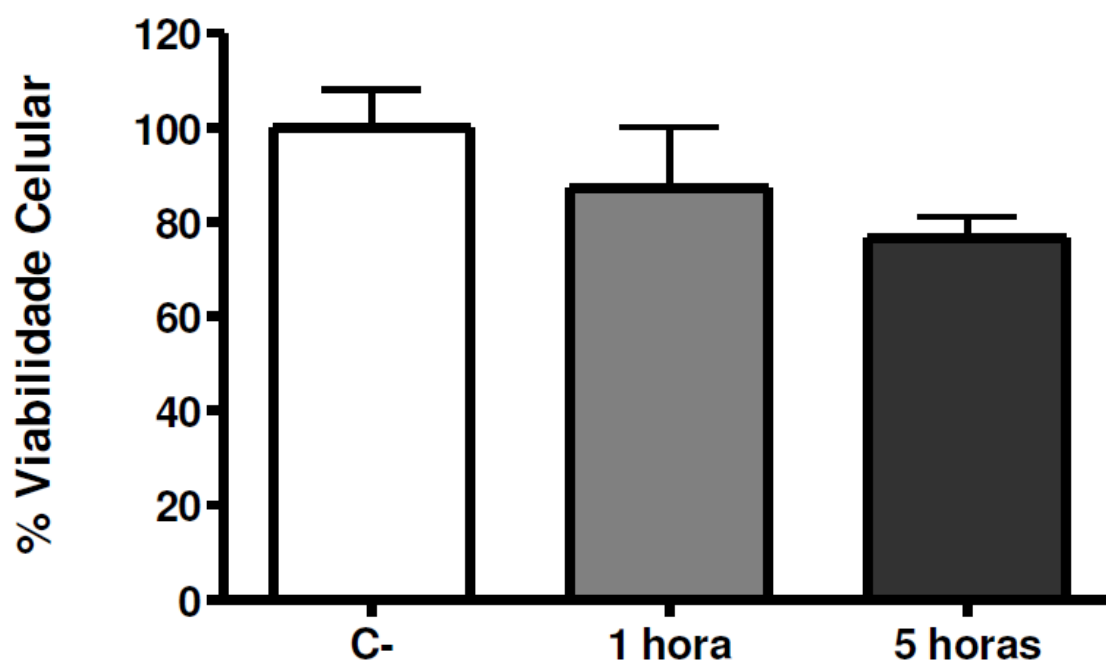
de 96 poços e então incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por períodos num intervalo 10 a 100 minutos.

### 3.2.2 Teste de Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade permite avaliar quão citotóxico a amostra de fluido magnético é para as células de S180. O método experimental é denominado MTT e consiste em avaliar a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazano, intensamente coloridos, no interior das células. Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria. Este método, sugerido pela primeira vez por Mossman [70, Mossman; 1983], foi modificado especificamente para células em suspensão, nomeadamente *T.pyriformis* por Dias *et al.* [71, Dias; 1999] em placas de 96 poços: a  $140\mu\text{L}$  de cultura são adicionados  $10\mu\text{L}$  de solução aquosa de MTT ( $10\text{mg/L}$ ) deixando-se a incubar durante 4 horas; são então adicionados  $150\mu\text{L}$  de DMSO e, após 30 minutos, é feita a leitura a  $550\text{nm}$ , num leitor ELISA.

Em nosso ensaio de MTT,  $2 \times 10^5$  de células foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença do composto cis-tetra-amino-dicloro-rutênio(III) ( $0,38$  a  $383\mu\text{M}$ ) ou cisplatina ( $50\mu\text{M}$ ) e incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Ao final do período de incubação, foi adicionado aos poços de cultivo celular  $10\mu\text{L}$  de MTT na concentração de  $5\text{mg.mL}^{-1}$ , e após 3 h de incubação com o MTT, foram acrescentados  $50\mu\text{L}$  SDS a 10% diluído em HCL/ $0,01\text{N}$ . A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro (Awareness Technology INE/ Stat Fax 2100). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da equação (3.5). Para nossa concentração (1:1) foram retiradas duas amostras após 1 hora e 5 horas de exposição, respectivamente, o resultado deste teste pode ser verificado no gráfico da figura (3.4).

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Absorbância do Tratamento}}{\text{Absorbância do controle negativo} \times 100} \quad (3.5)$$



**Figura 3.4** : Percentual de viabilidade celular de células de Sarcoma 180 após 1h e 5h de exposição com o fluido magnético de  $\gamma - Fe_2O_3$

A barra sem preenchimento corresponde ao controle negativo que é composto somente pelas células S180. A barra intermediária corresponde ao período de uma hora de exposição das células com a amostra de fluido magnético e, finalmente, a barra mais escura corresponde a exposição das células após cinco horas. Uma observação importante que podemos fazer sobre este resultado é que no intervalo de tempo em que trabalhamos as nanopartículas magnéticas de  $\gamma - Fe_2O_3$  recobertas com dextrana não são citotóxicas para as células de S180. Note que depois de cinco horas temos uma viabilidade celular de  $76 \pm 8\%$ .

# Capítulo 4

## Estudo Magnético do Processo de Internalização Celular de Nanopartículas Magnéticas

### 4.1 Magnetometria

A magnetometria é uma técnica muito poderosa para a investigação de sistemas magnéticos. Esta técnica permite, por meio da análise das curvas de magnetização, obter informações sobre a quantidade de partículas por unidade de volume, ou seja, a fração volumétrica de nanopartículas magnéticas de uma suspensão coloidal de nanopartículas magnéticas (ferrofluidos), entre outras. Esta é uma boa aproximação para o objetivo de nosso estudo mesmo sabendo que as curvas de magnetização são um pouco mais complexas do que parecem ser mostradas neste trabalho. Necessitando as mesmas de um ajuste teórico considerando a função de Langevin de primeira ordem, diâmetro modal e a polidispersão da amostra.

Medidas de magnetização podem ser realizadas basicamente por três métodos distintos: métodos indutivos, através de força magnética quando um material é submetido a um gradiente de campo magnético ou mesmo via propriedade intrínseca do material tal como efeito Hall, magneto-resistência [72].

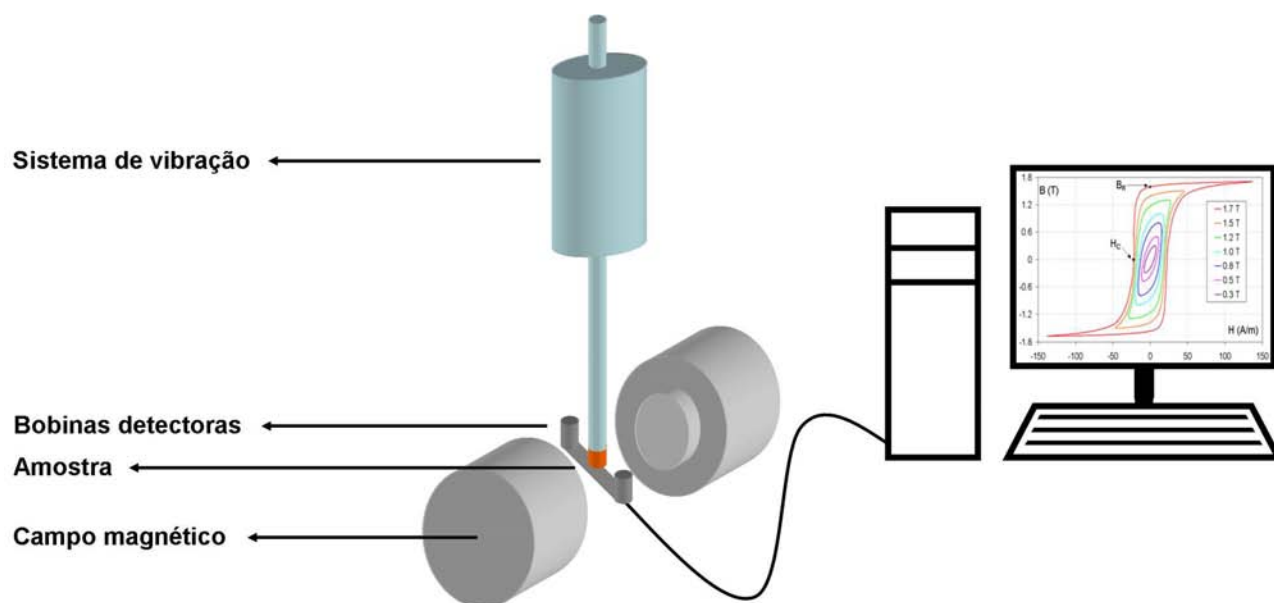
Um exemplo de método indutivo é o desenvolvido por Foner em 1955 [73] o Magnetômetro de Amostra Vibrante (Vibrating Sample Magnetometer, VSM) que é provavelmente um dos equipamentos mais usados nos laboratórios de pesquisa, caracterizando-se pela sua boa

performance, baixo custo e simplicidade de funcionamento.

Na Fig.(4.1) mostramos um diagrama do VSM. Fazendo uma amostra vibrar à frequência  $f$ , induzir-se-á uma voltagem alternada nas bobinas de detecção. Esta voltagem é dada por

$$V = \sigma GA2\pi f \cos(2\pi ft) \quad (4.1)$$

onde  $\sigma$  é o momento magnético da amostra,  $G$  é função da geometria das bobinas de detecção e  $A$  a amplitude de vibração da amostra.



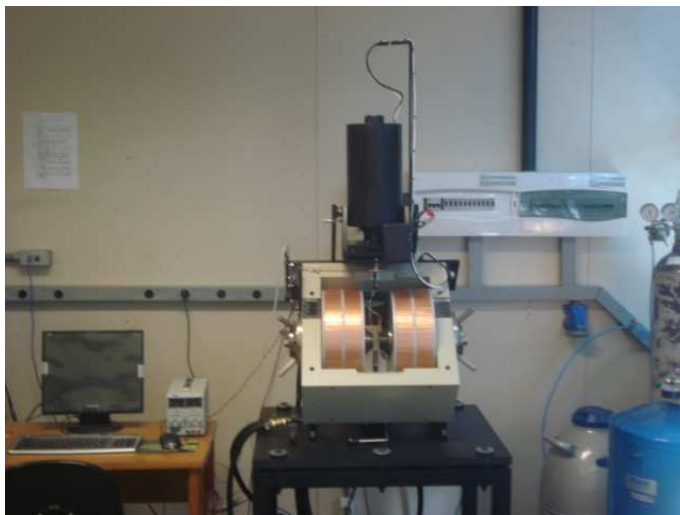
**Figura 4.1 :** Diagrama do VSM

A amostra é fixada na extremidade de uma haste rígida, enquanto a outra extremidade da haste é fixada à membrana de um alto-falante ou a um motor com um sistema de polias ou engrenagens. Vale a pena destacar dois detalhes: um deles é que a medida de magnetização feita com o deslocamento da amostra permite eliminar outras contribuições que não as oriundas da amostra; o segundo é que a medida é realizada com o auxílio de detecção síncrona com o uso de um amplificador lock-in, o que proporciona um grande aumento de sensibilidade, pois este componente capta apenas o sinal de interesse para a medida, suprimindo o efeito de ruídos ou interferência de componentes ativos [73].

As figuras (4.2) e (4.3) mostram o magnetômetro utilizado em nossos experimentos. Este VSM é o modelo EV9 fabricado pela empresa ADE-MAGNETICS. A precisão das medi-

das deste VSM é de  $10^{-6}$  emu. As bobinas são resfriadas a água e podem atingir um campo magnético de até 2T.

À temperatura ambiente uma fração considerável das nanopartículas magnéticas podem encontrar-se no regime superparamagnético (SP). Torna-se importante, então, discutir a curva de magnetização deste sistema.



**Figura 4.2 :** Magnetômetro de amostra vibrante do laboratório de Magnetometria do Instituto de Física da UFG. Figura 1



**Figura 4.3 :** Magnetômetro de amostra vibrante do laboratório de Magnetometria do Instituto de Física da UFG. Figura 2

## 4.2 Superparamagnetismo

O material superparamagnético caracteriza-se pela ausência de coercividade, ou seja, ausência de histerese. A origem da palavra superparamagnetismo deve-se a Bean e Livingston que observaram semelhanças entre esse material e o comportamento dos materiais paramagnéticos. A diferença encontra-se na ordem de grandeza da magnetização que é aproximadamente  $10^2 - 10^3$  vezes maior que de materiais paramagnéticos típicos. Para uma melhor compreensão destes sistemas estudaremos este fenômeno nesta seção.

Quando se aplica um campo magnético não nulo em uma amostra de fluido magnético, suas nanopartículas magnéticas tendem a ter seus momentos magnéticos alinhados com esse campo, de modo que, quanto maior a intensidade desse campo, mais alinhados estarão os momentos magnéticos das nanopartículas. Esse fenômeno é responsável pelo comportamento *superparamagnético* que o fluido magnético apresenta.

Representando cada nanopartícula pelo seu momento de dipolo magnético ( $\vec{\mu}$ ), o torque ( $\vec{\tau}$ ) devido ao campo  $\vec{B}$  sobre ela pode ser escrito da forma

$$|\vec{\tau}| = |\vec{\mu} \times \vec{B}| = |\vec{\mu} \times (\mu_0 \vec{H})| = \mu_0 \mu H \sin \theta \quad (4.2)$$

onde  $\theta$  é o ângulo entre o momento magnético e o campo magnético.

O trabalho realizado para girar o momento magnético da nanopartícula de  $\theta = 0$  até  $\theta = \theta'$  é dado por

$$W = \int_0^{\theta'} \tau d\theta = \int_0^{\theta'} \mu_0 \mu H \sin \theta d\theta = \mu_0 \mu H (1 - \cos \theta') \quad (4.3)$$

Esse trabalho pode ser usado como energia no *fator de Boltzmann* a partir do qual será calculado o valor esperado do momento de dipolo magnético. Como  $W = \Delta U$ , onde  $U$  é a energia potencial, pode-se definir a energia potencial como sendo nula quando  $\theta = 0$  de modo que teremos  $W = U$ . Como a variável de integração  $\theta$  não será mais usada, passaremos a usar simplesmente  $\theta$  ao invés de  $\theta'$ .

Se qualquer orientação do momento de dipolo de uma nanopartícula for igualmente

provável, a probabilidade  $p(\theta)d\theta$  de que ele faça um ângulo entre  $\theta$  e  $\theta + d\theta$  com  $\vec{H}$  será simplesmente igual a razão entre a área de um anel infinitesimal de raio  $\sin\theta$  e espessura  $1d\theta$  e a área da superfície de uma esfera de raio unitário, portanto

$$p(\theta)d\theta = \frac{2\pi \sin\theta}{4\pi(1)^2}d\theta = \frac{\sin\theta}{2}d\theta \quad (4.4)$$

Havendo  $N$  nanopartículas de mesmo momento de dipolo magnético o número  $n(\theta)d\theta$  de momentos alinhados entre  $\theta$  e  $\theta + d\theta$  é obtido multiplicando-se  $n(\theta)d\theta$  por  $N$ . Segue-se que

$$n(\theta)d\theta = \frac{N}{2} \sin\theta d\theta \quad (4.5)$$

Porém, existem algumas orientações mais prováveis e, para evidenciar esse efeito, deve-se acrescentar o *fator de Boltzmann* na função  $n(\theta)$ , portanto

$$n'(\theta)d\theta \propto e^{-W/k_B T} n(\theta)d\theta = e^{-W/k_B T} \frac{N}{2} \sin\theta d\theta \quad (4.6)$$

onde o uso do símbolo  $\propto$  indica que para  $n'(\theta)d\theta$  ser uma densidade de probabilidade, esse fator deve ser normalizado pela integral do fator de Boltzmann sobre o *espaço de configurações*. Nesse caso, a constante de proporcionalidade é dada pela seguinte condição

$$\int_0^\pi n'(\theta)d\theta = N \quad (4.7)$$

A componente de cada momento de dipolo magnético na direção do campo é  $\mu \cos\theta$  de modo que o valor esperado para o momento de dipolo magnético é a integral sobre essa componente, visto que componentes perpendiculares se cancelarão. Portanto

$$\langle \mu \rangle = \frac{\int_0^\pi \mu \cos\theta n(\theta)d\theta}{\int_0^\pi n(\theta)d\theta} \quad (4.8)$$

Substituindo a eq(4.6) em (4.8), têm-se

$$\begin{aligned} \langle \mu \rangle &= \frac{\int_0^\pi \mu \cos\theta \frac{N}{2} e^{-\mu_0 \mu H(1-\cos\theta)/k_B T} \sin\theta d\theta}{\int_0^\pi \frac{N}{2} e^{-\mu_0 \mu H(1-\cos\theta)/k_B T} \sin\theta d\theta} \\ &= \frac{\int_0^\pi \mu \cos\theta \frac{N}{2} e^{\mu_0 \mu H \cos\theta/k_B T} \sin\theta d\theta}{\int_0^\pi \frac{N}{2} e^{\mu_0 \mu H \cos\theta/k_B T} \sin\theta d\theta} \end{aligned} \quad (4.9)$$

Fazendo a seguinte mudança de variáveis

$$u = \frac{\mu_0 \mu H}{K_B T} \cos \theta \Rightarrow -\frac{\mu_0 \mu H}{K_B T} \sin \theta d\theta = du \quad (4.10)$$

e substituindo (4.10) em (4.9) obtemos

$$\langle \mu \rangle = \frac{\mu \int_{-\xi}^{\xi} u e^u du}{\xi \int_{-\xi}^{\xi} e^u du}, \quad \xi = \frac{\mu_0 \mu H}{K_B T} \quad (4.11)$$

Integrando o denominador da eq(4.11) por partes e recordando a relação de arco hiperbólico  $e^\alpha - e^{-\alpha} = 2 \sinh \alpha$  teremos

$$\langle \mu \rangle = \frac{\mu}{\xi} \left( \frac{\xi \cosh \xi - \sinh \xi}{\sinh \xi} \right) = \mu \left( \coth \xi - \frac{1}{\xi} \right) \quad (4.12)$$

$$\frac{\langle \mu \rangle}{\mu} = \coth \xi - \frac{1}{\xi} = L(\xi) \quad (4.13)$$

A função (4.13) é chamada de *Langevin de primeira ordem* e  $\mu = M_{sol} \langle D^3 \rangle / 6$ . Logo, a quantidade  $\langle \mu \rangle / \mu$  é igual a  $M / M_s$ , ou seja, a razão entre a magnetização da amostra e sua *magnetização de saturação*. Essa última é a magnetização máxima que ela poderia ter caso todos os momentos de dipolo magnético estivessem totalmente alinhados com o campo magnético aplicado. A magnetização de saturação do sistema, em geral, é numericamente igual ao produto da magnetização do sólido, de que as nanopartículas são feitas ( $M_{sol}$ ), pela fração de volume do sistema ocupada por essas nanopartículas, quantidade essa denominada **fração volumétrica**  $\phi$  ( $\phi = N \pi \langle D^3 \rangle / 6$ ), onde  $N$  é o número de partículas por unidade de volume.

$$\frac{M}{M_s} = \frac{M}{\phi M_{sol}} = L(\xi) \quad (4.14)$$

Portanto, podemos determinar através das curvas de magnetização o valor de  $\phi$ . Pois, quando a amostra satura, ou seja, quando o campo magnético é muito grande ( $H \rightarrow \infty$ ), a função de Langevin tende a 1 ( $L(\xi) \rightarrow 1$ ). Logo, nesta condição, temos

$$\phi = \frac{M_{vsm}}{M_{sat}} \quad (4.15)$$

onde  $M_{vsm}$  e  $M_{sat}$  são a magnetização de saturação da amostra e a magnetização de saturação do material bulk.

Em nossos experimentos, pudemos determinar a concentração de nanopartículas magnéticas utilizando o cálculo proposto na equação (4.15). Para estes cálculos, utilizamos a magnetização de saturação do maghemita bulk de 76 emu/g [74–76] à temperatura ambiente e a sua densidade de 4,9g/ml [77, 78]. A maneira de realizar este cálculo está exposta na seção seguinte, onde esta é uma boa aproximação para o objetivo de nosso estudo mesmo sabendo que as curvas de magnetização são mais complexas do que parecem ser mostradas neste trabalho. As curvas de magnetização devem ser ajustadas teoricamente considerando a função de Langevin de primeira ordem, diâmetro modal e a polidispersão da amostra.

### 4.2.1 Cálculo da Fração Volumétrica de NPMs

Em um sistema superparamagnético, o comportamento da curva de magnetização é uma Langevin de primeira ordem como na equação (4.16)

$$M_{vsm} = \phi M_s^b L(\xi) \quad (4.16)$$

Na saturação, ou seja, quando o campo magnético é muito grande podemos afirmar que a Langevin tende a um valor unitário ( $L(\xi) \rightarrow 1$ ). Logo

$$M_{vsm} = \phi M_s^b \quad (4.17)$$

Esta última equação nos fornece uma relação para o cálculo da fração volumétrica de nanopartículas magnéticas diretamente de (4.17). Logo

$$\phi = \frac{M_{vsm}}{M_s^b} \quad (4.18)$$

onde  $M_s^b$  a magnetização de saturação do material bulk e  $M_{vsm}$  é o valor da magnetização de saturação da amostra medida no VSM. Neste caso as magnetizações estão em unidade de emu/cm<sup>3</sup>. Muitas vezes é mais fácil trabalhar em emu/g. Neste caso podemos tratar como exposto a seguir.

As curvas de magnetização que medimos no VSM são dadas em unidades de momento magnético (emu). Ao dividirmos pela massa total da amostra ontém-se curva de magnetização

em unidades de emu/g. Note que a equação (4.18) pode ser usada desde que os valores de magnetização estejam em emu/cm<sup>3</sup>. Logo, para extrairmos a fração volumétrica de nosso sistema devemos proceder da seguinte forma. Lembrando que o momento magnético médio da amostra é dado por

$$\langle \mu \rangle = N\mu_p L(\xi) \quad (4.19)$$

onde  $N$  e  $\mu_p$  são o número total de partículas e o momento magnético de uma partícula, se dividimos (4.19) pela massa total obtém-se

$$\frac{\langle \mu \rangle}{m_T} = \frac{1}{m_T} \times N\mu_p L(\xi) \quad (4.20)$$

Na equação (4.20) podemos identificar os valores de magnetização da amostra ( $M_{vsm}$ ) em emu/g, ou seja, pode-se escrever esta equação como

$$M_{vsm} = \frac{1}{m_T} \times N\mu_p L(\xi) \quad (4.21)$$

Para avaliarmos os dados medidos em termos de valores conhecidos, multiplicamos e dividimos o segundo membro pela massa da partícula ( $m_p$ ). Logo,

$$M_{vsm} = \frac{m_p}{m_T} \times \frac{\mu_p}{m_p} NL(\xi) = \frac{m_p}{m_T} \times M_p NL(\xi) \quad (4.22)$$

sendo agora  $M_p$  a magnetização da partícula em unidades de emu/g.

Utilizando a relação entre massa e densidade dada por  $m = \rho v$  podemos escrever (4.22) da forma

$$M_{vsm} = \frac{\rho_p v_p}{\rho_T v_T} \times N M_p L(\xi) = \frac{N v_p}{v_T} \times M_p L(\xi) \times \frac{\rho_p}{\rho_T} = \phi M_p L(\xi) \times \frac{\rho_p}{\rho_T} \quad (4.23)$$

onde  $\phi$  é a fração volumétrica de partículas magnéticas dada por

$$\phi = \frac{N v_p}{v_T} \quad (4.24)$$

Como já dito anteriormente, a amostra medida é composta por nanopartículas magnéticas de maghemita e do líquido carreador (água). Então, a densidade total da amostra pode ser

escrita em termos da fração volumétrica de nanopartículas magnéticas e das densidades da partícula e do líquido carreador de forma que

$$\rho_T = \phi\rho_p + (1 - \phi)\rho_c = \rho_c + \phi(\rho_p - \rho_c) \quad (4.25)$$

No caso de  $\phi \ll 1$  o termo  $\phi(\rho_p - \rho_c) \approx 0$ . Então, podemos escrever (4.25) como

$$\rho_T \approx \rho_c \quad (4.26)$$

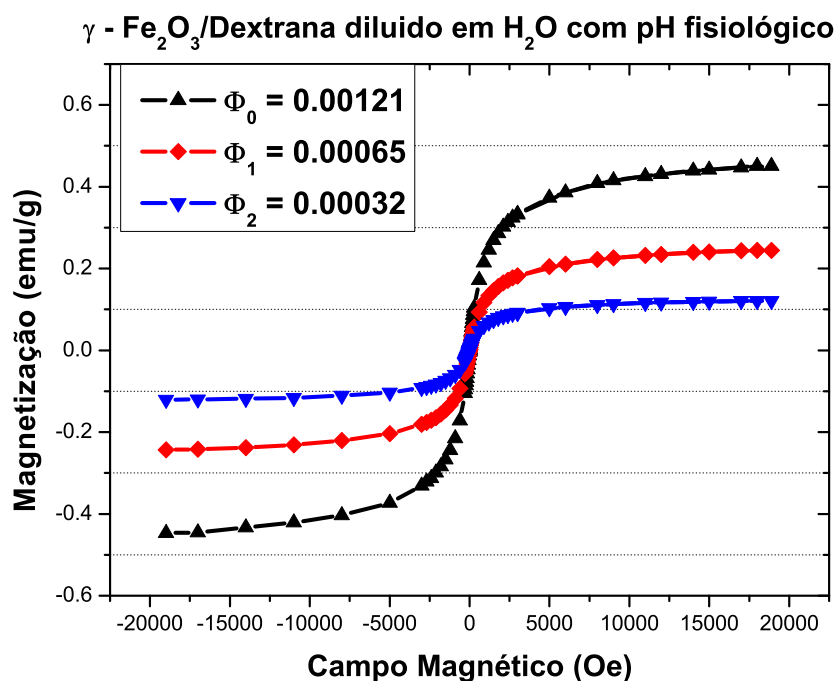
Em condições de alto campo magnético aplicado, a função de Langevin  $L(\xi) \rightarrow 1$ . Então, substituindo (4.26) e isolando  $\phi$  em (4.23) temos

$$\phi = \frac{M_{vsm}}{M_p} \times \frac{\rho_c}{\rho_p} \quad (4.27)$$

Na equação (4.27) temos a fração volumétrica em termos das magnetizações de saturação da amostra e da partícula em emu/g. Em nossas análises assumimos a magnetização da partícula como sendo a magnetização do material bulk. E para estes cálculos utilizamos a densidade do líquido carreador  $\rho_c = 1g/cm^3$ , a densidade da maghemita  $\rho_p = 4,9g/cm^3$  e a magnetização do material bulk  $M_s^b = 76$  emu/g [74–76].

### 4.3 Resultados de Magnetometria

Como exposto anteriormente, medidas de curvas de magnetização em fluidos magnéticos nos permitem calcular a quantidade de partículas magnéticas por unidade de volume e, por meio disso, determinar a fração volumétrica de partículas magnéticas presente no meio. Inicialmente, fizemos as medidas com a amostra de  $\gamma - Fe_2O_3$  recoberta com dextrana para determinarmos sua fração volumétrica. Assumiremos que nossas nanopartículas possuem a mesma distribuição de cátions do sistema bulk, ou seja, a magnetização de saturação da partícula é igual a 76 emu/g [74–76]. A curva negra corresponde a amostra de fluido magnético pura (1:0), a curva vermelha corresponde a amostra de fluido magnético diluída em 1:1 e a curva azul corresponde a amostra de fluido magnético diluída em 1:4. Todas as diluições foram realizadas em água em pH fisiológico ( $\sim 7,4$ ). Como esperado, observa-se uma diminuição do sinal magnético ao diluirmos a amostra de fluido magnético.



**Figura 4.4 :** Curvas de magnetização da amostra de  $\gamma - Fe_2O_3$  recoberta com dextrana: Preto-amostra em 1:0, Vermelho-diluída em 1:1 e Azul-diluída em 1:4

### 4.3.1 Teste de Efeito de Centrifugação

Nosso estudo possui o objetivo de determinar o número de nanopartículas internalizadas por células tumorais de Sarcoma 180. Neste intuito, desenvolvemos uma metodologia para separar as células de nanopartículas suspensas no meio de cultura celular.

Primeiramente, fizemos um teste de centrifugação em diferentes rotações para avaliar a sedimentação de nanopartículas em meio de cultura celular. O teste foi realizado na centrífuga Eppendorf-centrifuge 5417R do grupo de Biofísica do IF-UFG, coordenado pelo Prof. Dr. Antônio Alonso. Os resultados estão descritos de forma simplificada na tabela (4.1) onde foram feitas centrifugações variando as rotações e mantendo o tempo do procedimento. Notamos visualmente que as nanopartículas magnéticas recobertas com dextrana só sedimentam para valores de aceleração acima de  $1500 \times g$ .

Teste de Centrifugação Visual			
$n^{\circ}$	Tempo	Rotações e Acelerações	Status
1	10min	$1000rpm \simeq 95 \times g$	Não sedimentou
2	10min	$2000rpm \simeq 390 \times g$	Não sedimentou
3	10min	$3000rpm \simeq 840 \times g$	Não sedimentou
4	10min	$4000rpm \simeq 1500 \times g$	Não sedimentou
5	10min	$14000rpm \simeq 18200 \times g$	Sedimentou pouco

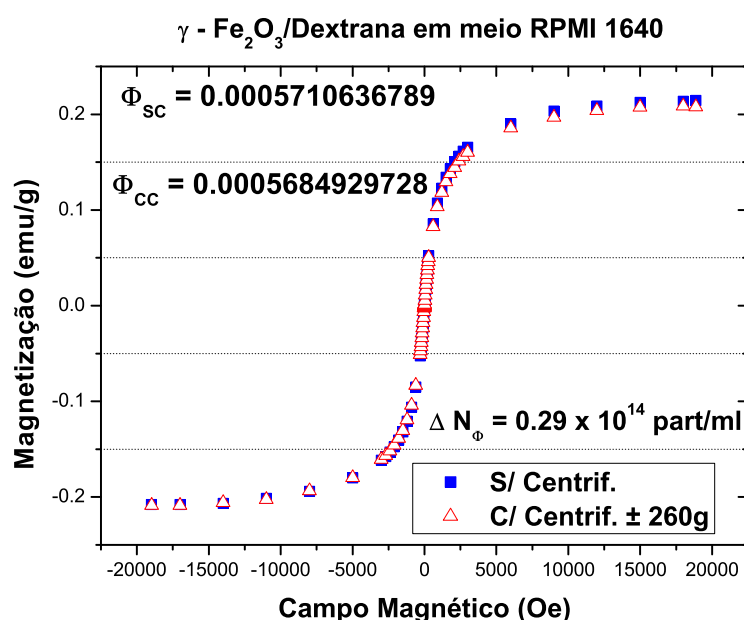
**Tabela 4.1 :** Teste de centrifugação visual de amostra de  $100\mu l$  de fluido magnético diluídos em  $100\mu l$  de meio de cultura celular do S180

Cabe aqui ressaltar que no procedimento padrão realizado no laboratório de citogenética para separar as células do meio, as amostras são submetidas a rotações a  $260 \times g$  durante 10min. Durante este processo ocorre, então, a sedimentação das células para o fundo do eppendorf. O sobrenadante é retirado e, posteriormente, as células (antes sedimentadas) são suspensas em solução RPMI 1640. Nossos resultados visuais, sugerem que nesta rotação as nanopartículas não precipitam. Porém, testes visuais não são cientificamente adequados. Logo, com o objetivo de realizar uma análise quantitativa, refizemos o mesmo teste utilizando a técnica de magnetometria.

A magnetometria nos permite determinar, com boa precisão, a fração volumétrica de

partículas magnéticas analisando a curva de magnetização em regimes de alto campo magnético ( $\sim 2T$ ). O teste realizado consistiu de uma amostra diluída em meio de cultura celular mantida sob centrifugação de  $260 \times g$  por 10 min. Após este procedimento são feitas medidas de magnetometria do sobrenadante e do precipitado. A diluição desta amostra é de 1:1, ou seja, uma parte de fluido magnético para uma parte de meio de cultura celular.

O gráfico da figura (4.5) mostra os dados da amostra antes de centrifugar e de seu sobrenadante após este processo. A tabela (4.2) apresenta os resultados obtidos com as duas amostras.



**Figura 4.5 :** Curvas de magnetização da amostra de  $\gamma - Fe_2O_3$  recoberta com dextrana diluída me meio de cultura do S180 em diluição de  $100\mu l$  para  $100\mu l$ : Azul-sem centrifugação, Vermelho-com centrifugação

Teste de Centrifugação: VSM		
Amostras	$M_S(\frac{emu}{g})$	$\phi_{nps}$
S/ Centrifugar	0,212664114	0.0005710636789
C/ 10min, $\pm 260 \times g$	0.211706783	0.0005684929728

**Tabela 4.2 :** Dados do teste de centrifugação por magnetometria

De fato, por meio deste teste foi possível calcular as frações volumétricas antes e depois de centrifugar. Note que foi encontrada uma pequena diferença nas amostras. Esta

diferença corresponde a um número de partículas por unidade de volume da ordem de  $N = 0.29509765 \times 10^{14}$ part/ml. Este resultado permitiu estimar o erro neste processo que pode estar associado a sedimentação de nanopartículas magnéticas por adesão na parede do eppendorf ou pela precipitação de aglomerados. Portanto, podemos garantir que se houverem diferenças significativas entre o sobrenadante e o precipitado em nossos resultados, estaremos vendo parte das partículas sedimentando por outro motivo e não por estes que foram apresentados.

### 4.3.2 Medidas Magnéticas de NPMs Internalizadas por Células S180

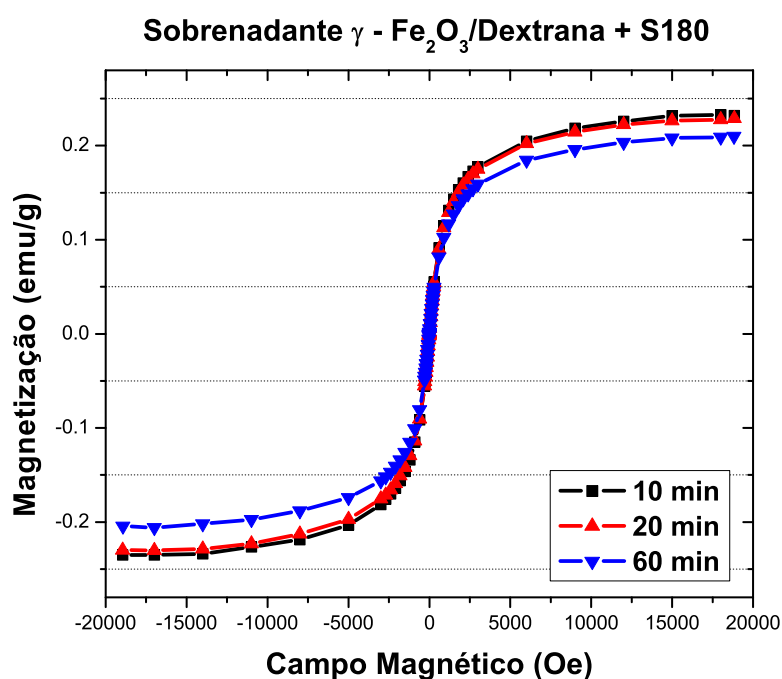
A estratégia utilizada para investigar se há internalização das nanopartículas magnéticas pelas células de Sarcoma 180 foi utilizar a técnica de Magnetometria de Amostra Vibrante. As medidas de magnetometria foram realizadas com diferentes amostras preparadas após diferentes tempos de exposição das nanopartículas às células tumorais de S180 [13, 79]. Note que após este tempo há o processo de centrifugação. As medidas de VSM são feitas utilizando o “sobrenadante” (nanopartículas no líquido carreador) e “precipitado” (células mais nanopartículas internalizadas). É importante ressaltar que o precipitado constituído de células com nanopartículas internalizadas é ressuspensão em solução RPMI 1640. Por meio dessa análise foi possível determinar a quantidade de nanopartículas internalizadas.

O procedimento experimental foi o seguinte: o fluido magnético de maghemita recoberta com dextrana foi preparado em diluição do tipo volume-volume onde tínhamos  $200\mu\text{l}$  de fluido para  $200\mu\text{l}$  de solução contendo meio de cultura celular com células de Sarcoma 180. Em cada um dos tempos registrados as amostras foram centrifugadas a  $260 \times g$  e lavadas uma vez com solução RPMI 1640. Assim, foi possível retirar o sobrenadante (parte da solução que fica suspensa) e o sedimentado (material que fica depositado no fundo do eppendorf). Este último foi ressuspensão em solução em  $100\mu\text{l}$  de RPMI 1640 e medidas de magnetização foram realizadas.

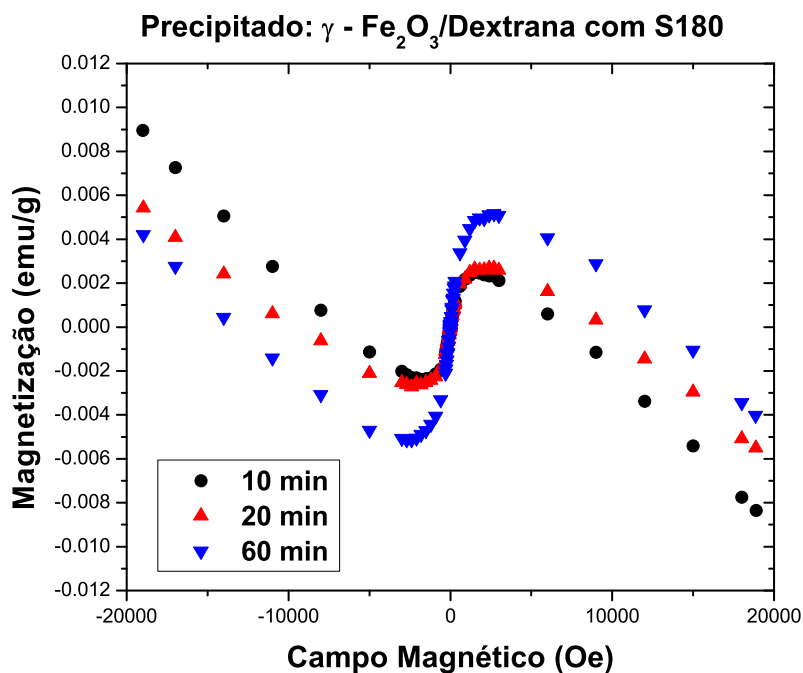
O gráfico da figura (4.6) apresenta os dados do sobrenadante após diferentes tempos de exposição. Nota-se facilmente, a existência de um sinal superparamagnético. Por outro lado,

no gráfico da figura (4.7) temos as curvas de magnetização do sedimentado, ou seja, de células contendo nanopartículas magnéticas. Os dados apresentam contribuições diamagnéticas oriundas das células, meio RPMI 1640 e a camada de cobertura de dextrana, e superparamagnética, devido a nanopartículas magnéticas internalizadas. Em ambas as figuras observa-se alterações nos dados magnéticos dependendo do tempo de exposição.

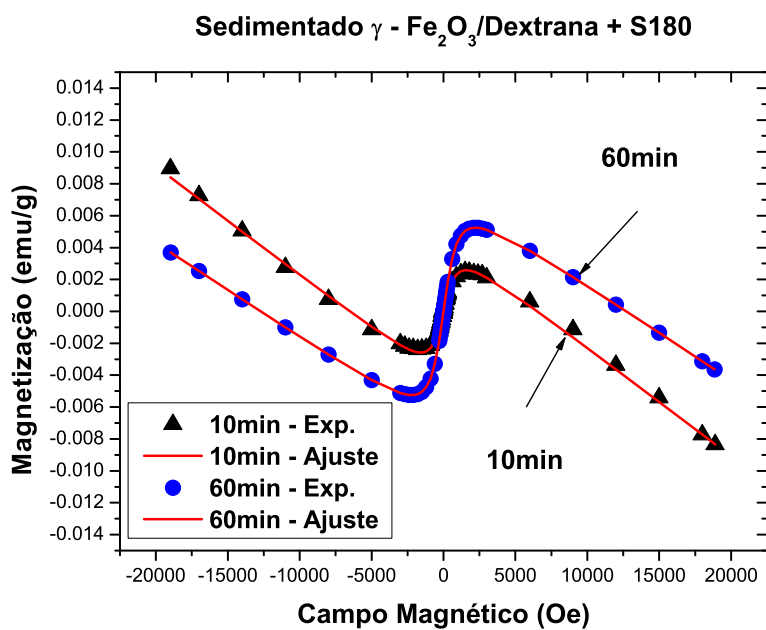
Os dados das células com nanopartículas internalizadas (sedimentado) podem ser ajustados considerando duas contribuições; uma diamagnética, devido aos constituintes das células, e outra superparamagnética. As linhas sólidas no gráfico da figura (4.8) corresponde ao melhor ajuste dos dados experimentais considerando o modelo acima. De fato, pode-se ainda retirar a contribuição diamagnética e apresentar apenas a contribuição devido as nanopartículas magnéticas. Na figura (4.9) apresenta os dados para as amostras preparadas em tempos distintos. Estes dados são extremamente importantes já que permitem extrair, por meio da magnetização de saturação no regime de alto campo, o número de nanopartículas internalizadas.



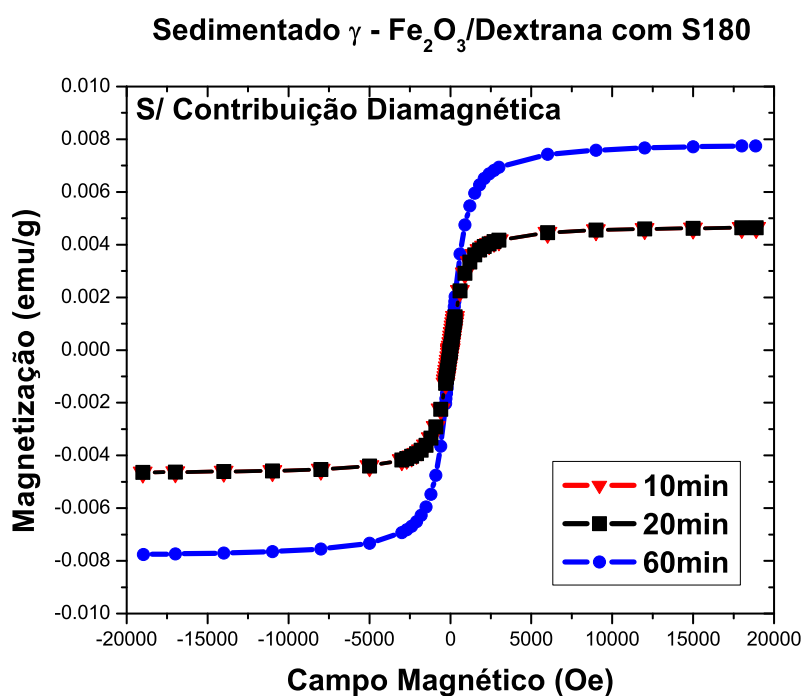
**Figura 4.6 :** Curvas de magnetização da amostra de  $\gamma - Fe_2O_3$  recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180: Sobrenadante



**Figura 4.7 :** Curvas de magnetização da amostra de  $\gamma - Fe_2O_3$  recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180: Parte sedimentada e suspensa em solução RPMI 1640



**Figura 4.8 :** Curvas de magnetização da amostra de  $\gamma - Fe_2O_3$  recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180: Ajuste teórico



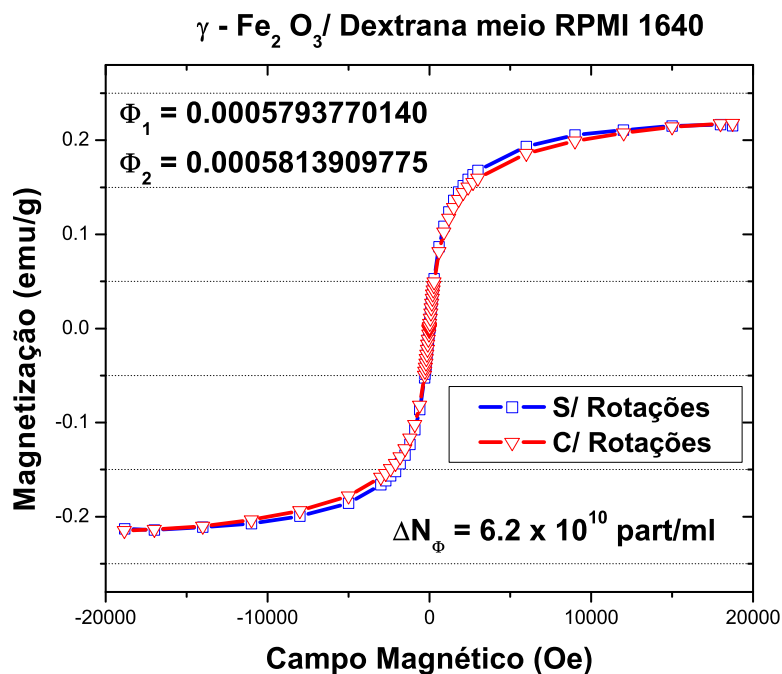
**Figura 4.9 :** Curvas de magnetização da amostra de  $\gamma - Fe_2O_3$  recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180: Sem contribuição diamagnética das células

<b>Dados de Magnetometria do Fluido Magnético com S180</b>			
$n^\circ$	Tempo	$N(\times 10^{14}part/ml)$	Massa de NPMs/cel ( $pg/cel$ )
1	10min	1.390209266	$61 \pm 12$
2	20min	1.442611832	$63 \pm 13$
3	60min	2.373528015	$103 \pm 21$

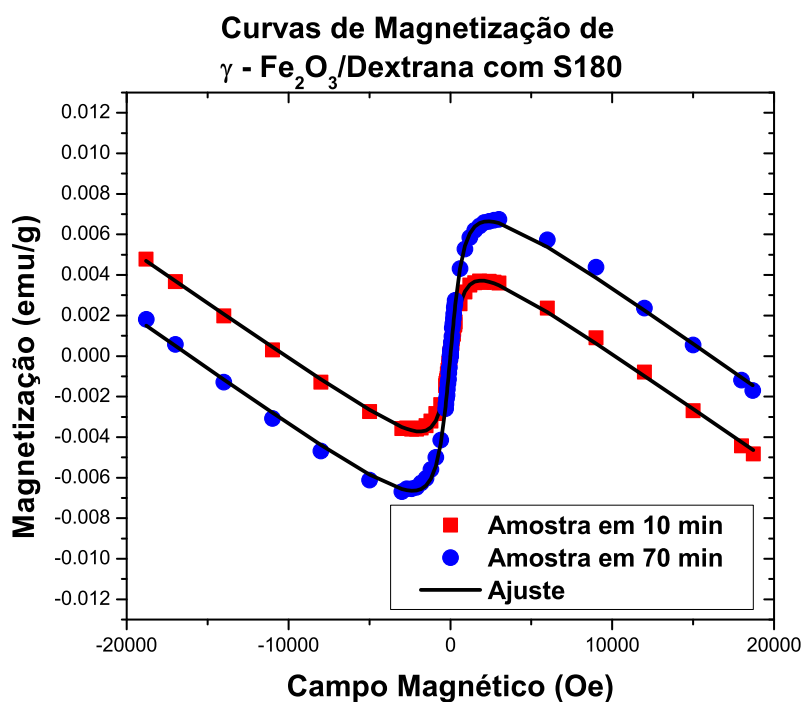
**Tabela 4.3 :** Dados das medidas de magnetometria do primeiro experimento ( $1pg = 10^{-12}g$  e N o número de partículas por unidade de volume)

Como a quantidade de dados era pequena realizamos uma nova bateria de testes. Desta vez as amostras foram preparadas em duplicata (duas amostras em cada tempo) na mesma diluição de 1:1 (volume : volume). Um novo teste de centrifugação foi realizado (vide figura 4.10). A figura (4.11) mostra duas das medidas realizadas neste segundo experimento, onde os círculos em azul e os quadrados vermelhos correspondem as amostras de fluido magnético com as S180 em tempos de exposição de 10 min e 70 min, respectivamente. A figura (4.12) mostra as mesmas curvas de magnetização, porém, sem a contribuição diamagnética extraída através e ajuste teórico. Para os dois testes de efeito de centrifugação nota-se que a quantidade de

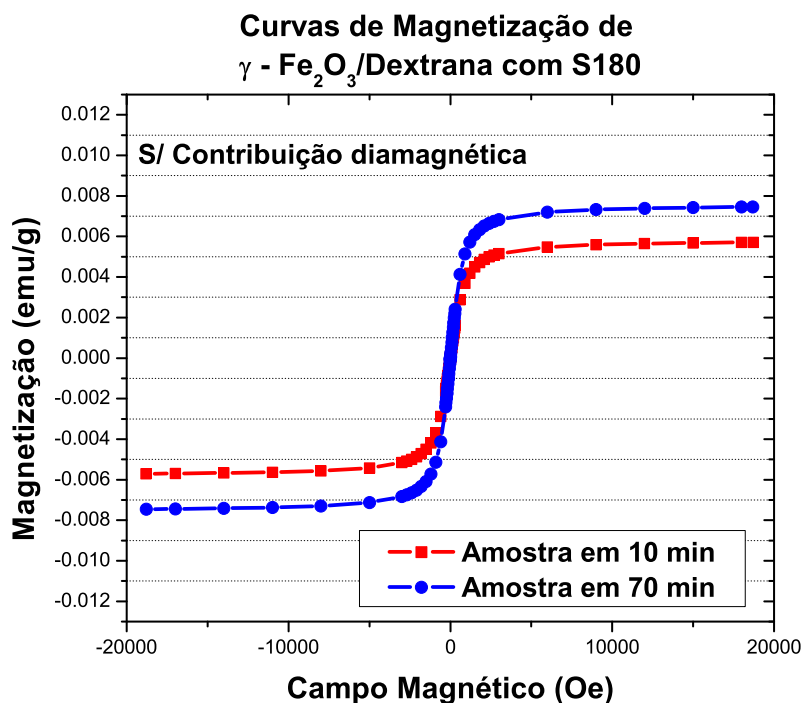
partículas que precipitam por causa do processo de rotação é muito baixa. Os resultados desta nova verificação pode ser visto nos dados da tabela 4.4



**Figura 4.10 :** Curvas de magnetização da amostra de  $\gamma - Fe_2O_3$  recoberta com dextrana diluída me meio de cultura do S180 em diluição de  $100\mu l$  para  $100\mu l$ : Azul-sem centrifugação, Vermelho-com centrifugação



**Figura 4.11** : Curvas de magnetização da amostra de  $\gamma - Fe_2O_3$  recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180

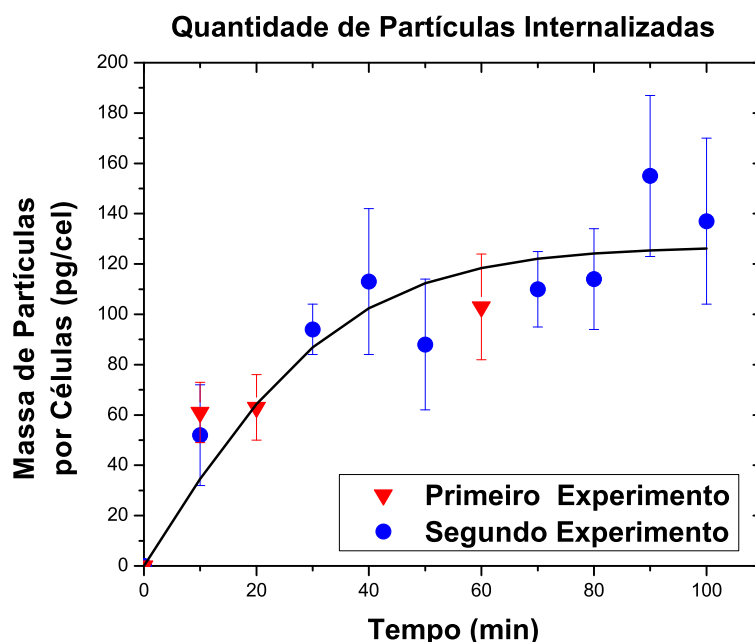


**Figura 4.12** : Curvas de magnetização da amostra de  $\gamma - Fe_2O_3$  recoberta com dextrana junto a meio de cultura e células S180: Sem contribuição diamagnética das células

Dados de Magnetometria do Fluido Magnético com S180			
$n^\circ$	Tempo	$N(\times 10^{14}part/ml)$	Massa de NPMs/cel (pg/cel)
1	10min	1.390209266	$52 \pm 20$
2	30min	1.442611832	$94 \pm 10$
3	40min	2.140557608	$113 \pm 29$
4	50min	1.759143063	$88 \pm 24$
5	70min	2.266361061	$110 \pm 15$
6	80min	2.926987927	$114 \pm 20$
7	90min	3.084236591	$155 \pm 32$
8	100min	2.595726226	$137 \pm 33$

**Tabela 4.4 :** Dados das medidas de magnetometria do segundo experimento ( $1pg = 10^{-12}g$  e N o número de partículas por unidade de volume)

A figura (4.13) apresenta a quantidade de nanopartículas internalizadas (em unidades de massa) por célula tumoral em função do tempo de exposição. Nestes cálculos foi utilizado o diâmetro modal  $D_M = (5,5 \pm 0,1)nm$ , volume do porta amostra  $v_{pa} = (0,269 \pm 0,01)cm^3$ , a concentração de células de  $2 \times 10^5 cel/ml$ , volume da partícula  $v_p = 8,7113 \times 10^{-20}ml$  e a densidade da maghemita de  $4,9g/ml$ .



**Figura 4.13 :** Gráfico da quantidade de massa de nanopartículas magnéticas em pg ( $1pg = 10^{-12}g$ ) por células de S180

Finalmente, pode-se concluir pela análise dos dados de magnetometria que as nanopartículas de magnetita recobertas com dextrana foram internalizadas pelas células neoplásicas de Sarcoma 180, atingindo uma saturação na internalização em um período de 30-40 minutos.

No próximo capítulo provaremos que a técnica magneto-óptica de Birrefringência Magnética Estática (BME) também pode ser utilizada para investigar o processo de internalização de nanopartículas magnéticas. Outras questões pode ser analisada por BME, ou seja, como estão auto-organizadas as nanopartículas quando estão sendo internalizadas? De partículas individuais ou de um aglomerado de nanopartículas? A análise magneto-óptica irá contribuir para o entendimento do processo de internalização.

## Capítulo 5

# Estudo Magneto-óptico da Interação das Nanopartículas Magnéticas com Células S180

Neste capítulo, iniciaremos falando um pouco sobre o fenômeno de birrefringência e Birrefringência Magnética Estática (BME) para esclarecer o leitor sobre como podemos utilizá-la para investigar a existência de estruturas auto-organizadas (aglomerados de nanopartículas, por exemplo, cadeias lineares de nanopartículas) na suspensão coloidal. O modelo teórico será apresentado na seção 5.1.2 e o diagrama de bloco do experimento em 5.1.3. Os resultados experimentais ficaram na seção 5.2. Estes resultados foram divididos em quatro subseções. A primeira discute o efeito da concentração de nanopartículas magnéticas no meio de cultura celular das S180. Posteriormente, avaliamos o efeito temporal de nanopartículas no meio de cultura as S180. Esta seção foi importante, pois serviu de controle para estudar o efeito da interação de nanopartículas com células tumorais que foi finalmente investigada na seção 5.2.3. O objetivo deste capítulo é apresentar, possivelmente pela primeira vez na literatura, um estudo magneto-óptico da interação de nanopartículas magnéticas com células.

### 5.1 Birrefringência

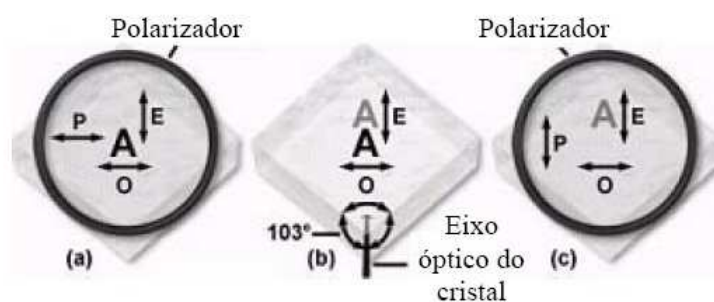
Os fluidos magnéticos na presença de campo externo tornam-se opticamente anisotrópicos. Isso ocorre devido a orientação de nanopartículas isoladas anisométricas, pequenos aglomerados (dímeros, trímeros, etc) ou a formação de cadeias sob ação de campo magnético

externo. O fenômeno pode ser detectado utilizando a técnica de Birrefringência Magnética Estática (BME). Esta, por sua vez, permite calcular o diâmetro médio das nanopartículas, a dispersão em torno desse diâmetro e a formação de aglomerados (cadeias) [40, 80]. Para compreender como a BME é um experimento simples e ao mesmo tempo poderoso é interessante começar por uma revisão de óptica.

### 5.1.1 Birrefringência Óptica

Muitos materiais cristalinos são opticamente anisotrópicos, como a calcita, a turmalina e o quartzo. Isto significa que suas propriedades ópticas não são uniformes espacialmente. Denomina-se **birrefringente** o material com diferentes índices de refração, dependendo da direção de propagação da luz que o atravessa. Segundo *Hecht (1991)*, o fenômeno da dupla refração foi observado pela primeira vez em cristais de calcita por Erasmus Bartholinus em 1669. Quando colocado sobre um desenho notavam-se duas imagens e não uma como o esperado. Bartholinus sugeriu que ao atravessar o cristal, o feixe de luz dividia-se em dois. Um raio o qual chamou de ordinário (O), e outro que contribuía para a segunda imagem e dependia da direção de propagação no cristal, denominado extraordinário (E).

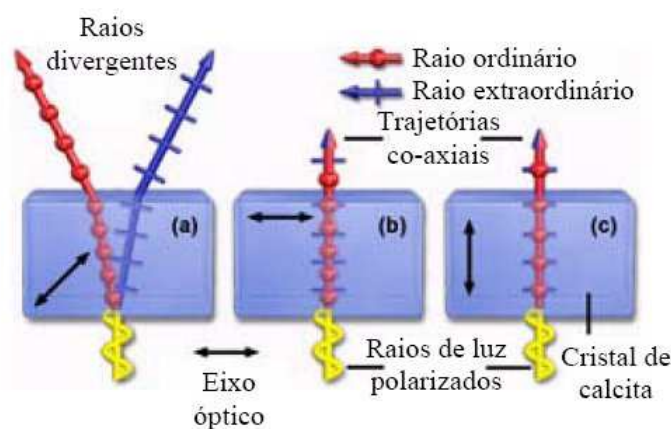
Analisando a polarização dos raios emergentes, observa-se que estes são lineares e perpendiculares entre si, como ilustra a Figura (5.1)



**Figura 5.1** : Representação do experimento de Bartholinus. Nas figuras (a) e (c) observa-se apenas uma imagem proveniente do feixe ordinário, e do extraordinário, respectivamente. Na figura (b) observa-se a imagem dupla (sem polarizador)

Se o feixe de luz incidente é oblíquo em relação ao eixo óptico, dois raios emergirão do cristal. No entanto, o comportamento do feixe luminoso pode ser diferente se ele penetrar de

forma perpendicular ou paralela ao eixo óptico. A figura (5.2) ilustra esse comportamento.



**Figura 5.2** : Separação das ondas de luz por um cristal birrefringente (a). Na figura (b) o feixe incide perpendicularmente ao eixo óptico do cristal provocando uma diferença de fase entre os feixes emergentes. Em (c), a incidência é paralela e os feixes não apresentam diferença de fase entre si.

Quando o raio incidente é perpendicular ao eixo óptico, os feixes ordinário e extraordinário são coincidentes, apesar de terem percorrido caminhos ópticos diferentes. Embora esses raios apareçam no mesmo ponto, apresentam diferença de fase entre si (vide fig.5.2). No caso do feixe incidente ser paralelo ao eixo óptico os raios emergentes comportam-se como se o material fosse isotrópico e percorrem o mesmo caminho, não apresentando diferença de fase (vide fig.5.2).

A birrefringência é medida pela diferença entre os índices de refração das direções dos feixes extraordinário e ordinário.

$$\Delta n = n_e - n_o \quad (5.1)$$

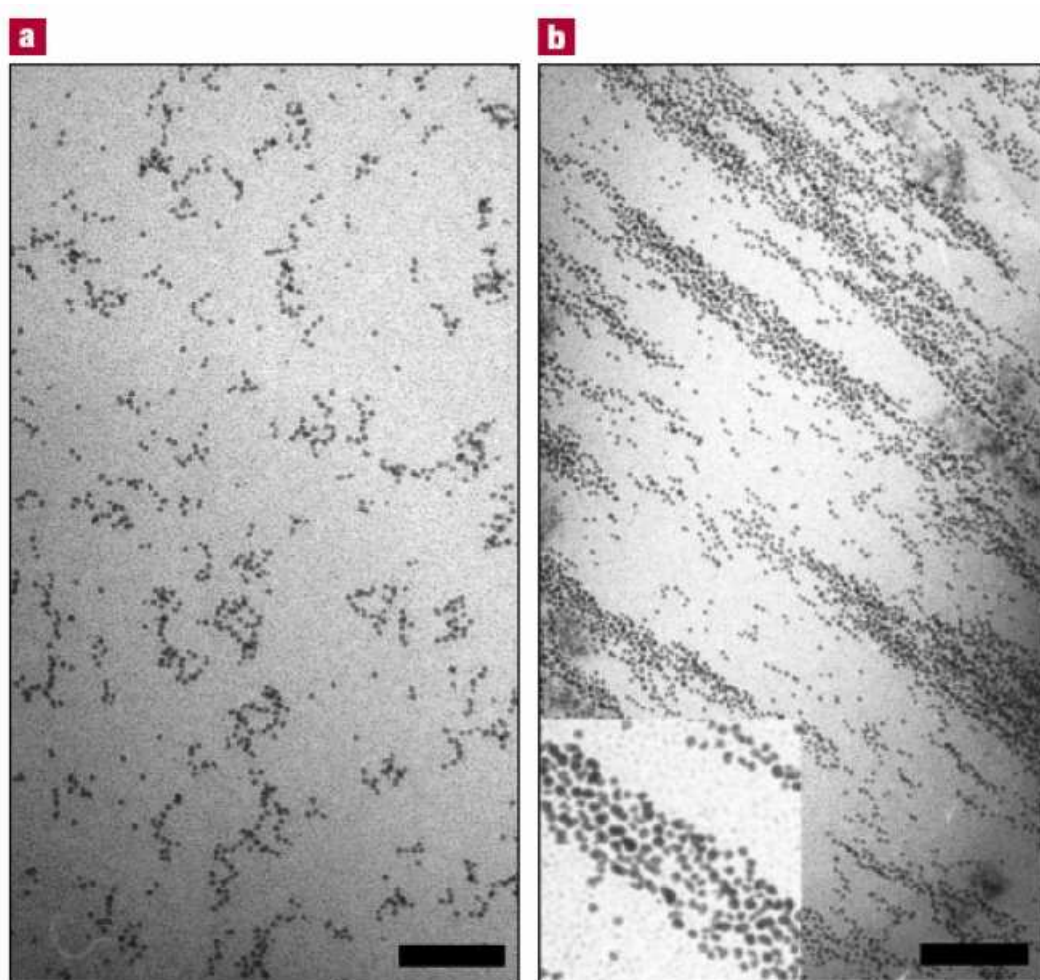
A observação de mudança no comportamento óptico do material em função do campo magnético, quando a propagação da onda dá-se na direção perpendicular a das linhas de campo é denominado efeito *Cotton-Mouton*.

As partículas do fluido tendem a girar e orientar seus momentos magnéticos, em relação a um campo aplicado, podendo, inclusive, formar estruturas auto-organizadas como mostram fotografias de microscopia eletrônica criogênica na figura (5.3). A diferença no índice de refração  $\Delta n$  é proporcional ao campo aplicado como será discutido adiante. O eixo óptico se orienta

segundo o campo aplicado, e o material comporta-se como um cristal anisotrópico, assim a equação (5.1) pode ser escrita como

$$\Delta n = n_{//} - n_{\perp} \quad (5.2)$$

com  $n_{//}$  o índice de refração na direção do campo magnético aplicado e  $n_{\perp}$  a orientação perpendicular ao campo aplicado.



**Figura 5.3 :** Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica de uma mistura binária de partículas com diâmetros diferentes. A micrografia (a) foi tomada em campo nulo, e (b) em campo  $H \neq 0$  [81, Butter *et al.*]. A barra de escala é de 200nm

### 5.1.2 Birrefringência Magnética Estática (BME)

A birrefringência em fluidos magnéticos pode ser determinada de acordo com a observação da mudança no comportamento óptico do material em função do campo magnético

externo aplicado. Define-se, então a birrefringência magnética como a diferença entre o índice de refração na direção paralela ao campo aplicado ( $n_{//}$ ) e o índice de refração na direção perpendicular ( $n_{\perp}$ ), vide eq.(5.2).

O modelo aqui utilizado para analisar tal fenômeno considera o alinhamento de aglomerados nos colóides (dímeros, trímeros e outros) como o responsável por sua anisotropia óptica. Nele, cada nanopartícula é considerada como um dipolo elétrico induzido  $\vec{p}$ , que, sob ação do campo elétrico oscilante  $\vec{E}$  da luz incidente, é

$$\vec{p} = \epsilon \overleftrightarrow{\alpha}_p \vec{E} \quad (5.3)$$

onde  $\epsilon$  é a permissividade elétrica do meio e  $\overleftrightarrow{\alpha}_p$  o tensor polarizabilidade elétrica de um aglomerado ou nanopartícula isolada anisométrica, representado, num sistema de coordenadas adequado (eixo de simetria do aglomerado), pela matriz

$$\overleftrightarrow{\alpha}_p = \begin{pmatrix} \alpha_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \alpha_{//} \end{pmatrix} \quad (5.4)$$

sendo  $\alpha_{\perp}$  e  $\alpha_{//}$  as componentes do tensor para um campo elétrico aplicado perpendicular e paralelamente ao eixo de simetria do aglomerado do qual a nanopartícula faz parte.

Por aplicação direta das equações de Maxwell obtemos uma forma explícita para o índice de refração para uma onda eletromagnética incidente numa região de permissividade elétrica  $\epsilon$ . Então, sejam as equações de Maxwell na ausência de cargas ( $\rho = 0$ ) e de densidade de corrente ( $\vec{J} = 0$ )

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (5.5)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = 0 \quad (5.6)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (5.7)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (5.8)$$

Sabendo que  $\vec{D} = \epsilon_o \vec{E} + \vec{P}$  e  $\vec{B} = \mu_o \vec{H}$

$$\begin{aligned}\vec{\nabla} \times \vec{H} &= \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \\ \frac{1}{\mu_o} \vec{\nabla} \times \vec{B} &= \frac{\partial}{\partial t} (\epsilon_o \vec{E} + \vec{P}) \\ \vec{\nabla} \times \vec{B} &= \mu_o \epsilon_o \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} + \mu_o \frac{\partial \vec{P}}{\partial t}\end{aligned}\quad (5.9)$$

Aplicando o  $\nabla \times$  em (5.8), substituindo (5.7) e (5.9)

$$\begin{aligned}\vec{\nabla} \times \vec{E} &= -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \\ \vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) &= -\frac{\partial}{\partial t} (\vec{\nabla} \times \vec{B}) \\ \vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{E}) &= -\mu_o \epsilon_o \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} - \mu_o \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2}\end{aligned}\quad (5.10)$$

Usando a identidade  $\vec{\nabla} \times (\vec{\nabla} \times \vec{A}) = \vec{\nabla} (\vec{\nabla} \cdot \vec{A}) - \nabla^2 \vec{A}$ , considerando que  $\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0$  na ausência de carga, a eq.(5.10) fica

$$\begin{aligned}\vec{\nabla} (\vec{\nabla} \cdot \vec{E}) - \nabla^2 \vec{E} &= -\mu_o \epsilon_o \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} - \mu_o \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2} \\ \nabla^2 \vec{E} &= \mu_o \epsilon_o \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} + \mu_o \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2}\end{aligned}\quad (5.11)$$

A solução de (5.11) é do tipo onda plana. Considere, então, uma onda propagando-se na direção  $\hat{x}$  da forma

$$\vec{E} = \vec{E}_o e^{i(\omega t - kx)} \quad (5.12)$$

Sabemos que em um fluido magnético com  $N$  partículas com momentos de dipolo  $\vec{p}$  a polarização é dada por

$$\vec{P} = N\vec{p} \quad (5.13)$$

sendo  $\vec{p}$  dado por (5.3). Logo, utilizando as relações

$$\nabla^2 \vec{E} = (ik)^2 \vec{E} \quad (5.14)$$

$$\frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = (i\omega)^2 \vec{E} \quad (5.15)$$

$$\frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2} = \epsilon_o N \langle \alpha \rangle \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \epsilon_o N \langle \alpha \rangle (i\omega)^2 \vec{E} \quad (5.16)$$

Substituindo as relações acima em (5.11) obtemos

$$\begin{aligned}(ik)^2 \vec{E} &= \mu_o \epsilon_o (i\omega)^2 \vec{E} + \mu_o \epsilon_o (i\omega)^2 N \langle \alpha \rangle \vec{E} \\ k^2 \vec{E} &= \omega^2 \mu_o \epsilon_o (1 + N \langle \alpha \rangle) \vec{E} \\ k^2 &= \omega^2 \mu_o \epsilon_o (1 + N \langle \alpha \rangle)\end{aligned}\quad (5.17)$$

sendo  $\langle \alpha \rangle$  a média do tensor polarizabilidade sobre  $N$  partículas no fluido magnético. Portanto, realizando uma passagem simples considerando as relações  $k^2 = n^2 \omega^2 / c^2$  e  $c = 1 / \sqrt{\mu_o \epsilon_o}$ , então

$$\begin{aligned}k^2 &= \omega^2 n^2 \mu_o \epsilon_o \\ n^2 &= \frac{k^2}{\omega^2 \mu_o \epsilon_o}\end{aligned}\quad (5.18)$$

Logo, de (5.18), (5.17) fica

$$n^2 = (1 + N \langle \alpha \rangle)\quad (5.19)$$

Para o caso de partículas muito pequenas comparadas com o comprimento de onda da luz incidente e dispersas numa suspensão não magnética (líquido carreador) com constante dielétrica  $\epsilon_1$ , (5.17) pode ser escrita como

$$k^2 = \omega^2 \mu_o \epsilon_1 (1 + N \langle \alpha \rangle)\quad (5.20)$$

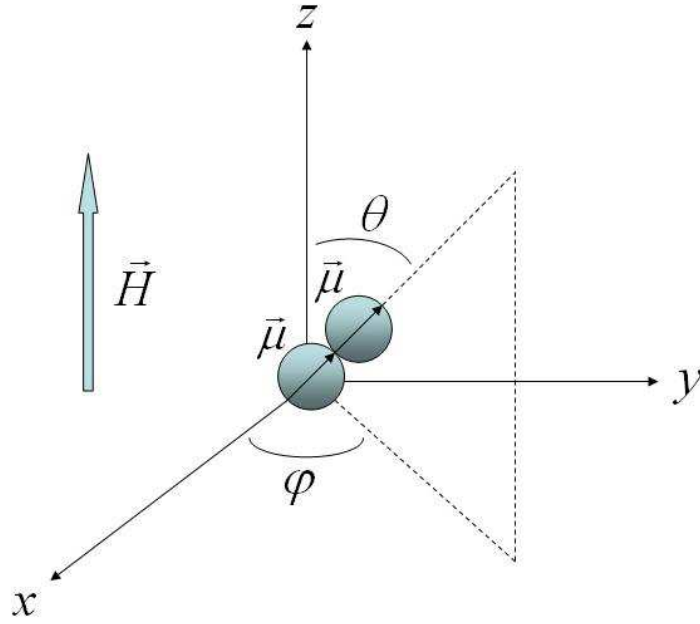
que assume a forma

$$n^2 = n_1^2 (1 + N \langle \alpha \rangle)\quad (5.21)$$

onde  $n$  é o índice de refração da suspensão e  $n_1$  o índice de refração do líquido carreador.

Se o eixo de simetria do aglomerado for representado em relação ao sistema de coordenadas de laboratório pelos ângulos polar  $\theta$  e azimutal  $\varphi$  e adotando um sistema de coordenadas conveniente, no qual o campo externo está ao longo da direção  $\hat{z}$  (figura 5.4), a polarizabilidade da partícula em coordenadas do laboratório será

$$\overleftarrow{\alpha} = R \overleftarrow{\alpha}_p R^{-1}\quad (5.22)$$



**Figura 5.4 :** Esquema de orientação de um aglomerado com relação ao referencial no laboratório.

onde  $R$  é a matriz rotação dada por

$$R = \begin{pmatrix} \sin \varphi & \cos \theta \cos \varphi & \sin \theta \cos \varphi \\ -\cos \varphi & \cos \theta \sin \varphi & \sin \theta \sin \varphi \\ 0 & -\sin \theta & \cos \theta \end{pmatrix} \quad (5.23)$$

Então, aplicando (5.22) temos

$$\begin{aligned} \overleftrightarrow{\alpha} &= \begin{pmatrix} \sin \varphi & \cos \theta \cos \varphi & \sin \theta \cos \varphi \\ -\cos \varphi & \cos \theta \sin \varphi & \sin \theta \sin \varphi \\ 0 & -\sin \theta & \cos \theta \end{pmatrix} \overleftrightarrow{\alpha}_p \begin{pmatrix} \sin \varphi & -\cos \varphi & 0 \\ \cos \theta \cos \varphi & \cos \theta \sin \varphi & -\sin \theta \\ \sin \theta \cos \varphi & \sin \theta \sin \varphi & \cos \theta \end{pmatrix} \\ \overleftrightarrow{\alpha} &= \begin{pmatrix} \alpha_{\perp} \sin \varphi & \alpha_{\perp} \cos \theta \cos \varphi & \alpha_{//} \sin \theta \cos \varphi \\ -\alpha_{\perp} \cos \varphi & \alpha_{\perp} \cos \theta \sin \varphi & \alpha_{//} \sin \theta \sin \varphi \\ 0 & -\alpha_{\perp} \sin \theta & \alpha_{//} \cos \theta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \sin \varphi & -\cos \varphi & 0 \\ \cos \theta \cos \varphi & \cos \theta \sin \varphi & -\sin \theta \\ \sin \theta \cos \varphi & \sin \theta \sin \varphi & \cos \theta \end{pmatrix} \end{aligned}$$

Fazendo a multiplicação de matrizes e usando as relações entre senos e cossenos ( $\sin^2 \delta + \cos^2 \delta =$

1) e tomando  $a = (\alpha_{//} - \alpha_{\perp})$

$$\overleftrightarrow{\alpha} = \begin{pmatrix} \alpha_{\perp} + a(\sin^2 \theta \cos^2 \varphi) & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_{\perp} + a(\sin^2 \theta \sin^2 \varphi) & 0 \\ 0 & 0 & \alpha_{\perp} + a \cos^2 \theta \end{pmatrix} \quad (5.24)$$

De acordo com a definição de birrefringência magnética, os termos de interesse são o perpendicular  $\alpha_{xx}$  e o paralelo  $\alpha_{zz}$  ao campo aplicado, logo

$$\alpha_{xx} = \alpha_{\perp} + (\alpha_{//} - \alpha_{\perp})(\sin^2 \theta \cos^2 \varphi) \quad (5.25)$$

$$\alpha_{zz} = \alpha_{\perp} + (\alpha_{//} - \alpha_{\perp})\cos^2\theta \quad (5.26)$$

Calculando a polarizabilidade média sobre as  $N$  partículas do fluido magnético usando (5.21), temos

$$n_i^2 = n_1^2(1 + N\langle\alpha\rangle_{ii}) \quad (5.27)$$

sendo  $i = x, z$ . Utilizando a seguinte expansão

$$(1 + x)^n = 1 + nx + \frac{n(n-1)}{2}x^2 + \dots \quad (5.28)$$

e aplicando em cada uma das componentes, a birrefringência  $\Delta n$  fica da forma

$$\Delta n(\theta, \varphi) = n_z - n_x \approx \frac{1}{2}n_1N(\alpha_{//} - \alpha_{\perp})(\cos^2\theta - \sin^2\theta \sin^2\varphi) \quad (5.29)$$

A média é calculada considerando-se o fator de Boltzmann sendo dada por

$$\langle\Delta n(\theta, \varphi)\rangle = \frac{1}{Z} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \Delta n(\theta, \varphi) e^{\xi \cos\theta} d(\cos\theta) d\varphi \quad (5.30)$$

onde  $Z$  é a função partição

$$Z = \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} e^{\xi \cos\theta} d(\cos\theta) d\varphi \quad (5.31)$$

com  $\xi = \mu_o\mu H/K_B T$  e  $\mu = \pi D^3 M_S/6$ , para o caso de uma nanopartícula anisométrica. A energia de interação Zeeman do dipolo magnético com o campo magnético externo  $U = -\vec{\mu} \cdot (\mu_o \vec{H})$ , onde  $\mu_o$  é a permeabilidade magnética do líquido,  $\mu$  o módulo do momento magnético de uma partícula,  $K_B$  a constante de Boltzmann,  $D$  o diâmetro da partícula e  $M_S$  a magnetização de saturação da amostra. Portanto, resolvendo (5.30) temos

$$\langle\Delta n(\theta, \varphi)\rangle = \frac{1}{2}n_1N(\alpha_{//} - \alpha_{\perp}) \left(1 - \frac{3}{\xi \tanh \xi} + \frac{3}{\xi^2}\right) \quad (5.32)$$

onde em (5.32) temos a função de Langevin de segunda ordem dada por

$$L_2(\xi) = 1 - \frac{3}{\xi \tanh \xi} + \frac{3}{\xi^2} \quad (5.33)$$

Mas em um fluido magnético monômeros, dímeros, trímeros e agregados maiores coexistem e a birrefringência deve levar em conta o sinal de cada estrutura. Logo, podemos escrever

$$\Delta n = \sum_Q C_Q \Delta n_Q \quad (5.34)$$

sendo  $C_Q$  é a fração volumétrica de agregados constituídos por  $Q$  partículas e  $\Delta n$  a birrefringência de cada agregado, onde o vínculo abaixo deve ser satisfeito.

$$\sum_Q C_Q = 1 \quad (5.35)$$

Deste modo, para uma amostra polidispersa podemos calcular a média da birrefringência da seguinte forma

$$\Delta n = \frac{\int_0^\infty \sum_Q C_Q L_2(\xi) f(D) P(D) dD}{\int_0^\infty D^3 P(D) dD} \quad (5.36)$$

onde  $P(D)$  é a distribuição de diâmetros lognormal com dispersão  $\sigma$  e diâmetro modal  $D_M$  de uma amostra caracterizada, por exemplo, por Microcopia eletrônica de Transmissão (TEM), sendo dada por

$$P(D) = \frac{\exp(-\sigma^2/2)}{\sqrt{2\pi}\sigma D_M} \exp\left[-\frac{\ln^2(D/D_M)}{2\sigma^2}\right] \quad (5.37)$$

com

$$L_2(\xi) = 1 - \frac{3}{\xi_Q \tanh \xi_Q} + \frac{3}{\xi_Q^2} \quad (5.38)$$

e

$$\Delta n_Q = \frac{\pi n_1 Q N_Q}{12} \langle \chi_{//} - \chi_{\perp} \rangle_Q \quad (5.39)$$

Para uma amostra polidispersa, cada cadeia contribui para birrefringência de acordo com o número de partículas que a mesma possui, ou seja,

$$\xi_Q = Q\xi \quad (5.40)$$

onde  $Q$  é o número médio de partículas nos aglomerados. No nosso caso, (5.34) pode ser representado por uma valor médio tal que

$$\Delta n = \Delta n_Q \int_0^\infty D^3 L_2(\xi_Q) P(D) dD \quad (5.41)$$

onde  $N_Q$  é o número de aglomerados médio e  $\chi_{ii}$  é a componente do tensor polarizabilidade por unidade de volume (susceptibilidade elétrica). Com esta equação ajustamos os dados experimentais e obtemos as informações sobre a formação de aglomerados no sistema coloidal.

As componentes da susceptibilidade elétrica são fortemente dependentes da distância superfície-superfície entre as nanopartículas. De fato, *Xu e Ridler* [80] utilizaram um modelo de dipolo oscilante para calcular as componentes para uma cadeia constituída de  $Q$  nanopartículas. Os resultados de  $\chi_{//}$  e  $\chi_{\perp}$  são os seguintes

$$\chi_{\perp} = \frac{1}{Q} \sum_{i=1}^Q \frac{\chi_o}{1 + \kappa_{\perp i} \chi_o} \quad (5.42)$$

$$\chi_{//} = \frac{1}{Q} \sum_{i=1}^Q \frac{\chi_o}{1 - \kappa_{//i} \chi_o} \quad (5.43)$$

com

$$\kappa_{\perp i} = \frac{v_p}{4\pi r^3} \sum_{i \neq j} \frac{1}{|j - i|^3} \quad (5.44)$$

e

$$\kappa_{//i} = 2\kappa_{\perp i} \quad (5.45)$$

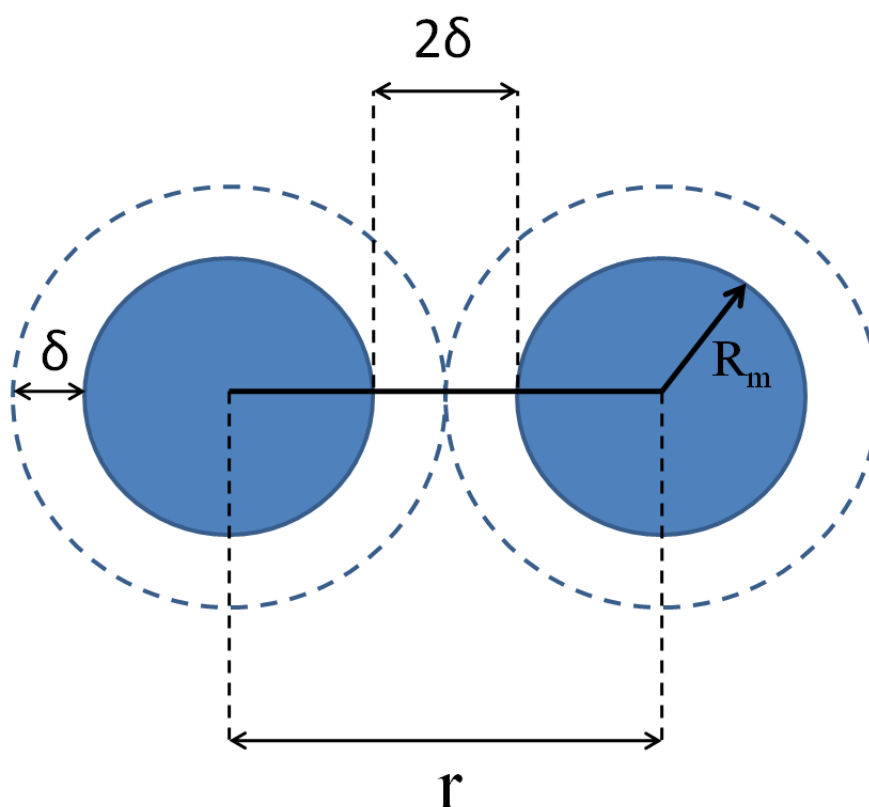
Sendo  $\chi_o$  para uma partícula dado por

$$\chi_o = \frac{\epsilon_p - \epsilon_1}{\epsilon_p + N(\epsilon_p - \epsilon_1)} \quad (5.46)$$

onde  $\epsilon_p$ ,  $\epsilon_1$  e  $N$  são a permissividade elétrica da partícula, a permissividade elétrica do líquido carreador e o fator de depolarização. Note que  $r$  é a distância centro a centro entre as nanopartículas e pode ser representado em termos da espessura da camada molecular que recobre a nanopartícula ( $\delta$ ) (vide figura 5.5) como

$$r = D_M + 2\delta \quad (5.47)$$

Portanto, a partir das análises dos dados de BME é possível obter  $\langle \chi_{//} - \chi_{\perp} \rangle$ . Este parâmetro, por sua vez, pode ser utilizado para obter informações acerca da camada de cobertura das nanopartículas que formam estruturas auto-organizadas no líquido carreador.



**Figura 5.5** : Representação esquemática da distância superfície a superfície entre duas nanopartículas magnéticas separadas a uma distância  $r$ .

### 5.1.3 Diagrama de Bloco do Experimento de BME

O diagrama de bloco para aplicação da técnica de birrefringência magnética consiste, basicamente, de uma luz (um laser, com comprimento de onda  $\lambda = 632nm$ ) que passa por um modulador (chopper), atravessando posteriormente um polarizador, em seguida o feixe é subdividido em dois ao passar por um separador de feixes que mantém a polarização da luz incidente. Um sinal de referência é obtido no detector 2 que está acoplado a um sistema de aquisição de dados. O outro feixe incide sobre a amostra, passa pelo analisador alcançando enfim o detector 1 (ambos os detectores são da marca OPTRON FT850-3) que envia um sinal ao amplificador lock-in que usa a frequência do chopper como referência (vide fig. 5.6).

Nesta montagem a direção de propagação do feixe de luz do laser e o campo magnético aplicado encontram-se perpendiculares entre si. Também, os eixos do polarizador são posicionados perpendiculares entre si, de modo que na ausência da amostra não há detecção de qualquer

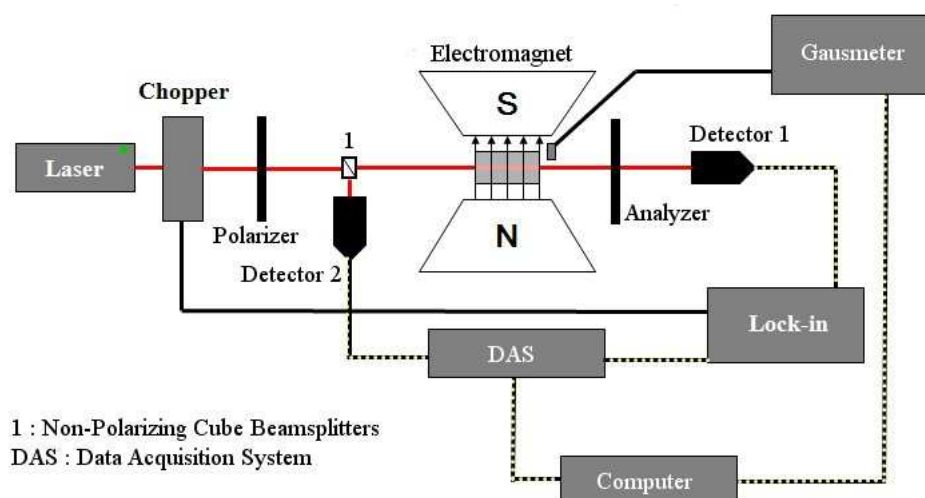


Figura 5.6 : Diagrama de bloco das medidas de birrefringência magnética estática.

sinal, já que de acordo com a lei de Malus

$$I_p = I_a \cos^2 \beta \quad (5.48)$$

sendo  $I_p$  e  $I_a$  as intensidades de luz que saem do polarizador e analisador, respectivamente e  $\beta$  o ângulo entre os planos de polarização dos mesmos, ou seja, para  $\beta = \pi/2$ ,  $I_p = 0$ . Dessa maneira, quando a amostra é colocada entre os polarizadores, caso seja birrefringente, há uma rotação do eixo de polarização da luz ao atravessar a amostra permitindo que um sinal seja detectado.

Para esse tipo de montagem, desconsiderando possíveis efeitos de dicroísmo, a intensidade do sinal que atinge o analisador varia com a birrefringência da amostra na forma

$$I = I_o \sin^2(2\nu) \sin^2 \left( \frac{\pi l}{\lambda} \Delta n \right) \quad (5.49)$$

onde  $I_o$  é a intensidade do sinal incidente,  $l$  a espessura do porta amostras,  $\lambda$  o comprimento de onda do laser,  $\Delta n$  a birrefringência do material da amostra e  $\nu$  o ângulo entre o analisador e o campo magnético aplicado. Em nossa configuração  $\nu = \pi/4$ .

A figura (5.7) mostra a montagem experimental da técnica de BME implementada no Laboratório de Magneto-óptica da Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.



**Figura 5.7** : Montagem experimental de BME do Laboratório de Magneto-óptica do IF-UFG.

## 5.2 Resultados de BME

A técnica de BME pode extrair informações sobre a distribuição de diâmetros do sistema coloidal, a autoorganização das nanopartículas no líquido carreador (nanoestruturas isoladas ou cadeias de nanopartículas), ou ainda a distância entre as mesmas (efeito da camada de cobertura). Estes dados podem ser utilizados para melhor compreender o processo de internalização celular de nanopartículas.

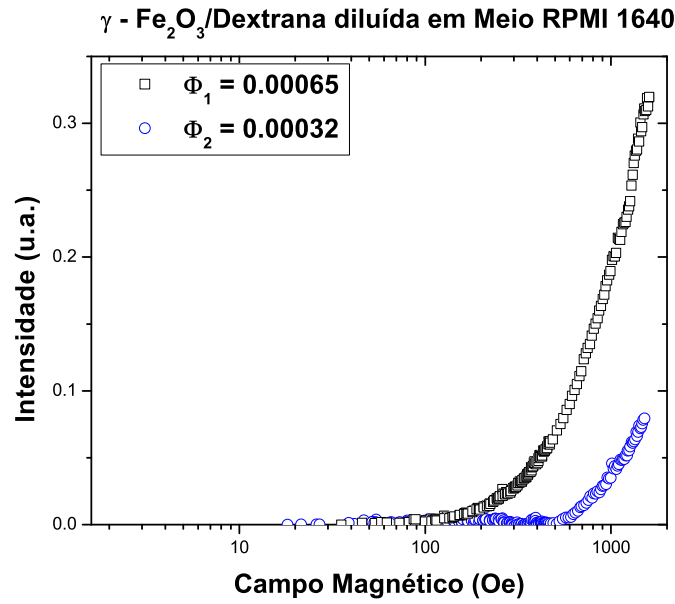
Com esta finalidade, foram realizados os experimentos com amostras controle. Estas amostras constituem do fluido magnético diluído em meio de cultura celular. Dois tipos de experimentos foram realizados. Primeiramente, foi investigado o efeito da concentração de nanopartículas (seção 5.2.1), enquanto que em uma segunda etapa (seção 5.2.2) analisou-se, para uma concentração de nanopartículas específica (1:1), o efeito temporal. Nosso intuito era obter dados que avaliassem, independentemente, a influência destes parâmetros. Estes foram então comparados com dados de BME de amostras contendo fluido magnético e células tumorais de Sarcoma 180 (seção 5.2.3). As medidas de BME desse sistema complexo avaliaram a influência do tempo de exposição de nanopartículas magnéticas com as células neoplásicas.

### 5.2.1 BME em Função da Concentração em meio de Cultura Celular

O primeiro experimento realizado foi o de medir a birrefringência em função da con-

centração de nanopartículas em meio de cultura celular. Neste experimento, trabalhamos com amostras constituídas pelo fluido magnético diluído em meio de cultura celular nas seguintes concentrações: 1:1 e 1:3. O intuito deste experimento é obter informações sobre o comportamento da amostra de fluido magnético quando exposta ao meio de cultura celular em diferentes concentrações.

O gráfico da figura (5.8) apresenta os dados de birrefringência em função do campo magnético. Quadrados e círculos correspondem as amostras com frações volumétricas de  $\phi_1 = 0,00065$  e  $\phi_2 = 0,00032$ , respectivamente. Note que quanto mais concentrada a amostra maior o sinal de BME. Isto vai de acordo com dados da literatura [40].



**Figura 5.8 :** Medida de BME da amostra de fluido magnético diluído em meio de cultura celular

O ajuste dos dados de BME foram feitos utilizando a equação

$$I = I_o^{exp} \left[ \sin^2 \left( \Delta n_s \int L_2(\xi_Q) D^3 P(D) d(D) \right) \right], \quad (5.50)$$

que possui apenas dois parâmetros ajustáveis,  $\Delta n_s$  e  $Q$ . Lembrando que  $Q$  corresponde ao número médio de nanopartículas formando um aglomerado e

$$\Delta n_s = \frac{\pi^2 l n_1 Q N_Q}{12\lambda} \langle \chi_{//} - \chi_{\perp} \rangle_Q, \quad (5.51)$$

A polidispersão e o diâmetro modal considerados foram os obtidos por TEM na seção 3.1.1 com seus valores de  $\sigma = 0,18 \pm 0,02$  e  $D_M = (5,5 \pm 0,1)\text{nm}$ , respectivamente. As figuras (5.9) e (5.10) apresentam os dados experimentais conjuntamente com os ajustes teóricos para diferentes concentrações. Note que aumentando a concentração de nanopartículas o tamanho médio do aglomerado também aumentou. Este fenômeno já foi observado por vários outros autores na literatura [40].

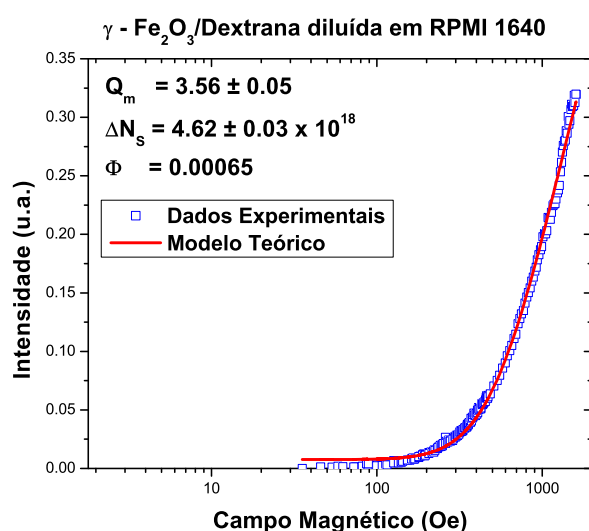


Figura 5.9 : Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético: diluição de 1:1

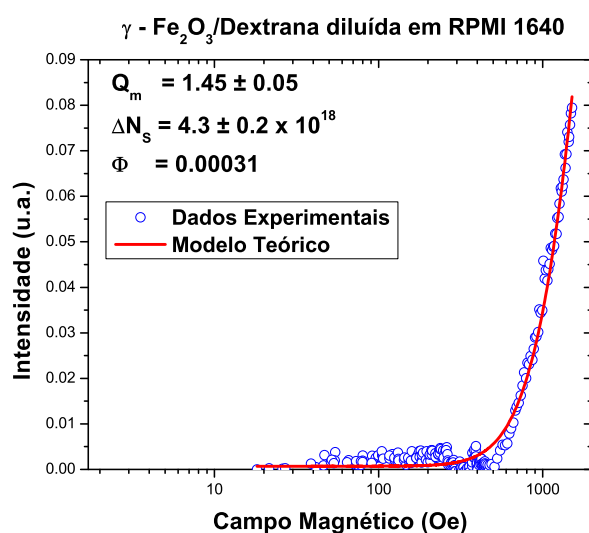
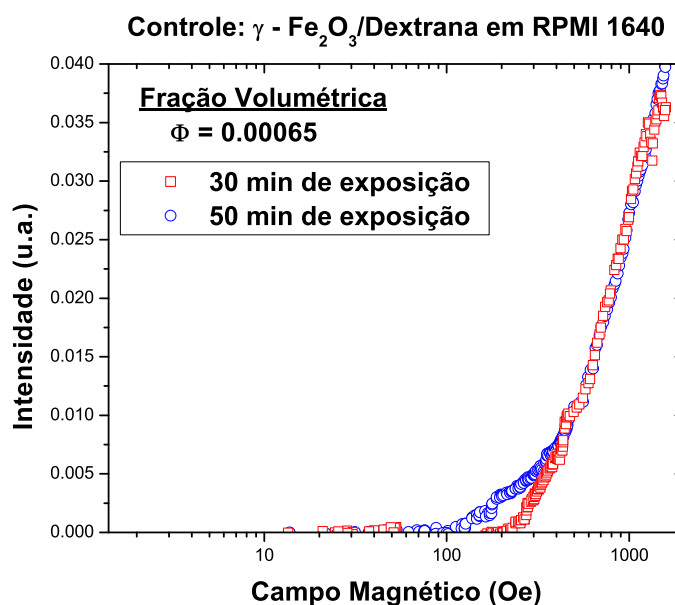


Figura 5.10 : Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético diluído 1x em meio de cultura: diluição 1:3

## 5.2.2 BME do Fluido Magnético em meio RPMI 1640: Aging Effect

No passo seguinte, diluímos o fluido magnético em meio de cultura da S180 na razão de  $100\mu\text{l}$  para  $100\mu\text{l}$  (1:1) de meio de cultura e, em seguida, realizamos as medidas de BME em intervalos distintos após a preparação das amostras. O gráfico da figura (5.11) apresenta os dados de BME em função do campo magnético para diferentes tempos. Os quadrados e círculos correspondem aos tempos de 30 min e 50 min, respectivamente. A figura (5.13) apresenta os dados experimentais de BME com seu respectivo ajuste. Enquanto a figura (5.14), (5.15) apresenta o tamanho médio do aglomerado e os valores da birrefringência de saturação em diferentes tempos, respectivamente. Note que basicamente, neste intervalo de tempo, não há uma mudança significativa nestes parâmetros. De fato, o tamanho médio do aglomerado permanece em torno de 4,8. Este resultado será utilizado como controle para comparação com os dados da seção seguinte.



**Figura 5.11 :** Controle da amostra de  $100\mu\text{l}$  de fluido magnético diluído em  $100\mu\text{l}$  de meio de cultura em função do tempo.

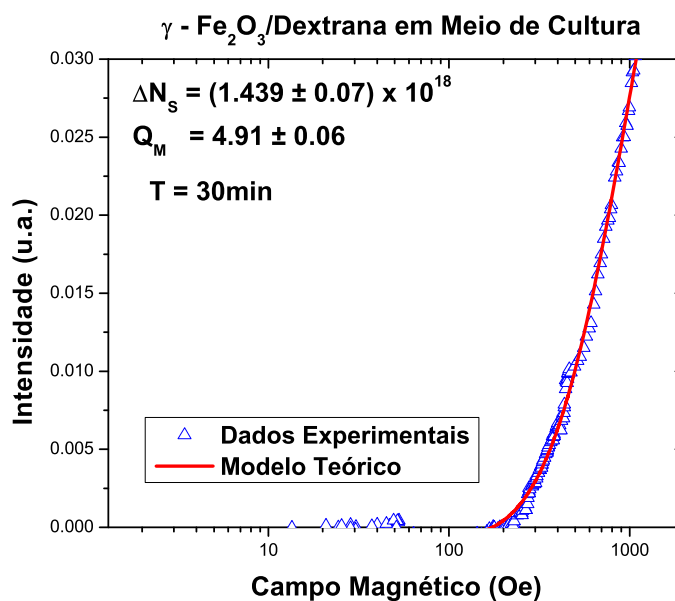


Figura 5.12 : Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético diluído 1× em meio de cultura em  $t = 50\text{min}$

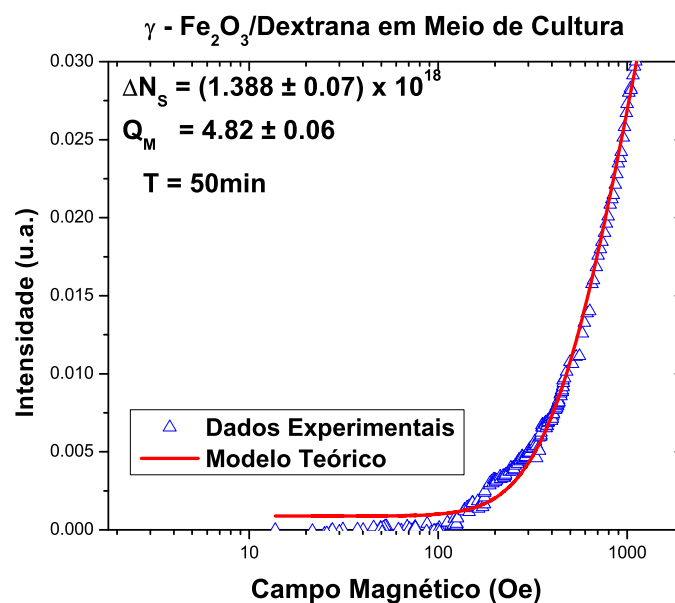


Figura 5.13 : Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético diluído 1× em meio de cultura em  $t = 50\text{min}$

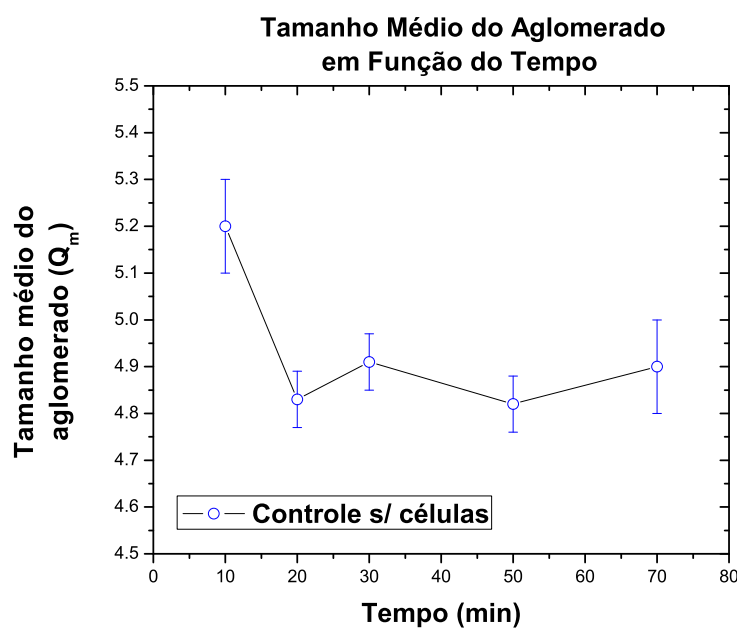


Figura 5.14 : Valores experimentais do tamanho médio dos aglomerados.

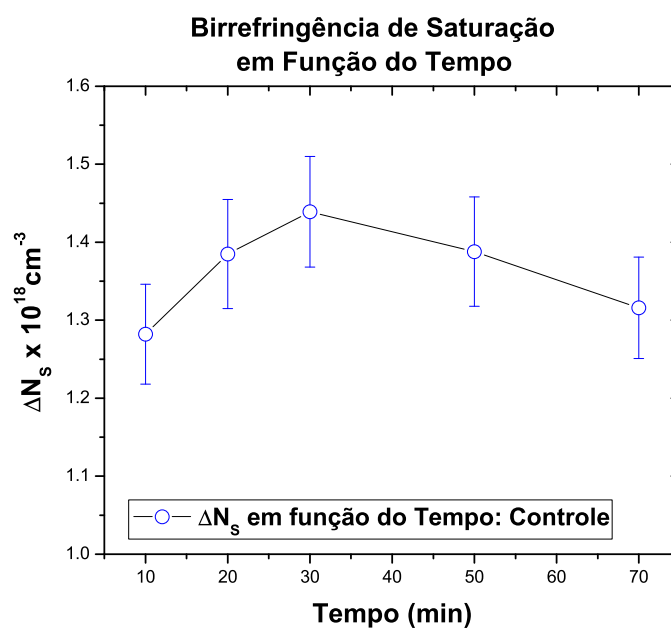
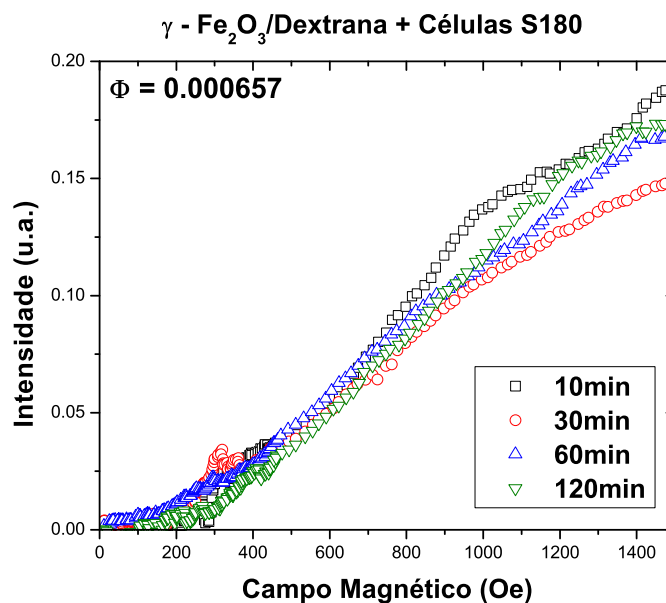


Figura 5.15 : Valores experimentais da birrefringência de saturação em tempos diferentes na mesma concentração.

### 5.2.3 BME do Fluido Magnético com Células S180

Estas medidas foram realizadas com amostras compostas por  $200\mu\text{l}$  de fluido magnético para  $200\mu\text{l}$  (1:1) de células S180 em meio de cultura. A figura (5.16) mostra as medidas em 10min, 30min, 60min e 120min depois da amostra preparada. Quadrados negros representam

a medida da amostra após 10min de exposição das nanopartículas com as células de S180, os círculos vermelhos correspondem as medidas de 30min, triângulos azuis as medidas de 60min e losangos verdes a 120min. Note que o sinal de BME cai entre 10min e 30min. E logo após começa a subir novamente.



**Figura 5.16 :** Dados de BME da amostra de fluido magnético em meio a células de S180 nos tempos de 10min, 30min, 60min e 120min

Uma maneira de avaliar como as partículas estão próximas num sistema em que possui aglomerados relativamente grandes é calcular a distância superfície a superfície entre elas. Este cálculo permite obter informações sobre a camada de cobertura. De fato, podemos estimar a distância superfície a superfície  $2\delta$  entre nanopartículas magnéticas utilizando os dados experimentais de BME e determinando a mesma utilizando o modelo teórico proposto. Assumindo que o número de partículas contribuindo para o sinal magneto-óptico é o mesmo obtido por MAV e utilizando equação (5.41) determina-se o valor experimental da grandeza  $\langle\chi_{//} - \chi_{\perp}\rangle_Q$ . Então, utilizando as equações (5.42), (5.43), (5.44), (5.45) e (5.47), e os a literatura de permissividade elétrica da maghemita  $\epsilon_o = 5,2 + 3i$  [82] e a permissividade do meio de  $\epsilon_1 = 1,78\epsilon_o$  [83], foi possível calcular a distância superfície a superfície obtendo  $(3,41 \pm 0,02)\text{nm}$  (considerando os dados em 10 min. nesta análise). O cálculo fornece uma camada de cobertura de  $(1,70 \pm 0,02)\text{nm}$ .

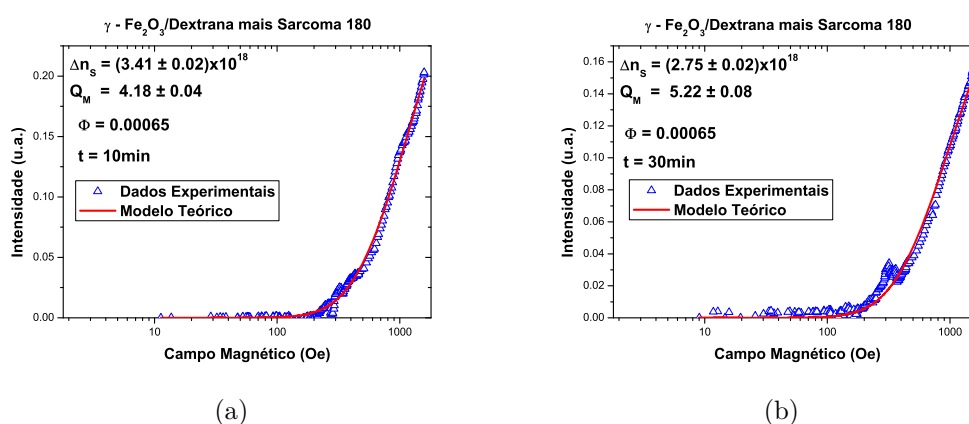
Esta análise só pode ser feita no instante inicial, pois, como mostra os dados de magnetometria, o processo de internalização das nanopartículas magnéticas é dinâmico.

Nas figuras 5.17(a), 5.17(b), 5.18(a) e 5.18(b) são apresentados os dados BME e seus respectivos ajustes pelo modelo teórico utilizado (vide tabela 5.1). Estes dados mostram que o tamanho médio do aglomerado vai de  $4,18 \pm 0,04$  em 10 min, passando por  $5,22 \pm 0,08$  em 30 min e chegando finalmente em  $3,62 \pm 0,02$  em 120 min. De fato, este comportamento difere do controle como mostra as figuras 5.19(a) e 5.19(b). Além disso, pode-se notar na figura (5.20) que a birrefringência de saturação faz um caminho inverso, ou seja, decresce e cresce novamente.

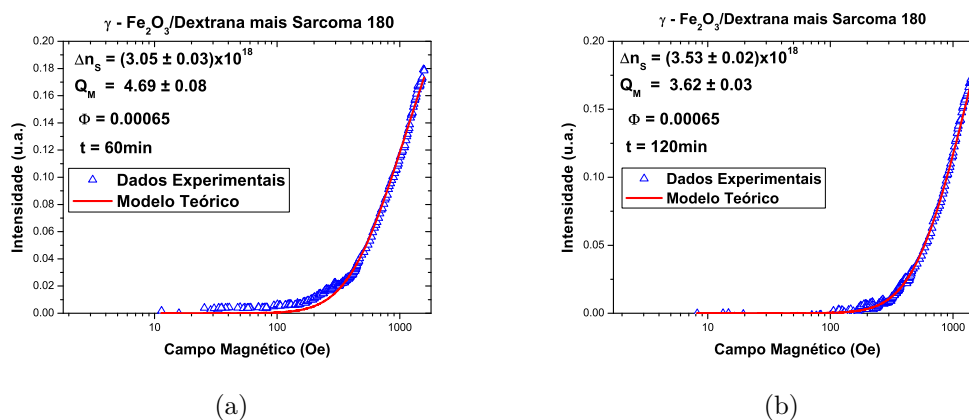
Note que a diminuição da birrefringência de saturação, que é proporcional ao número de nanopartículas contribuindo para o sinal de BME, está associado a internalização de nanopartículas magnéticas pelas células neoplásicas de Sarcoma 180. Sabe-se pelos dados de VSM que entre 30-40 minutos ocorre a saturação do processo de internalização de nanopartículas. Nossos dados, no mesmo intervalo de tempo, mostram que o número de partículas no meio de cultura contribuindo para o sinal de BME está decaindo. Conclui-se, portanto, que a técnica de BME foi capaz de identificar o processo de internalização. Após 30-40 minutos os dados de  $\Delta n_S$  voltam a crescer. A interpretação para tal fenômeno está associado a formação de pequenos aglomerados no meio de cultura, por exemplo, a formação de aglomerados de nanopartículas, que antes encontravam-se isoladas e, sendo esféricas, não contribuíam para o sinal de BME que como efeito de autoorganização passam a contribuir para o sinal de BME.

Dados de Birrefringência Magnética Estática			
$n^{\circ}$	Tempo	$\Delta n_s \times 10^{18}$	$Q_m$
1	10min	$3,41 \pm 0,02$	$4,18 \pm 0,04$
2	30min	$2,75 \pm 0,02$	$5,22 \pm 0,08$
3	60min	$3,05 \pm 0,03$	$4,69 \pm 0,08$
4	120min	$3,53 \pm 0,02$	$3,62 \pm 0,03$

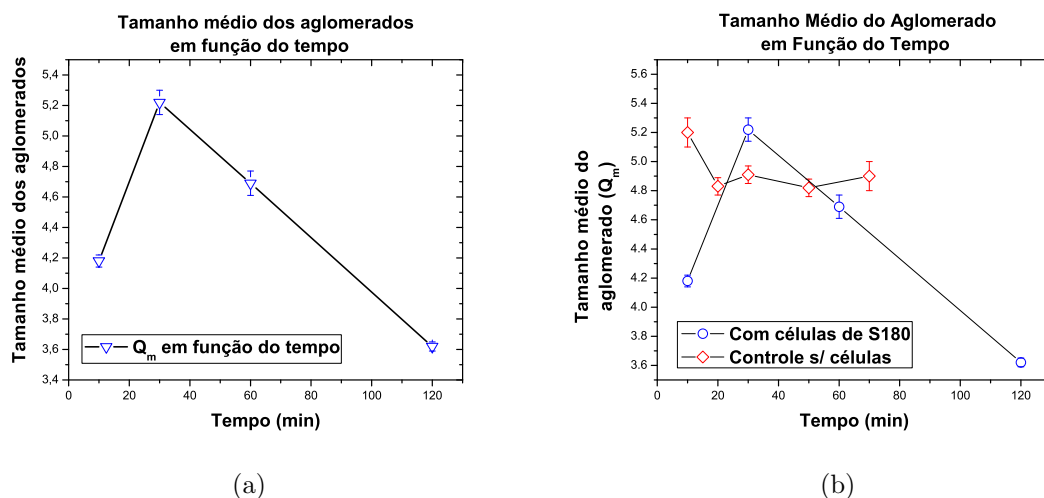
**Tabela 5.1** : Tabela dos valores de birrefringência de saturação de tamanho médio dos aglomerados em função do tempo da amostra de fluido magnético com células de S180



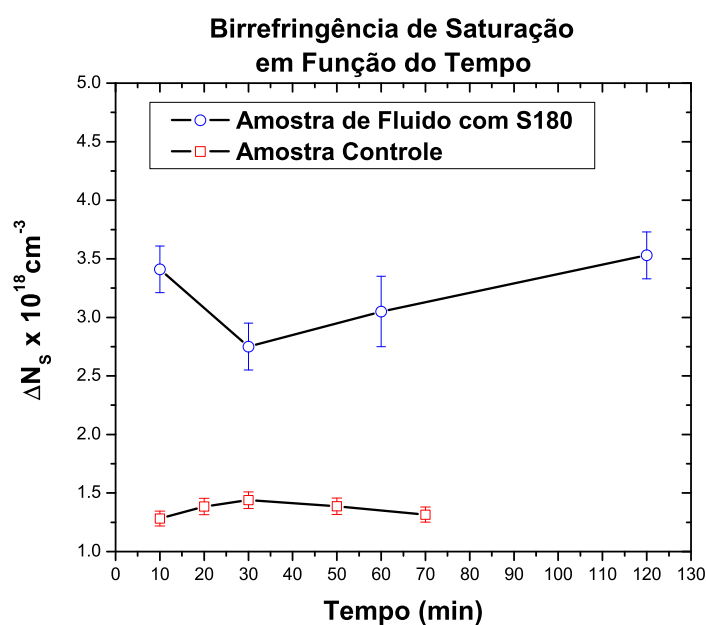
**Figura 5.17** : Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético com células S180. (a) 10min (b) 30min



**Figura 5.18** : Ajuste teórico dos dados de BME da amostra de fluido magnético com células S180. (a) 60min (b) 120min



**Figura 5.19 :** (a) Gráfico da evolução do tamanho médio dos aglomerados em relação ao tempo da amostra de fluido magnético (b) Gráfico comparativo entre os dados de BME da amostra de fluido magnético com as células de S180 e o controle



**Figura 5.20 :** Análise dos dados de BME da amostra de fluido magnético diluído em mio RPMI 1640 com células de S180 em função do tempo

Por outro lado é interessante notar que o tamanho médio do aglomerado tem um comportamento oposto quando comparado a a birrefringência de saturação. Até em trono de 30 minutos  $Q$  está crescendo e após este intervalo volta a crescer. A questão fundamental agora é entender o que os dados de BME estão nos informando sobre o processo de internalização.

Na nossa avaliação os dados parecem sugerir que nanonestruturas de tamanhos distintos são internalizadas de forma diferenciada. Para esclarecer nosso argumento, suponha um sistema constituído de dois tipos de estruturas auto-organizadas, pequenos aglomerados ( $Q_1$ ) e grandes aglomerados ( $Q_2$ ). O tamanho médio do aglomerado pode ser escrito da forma

$$\langle Q \rangle = \sum_i^2 f_{Q_i} Q_i = f_{Q_1} \times Q_1 + f_{Q_2} \times Q_2, \quad (5.52)$$

onde  $f_{Q_i}$  é a fração de aglomerados que contribuem para o sinal de BME dado por

$$f_{Q_i} = \frac{N_{Q_i}}{N_T}, \quad (5.53)$$

onde  $N_{Q_i}$  é o número de aglomerados  $Q_i$  e  $N_T$  o número total de partículas contribuindo para o sinal magneto-óptico. Além de (5.52), note que existe um vínculo no somatório dado por

$$\sum_i^2 f_{Q_i} = 1 \Rightarrow f_{Q_1} + f_{Q_2} = 1 \quad (5.54)$$

Colocando  $f_{Q_1}$  em termos de  $f_{Q_2}$  utilizando (5.54) e substituindo em (5.52), temos

$$\langle Q \rangle = Q_1 + f_{Q_2}(Q_2 - Q_1) \quad (5.55)$$

cujos comportamento está descrito de forma simplificada na figura (5.21)

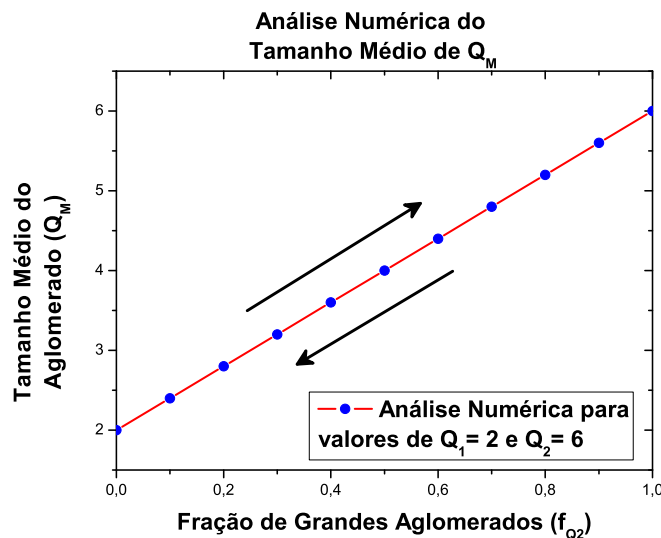


Figura 5.21 : Análise numérica de (5.55) com valores fictícios de  $Q_1 = 2$  e  $Q_2 = 6$

No nosso caso, o sistema é composto por várias estruturas (partículas anisométricas, dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc). Pensando em nanoestruturas formadas por grandes e pequenos aglomerados podemos entender nossos resultados da seguinte forma. No intervalo de 0-30 min. o número total de partículas contribuindo para o sinal de BME decai e o motivo está associado a internalização de nanopartículas pelas S180. Note que neste mesmo intervalo o tamanho médio do aglomerado aumenta. A única maneira disto acontecer é se a fração de pequenos aglomerados tiver diminuído, ou seja, nossos resultados indicam que a internalização está acontecendo preferencialmente por pequenos aglomerados. Acima de 30 min. o número de partículas contribuindo para o sinal de BME sobe. De acordo com os dados de MAV neste intervalo não há mais internalização. Lembrando também que os dados de viabilidade celular sugerem que as células continuam vivas. Neste intervalo o tamanho médio do aglomerado começa a cair. A explicação para este fato é que partículas isoladas esféricas começam a formar pequenos aglomerados, que além de aumentar o sinal de birrefringência de saturação diminuem o tamanho médio do aglomerado.

Finalmente, pode-se concluir que a técnica magneto-óptica de birrefringência magnética estática foi capaz de identificar o processo de internalização de nanopartículas magnéticas recobertas com dextrana em células de Sarcoma 180. Inclusive identificou o tipo de nanoestrutura autoorganizada (pequenos aglomerados) que é mais facilmente internalizada pela célula S180.

# Capítulo 6

## Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho investigamos o processo de internalização de nanopartículas magnéticas de magnetita, recobertas com dextrana, por células neoplásicas de Sarcoma 180 (S180), por meio das técnicas de magnetometria de amostra vibrante (MAV) e birrefringência magnética estática (BME).

As nanopartículas de magnetita recobertas com dextrana foram sintetizadas no Laboratório da Prof(a). Dra. Patricia Sartoratto do Instituto de Química da UFG e caracterizadas por microscopia eletrônica de alta resolução nos fornecendo um diâmetro modal de  $5,5 \pm 0,1$  nm e dispersidade de  $0,18 \pm 0,02$ , quando os dados de frequência, obtidos pelo método de Sturges, são ajustados por uma distribuição do tipo lognormal. A baixa dispersidade dos diâmetros provavelmente está associada ao crescimento in-situ das nanopartículas conjuntamente com a camada de cobertura.

As células tumorais de S180 foram obtidas, no Laboratório da Profa. Dra. Elisângela Lacerda do Instituto de Ciências Biológicas da UFG, segundo protocolo estabelecido pela American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). O teste de citotoxicidade, utilizando o método MTT, mostrou alta viabilidade celular comprovando que não houve morte celular significativa dentro do intervalo de tempo das medidas de BME e MAV (120 minutos).

As medidas de magnetização das células contendo nanopartículas magnéticas foram realizadas em um intervalo de tempo de exposição de até 100 minutos. As amostras que continham apenas células com nanopartículas internalizadas foram obtidas por meio de um

processo de centrifugação a  $260\times g$  por 10 minutos. Constatamos que entre 10 e 70 minutos a quantidade de nanopartículas internalizadas em unidade de massa passou de  $52 \pm 20$  pg/célula para  $110 \pm 15$  pg/célula. Em particular, os resultados experimentais de magnetização indicam que o processo de internalização satura em torno de 30 a 40 minutos. Portanto, concluímos que a técnica de MAV pode ser utilizada para determinar tanto o número de nanopartículas internalizadas como a velocidade em que as mesmas são endocitadas.

Diferentemente dos dados de magnetometria, as medidas de BME foram feitas em amostras controle (nanopartículas em meio RPMI 1640) e o sistema contendo tanto células S180 quanto nanopartículas no meio RPMI 1640. Dados foram obtidos numa larga faixa de tempo (120 min.). Inicialmente observou-se que o sinal de BME do sistema investigado decresce num intervalo de tempo (entre 30-40 minutos) e depois volta a crescer. De fato o ajuste dos dados de BME indicam que a birrefringência de saturação ( $\Delta n_s$ ) decresce nos primeiros 30 minutos e depois volta a crescer de forma suave, enquanto o tamanho médio do aglomerado possui um comportamento oposto, ou seja cresce nos primeiros 30 minutos e depois volta a decrescer. Em particular, no tempo de exposição,  $t_{exp}$ , de 10 min. o tamanho médio do aglomerado (birrefringência de saturação) variou de  $4,18 \pm 0,04$  ( $\Delta n_s = 3,41 \pm 0,02 \times 10^{18} \text{cm}^{-3}$ ) para  $5,22 \pm 0,08$  ( $\Delta n_s = 2,75 \pm 0,02 \times 10^{18} \text{cm}^{-3}$ ) em  $t_{exp}=30$  min. Como a birrefringência de saturação é proporcional ao número de nanopartículas contribuindo para o sinal magneto-óptico conclui-se que o decréscimo do sinal magneto-óptico foi decorrente do processo de internalização de nanopartículas magnéticas pelas células S180. Por sua vez, a análise da dependência temporal do tamanho médio do aglomerado também sugere que o processo de internalização ocorre primeiramente com nanopartículas anisométricas ou com nanoestruturas formando pequenos aglomerados. Portanto, concluímos que a técnica magneto-óptica pode ser utilizada para investigar o processo de internalização, sendo capaz inclusive de extrair informações sobre a estrutura autoorganizada que está sendo internalizada. Aparentemente, de acordo com nosso levantamento bibliográfico, esta é a primeira vez na literatura que uma técnica magneto-óptica é utilizada para tal fim.

O estudo da interação de nanopartículas com células parece ainda estar no início. Não existem ainda tantos trabalhos nesta área apesar deste número ter aumentado nos últimos anos. De fato é fundamental avaliar e desenvolver técnicas, preferencialmente baratas e rápidas, capazes de visualizar, por exemplo, este processo de internalização. Uma das possíveis aplicações associadas a utilização da técnica magneto-óptica é a rápida e eficiente determinação do tempo mínimo para a marcação de células por nanopartículas magnéticas, como por exemplo, marcação de células-tronco, já que estas nanoestruturas são excelentes agentes de contraste em sistemas de imageamento por ressonância magnética nuclear.

Nosso trabalho prova que as técnicas de magnetometria de amostra vibrante e, em particular, a birrefringência magnética estática pode ser utilizada para investigar o processo de internalização de nanopartículas magnéticas por células. Vislumbramos como perspectivas futuras diversos estudos com nanopartículas magnéticas de diferentes diâmetros, tipos (diversas ferritas), outras camadas de cobertura (carga superficial positiva ou negativa), diferentes quantidades de camada molecular e, obviamente, outras células (neoplásicas, células-tronco, macrófagos, etc). Estas investigações podem ajudar a esclarecer a influência de todos estes parâmetros na dinâmica de internalização.

# Bibliografia

- [1] N. Duran, L.H.C. Mattoso, and P.C. Morais. Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. Artliber, 2006.
- [2] S.E Khalafalla and G.W Reimers. US Patent 3 764 540. Technical report, USA, 1973.
- [3] C. Wang, S. Peng, R. Chan, and S.H. Sun. Synthesis of AuAg Alloy Nanoparticles from Core/Shell-Structured Ag/Au. *SMALL*, **5**, 567–570, 2009.
- [4] K. Duttaa, S.t Mannab, and S.K. De. Optical and electrical characterizations of ZnS nanoparticles embedded in conducting polymer. *Synthetic Metals*, **159**, 315–319, 2009.
- [5] J. C. Bacri, R. Perzynski, and D. Salin. Magnetic and thermal behaviour of  $\gamma - Fe_2O_3$  fine grains. *J. Magn. Magn. Mater.*, **71**, 246–254, 1988.
- [6] A.F.Bakuzis. Propriedades Magnéticas e Magneto-ópticas de Fluidos Magnéticos. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 2000.
- [7] J.W.M. Butle, T. Douglas, B. Witwer, Su-Chu Zhang, E. Strable, B.K. Lewis, H. Zywicke, B. Miller, P. van Gelderen, B.M. Moskowitz, I.D. Duncan, and J.A. Frank. Magneto-dendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nature Biotechnology*, **19**, 1141–1147, 2001.
- [8] P. L.; Tsang K. W. T.; Wang L.; Xu B. Gu, H. W.; Ho. Using biofunctional magnetic nanoparticles to capture vancomycin-resistant enterococci and other gram-positive bacteria at ultralow concentration. *J. American Chemistry Society*, **125**, 1502–1503, 2003.
- [9] K.H.; Waldoefener N.; Teichgraeber U.; Pinkernelle J.; Neumann F.; Thiesen B.; von Deimling A.; Felix R. Jordan A.; Sholz R.; Maier-Hauff K.; Frank. The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, **78**, 7–14, 2006.
- [10] R. Weissleder, K. Kelly, E. Yi Sun, T. Shtatland, and L. Josephson. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature Biotechnology*, **23**, 1418–1423, 2005.

- [11] G. StoLLa and M. Bendszus. Imaging of Inflammation in the peripheral and central nervous system by magnetic resonance imaging. *Neuroscience*, **158**, 1151–1160, 2009.
- [12] A. Ito, H. Honda, and T. Kobayashi. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of heat controlled necrosis with heat shock protein expression. *Cancer Immunol Immunother*, **55**, 320–328, 2006.
- [13] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, and J. M. DeSimone. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academic of Scienc*, **105**, 11613, 2008.
- [14] B. D. Chithrani and W. C. W. Chan. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Letters*, **7**, 1542–1550, 2007.
- [15] Huang B.; Chen P.; Huang C.; Jung S.; Ma Y.; Wu T.; Chen J.; Wei K. Bioavailability of magnetic nanoparticles to the brain. *J. Magnetism and Magnetic Materials*, **321**, 1604–1609, 2009.
- [16] Huang M.; Qiao Z.; Miao F.; Jia N.; Shen H. Biofunctional magnetic nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging of pancreas cancer. *Microchim Acta*, **167**, 27–34, 2009.
- [17] Berry C. C., Wells S., Charles S., Aitchison G., and Curtis A. S. G. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials*, **25**, 5405–5413, 2004.
- [18] J. H. Clement, M. Schwalbe, N. Buske, K. Wagner, M. Schnabelrauch, P. Gornert, K. O. Kliche, K. Pachmann, W. Weitschies, and K. Hoffken. Differential interaction of magnetic nanoparticles with tumor cells and peripheral blood cells. *Journal Cancer Res Clin Oncol*, **132**, 287–292, 2006.
- [19] Pedro Tartaj; Maria del Puerto Morales; Sabino Veintemillas-Verdaguer; Teresita Gonzalez-Carreno and Carlos J Serna. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **36**, 182–197, 2003.
- [20] P. P. C. Sartoratto and A. V. S. Neto; E. C. D. Lima; A. L. C. Rodrigues de SÃ¡; P. C. Morais. Preparation and electrical properties of oil-based magnetic fluids. *Journal Applied of Physics*, **97**, 10Q917, 2005.
- [21] R.E. Rosensweig. *Ferrohydrodynamics*. Mineola: Dover Publ. NY, 1997.
- [22] George N. Glavee; Carl F. Kernizan; Kenneth J. Klabunde; Christopher M. Sorensen and George C. Hadjapanayis. *Clusters of Immiscible Metals. Iron-Lithium Nanoscale Bimetallic*

- Particle Synthesis and Behavior under Thermal and Oxidative Treatments. *Chem. Mater.*, **3**, 967–976, 1991.
- [23] Massart R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Transactions on Magnetics*, **17**, 1247–1248, 1981.
- [24] P.C. Morais; V.K. Garg; A.C. Oliveira; L.P. Silva; R.B. Azevedo; A.M.L. Silva and E.C.D. Lima. Synthesis and characterization of size-controlled cobalt-ferrite-based ionic ferrofluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **225**, 37–40, 2001.
- [25] Anna C. S. Samia Adam J. Rondinone and Z. John Zhang. A Chemometric Approach for Predicting the Size of Magnetic Spinel Ferrite Nanoparticles from the Synthesis Conditions. *J. Phys. Chem. B*, **104**, 7919–7922, 2000.
- [26] J. A. Lopez Perez, M. A. Lopez Quintela ; J. Mira; J. Rivas, and S. W. Charles. Advances in the Preparation of Magnetic Nanoparticles by the Microemulsion Method. *J. Phys. Chem. B*, **101**, 8045–8047, 1997.
- [27] J.R. Thomas. Preparation and magnetic properties of colloidal cobalt particles. *J. Appl. Phys*, **37**, 2914–2915, 1966.
- [28] R. Aquino; F.A. Tourinho; R. Itri; M.C.F.L. e Lara and J. Depeyrot. Size control of MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in electric double layered magnetic fluid synthesis. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **252**, 23–25, 2002.
- [29] Xuebo Cao and Li Gu. Spindly cobalt ferrite nanocrystals: preparation, characterization and magnetic properties. *Nanotechnology*, **16**, 180–185, 2005.
- [30] Jian-Min Li, A. C. H. Huan, Liang Wang, You-Wei Du, and Duan Feng. Interface effects on magnetoresistance and magnetic-field-reduced Raman scattering in magnetite. *Physical Review B*, **61**, 6876–6878, 2000.
- [31] A. Halbreich, J. Roger, J.N. Pens, D. Geldwerth, M.F. Da Silva, M. Roudier, and J.C. Bacri. Biomedical application of maghemite ferrofluid. *Biochimie*, **80**, 379–390, 1998.
- [32] Arthur B. Ellis, Cynthia G. Widstrand, and Karen J. Nordell. Designing and Reporting Experiments in Chemistry Classes Using Examples from Materials Science: Illustrations of the Process and Communication of Scientific Research. *J. Chem. Educ.*, **78**, 1044, 2001.
- [33] Paul E. Laibinis Lifen Shen and T. Alan Hatton. Bilayer Surfactant Stabilized Magnetic Fluids: Synthesis and Interactions at Interfaces. *Langmuir*, **15**, 447–453, 1999.

- [34] P.G. Sobrinho Sousa M.H., J.C. Rubim and F.A. Tourinho. Biocompatible magnetic fluid precursors based on aspartic and glutamic acid modified maghemite nanostructures. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **225**, 6772, 2001.
- [35] J. Petriz J. Garcia Mercadal M., J.C. Domingo and M.A. de Madariaga. Preparation of immunoliposomes bearing poly(ethylene glycol)-coupled monoclonal antibody linked via a cleavable disulfide bond for ex vivo applications. *Biochimica et Biophysica Acta*, **18**, 299–210, 2000.
- [36] Robert S. Moldaya and Donald Mackenziea. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *Journal of Immunological Methods*, **52**, 353–367, 1982.
- [37] Carpenter EE Li SC John VT Charles J. O'Connor, Seip CT. SYNTHESIS AND REACTIVITY OF NANOPHASE FERRITES IN REVERSE MICELLAR SOLUTIONS. *Nanostructured Materials*, **12**, 65–70, 1999.
- [38] Everett Carpenterb Claudio Sangregorioc Weilie Zhoua Amar Kumbhara Jessica Simsa Charles J. O'Connor, Vladimir Kolesnichenkoa and Fabrice Agnolia. Fabrication and properties of magnetic particles with nanometer dimensions. *Synthetic Metals*, **122**, 547–557, 2001.
- [39] Candace T. Seip and Charles J. O'Connor. THE FABRICATION AND ORGANIZATION OF SELF-ASSEMBLED METALLIC NANOPARTICLES FORMED IN REVERSE MICELLES. *NanoStructured Materials*, **12**, 183–186, 1999.
- [40] E. R. Cintra, F. S. Ferreira, J. L. Santos Junior, J. C. Campello, L. M. Socolovsky, E.M. Lima, and A. F. Bakuzis. Nanoparticle agglomerates in magnetoliposomes. *Nanotechnology*, **20**, 045103, 2009.
- [41] Fernanda M. Rocha, Samantha Cristina de Pinho, Ricardo L. Zollner, and Maria Helena A. Santana. Preparation and characterization of affinity magnetoliposomes useful for the detection of antiphospholipid antibodies. *J. Magn. and Magnetic Materials*, **225**, 101–108, 2001.
- [42] L B Bangs. New developments in particle-based immunoassays: Introduction. *Pure and Applied Chemistry*, **68**, 1873–1879, 1996.
- [43] P D Rye. Sweet and sticky: Carbohydrate coated magnetic beads. *Bio-technology*, **14**, 155–157, 1996.

- [44] B. Denizot, G. Tanguya, F. Hindrea, E. Rumpa, Jean Jacques Le Jeunea, and P. Jalleta. Phosphorylcholine Coating of Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, **209**, 66–71, 1999.
- [45] D. Portet, B. Denizot, E. Rump, Jean-Jacques Lejeune, and P. Jallet. Nonpolymeric Coatings of Iron Oxide Colloids for Biological Use as Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Journal of Colloid and Interface Science*, **238**, 37–42, 2001.
- [46] Klaus Maier-Hauff Manfred Johannsen Peter Wust Jacek Nadobny Hermann Schirra Helmut Schmidt Serdar Deger Stefan Loening Wolfgang Lanksch Roland Felix Andreas Jordan, Regina Scholz. Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **225**, 118–126, 2001.
- [47] Ivo Safarik and Mirka Safarikova. Magnetic nanoparticles and biosciences. *Monatshefte fur Chemie*, **133**, 737–759, 2002.
- [48] Sabolovic D Roger J Pons JN Sestier C, Da-Silva MF. Surface modification of superparamagnetic nanoparticles (ferrofluid) studied with particle electrophoresis: Application to the specific targeting of cells. *ELECTROPHORESIS*, **19**, 1220–1226, 1998.
- [49] Kobayashi T. Shinkai M., Honda H. Preparation of fine magnetic particles and application for enzyme immobilization. *Biocatalysis*, **5**, 61–69, 1991.
- [50] W Andra, C. G. d'Ambly, R. Hergt, I. Hilge, and W. A. Kaiser. Temperature distribution as function of time around a small spherical heat source of local magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **194**, 197–203, 1999.
- [51] Peter Wust Horst Fahling Andreas Jordan, Regina Scholz and Roland Felix. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **201**, 413–419, 1999.
- [52] RK Gilchrist, R Medal, WD Shorey, RC Hanselman, JC Parrott, and CB Taylor. Selective inductive heating of lymph nodes. *Annals of surgery*, **146**, 596–606, 1957.
- [53] Paul A. Bunn Jr Daniel C.F. Chan, Dmitri B. Kirpotin. Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **122**, 374–378, 1993.

- [54] Wilfried Andra Robert Hiergeist Rudolf Hergt Werner A. Kaiser Ingrid Hilger, Katrin Fruhauf. Heating Potential of Iron Oxides for Therapeutic Purposes in Interventional Radiology. *Academic Radiology*, **9**, 198–202, 2002.
- [55] R. E. Rosensweig. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **252**, 370–374, 2002.
- [56] Watson J H L Freeman M. W., Arrot A. Magnetism in medicine. *J. App. Phys.*, **31**, 404–405, 1960.
- [57] JC Joubert. Magnetic microcomposites as vectors for bioactive agents: The state of art. *An. Quim.*, **93**, S70–S76, 1997.
- [58] S Goodwin, C Peterson, C Hoh, and C Bittner. Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCs) enhancing intra-arterial chemotherapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **194**, 132–139, 1999.
- [59] Sabino Veintemillas-Verdaguer Teresita GonzÁlez-Carreño Carlos J Serna Pedro Tartaj, Maria del Puerto Morales. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **36**, 182–197, 2003.
- [60] Kehr J Klason T-Bjelke B Muhammed M Kim DK, Zhang Y. Characterization and MRI study of surfactant-coated superparamagnetic nanoparticles administered into the rat brain. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **225**, 256–261, 2001.
- [61] Roberts HC Roberts TPL, Chuang N. Neuroimaging: do we really need new contrast agents for MRI? *European Journal of Radiology*, **34**, 166178, 2000.
- [62] Weissleder R Basilion JP Hogemann D, Josephson L. Improvement of MRI probes to allow efficient detection of gene expression. *Bioconjugate Chem.*, **11**, 941–946, 2000.
- [63] Weissleder R Josephson L, Perez JM. Magnetic nanosensors for the detection of oligonucleotide sequences. *Angew. Chem. Int.*, **40**, 3204, 2001.
- [64] Josephson L Weissleder R Hogemann D, Ntziachristos V. High throughput magnetic resonance imaging for evaluating targeted nanoparticle probes. *Bioconjugate Chem.*, **13**, 116–121, 2002.
- [65] S. Neveu; A. Bee; M. Robineau and D. Talbot. Size-Selective Chemical Synthesis of Tartrate Stabilized Cobalt Ferrite Ionic Magnetic Fluid. *Journal of Colloid and Interface Science*, **255**, 293–298, 2002.

- [66] B. Payet, D. Vincent, L. Delaunay, and G. Noyel. Influence of particle size distribution on the initial susceptibility of magnetic fluids in the Brown relaxation range. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **186**, 168–174, 1998.
- [67] J. Popplewell and L. Sakhnini. The dependence of the physical and magnetic properties of magnetic fluids on particle size. *J. Magnetism and Magnetic Materials*, **149**, 72–78, 1995.
- [68] Leandro Carlos Figueiredo. Sistemas magnéticos nanoparticulados à base de maghemita. Tese de Doutorado, IF-Universidade de Brasília, 2009.
- [69] David Servan-Schreiber. *Anticâncer*. Fontanar, 2007.
- [70] T. Mossman. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55–63, 1983.
- [71] Carvalho G. S. Mota M. e Lima N. Dias N., Nicolau A. Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. *J. Basic Microbiol.*, **39**, 103–108, 1999.
- [72] L.C. Sampaio, F. Garcia, G.R.C. Gernicchiaro, and A.Y. Takeuchi. Técnicas de Magnetometria. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, **22**, 406–410, 1999.
- [73] S. Foner. The vibrating sample magnetometer: Experiences of a volunteer (invited). *J. Appl. Phys.*, **79**, 4740–4745, 1996.
- [74] Fashen Li Tao Wang, Ying Wang. Approach to prepare magnetic  $Mn_{0.5}Fe_{2.5}O_4$  wires under an external magnetic field. *Materials Letters*, **60**, 3899–3902, 2006.
- [75] Igor E. Agranovski Sangsun Yang Mansoo Choi Igor S. Altman, Yoon-Hyung Jang. Stabilization of spinel structure during combustion synthesis of iron nanooxides. *Journal of Nanoparticle Research*, **6**, 633–637, 2004.
- [76] M. Tada, S. Hatanaka, H. Sanbonsugi, N. Matsushita, and M. Abe. Method for synthesizing ferrite nanoparticles  $\sim 30\text{nm}$  in diameter on neutral pH condition for biomedical applications. *Journal Applied of Physics*, **93**, 7566–7568, 2003.
- [77] J. Vidal-Vidal, J. Rivas, and M.A. L 'opez-Quintela. Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **288**, 44–51, 2006.
- [78] I. T. Lucas, S. Durand-Vidal, E. Dubois, J. Chevalet, and P. Turq. Surface charge density of maghemite nanoparticles: Role of electrostatics in the proton exchange. *Journal of Physical Chemistry C*, **50**, 18568, 2007.

- [79] Wotschadlo J.; liebert T.; Heinze T.; Wagner K.; Schnabelrauch M.; Dutz S.; Muller R.; Steiniger F.; Schwalbe M.; Kroll T. C.; Hoffken K.; Buske N.; Clement J. H.;. Magnetic nanoparticles coated with carboxylmethylated polysaccharide shells - Interaction with human cells. *J. Magnetism and Magnetic Materials*, **321**, 1469–1473, 2009.
- [80] M. Xu and P. J. Ridler. Linear dichroism and birefringence effects in magnetic fluids. *J. Appl. Phys.*, **82**, 326–332, 1997.
- [81] K. Butter, P.H.H Bomans, P.M. Frederik, G.J. Vroege, and A.P. Philipse. Direct observation of dipolar chains in iron ferrofluids by cryogenic electron microscopy. *Nature Materials*, **2**, 88–91, 1996.
- [82] W. F. J. Fontijn, P. J. van der Zagg, M. A. C. Devillers, and R. Metselaar. Optical and magneto-optical polar Kerr spectra of  $Fe_3O_4$  and  $Mg^{2+}$ - or  $Al^{3+}$ - substituted  $Fe_3O_4$ . *Physical Review B*, **56**, 5432, 1997.
- [83] C.F. Bohren and D.R. Huffman. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. John Wiley and Sons, 1983.