

BRUNO DE VASCONCELLOS AVERALDO HANGAI

**Encapsulamento e estudo magnético de nanopartículas de ZnFe_2O_4 embebidas em
matrizes termorrígidas**

Bruno de Vasconcellos Averaldo Hangai

Encapsulamento e estudo magnético de nanopartículas de ZnFe_2O_4 embebidas em matrizes termorrígidas

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica na área de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Zirpoli Simões

H239e	Hangai. Bruno de Vasconcellos Averaldo Encapsulamento e estudo magnético de nanopartículas de ZnFe₂O₄ embebidas em matrizes termorrígidas / Bruno de Vasconcellos Averaldo Hangai – Guaratinguetá, 2021. 118 f : il. Bibliografia: f. 109-118 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2021. Orientador: Prof. Dr. Alexandre Zirpoli Simões Coorientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Rosifini Alves Claro 1. Nanopartículas. 2. Alteração hidrotermal. 3. Microondas. I. Título CDU 537-962(043)
-------	---

BRUNO DE VASCONCELLOS AVERALDO HANGAI

**ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
“MESTRE EM ENGENHARIA MECÂNICA”**

**PROGRAMA: ENGENHARIA MECÂNICA
CURSO: MESTRADO**

APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ivonete Ávila
Coordenadora

BANCA EXAMINADORA:

Alexandre Z Simões

PROF. DR. ALEXANDRE ZIRPOLI SIMÕES

Orientador / UNESP/FEG

participou por videoconferência

Alexandre Z Simões

PROF. DR. MAURICIO ANTONIO ALGATTI

UNESP/FEG

participou por videoconferência

Alexandre Z Simões

PROF. DR. EDERSON CARLOS DE AGUIAR

UEMS

participou por videoconferência

Julho de 2021

DADOS CURRICULARES

BRUNO DE VASCONCELLOS AVERALDO HANGAI

NASCIMENTO	03/01/1993 – Guaratinguetá / SP
FILIAÇÃO	José Roberto Hangai. Fátima Aparecida de Vasconcellos Averaldo Hangai.
2014/2019	Curso de Graduação Engenharia de Materiais na Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Campus de Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista.
2019/2021	Curso de Pós-Graduação Engenharia Mecânica – Área de concentração Materiais na Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Campus de Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Processo nº: 88882.433461/2019-01.

Agradeço ao CDMF-CEPID pelo apoio na infraestrutura para execução da proposta.

RESUMO

Existe uma variedade de procedimentos clínicos para a terapia do câncer. O desenvolvimento da hipertermia magnética trouxe um impulso adicional à terapia do câncer, tornando os efeitos destes tratamentos potencializados. A hipertermia baseia-se no princípio de que temperaturas em torno de 42°C destroem células cancerosas, preservando os tecidos saudáveis circundantes. As interações biológicas entre os polímeros e o sangue foram estudadas por ensaios biológicos *in vitro*. Estudos de adsorção de proteínas, adesão de plaquetas, atividade do lactato desidrogenase (LDH) e propriedades de tromborresistência estão apresentados. Os ensaios de adsorção de proteínas na superfície dos polímeros mostraram que as redes epóxi adsorvem mais albumina do que fibrinogênio. Os resultados relacionados à adesão de plaquetas, atividade do lactato desidrogenase e propriedades de tromborresistência indicaram que as redes DGEBA/IPD e DGEBA/3DCM exibem comportamento hemocompatível. As amostras DGEBA/IPD e DGEBA/DCM apresentam boas propriedades biocompatíveis e não revelaram qualquer diminuição da viabilidade de células semelhantes a osteoblastos. Nanopartículas de ZnFe_2O_4 com estrutura tipo espinélio e comportamento levemente ferromagnético foram obtidas pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas e revestidas em matrizes termorrígidas. Os espectros de Infravermelho das cerâmicas revestidas ilustram bandas vibracionais de adsorção para o éter diglicidílico do bisfenol A (DGEBA) e alcoxissilanos. A distribuição de tamanho, das amostras revestidas, revelou um aumento na magnitude das nanopartículas, confirmando o revestimento. As propriedades magnéticas das cerâmicas revestidas, não sofreram alterações nas suas propriedades, visto que o material de revestimento não possui propriedade magnéticas. Sendo assim, acreditamos que os resultados alcançados nesta pesquisa promoveram o desenvolvimento de nanopartículas magnéticas otimizadas para hipertermia magnética. Tanto por mostrar sua viabilidade, quando testados *in vitro*, quanto por promover o conceito de ZnFe_2O_4 /matriz epóxi como um próximo passo para o aprimoramento dessa classe de cerâmicas.

PALAVRAS-CHAVE: Nanopartículas. Ferrita de zinco. Hidrotermal micro-ondas.

ABSTRACT

There are several clinical procedures for cancer therapy. The development of magnetic hyperthermia brought an additional boost to cancer therapy, making the effects of these treatments strengthened. Hyperthermia is based on the principle that temperatures around 42 °C destroy cancer cells, while preserving the surrounding healthy tissues. Biological interactions between polymers and blood were studied by *in vitro* biological assays. Studies of protein adsorption, platelet adhesion, lactate dehydrogenase (LDH) activity, and thromboresistance properties are presented. Assays of protein adsorption on the surface of polymers showed that epoxy networks adsorb more albumin than fibrinogen. Results related to platelet adhesion, lactate hydrogenase activity and thromboresistance properties indicated that DGEBA/IPD and DGEBA/3DCM networks exhibit hemocompatible behavior. DGEBA/IPD and DGEBA/DCM samples present good biocompatible properties and did not reveal any decrease in the viability of osteoblast-like cells. FTIR spectra of the coated ceramics illustrates the vibrational bands of adsorption for the diglycidyl ether of bisphenol A (DGEBA) and alcossilanes. Nanoparticles with spinel structure and weak ferromagnetic behaviour were obtained by the microwave hydrothermal assisted method and recovered in thermorigid matrices. The size distribution of the coated samples revealed an increase in the nanoparticle size, confirming the coating. The magnetic properties of the coated ceramics have not changed in their properties, since the coating material has no magnetic properties. Therefore, we believe that the results achieved in this research promoted the development of magnetic nanoparticles optimized for magnetic hyperthermia. Both for showing their viability when tested *in vitro*, and for promoting the concept of ZnFe_2O_4 /epoxy matrix as a next step for the improvement of this class of ceramics.

KEYWORDS: Nanoparticles. Zinc ferrite. Hydrothermal microwave.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dados sobre a estimativa de novos casos de câncer para o ano de 2020.....	14
Figura 2 - Diferença entre o desenvolvimento saudável de um órgão e o desenvolvimento de um agente canceroso e a infecção do órgão.	21
Figura 3 - Esquema geral da formação e desenvolvimento de um câncer.	21
Figura 4 - Diferenças entre o tumor maligno e o benigno.....	22
Figura 5 - a) Rotação de Néel b) Rotação de Brown.....	27
Figura 6 - Escala nanométrica de sistemas biológicos naturais e das nanoesferas magnéticas.	28
Figura 7 - Ilustração Esquemática de um material diamagnético quando submetido a ação de um campo magnético externo.....	31
Figura 8 - Ilustração Esquemática de um material paramagnético quando submetido a ação de um campo magnético externo.....	31
Figura 9 - Ilustração esquemática de um material ferromagnético quando submetido a ação de um campo magnético externo.....	32
Figura 10 - (a) Antiferromagnetismo. (b) Diferença entre Ferromagnetismo e Ferrimagnetismo.....	33
Figura 11 - Magnetização das nanopartículas em função do diâmetro (D_c).....	33
Figura 12 - Estrutura espinélica do $ZnFe_2O_4$	36
Figura 13 - Espectro eletromagnético.....	38
Figura 14 - Classificação dos materiais quanto à interação com micro-ondas.....	39
Figura 15 - Alinhamento de moléculas de água por irradiação de micro-ondas.	40
Figura 16 - Forno micro-ondas adaptado para a síntese de materiais cerâmicos.	41
Figura 17 - Perfil de aquecimento no método convencional e micro-ondas.	42
Figura 18 - Esquema da silanização da partícula garnet.	43
Figura 19 - Equações que representam a reação de obtenção do DGEBA.....	44
Figura 20 - Equação que representa a competição entre o bisfenol A e epícloridina, para a formação do DGEBA.	45
Figura 21 - Determinação do equivalente epóxi por meio de titulação.....	46
Figura 22 - Fotos do HAM e seus principais componentes: (a) copo de teflon. (b) reator hidrotérmico.	48
Figura 23 - Esquema de Funcionamento do sistema montado para o método hidrotermal.....	48

Figura 24 - (a) Solução resultante após centrifugação; (b) lavagem das nanopartículas; (c) secagem das nanopartículas; (d) obtenção das nanopartículas.	49
Figura 25 - Equipamento difratômetro de ânodo rotatório RIGAKU RINT2000.	53
Figura 26 - Modelo esquemático das bandas eletrônicas de condutores, semicondutores e isolantes.	61
Figura 27 - Modelos esquemáticos das recombinações envolvidas nas emissões de FL.	62
Figura 28 - Modelos representativos de semicondutores com band gap (a) direto e (b) indireto, respectivamente.	63
Figura 29 - Espectros FTIR dos polímeros epóxi: DGEBA/3DCM (azul), DGEBA/IPD (verde) e DGEBA/4MPip (vermelho).	70
Figura 30 - Curvas de DSC para o polímero DGEBA/3DCM após o programa de cura.	71
Figura 31 - Micrografias MEV das superfícies do vidro e do polímero DGEBA/IPD depois de um tempo de incubação de 180 s com o sangue: A e B - (Vidro) e (C e D) - Polímero DGEBA/IPD.	73
Figura 32 - Micrografias MEV das superfícies dos polímeros DGEBA/3DCM e DGEBA/4MPip depois de um tempo de incubação de 180 s com o sangue: (A e B) – Polímero DGEBA/3DCM e (C e D) – Polímero DGEBA/4MPip.	74
Figura 33 - Porcentagem de plaquetas aderidas na superfície dos polímeros com morfologia arredondada depois do contato com o sangue.	75
Figura 34 - Adesão de plaquetas humanas nas superfícies dos polímeros. Determinado pelo ensaio LDH.	75
Figura 35 - Formação de trombos versus tempo nas superfícies dos materiais polímeros e o vidro.	76
Figura 36 - Quantidade de HSA e HFb adsorvida para os materiais DGEBA/IPD, DGEBA/3DCM e DGEBA/4MPip.	77
Figura 37 - Nanopartículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas via hidrotermal micro-ondas com surfactante (CTAB).	79
Figura 38 - Nanopartículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas via hidrotermal micro-ondas sem adição de agente mineralizador (KOH).	80
Figura 39 - Análise da fase quantitativa de nanopartículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas via hidrotermal micro-ondas com mineralizador.	81
Figura 40 - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier da ZnFe_2O_4	83
Figura 41 - Espectroscopia Raman de nanopartículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas via hidrotermal micro-ondas.	85

Figura 42 - Isotermas de adsorção e dessorção de N ₂ de nanopartículas de ZnFe ₂ O ₄ sintetizadas via hidrotermal micro-ondas.	86
Figura 43 - UV-Visível de nanopartículas de ZnFe ₂ O ₄ sintetizadas via hidrotermal assistido por micro-ondas.	87
Figura 44 - MET de Alta Resolução de nanopartículas de ZnFe ₂ O ₄ e, inserido, mostra a imagem de difração de área selecionada de nanopartículas de ZnFe ₂ O ₄	88
Figura 45 - Distribuição do diâmetro médio das partículas.	90
Figura 46 - Partículas de ZnFe ₂ O ₄ sintetizadas a 140°C por 32 minutos usando o método hidrotérmico assistido por micro-ondas.	91
Figura 47 - Espectros de fotoluminescência à temperatura ambiente de nanopartículas de ZnFe ₂ O ₄ sintetizadas a 140°C por 32 minutos usando o método hidrotérmico assistido por micro-ondas.	92
Figura 48 - Curva M-H da nanopartícula de ZnFe ₂ O ₄ sintetizada a 140°C por 32 minutos usando o método hidrotérmico assistido por micro-ondas e, inserido, ilustra os resultados de espectroscopia paramagnética eletrônica do nanopó.	95
Figura 49 - Mecanismo para ocorrer a silanização.	99
Figura 50 - FTIR da ferrita de zinco após silanização.	100
Figura 51 - a) Cerâmica após silanização. b) Cerâmica pura.	100
Figura 52 - FEG-SEM das nanopartículas de ZnFe ₂ O ₄ silanizadas com grupos organossilano e encapsuladas em resina epóxi/amina.	102
Figura 53 - Histograma do diâmetro médio das nanopartículas de ZnFe ₂ O ₄ encapsuladas. .	102
Figura 54 - Curva M-H da nanopartícula de ZnFe ₂ O ₄ sintetizada a 140°C por 32 minutos usando o método hidrotérmico assistido por micro-ondas, após o revestimento DGEBA/IPD.	103
Figura 55 - a) Células HEK, 48 horas após a inoculação com PBS (controle negativo); (b) DMSO (controle positivo); (c) 1,0 µg / mL, (d) 10 µg / mL, e (e) 20 µg / mL de nanopartículas de ZnFe ₂ O ₄ ; Setas vermelhas indicam células HEK aderidas ao fundo da placa.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades típicas da resina epóxi DGEBA.....	46
Tabela 2 - Reagentes utilizados para a síntese se nanopartículas de ZnFe_2O_4	47
Tabela 3 - Estrutura química e características dos monômeros. (M: massa molecular, F: funcionalidade).....	50
Tabela 4 - Descrição de alguns exemplos comuns desta propriedade óptica.....	60
Tabela 5 - Resumo das principais atribuições das bandas de absorção para o DGEBA, ligado a compostos com grupos amina alifática.....	70
Tabela 6 - Temperatura de transição vítrea dos materiais determinada por DSC, após o programa de cura.	72
Tabela 7 - Parâmetros de Rede (RB = R-Bragg, Rwp = R-Perfil Ponderado, Rexp = R-esperado e GoF=Goodness-of-fit).	82
Tabela 8 - Valores medidos retirados do EPR.....	98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	CÂNCER.....	20
3.2	HIPERTEMIA MAGNÉTICA.....	24
3.3	NANOPARTÍCULAS.....	28
3.4	CÉLULAS HEK.....	29
3.5	COMPORTAMENTO MAGNÉTICO.....	30
3.6	FERRITA DE ZINCO (ZnFe_2O_4).....	34
3.7	MÉTODO HIDROTHERMAL ASSISTIDO POR MICRO-ONDAS	37
3.8	HIDROTHERMAL CONVENCIONAL VERSUS HIDROTHERMAL ASSISTIDO POR MICRO-ONDAS	41
3.9	FUNCIONALIZAÇÃO POR SILANIZAÇÃO DA NANOCERÂMICA EM MATRIZ EPOXÍDICA	42
3.10	SISTEMA EPÓXI A BASE DO ÉTER DIGLICIDÍLICO DO BISFENOL A (DGEBA) E AMINAS CICLIALIFÁTICAS.....	43
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	47
4.1	REAGENTES UTILIZADOS PARA SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS	47
4.2	SÍNTESE DA MATRIZ EPOXÍDICA DGEBA.....	49
5	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	52
5.1	DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X (DRX).....	52
5.2	REFINAMENTO DE RIETVELD	53
5.3	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....	55
5.4	ESPECTROSCOPIA DE ESPALHAMENTO RAMAN	55
5.5	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)	56
5.6	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO (BET).....	56
5.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR FEIXE DE EMISSÃO DE CAMPO	57
5.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE ALTA RESOLUÇÃO	58

5.9	MEDIDAS DE MAGNETIZAÇÃO E ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNETICA DE ELÉTRONS (EPR).....	58
5.10	LUMINESCÊNCIA	59
5.11	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	63
5.12	CARACTERIZAÇÃO MAGNÉTICA.....	64
5.13	ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO	64
5.14	ADESÃO DE PLAQUETAS	65
5.15	TROMBORRESISTÊNCIA.....	65
5.16	ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS.....	67
5.17	ESTUDO DA CITOTOXIDADE IN VITRO	67
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.1	RESULTADOS OBTIDOS DA SÍNTESE DO MATERIAL DE REVESTIMENTO	69
6.2	ESPECTROSCOPIA FT-IR E DETERMINAÇÃO POR DSC DA MATRIZ EPOXÍDICA	69
6.2.1	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	69
6.2.2	Colorimetria exploratória diferencial (DSC).....	70
6.2.3	Adesão de plaquetas e ativação	72
6.2.4	Tromborresistência	76
6.2.5	Adsorção de proteínas.....	77
6.3	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	78
6.3.1	Difratometria de Raios x	78
6.3.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	82
6.3.3	Espectroscopia de espalhamento Raman	83
6.3.4	Isotermas de adsorção	85
6.3.5	Espectroscopia de absorção no Ultravioleta-visível (UV-Vis)	86
6.3.6	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	88
6.3.7	Diâmetro médio das partículas	89
6.3.8	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	90
6.3.9	Fotoluminescência (PL)	91
6.3.10	Comportamento magnético	94
6.4	NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS POR SILANIZAÇÃO	98
6.4.1	FT-IR da nanopartícula funcionalizada	98

6.5	NANOPARTÍCULAS APÓS ENCAPSULAMENTO.....	101
6.6	CÉLULAS HEK.....	103
7	CONCLUSÃO	107
8	SUGESTÃO PARA ATIVIDADES FUTURAS	109
	REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma enfermidade muito agressiva e, muitas vezes, incontrolável, que afeta milhares de novas pessoas a cada ano. Atualmente, é uma das maiores causas de mortalidade entre os seres humanos. Apesar de todo o avanço alcançado na medicina clínica preventiva, o câncer continua sendo uma ameaça oculta, de surgimento inesperado e pronunciada. De acordo com o INCA, em 2020, as estimativas eram de 625.370 novos casos de câncer na população brasileira (Figura 1).

Figura 1 - Dados sobre a estimativa de novos casos de câncer para o ano de 2020.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	65.840	62,95	50,78	13.640	60,53	57,33	-	-	-	-	-	-
Mama feminina	-	-	-	-	-	-	66.280	61,61	43,74	19.820	78,88	45,90
Colo do útero	-	-	-	-	-	-	16.590	15,43	12,60	4.180	16,55	10,13
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	16,99	16,19	3.180	14,17	16,11	12.440	11,56	9,24	3.760	14,96	11,32
Cólon e reto	20.520	19,63	18,80	5.320	23,59	21,26	20.470	19,03	13,36	6.260	24,90	15,59
Estômago	13.360	12,81	11,37	2.430	10,85	11,23	7.870	7,34	5,95	1.920	7,71	6,61
Cavidade oral	11.180	10,69	9,25	2.040	9,03	9,19	4.010	3,71	2,66	1.040	4,00	3,21
Laringe	6.470	6,20	5,75	1.150	5,00	4,97	1.180	1,06	0,92	360	1,06	0,79
Bexiga	7.590	7,23	4,61	1.800	7,87	7,12	3.050	2,80	2,03	900	3,44	2,61
Esôfago	8.690	8,32	6,48	1.160	5,00	6,27	2.700	2,49	1,76	460	1,60	1,42
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.650	6,18	4,84	1.870	7,50	5,19
Linfoma de Hodgkin	1.590	1,52	1,33	450	1,71	1,93	1.050	0,95	0,88	430	1,35	1,04
Linfoma não Hodgkin	6.580	6,31	5,67	1.430	6,41	7,27	5.450	5,07	3,37	1.260	4,96	4,27
Glândula tireoide	1.830	1,72	1,52	1.090	4,52	1,81	11.950	11,15	8,13	4.650	18,47	8,13
Sistema nervoso central	5.870	5,61	5,22	1.150	5,07	6,27	5.220	4,85	4,17	1.440	5,69	4,55
Leucemias	5.920	5,67	5,55	1.210	5,43	5,93	4.890	4,56	3,95	1.180	4,69	4,64
Corpo do útero	-	-	-	-	-	-	6.540	6,07	5,22	1.930	7,61	6,14
Pele melanoma	4.200	4,03	2,01	790	3,36	3,40	4.250	3,94	1,78	870	3,28	2,49
Outras localizações	48.060	45,97	41,48	9.320	41,34	48,09	42.390	39,43	29,40	9.790	38,88	26,48
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	225.460	215,65	215,86	46.160	204,92	238,47	222.980	207,36	145,00	62.120	247,24	159,85
Pele não melanoma	83.770	80,12	-	20.010	88,84	-	93.160	86,65	-	19.090	75,98	-
Todas as neoplasias malignas	309.230	295,78	-	66.170	293,75	-	316.140	294,00	-	81.210	323,22	-
Todas as neoplasias malignas, corrigidas para sub-registro	387.980	371,11	-	-	-	-	297.980	277,11	-	-	-	-

*População padrão mundial (1960). / *Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2020).

Atualmente, as terapias para o tratamento de câncer consistem, de um modo geral, de cirurgia para remoção do tecido e quimio/radioterapia. Estas terapias têm uma eficácia limitada, altos níveis de citotoxicidade e vários efeitos secundários indesejados, além de serem utilizadas há mais de 40 anos. Ainda para complicar, a natureza da doença é tal que, a

menos que se destruam todas as células do câncer, as hipóteses de reincidência são elevadas e, normalmente, estão associadas a tumores mais agressivos e resistentes à terapia.

Diante desse cenário, o aperfeiçoamento das técnicas aplicadas e o desenvolvimento de novos quimioterápicos que sejam eficientes e com baixa toxicidade, faz-se fundamental. Assim como o desenvolvimento de novos processos terapêuticos que forneçam resultados eficientes e com danos mais atenuados aos pacientes. Para alcançar esse objetivo, diversas técnicas que apresentem maior especificidade para as células cancerígenas têm sido desenvolvidas nos últimos anos, dentre elas a hipertermia magnética, que se baseia no aquecimento do tecido tumoral.

A hipertermia magnética é um procedimento terapêutico que consiste no aumento da temperatura na região do corpo que esteja sendo afetada pela enfermidade, com o objetivo de causar a lise dessas células cancerosas. Esse aumento de temperatura é decorrente de um estímulo magnético fornecido às nanopartículas que, ao possuírem boa resposta magnética, aquecem e, conseqüentemente, aquecem o tecido canceroso. O aumento de temperatura requerido pela hipertermia pode ser atingido, entre outros métodos, pelo uso de nanopartículas magnéticas (NPMs), processo este conhecido com o nome de magneto-hipertermia (MHT) [2].

O desenvolvimento de técnicas de síntese dessas partículas que possuem propriedades magnéticas exclusivas elevou o patamar de sua importância. Saltou de mera especulação teórica para a condição de tratamento complementar a quimio e radioterapia. Assim, surge uma nova estratégia para as ciências biomédicas: sintetizar essas nanopartículas magnéticas biocompatíveis, que irão aquecer e destruir as células cancerígenas localizadas.

Outra grande vantagem é que a MHT aquece somente a região do tecido tumoral, poupando as regiões não afetadas. Para isso, são introduzidas NPMs no tecido doente e aplica-se um Campo Magnético Alternado (CMA), com frequência e intensidade adequadas, até que seja suficiente para aquecer as células tumorais. A temperatura ideal para isso e que deve ser mantida por tempo adequado é em torno de 42°C, temperatura a qual, normalmente, destrói o tecido tumoral [3].

Nesse panorama, as suas propriedades magnéticas exclusivas e da sua possibilidade de interagir com células biológicas, as nanopartículas magnéticas (NPMs) têm atraído grande atenção para potenciais aplicações biomédicas [4].

Para aplicações biomédicas, as propriedades magnéticas são fundamentais e, por isso, vem sendo estudada arduamente. No âmbito acadêmico, nanopartículas que satisfazem esses requisitos vem sendo investigadas e estudadas para fins biomédicos, como as cerâmicas de

ítrio, ferro e alumínio (YFeAl) que com elevado momento de saturação e com temperatura de Curie (T_c) adequada, pode ser ajustada pela variação da concentração de íons Fe e Al, adequando a T_c muito próxima à da temperatura corporal [5].

Sobre o critério de biocompatibilidade, é necessário o desenvolvimento de técnicas de revestimento que permitam as propriedades biocompatíveis requeridas para sua aplicação na MHT de modo clinicamente seguro [6]. É importante salientar que o aperfeiçoamento e o estudo do processo de síntese de nanopartículas magnéticas revestidas por polímeros são fundamentais para a obtenção de sistemas implantáveis para o tratamento de carcinomas pelo processo da MHT.

Com o avanço nos métodos de síntese de nanomateriais associado a entrega de fármacos diretamente na célula doente (Drug Delivery Systems), esses sistemas tem se tornado um ambiente fértil para desenvolver complexos formas de diagnósticos e de terapia do câncer, diminuindo os efeitos colaterais causados pela quimioterapia e radioterapia. Neste tratamento, o agente terapêutico é incorporado dentro das nanopartículas, que circulam na corrente sanguínea e são acumuladas dentro do tumor através do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (do inglês *Enhanced Permeability and Retention*, ou EPR). Para que seja possível a circulação dessas nanopartículas na corrente sanguínea por tempo suficiente no organismo, deve existir biocompatibilidade entre as nanopartículas e o corpo, ou seja, não pode ser reconhecida como “corpo estranho” e o sistema imunológico aja no sentido de atacar e prejudicar a ação dos fármacos.

O uso de polímeros epóxi biocompatíveis tem sido atrativo para revestir nanopartículas ferromagnéticas (através da dispersão polimérica) pois já foi verificado o uso desses polímeros para aços inoxidáveis que se expandem na artéria cardíaca danificada para aumentar o fluxo sanguíneo. Além do mais, sabe-se que essas formulações epoxídicas possuem excelentes propriedades adesivas em vários metais.

Para cumprir o critério da biocompatibilidade, foi escolhido como revestimento uma matriz epóxi à base do éter diglicidílico do bisfenol A (DGEBA) e como agentes de cura, três aminas ciclo-alifáticas, a fim de determinar qual a formulação mostra melhores propriedades biológicas. A utilização de diluente reativo, éter diglicidílico do butanodiol (DGEBD) nas formulações teve como objetivo diminuir a viscosidade da mistura DGEBA/aminas.

As nanopartículas revestidas com matriz epóxi não devem mudar significativamente as suas propriedades magnéticas, como a magnetização de saturação, e coercividade. A temperatura de Curie que para um material ferromagnético perde suas propriedades

magnéticas, passando a ser um material paramagnético, deve ser próxima à temperatura das células corporais.

Materiais ferromagnéticos possuem a propriedade de apresentar uma magnetização espontânea, mesmo na ausência de um campo magnético aplicado. Sendo a temperatura requerida para a MHT em torno de 42 °C, é próxima a esta temperatura que o material deve desmagnetizar, ou seja, é próxima a esta temperatura que deve ser a temperatura de Curie. Este ajuste da temperatura de Curie faz com que estas nanopartículas se tornem úteis para sua aplicação na MHT. Pois, a esta temperatura, as células cancerosas são inativadas sem prejudicar o tecido saudável.

Por fim, visto que o câncer acomete um número significativo de casos todos os anos, é de extrema importância a otimização da produção dessas nanopartículas, bem como seus processos de funcionalização e encapsulamento. A matriz que será responsável por encapsular as nanopartículas precisa garantir que as propriedades originais das nanopartículas seja mantida, ou, pelo menos, tenha mudanças mínimas, para que seja possível a aplicabilidade. Para garantir uma boa adesão entre matriz e nanopartículas, a funcionalização pode ser otimizada e avaliar dentre os testes de citotoxicidade realizados àquele que apresentar o melhor resultado com o fluido corporal. É fundamental a continuidade e a evolução dessas etapas para que sua viabilidade para a aplicação seja um desafio a ser vencido nas próximas décadas.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de formulações de materiais compostos por nanopartículas ferromagnéticas sintetizadas via rota hidrotermal assistida por micro-ondas, hospedadas em matriz epoxídica do tipo éter diglicidídico do bisfenol A (DGEBA). Tais sistemas deverão possuir propriedades magnetocalóricas e biocompatíveis para que uma de suas aplicações possa ser utilizada no tratamento do câncer através da técnica de hipertermia. Além de propriedades magnéticas e a busca pela biocompatibilidade adequada, outras propriedades podem ser exploradas, como a fotoluminescência e sua possível aplicação fotocatalítica.

Serão otimizadas tanto as composições do material ferromagnético como a composição do material polimérico, utilizando as técnicas de síntese hidrotérmica assistida por micro-ondas e de polimerização em fase heterogênea e policondensação em múltiplas etapas, respectivamente. Ambas a técnicas vêm sendo desenvolvidas em nossos laboratórios para a obtenção de nanosistemas com adequada estabilidade dimensional e propriedades de biocompatibilidade.

A finalidade específica é a obtenção de um material ferromagnético encapsulado com material termorrígido, com distribuição de tamanhos, características mecânicas, e estabilidade dimensional adequados para uma possível aplicação na terapia do câncer por magneto-hipertermia.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese da ZnFe_2O_4 utilizando a rota hidrotermal assistida por micro-ondas;
- Avaliação de propriedades físico-químicas, como as magnéticas e fotoluminescentes, das nanopartículas obtidas;
- Silanizar as cerâmicas, com alcoxissilanos, fazendo com que, através do grupo amino ativo na superfície do material, possa promover uma melhor adesão interfacial entre a superfície das nanopartículas e a matriz epóxi;
- Revestimento das nanocerâmicas com uma matriz epóxi à base do éter diglicidídico do bisfenol A (DGEBA), utilizando como agentes de cura, aminas cicloalifáticas;
- Avaliar o diâmetro médio e a morfologia das nanopartículas encapsuladas;

- Estudo de citotoxicidade das células epiteliais do rim humano embrionário (células HEK) tratadas com nanopartículas de ferrita de zinco em diversas concentrações.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER

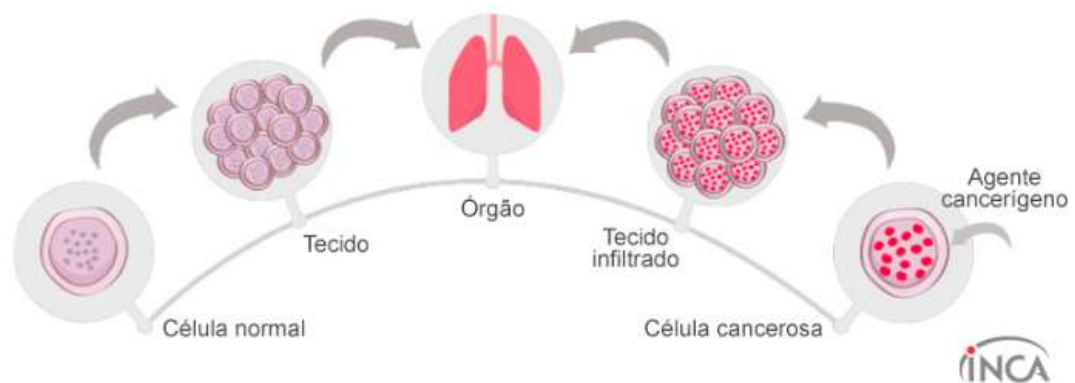
O câncer é o nome dado para um conjunto de cerca de 100 doenças que possuem em comum o crescimento desordenado de células e invadem tecidos e órgãos, podendo espalhare-se para outras regiões do corpo (metástase) [7].

Uma célula normal pode sofrer uma mutação genética, ou seja, alterações no DNA dos genes. As células cujo material genético foi alterado passam a receber instruções erradas para as suas atividades (Figura 2). Independentemente da exposição a agentes cancerígenos ou carcinógenos, as células sofrem processos de mutação espontânea, que não alteram seu desenvolvimento normal. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que, a princípio, são inativos em células normais. Quando ativados, os proto-oncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais. Essas células diferentes são denominadas cancerosas [7], Figura 3.

A multiplicação das células normais que formam os tecidos do corpo humano é um processo contínuo e natural. A maioria das células cresce, multiplica-se e morre ordenadamente, exceto algumas que nunca se dividem, como os neurônios, já as células do tecido epitelial dividem-se de forma rápida e contínua. Em determinadas circunstâncias, as células podem dividir-se sem que isto seja necessário (processo conhecido como neoplasia) e então formar uma massa de tecidos sem função biológica denominada tumor. Os tumores podem ser malignos ou benignos [8], Figura 4.

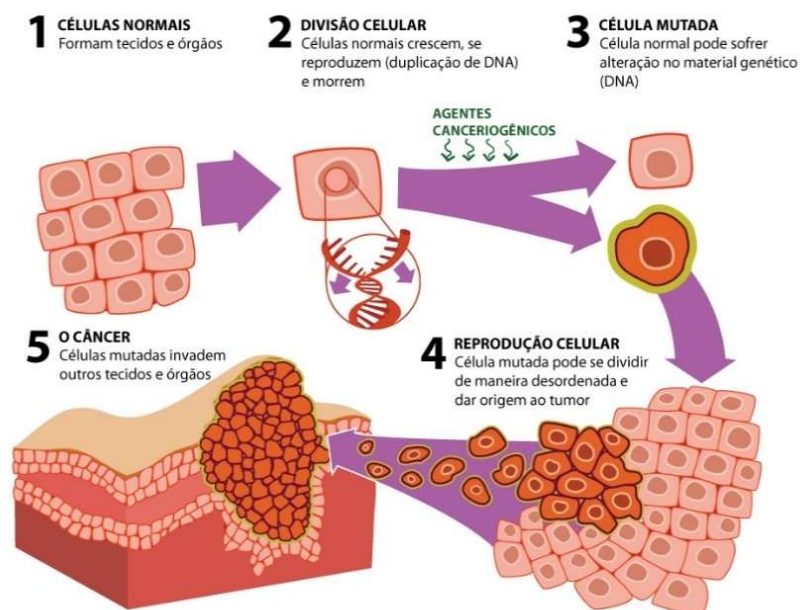
Nos tumores malignos, o crescimento é diferente. Ao invés de morrerem, elas continuam crescendo sem controle, rapidamente e de forma agressiva, gerando novas células cancerosas. Quando essas células se espalham para outras regiões do corpo, por vasos sanguíneos ou linfáticos (processo conhecido como metástase), e acarretam transtornos funcionais num organismo vivo, o câncer toma sua forma [8].

Figura 2 - Diferença entre o desenvolvimento saudável de um órgão e o desenvolvimento de um agente canceroso e a infecção do órgão.



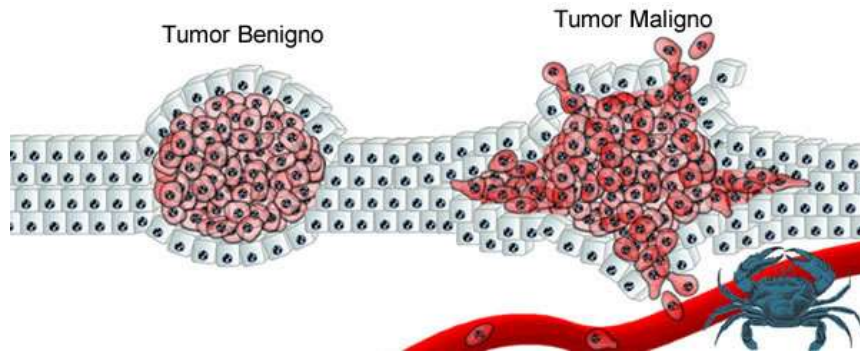
Fonte: INCA (2020).

Figura 3 - Esquema geral da formação e desenvolvimento de um câncer.



Fonte: Tua Saúde (2021)

Figura 4 - Diferenças entre o tumor maligno e o benigno.



Fonte: Medsimples (2012).

Note a diferença entre um tumor benigno, que fica restrito a uma região e o tumor maligno, que invade tecidos vizinhos e gera metástases pelo sangue e vasos linfáticos. O câncer pode surgir em qualquer órgão do corpo humano, sendo que, cada órgão pode ser mais ou menos afetado por diferentes tipos de tumores, mais ou menos agressivos. Os tumores malignos mais frequentes são os de pele, fígado, próstata, estômago, mama e útero [9].

Apesar de não serem bem conhecidos os motivos que levam uma pessoa a desenvolver câncer, é sabido que alguns fatores aumentam o risco de aparecimento da doença, que podem ser fatores ambientais (como exposição à radiação), doenças (como a hepatite) ou hábitos (como ingerir bebidas alcoólicas ou fumar). Particularmente para o caso do fígado, fatores como exposição a certos produtos químicos e ingestão de alimentos com aflatoxinas aumentam o risco de desenvolver a doença, mas os maiores riscos são a infecção crônica do fígado pelo vírus da hepatite B ou C e a cirrose hepática [10].

Os três tipos mais comuns de hepatite são a hepatite A, B e C. O vírus da hepatite A não costuma causar infecções crônicas e não está associado ao câncer de fígado. Pessoas infectadas pelo vírus B têm 100 vezes mais chance de desenvolver o câncer hepático. A hepatite viral B ou C é transmitida através de contato com sangue infectado ou outros fluidos corporais, como no contato sexual. A prevenção pode ser feita através de vacinação, no caso da hepatite B. Ainda não existe vacina para a hepatite C [11].

A cirurgia, radioterapia e quimioterapia podem ser usadas para tratar os tumores hepáticos. O tipo de tratamento selecionado para cada paciente depende de alguns fatores tais como: se o tumor está limitado ao fígado, se está limitado à área onde se iniciou ou se espalhou por todo o fígado. O tratamento cirúrgico é o que oferece a melhor chance de cura. Consiste na remoção de parte do fígado onde está localizado o tumor com uma margem de segurança tal que a parte remanescente do fígado tenha a capacidade de se regenerar, o que

ajuda na recuperação funcional do fígado. Em alguns casos existe a necessidade do transplante hepático. A quimioterapia consiste na aplicação de drogas que inibem a formação e proliferação de células tumorais. Pode ser usada pela via sistêmica (no caso de câncer primário), quando é aplicada numa veia sistêmica periférica ou central que levam a droga para o coração que bombeia para todo o organismo, inclusive o fígado. Também pode ser administrado diretamente na circulação hepática (câncer primário), colocando-se um cateter na artéria hepática através de punção percutânea auxiliada por técnicas de angiografia ou por colocação cirúrgica [10]. A radioterapia nos tumores hepáticos é limitada pela baixa tolerância do parênquima hepático à radiação. A dose tolerada fica abaixo da necessária para uma efetiva ação antitumoral e controle da lesão, mas acarreta alívio temporário de sintomatologia. É necessário avaliar os riscos de lesão do parênquima hepático normal: o que limita significativamente o emprego desta técnica [12,13]. Tanto a quimioterapia quanto a radioterapia são tratamentos agressivos, e provocam diversos efeitos colaterais. A hipertermia magnética se destaca devido a seletividade de particular interesse.

A estimativa mundial mostra que, em 2012, ocorreram 14,1 milhões (exceto câncer de pele não melanoma) de casos novos de câncer e 8,2 milhões de óbitos. Houve um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (53%) quanto na mortalidade (57%). De modo geral, as maiores taxas de incidência foram observadas nos países desenvolvidos (América do Norte, Europa Ocidental, Japão, Coreia do Sul, Austrália e Nova Zelândia). Taxas intermediárias são vistas na América do Sul e Central, no Leste Europeu e em grande parte do Sudeste Asiático (incluindo a China). As menores taxas são vistas em grande parte da África e no Sul e Oeste da Ásia (incluindo a Índia). Enquanto, nos países desenvolvidos, predominam os tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto), nos países de baixo e médio desenvolvimentos, ainda é alta a ocorrência de tipos de câncer associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado). Além disso, apesar da baixa incidência, a mortalidade representa quase 80% dos óbitos de câncer no mundo [14].

Estima-se, para o Brasil, biênio 2020-2021, a ocorrência de mais de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (mais de 170 mil casos novos), ocorrerão cerca de 450 mil casos novos de câncer [13]. Assim, é evidente a necessidade da continuidade e evolução de tratamentos que possivelmente auxiliem as técnicas tradicionais, como medida de reduzir cada vez mais essas estatísticas, embora seja algo de difícil diagnóstico prévio.

3.2 HIPERTERMIA MAGNÉTICA

A hipertermia magnética é um método relativamente novo utilizado para o tratamento de câncer. O processo consiste em inserir na corrente sanguínea partículas magnéticas, que posteriormente serão aderidas as células cancerosas. Com o aumento da temperatura por volta de 40 – 43 °C [14], as células cancerosas são destruídas, já que estas não são resistentes a mudanças bruscas de temperatura quando comparadas com as células normais circunvizinhas. Para isso, um campo magnético alternado é aplicado e essas partículas geram calor devido à perda por histerese, e o calor gerado destrói as células cancerosas. O aumento de temperatura requerido pela hipertermia pode ser atingido, entre outros métodos, pelo uso de nanopartículas magnéticas, processo este conhecido com o nome de magneto-hipertermia ou magnetotermocitólise [15-16]. Quando submetidas à ação de um campo magnético externo de frequência alternada, as nanopartículas magnéticas são aquecidas. O uso de nanopartículas magnéticas (monodomínios magnéticos) é preferível as micropartículas (multidomínios magnéticos) uma vez que nanopartículas magnéticas respondem mais eficientemente a campos externos absorvendo destes mais energia.

Geralmente, dois tipos de partículas são usados para o tratamento do câncer, a ferromagnética e a superparamagnética. Dentre esses tipos, o melhor a ser utilizado é a partícula com comportamento superparamagnético, pois a quantidade de campo magnético requerido para gerar calor é inferior quando comparado com as partículas ferromagnéticas.

Na hipertermia magnética, é utilizado um fluido (também chamado de hipertermia com fluido magnético) em que nanopartículas magnéticas estão contidas e, posteriormente, é injetado diretamente na região tumoral. O fluido magnético terá que ser biocompatível, possuir pH neutro e salinidade controlada. Para evitar ao máximo complicações durante o tratamento, as partículas devem dispersar-se uniformemente por todo o líquido e ter concentração pequena o suficiente para evitar a precipitação devido à gravidade. No caso da injeção do fluido, pode ser de forma direta, no local do tumor caso o local seja conhecido, ou intravascular. Para a injeção intravascular, o fluido é injetado em uma artéria que alimenta o tumor com sangue. Nesse caso, o local do tumor não é conhecido e por isso as nanopartículas magnéticas serão espalhadas por todo o corpo (e por isso o nível de toxicidade tem que ser baixo, bem como o momento de saturação alto para o uso de pequenas doses). O aquecimento, no entanto, pode ser localizado através da aplicação de um campo magnético externo de frequência variável apenas na região contendo os tumores.

O tratamento por radiofrequência é uma alternativa a ser usada para melhorar outros tratamentos. Quando a hipertermia foi associada com a radioterapia, ela melhorou o controle local do melanoma de 28% para 46% em 2 anos de acompanhamento; provocou aumento da remissão total do câncer recorrente de mama de 38% para 60%, aumentou o índice de remissão total do câncer avançado cervical de 57% para 82% e no glioblastoma multiforme aumentou a sobrevida de 2 anos de 15% para 31%. Com auxílio da hipertermia, é possível obter erradicação total de vários tipos de neoplasas malignas [15].

Existe uma variedade de técnicas possíveis para gerar calor na região afetada pelo câncer, são elas: irradiação do tumor com radiação eletromagnética de alta frequência (300 a 2450 MHz), de baixa frequência (0,1 a 27 MHz), ultra-som (0,3 a 3 MHz) e lasers na região do infravermelho [17]. O grande problema dessas técnicas é a falta de seletividade, ou seja, atinge tanto células cancerosas quanto células saudáveis. Justamente por isso a hipertermia magnética se destaca quando comparada as demais técnicas, devido a seletividade dos locais de ação ser o ponto forte, além da possibilidade de serem guiadas até alvos específicos por campos magnéticos externos.

O objetivo da hipertermia é a citólise da região tumoral (tecidos tumorais) por meio da hipertermia local, via aplicação de um campo magnético variável no tempo sobre monodomínios magnéticos ligados previamente a células cancerosas. É importante salientar que os efeitos de aquecimento em partículas magnéticas são devidos a perdas por relaxação de Néel ou perdas por relaxação de Brown.

As perdas por relaxação de Néel, estão associadas às inversões da magnetização de saturação (M_s) de cada partícula monodomínio em relação a seu eixo de anisotropia, podendo estas serem expressas pela equação (1),

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{KV}{k_B T}} \quad (1)$$

em que τ_N é o chamado tempo de relaxação de Néel (tempo de relaxação é o tempo médio que a partícula leva para mudar de um estado de equilíbrio para outro, revertendo assim seu momento magnético), τ_0 é uma constante com valor aproximado de 10^{-9} s, KV é a energia de barreira, K_B a constante de Boltzmann e T é a temperatura. Neste mecanismo a partícula permanece imóvel enquanto seu momento oscila entre dois estados de energia (Figura 5(a)) e

esta oscilação é responsável pelo aquecimento das nanopartículas magnéticas [18]. O detalhe dessa análise é que a relação entre o tempo de medida e o tempo de relaxação, o qual define o estado da partícula; se o tempo de medida for superior a τ_N , o sistema apresentará um caráter superparamagnético, caso contrário o resultado indicará a um sistema bloqueado (isto é, a orientação de sua magnetização não é alterada). O outro mecanismo de relaxação que pode ocorrer em partículas que estejam imersas em algum fluido e em presença de um campo magnético alternado é a relaxação de Brown. Esta se deve ao atrito dinâmico entre as nanopartículas e o meio no qual elas estão dispersas, de modo que as partículas tenderão a sofrer rotações aleatórias e também poderão ser induzidas a rotacionar devido a um campo magnético aplicado (Figura 5(b)). O resultado disto é a dissipação de calor por meio do atrito viscos entre a partícula e o meio circundante. Este fenômeno possui um tempo de relaxação dado por:

$$\tau_B = \frac{3V\eta}{K_B T}, \quad (2)$$

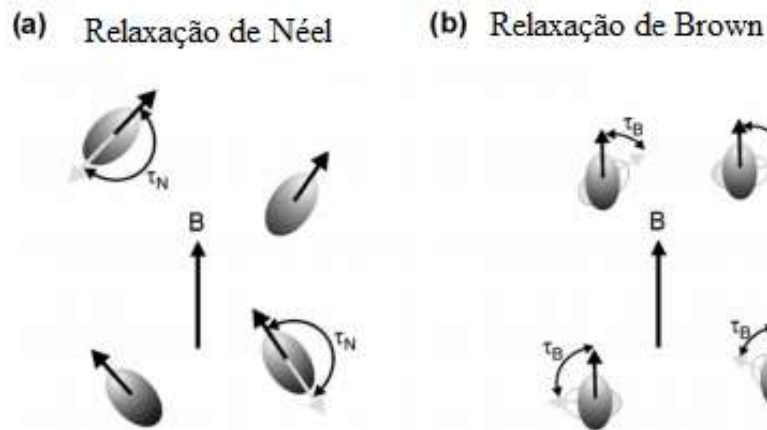
Em que η é o coeficiente de viscosidade do fluido e V é o volume hidrodinâmico da partícula [19].

Durante a aplicação de um campo magnético num ferrofluido, esses dois mecanismos podem ocorrer simultaneamente, onde um pode prevalecer sobre o outro. Isto vai depender do fluido onde as partículas se encontram e das características físicas e magnéticas das partículas. Desse modo o tempo de relaxação efetivo deve ser uma combinação desses dois efeitos, podendo ser expresso através da relação [20]:

$$\frac{1}{\tau_e} = \frac{1}{\tau_B} + \frac{1}{\tau_N}, \quad (3)$$

Onde τ_B e τ_N são a relaxação de Brown e relaxação de Néel, respectivamente.

Figura 5 - a) Rotação de Néel b) Rotação de Brown.



Fonte: Laurent et al. (2011).

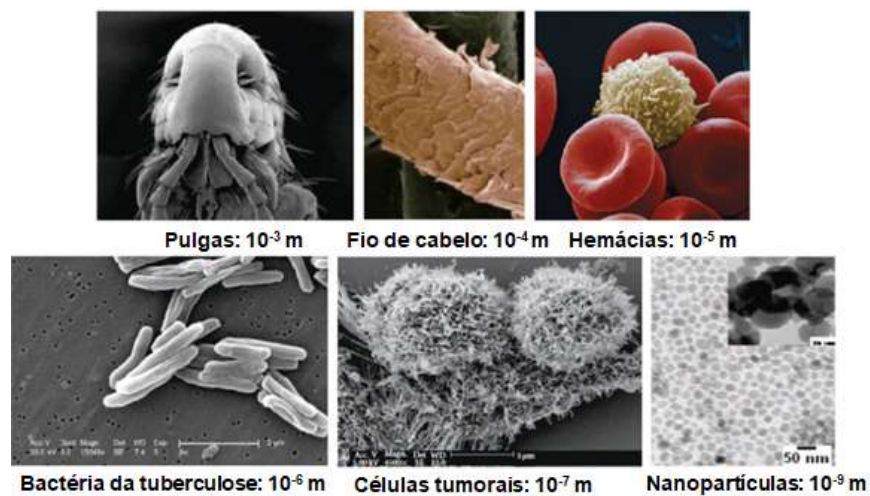
O mecanismo pelo qual a hipertermia age ainda não é completamente compreendido, porém sabe-se que as enzimas sofrem desnaturação proteica para temperaturas superiores a, aproximadamente, 41°C. As mitocôndrias têm seu funcionamento comprometido (atrapalhando o metabolismo energético), as membranas celulares têm sua estrutura comprometida e as vias metabólicas que dependem do oxigênio são perturbadas de acordo com a taxa de morbidade e mortalidade celular. A termosensibilidade das células tumorais devido ao pH relativamente baixo e o fluxo de sangue reduzido nas células tumorais são dois dentre outros motivos que tornam a técnica de hipertermia eficiente e útil quando aliada a agentes quimioterápicos ou radioterapia [4].

É interessante salientar que os estudos a cerca o tema não são tão recentes, porém o destaque dado a este tema e a importância tem aumentado exponencialmente. O início dos estudos efetivos sobre o tema foi em 1957, com a publicação do artigo de Gilchrist *et al.* [21], aplicando a hipertermia magnética no Luke's Hospital, em Chicago, Estados Unidos. O grupo utilizou nanopartículas de óxido de ferro ($\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$) com diâmetros menores que 1 μm para hipertermia em nódulos linfáticos de cães *post mortem*. Depois, em 2001, Jordan *et al.* [22] publicaram um estudo sobre o tema, em que apresentavam o primeiro sistema de terapia utilizando a hipertermia magnética para aplicação clínica. O estudo tinha como alvo específico o tratamento de glioblastoma e carcinoma de próstata. Desde então, a técnica tem se desenvolvido e avançando como uma alternativa real para o tratamento de carcinomas.

3.3 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Nano é um prefixo (de origem grega, que significa “anão”) usado na ciência para denominar um bilionésimo de metro (10^{-9} m = 1 nm). A seguir (Figura 6), uma ilustração comparativa da escala comparativa de tamanho entre os sistemas biológicos e nanopartículas sintéticas é ilustrado pelas micrografias do microscópio eletrônico de varredura.

Figura 6 - Escala nanométrica de sistemas biológicos naturais e das nanoesferas magnéticas.



Fonte: Pestana (2014).

Nanopartículas magnéticas (NPMs) são materiais nanoestruturados entre 1 e 100 nm de diâmetro que direcionam sua movimentação na presença de campo magnético. Assim, as chamadas nanopartículas possuem algumas características que os materiais na forma de “bulk” (partículas com dimensões maiores) não possuem, são algumas delas: alta capacidade catalítica, melhores taxas de sinterização, rápido tempo de resposta em dispositivos sensores, melhor condutividade, dentre outras [23]. Levando em consideração que os capilares sanguíneos hepáticos possuem diâmetro médio entre 4 e 16 micrometros [1], torna-se evidente a importância de que, para uma boa dispersão das partículas e que possam ser efetivamente utilizadas no tratamento por hipertermia, as partículas estejam em escala nanométrica. Assim, é importante que a distribuição de tamanho das partículas seja bem controlada. Com uma distribuição homogênea, o processo de conversão da energia magnética em calor é favorecido, já que proporciona uma distribuição homogênea da temperatura dentro da região tumoral.

Os nanomateriais magnéticos vêm sendo vastamente aplicados em diferentes áreas, sendo considerados materiais altamente sofisticados na área de tecnologia e com um futuro promissor no desenvolvimento de materiais biocompatíveis para uso em aplicações biomédicas. Nos últimos anos as pesquisas com materiais magnéticos se impulsionaram devido às descobertas feitas sobre estas nanopartículas magnéticas. Tais pesquisas demonstram o empenho para tentar compreender o comportamento físico-químico destes materiais, que possuem estruturas complexas e tamanhos cada vez menores. Este mesmo esforço é usado também para descobrir sobre suas interessantes propriedades químicas, elétricas, ópticas e magnéticas. [24]

Os sistemas magnéticos nanocristalinos são constituídos por nanopartículas magnéticas, sendo que estas podem se encontrar em meios sólidos (sólidos granulares) ou em meios líquidos (fluidos magnéticos ou ferrofluidos). No caso de nanopartículas dispersas em meios sólidos, estas podem estar imersas em matrizes condutoras ou isolantes, cristalinas ou amorfas. Já no caso dos ferrofluidos, as nanopartículas estão em contato com um líquido carreador de base aquosa ou oleosa, geralmente recobertas com uma camada orgânica que evita o contato entre as nanopartículas e sua decantação [25].

Esses materiais em escala nanométrica se mostram bastante promissores para diagnóstico e tratamento do câncer, seja no diagnóstico em técnicas de aumento do contraste em imagens de ressonância magnética, ou no tratamento através da hipertermia magnética. Essa tecnologia dedicada à terapia oncológica permite a detecção rápida e sensível de células malignas em estágios iniciais e seu controle de forma não invasiva [25].

O aumento de temperatura requerido pela hipertermia pode ser atingido, entre outros métodos, pelo uso dessas nanopartículas magnéticas. Quando submetidas à ação de um campo magnético externo de frequência alternada, as nanopartículas magnéticas são aquecidas. O uso de nanopartículas magnéticas é preferível, uma vez que respondem mais eficientemente a campos externos absorvendo destes mais energia [1].

3.4 CÉLULAS HEK

As células HEK são chamadas de células 293 de rim embrionárias humanas, ou, também, apenas células 293. Elas foram geradas em 1973 através de um procedimento chamado de transfecção de culturas de células de rim humano saudável com o DNA de adenovírus. Quem realizou esse procedimento foi Frank Graham e, sobre o nome dessas células é explicado da seguinte forma: o nome HEK é devido a origem ser culturas de rins

embrionários humanos e o número 293 é devido a um costume de Graham em numerar os seus experimentos. A sua aplicação é amplamente utilizada na biologia devido a sua elevada propensão para transfecção e grande confiabilidade para seu crescimento [26]. Também possui uma interessante aplicação na biotecnologia para produção de proteínas terapêuticas e vírus para terapia gênica [27-29].

Portanto, HEK é uma linha celular imortalizada de rim embrionário, que representa a morfologia epitelial e a possibilidade de formar tumores em camundongos nus. O desenvolvimento do câncer consiste na multiplicação desordenada dessas células. Sua classificação depende de como atua no corpo. No caso de tumor mais localizado, pode ser classificado como benigno e, se acometer outros órgãos e ocorrer metástase, é classificado como maligno. Os tratamentos contra o câncer, como quimioterapia e radioterapia, costumam ser invasivos, agressivos e debilitantes à saúde do paciente. Para reduzir seus efeitos colaterais e até mesmo melhorar sua eficiência, uma alternativa é combiná-los com novos tratamentos [30]. A linhagem celular HEK já foi aprovada para uso em humanos [31] e tem sido não tumorigênica em camundongos nus [32]. Esta linha celular foi subsequentemente geneticamente modificada para proteção contra as citocinas inflamatórias necessárias para induzir respostas anticâncer citotóxicas e também demonstrou recuperar rapidamente sua capacidade proliferativa e de produção de citocinas após descongelar de um estado criopreservado enquanto encapsulado em microcápsulas de alginato. Isso dá ao nosso sistema o potencial de ser uma terapêutica anticâncer útil "pronta para uso".

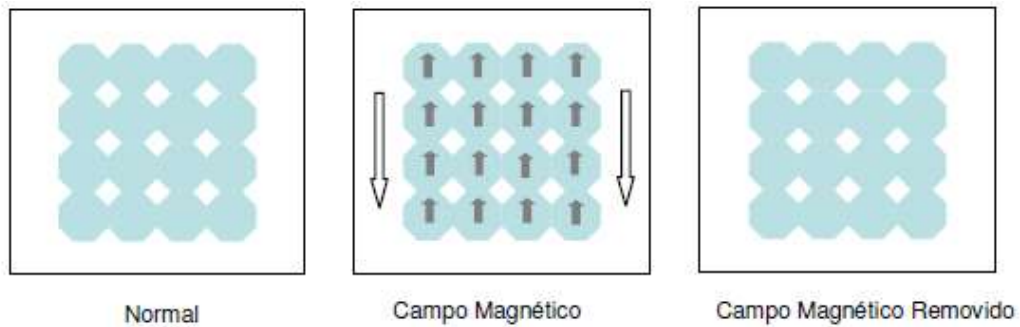
3.5 COMPORTAMENTO MAGNÉTICO

As propriedades magnéticas dos materiais estão intimamente relacionadas com os elétrons dos átomos desses materiais, que apresentam um momento magnético, sendo que este tem origem no giro do elétron em torno do núcleo do átomo e também do seu próprio eixo. Devido a isso, pode-se notar nos materiais diferentes tipos de comportamento magnético, como diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, ferrimagnetismo e antiferromagnetismo. Para melhor descrever esses comportamentos, é utilizado um importante parâmetro, a susceptibilidade magnética, que pode representar a resposta do material a aplicação de um campo magnético externo [33].

O diamagnetismo é caracterizado por uma susceptibilidade negativa. Em materiais que apresentam esse tipo de comportamento magnético, não há momento de dipolo magnético

intrínseco, sendo somente induzido na presença de um campo magnético externo, como representado na Figura 7 [34].

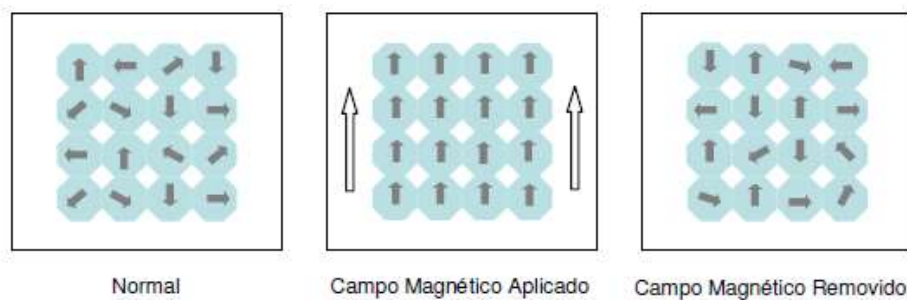
Figura 7 - Ilustração Esquemática de um material diamagnético quando submetido a ação de um campo magnético externo.



Fonte: Mozaffari, Arani e Amighian (2010).

Já os materiais paramagnéticos se caracterizam por apresentar uma susceptibilidade positiva, porém baixa. Nos materiais que apresentam esse comportamento magnético, observa-se uma disposição aleatória dos momentos de dipolo, na ausência de um campo magnético, que se alinham, porém, que se alinham com a aplicação de um campo magnético externo, na mesma direção do campo (Figura 8). Esse tipo de comportamento ocorre em alguns materiais, pelo fato de seus átomos possuírem momentos magnéticos diferentes de zero, devido a dois fatores, como o movimento magnético orbital e o momento magnético de *spin*. O primeiro está relacionado com o movimento dos elétrons em sua órbita, e o segundo associado ao *spin* desses elétrons [34].

Figura 8 - Ilustração Esquemática de um material paramagnético quando submetido a ação de um campo magnético externo.

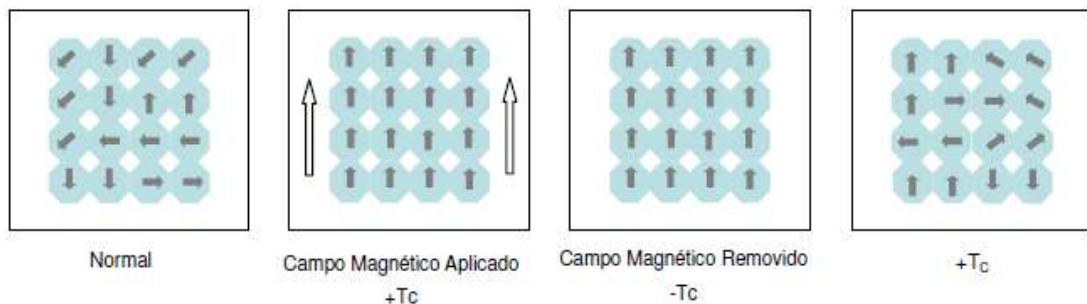


Fonte: Mozaffari, Arani e Amighian (2010).

Alguns materiais metálicos apresentam momento magnético permanente na ausência de um campo externo, sendo essas magnetizações muito grandes e permanentes. Essas são características do ferromagnetismo e são exibidas em metais de transição, como ferro, níquel e cobalto [33]. Além disso, o efeito ferromagnético é o comportamento observado na ferrita de zinco, material de estudo desse projeto, merecendo, portanto, também um destaque.

Os momentos magnéticos permanentes em matérias ferromagnéticos ocorrem devido aos *spins* dos elétrons não se cancelarem, ou seja, eles interagem com os do átomo vizinho resultando no alinhamento desses momentos de dipolo magnético, fenômeno conhecido como acoplamento de troca. Este alinhamento persistente é o que confere aos materiais ferromagnéticos seu magnetismo permanente, mesmo após a aplicação de um campo externo e após a interrupção deste (Figura 9). Existe, porém, uma temperatura, específica de cada material, em que o efeito permanente de alinhamento dos momentos de dipolo não pode mais ser observado, perdendo o seu comportamento ferromagnético. Essa temperatura é conhecida como temperatura de Curie [34].

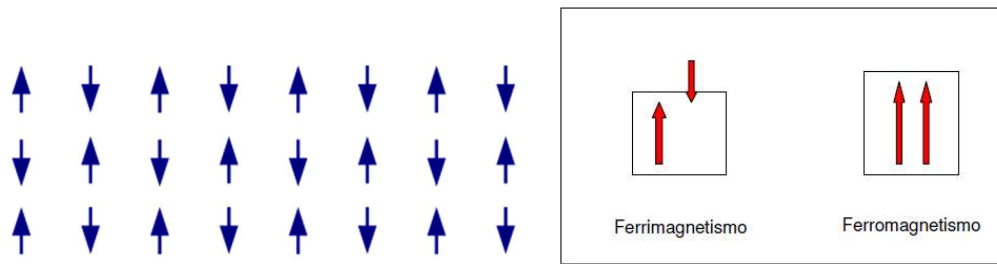
Figura 9 - Ilustração esquemática de um material ferromagnético quando submetido a ação de um campo magnético externo.



Fonte: Mozaffari, Arani e Amighian (2010).

Além desses comportamentos citados, ainda pode-se observar materiais com comportamento antiferromagnético e ferrimagnético. O primeiro, assim como o ferromagnetismo, é originado pela interação entre os *spins*, porém, com orientação em direções opostas. Já o segundo caso, o alinhamento dos momentos de dipolo ocorre de forma paralela, porém com momentos magnéticos diferentes. Os dois fenômenos podem ser observados na Figura 10 [34].

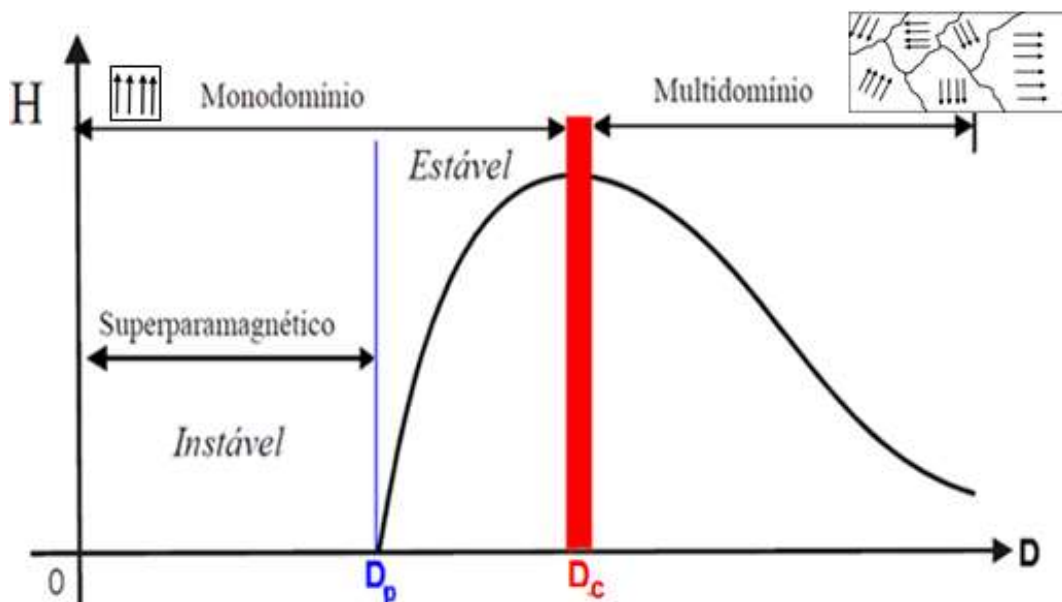
Figura 10 - (a) Antiferromagnetismo. (b) Diferença entre Ferromagnetismo e Ferrimagnetismo.



Fonte: Mozaffari, Arani e Amighian (2010).

Materiais ferromagnéticos possuem configurações multidomínios. No entanto, abaixo de um determinado diâmetro crítico (D_c), o material apresenta apenas um domínio. Nanopartículas magnéticas com diâmetro abaixo do diâmetro crítico, formam um único domínio magnético, enquanto que acima desse valor elas tendem a se dividir em múltiplos domínios na tentativa de diminuir a energia magnetostática. A Figura 11 ilustra a magnetização do material em função do D_c .

Figura 11 - Magnetização das nanopartículas em função do diâmetro (D_c).



Fonte: Cullity e Graham (2009).

3.6 FERRITA DE ZINCO (ZnFe_2O_4)

A ferrita de zinco passou a ser estudada e pesquisada com maior profundidade devido as suas propriedades magnéticas peculiares e sua aplicabilidade para a saúde, como o tratamento por hipertermia que utiliza este material na forma de nanopartículas. Porém, suas propriedades magnéticas são influenciadas pelo método de preparação, que afeta a sua estrutura [35]. A estrutura da ferrita de zinco é do tipo espinélio normal, com fórmula cristalográfica $(\text{Zn}^{+2})_A [\text{Fe}_2^{+3}]_B \text{O}_4^{-2}$, assim, torna-se necessário identificar e adaptar o tamanho das partículas para que tenha as propriedades magnéticas desejadas. Sua alta estabilidade, aquecimento por indução magnética (com temperaturas controladas em função da desnaturação proteica) e sua viabilidade celular (biocompatibilidade) são algumas características que chamam a atenção de cientistas para o estudo dessas nanopartículas [36].

A ferrita de zinco ZnFe_2O_4 trata-se de um composto que tem como formador de rede a magnetita (Fe_3O_4), em que utilizando metais do tipo M^{+2} , neste caso, o Zn^{+2} como modificador de rede forma-se a fase desejável. A presença de magnetita deve-se a sua biocompatibilidade, já que se estabiliza com a água formando uma solução coloidal. Isso permite que a nanopartícula seja transportada com segurança pelo corpo de modo que o sistema de defesa corporal não ataque a substância. Quanto aos tipos de metais mais adequados, em que apresentam magnetização satisfatória, encontra-se o Zn^{+2} e o Co^{+2} . Porém, o Co^{+2} é inviável economicamente e ainda pode ter o risco de intoxicar o corpo, assim, a atenção será para a solução sólida do Fe_3O_4 com o ZnO . [37].

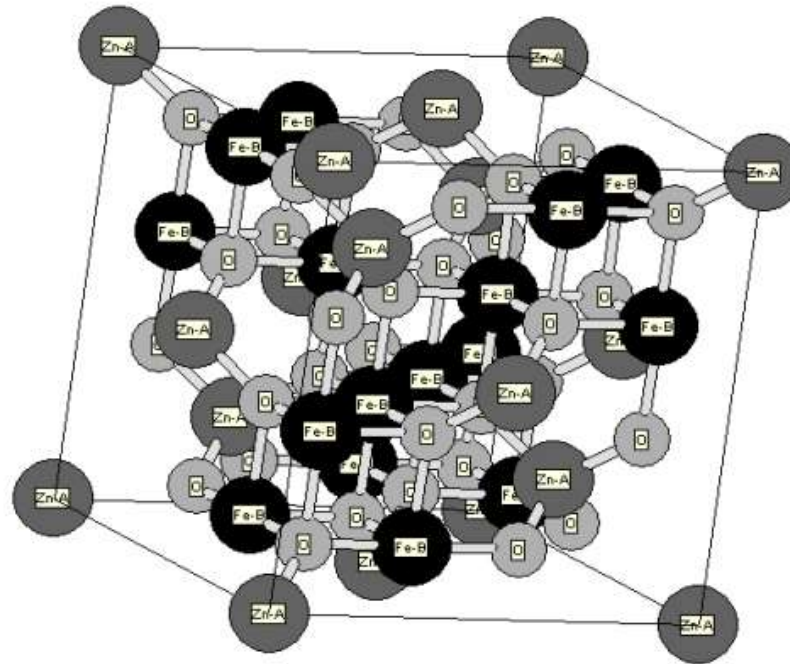
Quando se trata das propriedades magnéticas da ferrita de zinco, é importante analisar a estrutura dos domínios magnéticos, como se organizam, fatores que alteram e o que interfere na magnetização. A estrutura de espinélio normal (AB_2X_4), característica da ferrita de zinco, possui comportamento antiferromagnético, ou seja, os domínios se encontram paralelos e com sentidos opostos. Nesse caso, a distribuição catiônica esperada para a estrutura do óxido ZnFe_2O_4 (que obedecem as estruturas do tipo MFe_2O_4) é da seguinte forma: $(\text{Zn}_{0.67} \text{Fe}_{0.33})[\text{Zn}_{0.33} \text{Fe}_{1.67}]\text{O}_4$ [38]. O caráter antiferromagnético deixa de existir no momento em que os sítios ocupados pelos cátions Zn^{+2} e Fe^{+3} sejam rearranjados de forma que ambos os cátions ocupem de forma aleatória os sítios tetraédricos (normalmente ocupado pelo Zn^{+2} , “A”) e octaédricos (normalmente ocupado pelo Fe^{+3} , “B”), processo em que ocorre uma inversão estrutural. Assim, quando as interações entre A-B diminuem, na forma de “bulk” e em temperatura ambiente, a ferrita de zinco terá magnetização do tipo paramagnética, porém, quando em nanopartículas, ocorre essa inversão estrutural, resultando em um comportamento

ferromagnético. Agora, percebe-se uma influência direta entre a magnetização com a temperatura e tamanho da partícula. [39].

Sabendo qual é a estrutura ótima para uma magnetização desejável, é importante saber a influência da temperatura e do tamanho do grão nas propriedades finais do composto na forma de bulk. Quando o material se encontra na forma macroscópica, o tamanho de grão é maior, o que permite que os domínios se organizem paralelamente e com sentidos contrários, anulando-se e dando a característica antiferromagnética. Porém, quando em nanopartículas, o tamanho de grão é menor, dando menos liberdade de movimentação dos domínios, o que torna a magnetização do composto com comportamento ferromagnético. Para a temperatura, dois limites devem ser obedecidos para que tenham a magnetização desejada. Primeiramente, a temperatura deve ser acima de 10K (chamada de temperatura de Néel, em que abaixo dessa temperatura limite o composto tem característica antiferromagnética) [40] e deve atingir o limite superior que é adotado como a temperatura de Curie do material, pois como a temperatura ideal para atingir no interior do corpo é em torno de 40°C – 43°C, a temperatura de Curie é um valor menor e por isso adotada como limite superior. O controle da temperatura será dado pela auto-limitação do próprio composto, pois como o valor de temperatura a atingir é menor do que a temperatura de Curie, tem-se esse sistema de defesa, similar a função de um fusível [41].

Tendo em vista esses aspectos, a ferrita de zinco será utilizada na forma de nanopartículas, controlando a temperatura. A justificativa para a escolha de nanopartículas deve-se a seguinte proporção: quanto menor a partícula, maior o grau de inversão, proporcionando o comportamento ferromagnético desejado [42]. Como a temperatura de Curie para este nanomaterial dopado é baixa, será usada como limite, assim, permite uma interação de forma efetiva quando submetida a campo magnético externo e não causa desconforto biológico, sendo um material ideal para a aplicação da hipertermia magnética para o tratamento do hepatocarcinoma.

Figura 12 - Estrutura espinélica do ZnFe_2O_4 .



Fonte: Mathew e Juang (2007)

Devido às elevadas expectativas com relação a aplicabilidade da ferrita de zinco na área biomédica e em outras áreas, como biosensores [43] e fotocatalise [44], existe uma grande gama de estudos com relação ao seu método de síntese. Por exemplo, Sabale *et al.* [45] utiliza a síntese pelo método poliol, sintetizando diversas combinações de ferritas, como a ferrita de zinco, de níquel, de cobalto e manganês, com tamanho de partículas em torno de 4 a 10 nm e magnetização de saturação em torno de 17,49 emu/g (ferrita de níquel) e 51,99 emu/g (ferrita de manganês). Bini *et al.* utilizou o método de combustão assistida por micro-ondas [46] em que a ferrita de zinco foi dopada e realizada sua análise estrutural. De acordo com os dados mostrados, diversos dopantes foram utilizados para avaliar suas propriedades físicas e morfológicas, obtendo o tamanho do cristalito tanto para a ferrita pura quanto para ferrita dopada variável entre 40 e 4,5-8 nm, com magnetização de saturação entre 1,6 e 13,4 emu/g, variando de acordo com a composição (se há ou não presença de dopantes) e com campo magnético aplicado. Seyfoori *et al.* utilizou o método químico por co-precipitação [47]. De acordo com o este último experimento, o tamanho médio de cristalito obtido foi entre 45,76-81,38 nm (com o nanocompósito HAp e com a fase cristalina escolhida no plano (002)). e 60,02-63,05 nm (com o nanocompósito HAp e com a fase cristalina escolhida no plano (311)). Embora existam ainda outros métodos de síntese para a ferrita de zinco, a rota

hidrotermal assistida por micro-ondas oferece tempo e temperatura menores de síntese, o que torna o método viável para reprodução e com custos mais reduzidos.

A hipertermia magnética é uma inovação que resolve a questão da magnetização do material ao aplicar um campo externo (que depende da amplitude e frequência do campo aplicado, bem como tamanho, forma, distribuição e cristalinidade da partícula); do controle da temperatura, já que temperaturas superiores a 42°C podem provocar avarias no corpo (como bolhas, queimaduras e desconforto) além da preocupação com a temperatura de Curie (T_c), pois para uma temperatura acima da T_c o material se comporta como paramagnético (reduzindo a perda de calor devido a falta de histerese) e para um T_c abaixo, a magnetização é espontânea (tendo perdas de calor) – ou seja, a temperatura de Curie age como um limite máximo de temperatura a ser atingida; da biocompatibilidade, para evitar que as nanopartículas sejam fagocitadas ou outra reação imunológica, além da preocupação com a polaridade em relação ao fluido corporal (sangue) para o transporte dessas nanopartículas na corrente sanguínea e a eficiência do nanomaterial; e, por fim, do tamanho das partículas, que no caso, interfere na magnetização da ferrita de zinco [42].

É importante salientar que esse composto já foi utilizado para auxiliar no tratamento de alguns adenocarcinomas, como o mamário (utilizando camundongos) [48], prostático [49], ovariano [50], entre outros. Isso demonstra que seu potencial para tratamentos de adenocarcinomas é bem elevado.

3.7 MÉTODO HIDROTERMAL ASSISTIDO POR MICRO-ONDAS

O método hidrotermal convencional e o assistido por micro-ondas são os únicos métodos capazes de obter materiais de considerável complexidade (como, por exemplo, diferentes tamanhos e formas) na escala manométrica e em baixas temperaturas. Estes métodos economizam energia e são ambientalmente favoráveis, uma vez que as reações ocorrem em ambientes isolados.

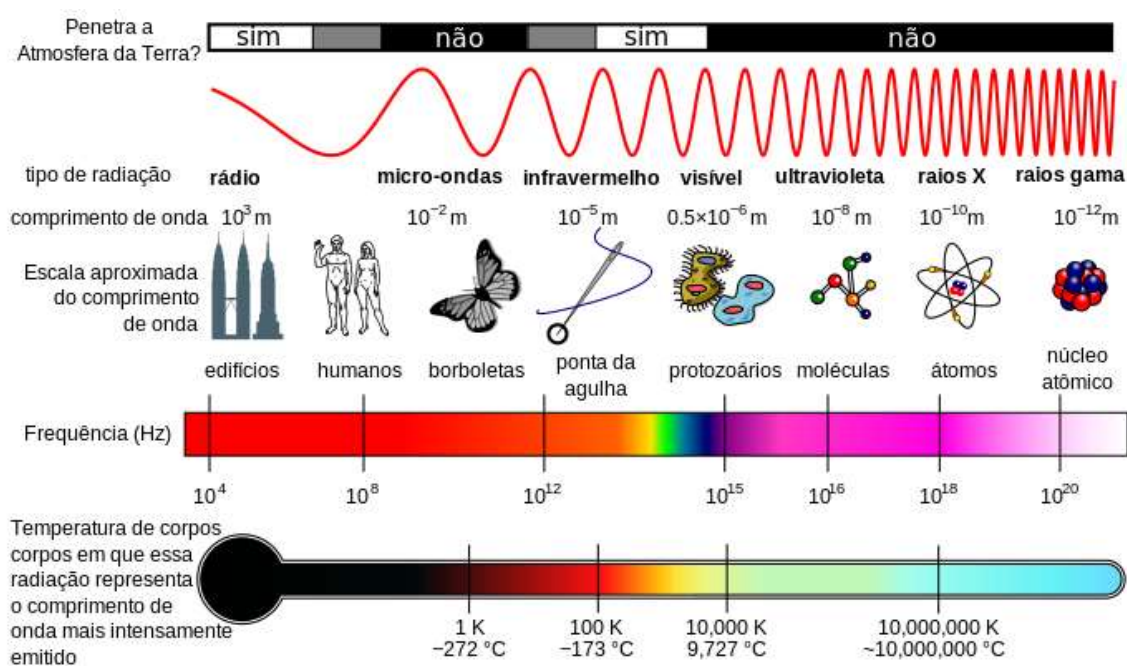
Em contraste com o método convencional, que requer longos tempos de síntese (o processo pode levar várias horas) e elevadas potências (mais de mil Watts), o aquecimento assistido por micro-ondas é uma técnica eficiente em sintetizar materiais em curtos períodos de tempo (geralmente minutos) e com menor consumo de energia (centenas de Watts) como consequência direta da uniformidade de aquecimento [52].

O processo assistido por micro-ondas atrai grande atenção por promover maior taxa de síntese quando comparado ao método convencional. De fato, como as micro-ondas podem

penetrar o material e fornecer energia, o calor é gerado por todo o volume, resultando em aquecimento volumétrico. A habilidade de elevar a temperatura da reação acima do ponto de ebulição do solvente aumenta a taxa de reação por um fator entre 10 e 1000. Isso permite que as reações sejam completadas em minutos ou até segundos [51].

As micro-ondas apresentam radiação eletromagnética com valores de frequência entre 0,3 e 300 GHz e comprimento de onda entre 1 mm e 1 m, valores intermediários ao de ondas de rádio e infravermelho (Figura 13).

Figura 13 - Espectro eletromagnético.



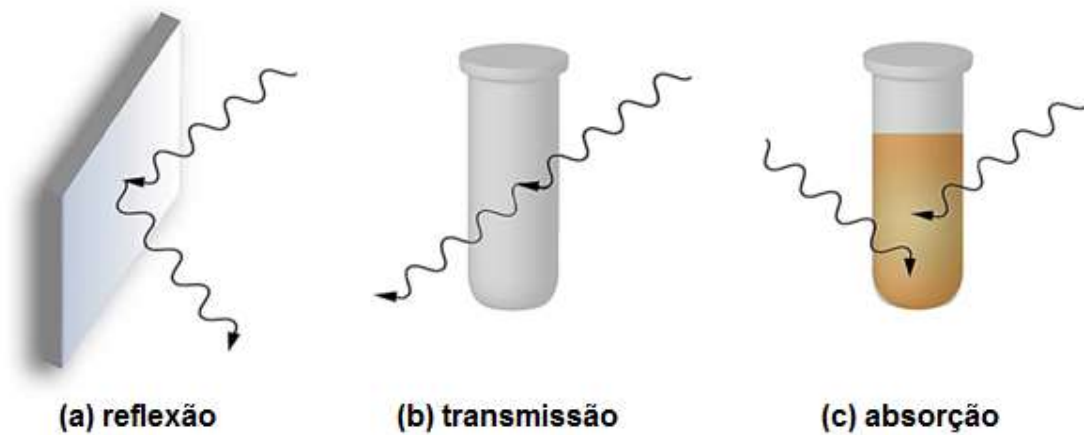
Fonte: Silva (2020).

As micro-ondas são usadas principalmente para a transmissão de informação e transmissão de energia. A frequência de operação de fornos micro-ondas é de 2,45 GHz. Nesta frequência, as oscilações ocorrem $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo. Consequentemente, moléculas submetidas a esta radiação agitam-se fortemente enquanto alinham e desalinham com as oscilações, criando um intenso aquecimento interno [51].

O aquecimento por micro-ondas é baseado na habilidade dos materiais de absorver e transformar energia eletromagnética em calor. Os materiais podem ser classificados em diferentes categorias, com respeito à sua interação com micro-ondas: refletores, transmissores e absorvedores (Figura 14). Os refletores, como os metais, não são aquecidos pelas micro-ondas. Os materiais transmissores permitem que a radiação passe pelo seu volume sem

absorvê-la, gerar calor ou perder energia. O Teflon é um exemplo de material transmissor, sendo por este motivo utilizado em autoclaves e recipientes nos quais as reações químicas e sínteses acontecem em fornos micro-ondas. Os absorvedores, por sua vez, são os materiais que absorvem a radiação eletromagnética das micro-ondas, gerando calor [51].

Figura 14 - Classificação dos materiais quanto à interação com micro-ondas.



Fonte: Sousa (2015).

A componente elétrica de um campo eletromagnético gera calor por dois mecanismos: polarização dipolar e condução iônica. A irradiação da amostra resulta no alinhamento dos dipolos ou íons ao campo elétrico aplicado. Conforme o campo oscila, os dipolos tentam se realinhar ao campo e, neste processo, há liberação de energia na forma de calor através da fricção molecular e perdas dielétricas. Assim, espécies presentes na mistura que possuam um dipolo permanente, como o H_2O , são aquecidas pela radiação das micro-ondas (Figura 15) [54].

Figura 15 - Alinhamento de moléculas de água por irradiação de micro-ondas.



Fonte: Souza (2011).

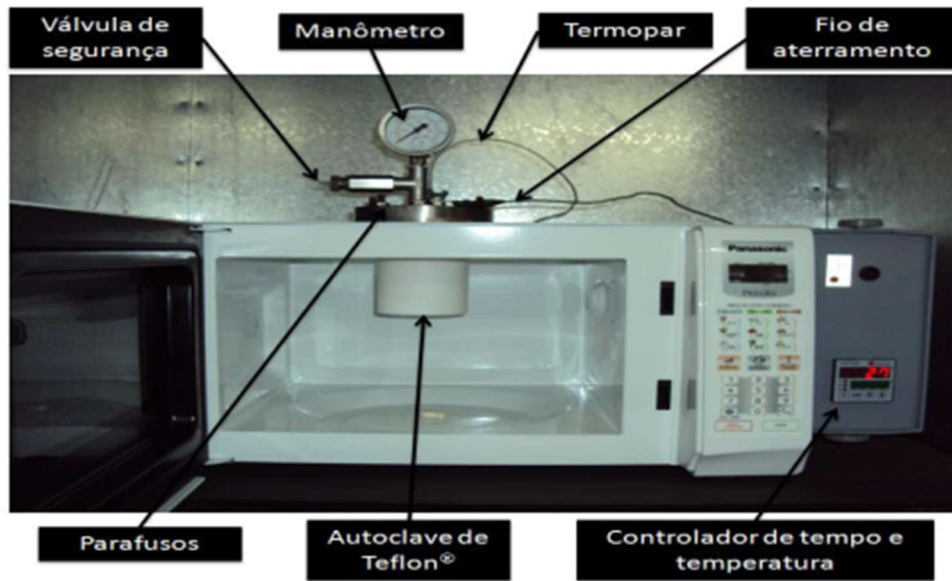
A capacidade de uma substância em converter energia eletromagnética em calor em uma determinada frequência e temperatura é dada pelo fator de perda ($\tan \delta$).

$$\tan \delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} \quad (4)$$

Onde ε'' é a perda dielétrica, indicativo da eficiência com a qual a radiação eletromagnética é convertida em calor, e ε' é a constante dielétrica, que descreve a habilidade das moléculas de serem polarizadas pelo campo elétrico. Logo, quanto maior o valor de $\tan \delta$, mais eficiente é a absorção da energia e mais rápido é o aquecimento [51].

A Figura 16 mostra o equipamento utilizado para síntese de materiais cerâmicos pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas.

Figura 16 - Forno micro-ondas adaptado para a síntese de materiais cerâmicos.

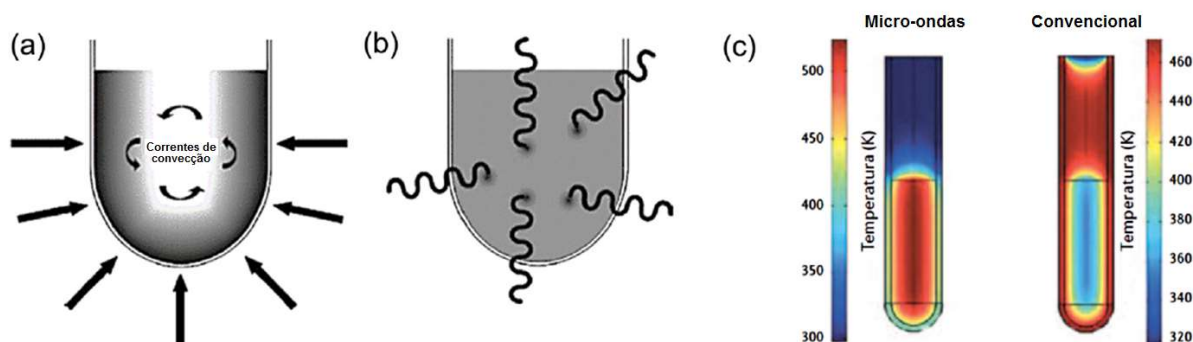


Fonte: Souza (2011).

3.8 HIDROTERMAL CONVENCIONAL VERSUS HIDROTERMAL ASSISTIDO POR MICRO-ONDAS

Tradicionalmente, a síntese de óxidos metálicos é efetuada por aquecimento condutivo por meio de fontes externas de calor. Este é um método lento e ineficiente de transferir energia para o sistema, uma vez que depende de correntes de convecção e da condutividade térmica dos vários materiais presentes na mistura. Isso faz com que muitas vezes a temperatura do recipiente seja maior que a da solução. Ademais, um gradiente de temperatura pode ser desenvolvido dentro da amostra e um superaquecimento local pode levar à decomposição de produtos, substratos ou reagentes, além de causar propriedades não uniformes no produto sintetizado [51]. Em contraste, a irradiação por micro-ondas produz aquecimento interno eficiente, devido à interação direta entre a sua energia eletromagnética e as moléculas presentes na solução (Figura 17).

Figura 17 - Perfil de aquecimento no método convencional e micro-ondas.



Fonte: Sousa (2015).

A irradiação por micro-ondas, portanto, eleva a temperatura de todo o volume simultaneamente (aquecimento volumétrico), enquanto no aquecimento convencional o recipiente é aquecido primeiro (Figura 17c). No caso de aquecimento por micro-ondas, o recipiente não absorve energia nessa frequência, permitindo a passagem da radiação sem obstáculos.

Por fim, pode-se citar como vantagens da síntese pelo método hidrotermal por micro-ondas: aquecimento volumétrico rápido, elevada taxa de síntese, seletividade, ser ambientalmente amigável, elevada eficiência e bom controle da composição, estrutura, distribuição de tamanho e morfologia. Assim, a tecnologia de aquecimento por micro-ondas emerge como uma fonte de síntese rápida, possibilitando a obtenção de nanoestruturas em minutos, ao invés das horas e até mesmo dias geralmente necessários para o método convencional [51,52,53].

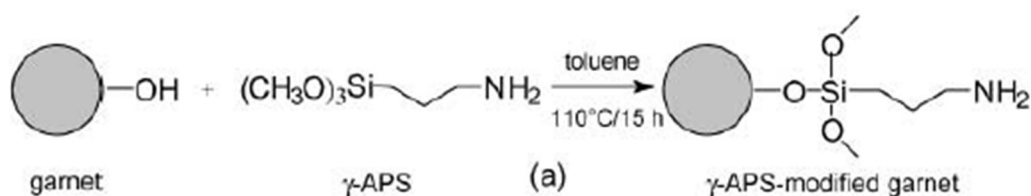
3.9 FUNCIONALIZAÇÃO POR SILANIZAÇÃO DA NANOCERÂMICA EM MATRIZ EPOXÍDICA

A utilização de polímeros a base de resina epoxídica do tipo éter diglicidílico do bisfenol A com aminas alifáticas como agentes de cura para o encapsulamento das partículas demanda e estimula o desenvolvimento de novas metodologias que estabeleçam a relação estrutura e propriedade, fator importante para a aplicação adequada destes sistemas em projetos específicos, como os solicitados para a utilização no tratamento do câncer por magneto-hipertermia. Os polímeros epoxídicos são os mais importantes e versáteis polímeros

termorrígidos usados na atualidade. Isto é devido à grande reatividade do anel epóxi na sua estrutura, o qual pode sofrer uma abertura e posterior reticulação da resina com um considerável número de compostos químicos, tais como aminas alifáticas e aromáticas, anidridos de ácido e poliamidas, etc. Os agentes de cura mais comumente utilizados são as aminas, em parte, devido ao excelente desempenho e facilidade de manuseio [55]. Com o objetivo de sucesso no encapsulamento, algumas técnicas são utilizadas para aumentar a interação do polímero com o substrato. A adesão pode ser feita por adsorção física, ligação química, bloqueio mecânico, difusão e adesão eletrônica. No caso da ligação química, é utilizado um agente funcionalizante para provocar a interação entre as superfícies [55].

A silanização é um processo que com um agente silanizante forma-se um sistema de ligações covalentes, fortes e duráveis. Os silanos possuem uma estrutura comum $R-Si(OR')_3$ onde R é o grupo que reage com o substrato e R' é geralmente um radical metila ou etil. Um exemplo dessa reação é o acoplamento do 3-aminopropil trimetoxisilano na superfície de partículas do tipo *garnet* demonstrado na Figura 18 [56-57].

Figura 18 - Esquema da silanização da partícula garnet.



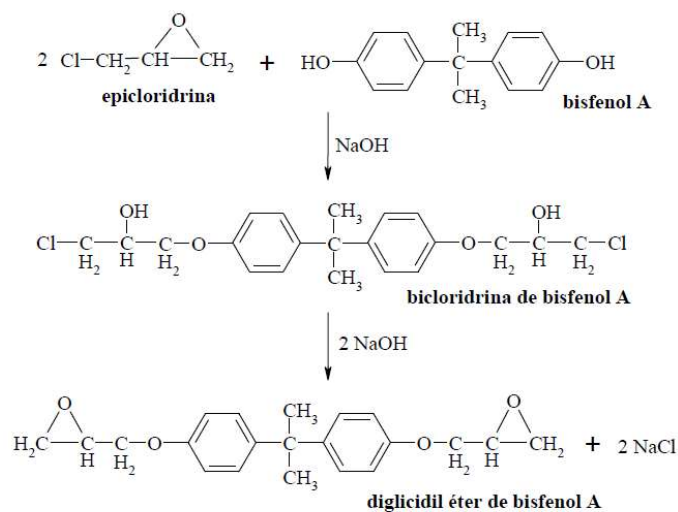
Fonte: Silva (2020) e Sousa (2015).

3.10 SISTEMAS EPÓXI A BASE DO ÉTER DIGLICIDÍLICO DO BISFENOL A (DGEBA) E AMINAS CICLOALIFÁTICAS

O composto químico mais comum utilizado para sintetizar o oligômero epóxi é o bisfenol A (2,2-bis (2,3-epoxipropofenil)-propano), que reagem com a epiclorigrina (2,3-epoxi-1-cloropropano), na presença de hidróxido de sódio como catalisador, para produzir éter diglicidílico do bisfenol (DGEBA).

Para a produção do DGEBA, dois moles de epiclorigrina reagem com uma solução básica de bisfenol A, representadas nas equações da Figura 19.

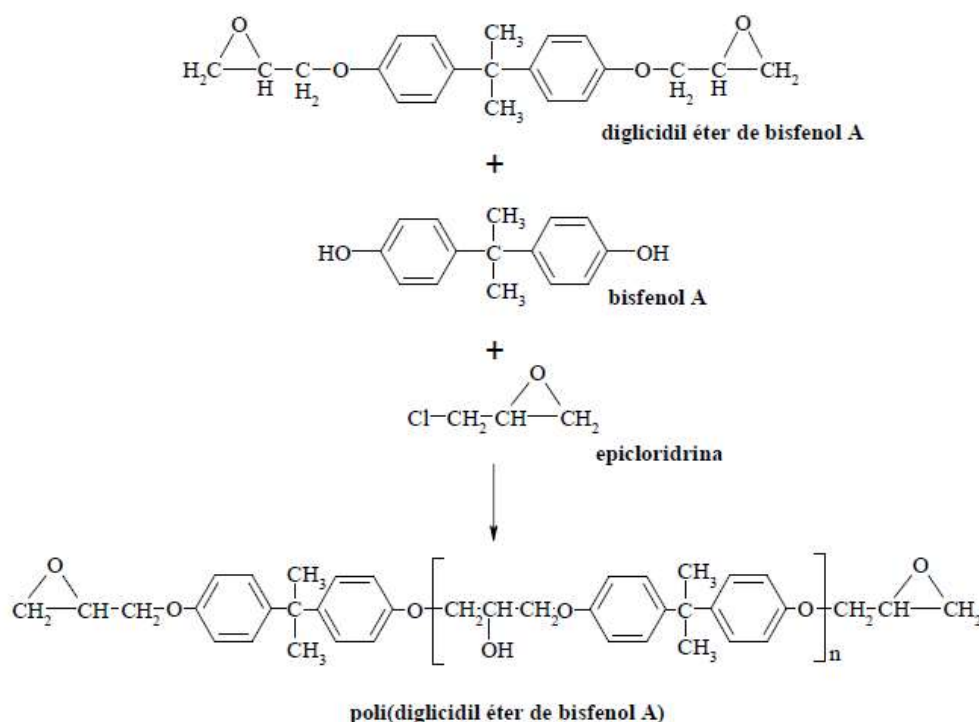
Figura 19 - Equações que representam a reação de obtenção do DGEBA.



Fonte: UGLEA (1998).

À primeira vista, a reação mostra ser em duas etapas: na primeira utilizando hidróxido de sódio como catalisador e, a segunda, utilizando hidróxido de sódio como reagente. Porém, a prática adotada industrialmente para produzir oligômeros sólidos e líquidos é utilizar um alto excesso de epicloridrina. Sob estas condições, a epicloridrina e o diglicidil éter de bisfenol A competem entre si para reagir com bisfenol A não consumido. Como consequência, macromoléculas de bisfenol A são sempre produzidas, representada na Figura 20.

Figura 20 - Equação que representa a competição entre o bisfenol A e epicloridrina, para a formação do DGEBA.



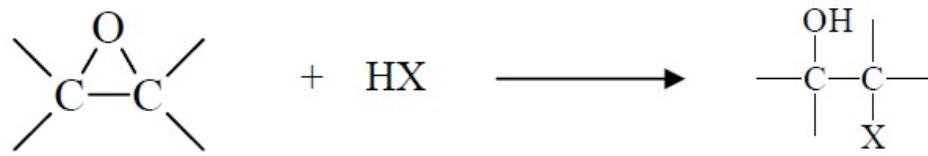
Fonte: UGLEA (1998).

Os valores de n nas resinas comuns no mercado podem variar em valores que vão desde 0,03 até 10. A temperatura ambiente os monómeros são sólidos cristalinos para valores de n próximos de zero, líquidos para $n = 0,5$ e sólidos amorfos com uma temperatura de transição vítrea, T_g entre 40 e 90° para valores de n maiores.

As resinas epóxi são caracterizadas pela sua viscosidade, ponto de fusão, cor, número de hidroxilas, porcentagem de insaturação, distribuição de peso molecular e outros, por meio de procedimentos padronizados [58].

No caso de resinas líquidas, a viscosidade merece atenção especial, pois é dependente da temperatura, e a alteração em poucos graus pode produzir diferenças significativas nas características de processamento. A quantidade de grupos epóxi é relatada em termos de “equivalente epóxi” ou o “peso equivalente epóxi” e é definida como o peso da resina em gramas que contêm um equivalente grama de epóxi. Esse parâmetro é utilizado no cálculo da proporção de agente de cura necessário, e pode ser determinado por análise de infravermelho ou por titulação com um grupo HX (Figura 21). A Tabela 1 mostra algumas propriedades típicas da resina epóxi DGEBA.

Figura 21 - Determinação do equivalente epóxi por meio de titulação.



Fonte: UGLEA (1998).

Tabela 1 - Propriedades típicas da resina epóxi DGEBA.

Peso Molecular médio (Mw)	Equivalente Epóxi (EEW)	Faixa de Viscosidade(mPa.s) 25°C
340	172-178	4000-6000
350	178-186	6500-9500
370	186-192	11000-15000

Fonte: Gonzales (2007).

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES UTILIZADOS PARA SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS

Os reagentes utilizados nas partes experimentais, bem como os respectivos fornecedores e graus de pureza de cada precursor estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Reagentes utilizados para a síntese se nanopartículas de ZnFe_2O_4 .

Reagentes	Grau de Pureza (%)	Fornecedor	Fórmula
Citrato de Amônio e Ferro III	99,5	Vetec	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$
Acetato de zinco dihidratado	99,9	Merck	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_6\text{Zn}$
Hidróxido de Potássio	99,8	Merck	KOH
Brometo de Cetrimônio	99,6	Sigma- Aldrich	$\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$

Fonte: Autoria própria.

Para dar início ao processo de síntese das nanopartículas, fez-se primeiro o cálculo estequiométrico visando conhecer a quantidade dos reagentes iniciais para o preparo da solução. Assim, pesou-se os reagentes iniciais em quantidade adequada para preparar 2,0g de ZnFe_2O_4 . Os reagentes usados foram citrato de amônio e ferro III ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$) e acetato de zinco dihidratado ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), e como solvente foi utilizado água. O meio reacional foi básico, através da adição de KOH, para manter o controle do pH. Outras duas amostras foram preparadas, na presença de surfactante CTAB (Brometo de Cetrímonio) e sem mineralizador KOH. Para todas as amostras utilizou-se a razão de 1Zn para 2Fe visando garantir a estequiometria do composto.

Após essa etapa de preparação, deu-se início ao processo hidrotermal assistido por micro-ondas. Para isso, primeiro a solução foi colocada em uma autoclave de Teflon® e em seguida acoplado junto a um reator, que contém um termopar, monômetro para monitoramento da pressão durante a reação e uma válvula de segurança, como mostra a Figura 22.

Figura 22 - Fotos do HAM e seus principais componentes: (a) copo de teflon. (b) reator hidrotérmico.



Copo de Teflon

(a)



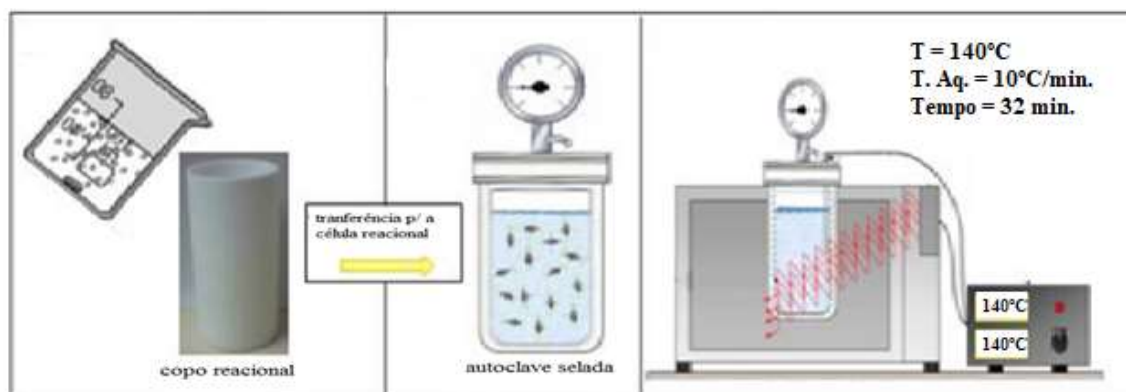
Reator Hidrotérmico

(b)

Fonte: Departamento de Materiais e Tecnologia (DMT) da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá – UNESP. (2021).

Todo o conjunto é montado em um forno micro-ondas adaptado para o processo (Figura 23). Nessa etapa, a solução sofreu reação durante 32 minutos, à uma temperatura de 140 °C, sendo esses parâmetros definidos no painel do equipamento antes do início da reação [82]. Um esquema de como o procedimento em micro-ondas foi realizado pode ser observado na Figura 16, que foi anteriormente mostrada.

Figura 23 - Esquema de Funcionamento do sistema montado para o método hidrotermal.



Fonte: Autoria própria (2021).

Por fim, retirou-se a solução e centrifugou-a por três vezes, para separar a fase sólida e líquida, sendo esta última descartada após o final dessa etapa. Colocou-se o sólido em uma

estufa, onde este permaneceu por aproximadamente 48 horas, há uma temperatura de aproximadamente 100°C (Figura 24).

Figura 24 - (a) Solução resultante após centrifugação; (b) lavagem das nanopartículas; (c) secagem das nanopartículas; (d) obtenção das nanopartículas.



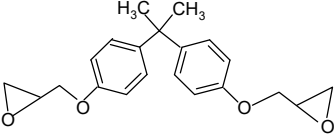
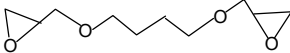
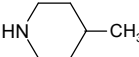
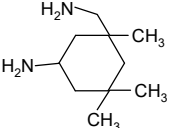
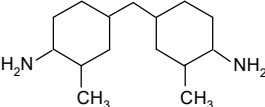
Fonte: Autoria própria (2021)

Após obtenção das nanopartículas, estas foram caracterizadas por Difração de raios-X (FEG-Guaratinguetá) e microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo (FEG-SEM-IQ-Araraquara) bem como termogravimetria e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).

4.2 SÍNTESE DA MATRIZ EPOXÍDICA DGEBA

As formulações usadas neste estudo são à base do monômero epóxi do tipo éter diglicidílico do bisfenol A (DGEBA) contendo como diluente reativo o éter diglicidílico do 1,4-butanodiol (GDEBD) com uma massa equivalente de grupos epóxi de 185,5 g eq⁻¹ e 123,4 eq⁻¹, respectivamente conforme determinado por titulação ácida [59]. Como comonômeros foram utilizadas as aminas cicloalifáticas isoforona diamina (IPD), 4,4'-diamino-3,3'-dimetildiciclohexilmetano (3DCM) e 4-metilpiperidina (4MPip). As aminas IPD e 3DCM com uma massa equivalente de grupos hidrogênio-amina de 42,6 e 59,6, respectivamente, determinado por titulação potenciométrica [60]. A estrutura química, fornecedor, pureza, massa molecular e funcionalidade dos vários produtos utilizados estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Estrutura química e características dos monômeros. (M: massa molecular, F: funcionalidade).

Monômeros	Estrutura química	Forneced. Jor	M g. mol ⁻¹	F
Éter diglicidílico do bisfenol A (DGEBA)		Dow Chemical DER 331	~371,00	2
Éter diglicidílico do 1,4-butanodiol (DGEBD)		Aldrich (60,0%)	202,25	2
4-Metilpiperidina (4MPip)		Aldrich (96,0%)	98,17	1
Isoforona diamina (IPD)		Aldrich (99,0%)	170,30	4
4,4'-Diamino-3,3'-dimetildiciclohexilmetano (3DCM)		Aldrich (99,0%)	238,41	4

Fonte: Passos (2020); Silva (2020).

As formulações foram modificadas pela adição de diluente reativo ao monômero epoxídico usando uma concentração de 30 phr (30g de DGEBD para cada 100g de DGEBA). As formulações contendo 3DCM e IPD foram preparadas por pesagem do monômero modificado e do comonômero em proporção estequiométrica (grupos epóxi/hidrogênio amina e/a = 1). As formulações com 4MPip foram preparadas usando uma concentração de comonômero de 5 phr (5g de 4MPip para cada 100g de DGEBA). Todas as formulações foram cuidadosamente agitadas durante 5 min à temperatura ambiente (25 °C) até assegurar uma mistura homogênea. Em seguida, as misturas líquidas foram desgaseificadas a vácuo por 10 min à temperatura ambiente (25 °C), depois vertidas em moldes de polietileno cilíndricos e submetidas a 60 °C durante 4 h.

Para a etapa de pós-cura, cada amostra com uma cura incompleta nos moldes de polietileno foi removida para moldes de vidro cilíndricos. A etapa de pós-cura das formulações à base de 3DCM e IPD foi de 180 °C e 160 °C durante 2 h, respectivamente.

Para a formulação à base 4MPip foi utilizado um programa de cura em duas etapas, a primeira a 60 °C durante 30 min, e a segunda a 120 °C durante 16 h. Terminada a etapa de pós-cura as amostras foram deixadas arrefecer lentamente, até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras (cilindros) foram removidas dos moldes e maquinadas para atingir as dimensões finais. Desta forma foram produzidas amostras na forma de discos com dimensões de 1,5 cm por 1,5 cm, as que foram tratadas mecanicamente para alcançar o acabamento superficial adequado. Para isto, a superfície destes discos foi submetida a polimento mecânico, primeiramente foram usados discos de carboneto de silício de grau 230, 300, 400, 500, 600 e 1200, e posteriormente foi utilizada solução-dispersão de polimento à base de óxido de alumina de grau 0,5 µm e 0,3 µm. Durante cada etapa de tratamento mecânico os discos foram lavados com água destilada para remover os resíduos de polimento. Finalmente as amostras na forma de discos foram secas com papel absorvente, e armazenadas em dessecador com sílica gel até sua utilização.

5 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

5.1 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X (DRX)

Os raios-X são radiações eletromagnéticas que podem ser polarizadas, difratadas e refletidas. A condição para ocorrência do fenômeno de difração está relacionada às estruturas cristalinas, as quais apresentam dimensões, das células unitárias, da mesma ordem do comprimento de onda característico dos raios-x. Devido ao espaçamento interplanar d , os raios provenientes da estrutura, em direção aos sensores, sofrem uma defasagem, responsável por gerar o fenômeno de interferência, que é construtiva segundo a Equação (5):

$$n.\lambda = 2.d.\sin\theta \quad (5)$$

Esta é a lei fundamental da cristalografia de raios-X, conhecida como Lei de Bragg, onde n corresponde aos padrões (primário, secundário, etc) de interferência, d a distância interplanar, λ o comprimento de onda do feixe incidente e θ o ângulo de difração.

A difratometria de raios-X foi utilizada para a identificação das fases formadas nas nanoestruturas obtidas por rota HAM. Utilizou-se um difratômetro de raios-X (Rigaku-DMax/2500C, Japão) com radiação Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), monocromatizada por cristal de grafite (Unesp - Instituto de Química - Araraquara), com velocidade de varredura de $0,2^\circ/\text{min}$, de 20 a 80° .

O tamanho médio de cristalito (d) foi calculado com base na equação a seguir, de Debye-Scherrer:

$$d = \frac{k.\lambda}{\beta.\cos\theta} \quad (6)$$

Onde k é uma constante, λ o comprimento de onda da radiação, β a largura à meia altura para o plano de maior intensidade e θ o ângulo de Bragg.

Figura 25 - Equipamento difratômetro de ânodo rotatório RIGAKU RINT2000.



Fonte: Autoria própria (2021).

5.2 REFINAMENTO DE RIETVELD

A análise de refinamento de Rietveld é uma ferramenta voltada para a interpretação dos padrões de difração de nêutrons ou de raios X. A ideia fundamental deste método é encontrar o melhor ajuste possível de um difratograma experimental em relação a um padrão difratométrico [61-63].

Isto permite extrair informações relacionadas à estrutura cristalina de um sólido (determinação de fases cristalográficas, dimensões da célula unitária, posições atômicas, tamanho de cristalito, microdeformações de rede, orientação preferencial) sem levar em consideração os efeitos provenientes de anomalias instrumentais ou de radiação de fundo [61].

No método de Rietveld, o critério para o refinamento dos parâmetros é definido por meio de uma função de minimização de resíduo (S) baseado no princípio dos mínimos quadrados, dada por [61]:

$$S = \sum_{i=1}^N w_i (y_i - y_{ic})^2 \quad (7)$$

Sendo N o número de pontos medidos no difratograma, w_i o peso atribuído a cada intensidade ($w_i = 1/y_i$), y_i e y_{ic} são as intensidades observadas e calculadas no i -ésimo ponto,

respectivamente. Para verificar a qualidade do ajuste, deve examinar alguns indicadores de confiabilidade rotineiramente executados no método de Rietveld, sendo que os mais comuns são: R_{wp} , R_{exp} e χ^2 . O índice ponderado do refinamento em função dos pontos do perfil (R_{wp}) é descrito por [64]:

$$R_{wp} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - y_{ic})^2}{\sum_i w_i (y_i)^2}} \quad (8)$$

O valor estatisticamente esperado para o R_{wp} (R_{exp}) é estimado pela equação a seguir [64]:

$$R_{exp} = \sqrt{\frac{(N - P)}{\sum_i w_i (y_i)^2}} \quad (9)$$

Sendo P o número de parâmetros refinados. O fator de convergência ou precisão do ajuste (χ^2) é determinado pela equação abaixo [61]:

$$\chi^2 = \frac{R_{wp}}{R_{exp}} \quad (10)$$

Um valor de χ^2 igual 1 na equação acima, indica que o R_{wp} atingiu o máximo dos valores estatisticamente esperados (R_{exp}) para todos os parâmetros refinados.

Os perfis e a assimetria dos picos foram ajustados por intermédio da função pseudo-Voigt modificada de THOMPSON-COX-HASTINGS (LARSON, VON DREELE, 2001) e pelo modelo de (FINGER, 1994).

Os padrões difratométricos usados nos refinamentos foram retirados do banco de dados ICSD (INORGANIC CRYSTAL STRUCTURE DATABASE, 2012).

5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho, com Transformada de Fourier, é utilizada na identificação de unidades estruturais encontradas nas substâncias com base nas frequências vibracionais de suas moléculas. As bandas registradas são decorrentes da absorção de radiação eletromagnética, resultante dos movimentos de vibração dos átomos constituintes dessa molécula. No caso de sólidos, existe um grande número de bandas, sendo que cada uma corresponde a um tipo de vibração específica de um composto. Neste trabalho, a espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi realizada empregando um espectrômetro modelo Equinox 55 (Bruker, Alemanha localizado no IQ-UNESP-Araraquara) em modo de refletância difusa, operando entre 400 e 4000 cm^{-1} , em temperatura ambiente. Quanto ao preparo das amostras, inicialmente foram usados citrato de amônio e ferro III ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$) e acetato de zinco dihidratado ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), e como solvente foi utilizado água. Para homogeneizar a solução, foi necessário um leve aquecimento. Posteriormente, foram usados um pistilo e um almofariz para desaglomerar e homogeneizar o tamanho das partículas desta pequena quantidade de material sintetizado.

5.4 ESPECTROSCOPIA DE ESPALHAMENTO RAMAN

Esta consiste de uma técnica baseada no espalhamento inelástico da luz monocromática, geralmente oriunda de uma fonte laser, fornecendo informações sobre o grau de desordem da rede cristalina. O espalhamento inelástico implica que a frequência do fóton na luz monocromática se altera devido à interação com a amostra. Fótons são absorvidos e então reemitidos e a frequência dos fótons reemitidos é deslocada da frequência monocromática original, gerando o efeito Raman, fornecendo informações a respeito de transições vibracionais e rotacionais. Cerca de 99,999% dos fótons incidentes do efeito Raman sofrem espalhamento elástico, do tipo Rayleigh. Este tipo de sinal não apresenta aplicações prática em caracterizações moleculares, sendo que somente em torno de 0,001% da luz incidente produz espalhamento inelástico, útil para este tipo de espectroscopia. Este método é sensível a mudanças na ordem à média distância da estrutura cristalina, e é frequentemente utilizado para estudar a introdução de defeitos e/ou fases secundárias nos materiais.

As medidas de espectroscopia Raman das amostras foram realizadas em temperatura ambiente por meio de um espectrômetro da marca Bruker modelo RFS100 localizado na UFSCAR, utilizando como fonte de excitação um laser de Nd-YAG com comprimento de onda de 1064 nm e potência de 100 mW. Para a região compreendida de 50 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} , foram feitas 32 varreduras com resolução espectral de 4 cm^{-1} . A espectroscopia de espalhamento Raman é uma técnica complementar à DRX, pelo fato de ser mais sensível às mudanças estruturais de ordem local em um dado material.

5.5 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

A quantificação do band gap é extremamente importante na indústria dos nanomateriais. Este se refere à diferença de energia entre o nível mais energético da banda de valência e o nível menos energético da banda de condução, no qual elétrons podem sofrer transições após absorverem um mínimo necessário de energia, o qual está intrinsicamente relacionado à condutividade elétrica dos materiais. A partir do espectro de reflectância difusa das amostras, obtém-se a função de Kubelka-Munk, convertendo o eixo vertical (y) para $F(R_{\infty})$. A energia do band gap (E_g) para as nanoestruturas de ZnFe_2O_4 é então determinada plotando o quadrado da função modificada em função da energia do fóton ($h\nu$) [88], em elétrons-volt (eV), conhecido por gráfico de Tauc.

Utilizou-se de um espectrômetro modelo Cary 5G (Varian, Estados Unidos localizado na UFSCAR), programado em modo de refletância difusa. Utilizaram-se λ situados na faixa de 200 nm a 800 nm para obter os espectros. A calibração do equipamento foi ajustada com o uso das esferas integradoras desenvolvidas pela empresa Labsphere. Segundo o fabricante, o padrão branco (SRS-99-010) tem aproximadamente 99 % de refletância, enquanto o preto (SRS-02-010) apresenta apenas 0,2 %.

5.6 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO (BET)

Adsorção é definida como a adesão de átomos ou moléculas de gás em uma superfície. Esta não deve ser confundida com absorção, na qual um fluido permeia o sólido ou líquido. A quantidade de gás adsorvida depende da área superficial exposta, da temperatura, da pressão do gás, além da força de interação entre o gás e o sólido. Na análise de área superficial pelo

método BET, o gás Nitrogênio é o mais utilizado devido à sua elevada interação com muitos sólidos. Como a interação entre fases gasosas e sólidas é relativamente fraca, a superfície é resfriada utilizando N₂ líquido a fim de obter quantidades detectáveis de gás adsorvido. Quantidades conhecidas de gás N₂ são então liberadas passo a passo dentro da célula reacional. Pressões relativas inferiores à pressão atmosférica são obtidas criando-se condições de vácuo parcial. Após a pressão de saturação, nenhuma adsorção é observada, independentemente de qualquer aumento na pressão.

Transdutores de pressão altamente precisos monitoram a mudança de pressão devido ao processo de adsorção, e depois de formadas as camadas de adsorção, a amostra é retirada da atmosfera com nitrogênio e aquecida para causar liberação do gás adsorvido, o qual pode ser então quantificado. Os dados coletados são mostrados na forma de uma isoterma BET, a qual plota a quantidade de gás adsorvido como função da pressão relativa, existindo cinco tipos possíveis de isotermas de adsorção.

Realizou-se quantificação da área de superfície das amostras, obtidas por rota hidrotermal assistida por micro-ondas, pelo método de Brunauer-Emmet-Teller (BET) [66], em ASAP 2010 (Micromeritics localizado no IQ-UNESP-Araraquara), sob temperatura de 77,35 K em atmosfera de gás nitrogênio (N₂).

5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR FEIXE DE EMISSÃO DE CAMPO (FEG-SEM)

Na microscopia por emissão de campo, um fio cristalino de tungstênio com uma extremidade pontiaguda é utilizado como fonte de elétrons. Nestes sistemas, um forte campo elétrico se forma na ponta fazendo com que os elétrons sejam arrastados em direção ao anodo. Existem três tipos de FEG, sendo elas as fontes de emissão a frio (1), as quais operam a temperatura ambiente, as fontes de emissão a quente (2), operando em temperaturas mais elevadas, reduzindo a absorção de gases na ponta além de estabilizar a emissão do feixe eletrônico, além das fontes de emissão Schottky (3). As medidas de FEG-SEM foram realizadas por meio de um equipamento da marca Carl Zeiss (Alemanha), modelo Supra 35-VP operado com feixe de elétrons incidentes de 6 kV, que tem uma resolução maior que o MEV. O equipamento está disponível na UFSCAR em parceria com o CDMF-CEPID.

5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE ALTA RESOLUÇÃO

A técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (*High-Resolution Transmission Electron Microscopy* - HRTEM) possui grande poder de resolução, atingindo a faixa atômica, além de oferecer vantagens importantes como: possibilidade de observar o que existe no volume dos materiais, pois os elétrons que formam a imagem atravessam toda a amostra, e facilidade de identificação dos detalhes da microestrutura através da técnica de difração de raios-X. A parte mais importante do equipamento é chamada de coluna, onde o feixe de elétrons é gerado e dirigido para atravessar a amostra. Em seguida, a imagem é ampliada e observada na tela, permitindo também o registro em câmera fotográfica. Várias lentes associadas permitem o controle da passagem de elétrons pela coluna, cujo vácuo deve atingir 10^{-5} mbar nas posições mais críticas (canhão e amostra). Nos microscópios mais modernos o vácuo é controlado por um sistema pneumático de válvulas. O equipamento ainda possui: um sistema de geração de alta tensão, que atinge a ordem de 100 a 200 kV nos microscópios tradicionais e acima de 1 MV nos chamados microscópios de alta voltagem; sistemas de alimentação e de controle da corrente nas diversas lentes eletromagnéticas; e bobinas de alinhamento. Existe também o mecanismo de contraste (espessura de massa, difração e fase), que gera diferenças nas imagens observadas na tela. O poder de resolução é da ordem de 0,2 nm e permite a observação de detalhes da estrutura cristalina dos materiais. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas em temperatura ambiente, dispersando as nanopartículas obtidas pelo método HAM em etanol e, após a secagem, adicionando-as em grades de Cu com tamanho de 300 mesh, seguida de vibração por energia ultrassônica por 5 minutos. O equipamento utilizado foi um FEI TECNAI F20 disponível na UFSCAR em parceria com o CDMF-CEPID.

5.9 MEDIDAS DE MAGNETIZAÇÃO E ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA DE ELÉTRONS (EPR)

Para medir o campo magnético DC, uma sonda Hall foi usado. As medições de magnetização foram realizadas através do magnetômetro de amostra vibratória (VSM) da Quantum Design TM. A medição da sorção de N₂ foi realizada usando o Micromeritics ASAP 2010 em 77 K.

A técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons, também conhecida por espectroscopia de ressonância de spin do elétron, consiste de uma técnica utilizada para estudar espécies químicas paramagnéticas, com elétrons desemparelhados. Como a maioria das técnicas espectroscópicas, espectrômetros EPR medem a absorção de radiação eletromagnética e um detector sensível à fase converte o sinal da absorção em sua primeira derivada, apresentando-a no eixo Y em função do campo magnético no eixo X, o qual pode ser representado em Gauss (G) ou Tesla (T), sendo que $1\text{ T} = 10.000\text{ G}$ [67].

Elétrons desemparelhados apresentam dois estados energéticos disponíveis, os quais são degenerados, devido à variação de seu momento magnético de spin. Tal degenerescência é deslocada à medida que o campo magnético externo aplicado sobre o material é elevado, absorvendo a energia da radiação quando em frequência de mesma magnitude, sendo essencialmente caracterizada pelo fenômeno da ressonância, observado através da varredura da energia absorvida da radiação incidente em função do campo aplicado. A amostra é submetida a um feixe de irradiação de micro-ondas de campo fixo com frequência variável ou de frequência fixa com campo variável, sendo que diferentes frequências podem ser utilizadas, denotadas como bandas S (3,5 GHz), X (9,25 GHz), K (20 GHz), Q (35 GHz) e W (95 GHz) [68].

Os espectros de EPR foram gravados com a inserção de alguns miligramas da amostra em pó na cavidade de um espectrômetro Bruker EMX-300 (EMBRAPA, São Carlos – SP), operando em banda X (9 GHz) com potência de micro-ondas de 2 mW, amplitude modulada em 1 G, constante de tempo 2,56 ms, tempo de conversão de 10,24 ms, frequência modulada em 100 kHz, e temperatura ambiente, obtidos com auxílio do software SimFonia, contido no próprio equipamento Bruker.

5.10 LUMINESCÊNCIA

Na História da Ciência, os fenômenos ópticos sempre fascinaram e desafiaram a mente do ser humano. Isso se estende desde a antiguidade remota, com as observações e os relatos registrados pelos filósofos gregos, até as contribuições matemáticas e físicas deixadas por grandes cientistas como: Isaac Newton, James Clerk Maxwell, Max Planck, Albert Einstein e outros -ia em sólidos, buscando com isto, tornar tecnologicamente viável a reprodutibilidade e o aumento da eficiência de dispositivos eletro-ópticos, por exemplo: lâmpadas, *lasers*, sensores de radiação e diodos emissores de luz visível. Na natureza, a luminescência é um

fenômeno físico que pode se manifestar das mais variadas maneiras, dependendo essencialmente do tipo de energia responsável pelo processo de excitação eletrônica.

Tabela 4 - Descrição de alguns exemplos comuns desta propriedade óptica.

Tipo de Luminescência	Origem da Energia de Excitação
<i>Bioluminescência</i>	Mecanismos biológicos
<i>Catodoluminescência</i>	Feixe de elétrons de alta energia
<i>Eletroluminescência</i>	Tensões elétricas
<i>Fotoluminescência</i>	Fótons
<i>Quimioluminescência</i>	Reações químicas
<i>Termoluminescência</i>	Termicamente estimulada por uma outra fonte de energia

Fonte: Autoria própria (2021).

Para poder compreender os mecanismos fundamentais de excitação eletrônica em sólidos é necessário ter conhecimento sobre os níveis de energia. O modelo mais aceito explica que um átomo isolado tem estados quânticos estacionários caracterizados por níveis de energia discretos e quantizados, correspondendo aos orbitais atômicos (s , p , d e f). Em um átomo com muitos elétrons, o estado fundamental pode ser encontrado quando os vários elétrons são distribuídos nos níveis de menor energia possível, obedecendo sempre o Princípio de Exclusão de Pauli. Como o elétron é dotado de spin, cada estado orbital comporta dois elétrons de spins opostos. Entretanto, em estado sólido os átomos são numerosos e muito próximos em células unitárias, as quais se repetem infinitamente. Essa característica causa uma perturbação nos níveis de energia dos átomos, isto é, se aproximarmos um grande número de átomos, teremos então um grande número de níveis energéticos próximos uns dos outros formando uma banda de energia quase contínua. Contudo, para uma distância infinita, os níveis de energia de estados equivalentes coincidem e são iguais aos de um átomo isolado. À medida que a distância diminui, os níveis se separam devido à interação entre os vizinhos, dando origem a bandas de energia permitidas e

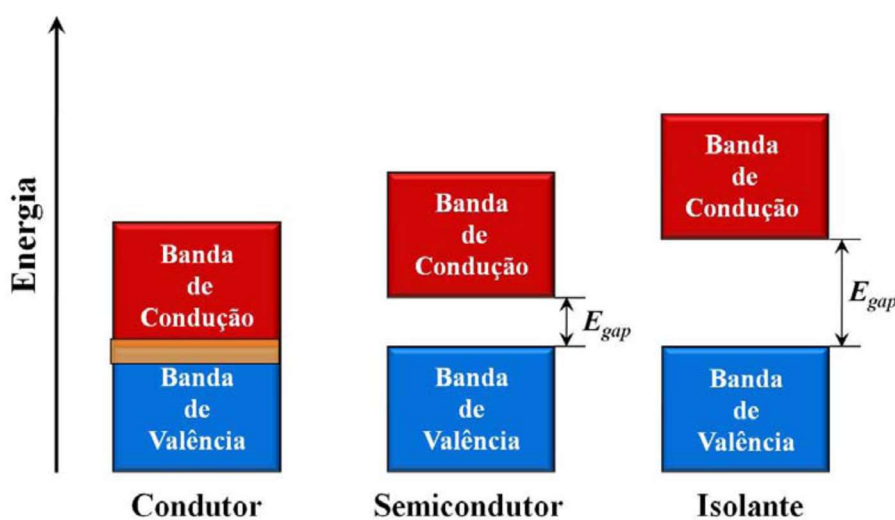
proibidas. A Figura 26 ilustra a configuração de bandas para três diferentes categorias de materiais (condutor, semicondutor e isolante).

Os condutores possuem uma elevada condutividade eletrônica, exatamente por causa de uma sobreposição existente entre a banda de valência (BV) e a banda de condução (BC) (parcialmente preenchida). Neste sentido, existe um grande número de elétrons livres disponíveis para as propriedades de condução, mesmo a temperatura ambiente.

Em um semicondutor, a BV (totalmente ocupada) e a BC (vazia) estão ligeiramente separadas por uma região proibida conhecida como *band gap*, onde não existem estados eletrônicos. Posteriormente a etapa de excitação, para que elétrons deixem os estados localizados próximos ao topo da BV e passem a ocupar aqueles situados abaixo da BC é necessário que consigam superar a energia de *band gap* (E_{gap}). Um exemplo de semicondutor intrínseco é o Si ($E_{gap} \approx 2,0$ eV).

Um material é considerado isolante devido à presença de um enorme intervalo de energia entre a BV e a BC. Como resultado, os elétrons do sólido são suficientes apenas para preencher completamente os níveis de energia da BV. Podemos destacar como exemplo o diamante ($E_{gap} \approx 7,0$ eV).

Figura 26 - Modelo esquemático das bandas eletrônicas de condutores, semicondutores e isolantes.

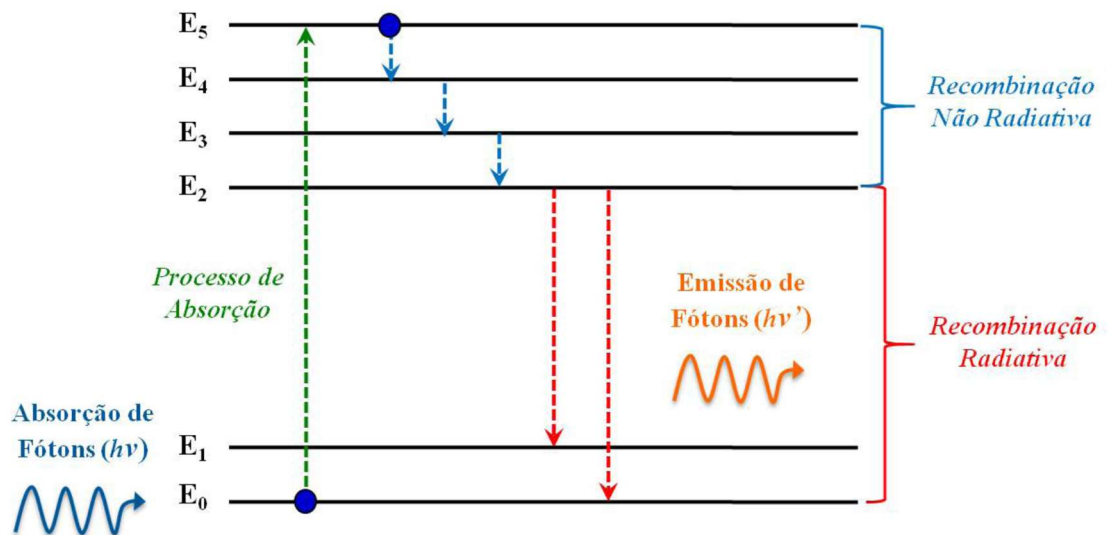


Fonte: Adaptado de Química Nova (2018).

Em particular, dos inúmeros tipos de luminescência, a fotoluminescência (FL) é uma das mais conhecidas. Esta propriedade óptica é frequentemente verificada em materiais com características semicondutoras. De modo geral, após a excitação mediante a absorção de

fótons, os elétrons provenientes da BV não permanecem por muito tempo nos estados de menor energia situados na BC. Durante a etapa de decaimento, os processos de recombinação de elétrons podem ser de duas maneiras: não radiativa e radiativa. A recombinação não radiativa ocorre quando o intervalo entre os níveis de maior energia é pequeno, dissipando então parte da energia eletrônica em térmica para a rede cristalina via excitação de fônons. Para tanto, geralmente quando há um grande afastamento dos estados energéticos como em transições do tipo banda- banda, as recombinações radiativas podem predominar por meio da liberação parcial da energia eletrônica sob a forma de fótons. A Figura 27 ilustra os processos competitivos de recombinação eletrônica.

Figura 27 - Modelos esquemáticos das recombinações envolvidas nas emissões de FL.



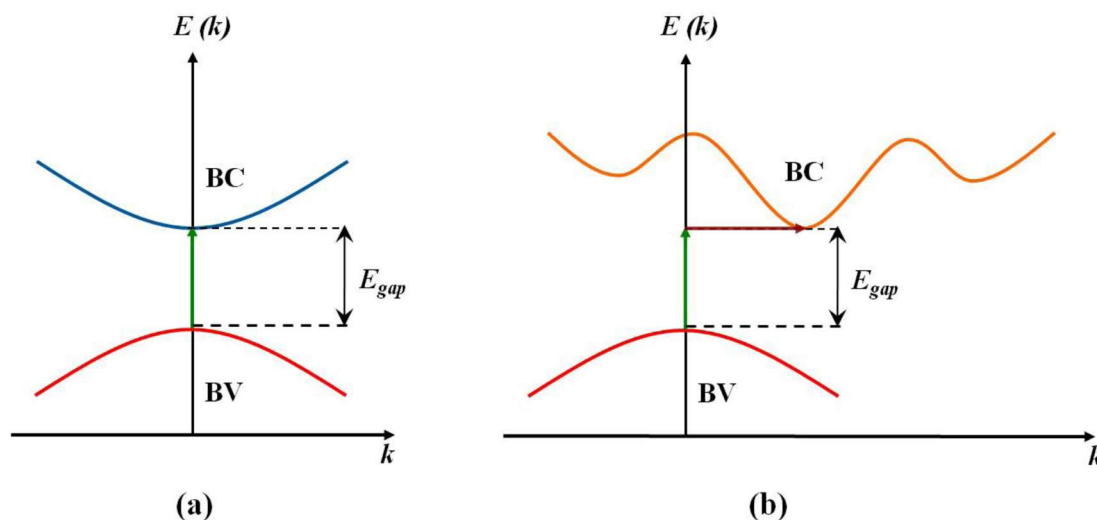
Fonte: Adaptado de Química Nova (2018).

Na Física de materiais, tanto a energia quanto o momento são duas grandezas que devem ser conservadas nas transições eletrônicas entre bandas de energia. Para semicondutores com *band gap* direto (BGD), o estado de máxima energia da BV e o mínimo da BC são encontrados sobre um mesmo vetor de onda (k vetor), ou seja, em uma equivalente zona de Brillouin no sólido (Figura 28(a)).

Nesta condição, a conservação do momento é satisfeita nas etapas de recombinação dos pares elétron-buraco, enquanto que a conservação da energia está vinculada a liberação de fótons, respectivamente. Isto diferencia das transições de *band gap* indireto (BGI), onde as transições eletrônicas acontecem em regiões distintas da zona de Brillouin, isto é, apresentando uma variação sobre (k vetor). É importante destacar que, a recombinação dos

pares elétronburaco não tem o mesmo momento. Para que isto seja possível, é obrigatoriamente necessário que o excesso de momento deva ser cancelado pelos fônons (Figura 28(b)).

Figura 28 - Modelos representativos de semicondutores com band gap (a) direto e (b) indireto, respectivamente.



Fonte: Adaptado de Química Nova (2018).

O ensaio para obtenção dos espectros de fotoluminescência foi realizado à temperatura ambiente com feixe de laser de 405 nm no LIEC na UFSCar.

5.11 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A DSC é também utilizada na determinação da temperatura de transição vítrea de uma substância. Esta determinação é feita a partir da descontinuidade que se observa no fluxo de calor do termograma. As principais vantagens da DSC são a simplicidade e rapidez das medições assim como a relevância da informação que é obtida nas medições por análise dos termogramas obtidos. A temperatura de transição vítrea (T_g), e o calor residual (ΔH), das formulações epóxi, após a cura, foram determinados por calorimetria exploratória diferencial (DSC), utilizando um calorímetro Shimadzu, modelo DSC 60 em atmosfera de nitrogênio gasoso. As amostras (~10,0 mg) foram aquecidas de 37 até 125 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ sob um fluxo de nitrogênio gasoso de 50 ml min⁻¹. Considerou-se temperatura de transição vítrea T_g o início da queda da alteração na capacidade calorífica.

5.12 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

Materiais destinados a aplicações oncológicas devem ser biocompatíveis para realizarem suas funções, sem provocar reações adversas num sistema biológico. A biocompatibilidade implica em uma série de características do biomaterial que incluem: não destruir ou sensibilizar elementos celulares do sangue, não desnaturar as proteínas plasmáticas, não causar respostas imunes diversas, não induzir à carcinogenicidade ou mutagenicidade, não produzir reações tóxicas ou alérgicas, não dizimar eletrólitos, não ser adversamente afetado pela esterilização, apresentar estabilidade no ambiente fisiológico e não provocar calcificação.

Para os testes de biocompatibilidade e citotoxicidade, do material de revestimento, foram feitos os seguintes ensaios biológicos *in vitro*: adesão de plaquetas e ativação por microscopia eletrônica de varredura (MEV), tromborresistência, adsorção de proteínas, estudos da citotoxicidade com células tipo osteoblastos MG63 (ATCC), e viabilidade celular por microscopia de luz e fluorescência.

5.13 ADESÃO DE PLAQUETAS

A biocompatibilidade das formulações DGEBA com o sangue foi avaliada pelo ensaio de adesão plaquetária aberto-estático com sangue humano. O sangue foi coletado de doadores saudáveis, de acordo com a Declaração de Helsinki, e aprovado pelo comitê de ética local. Para os estudos de adesão de plaquetas, discos com dimensões de 1,5 cm x 1,5 cm de cada amostra, após a cura, e do tratamento mecânico foram incubados durante 1 h em tampão fosfato salino (PBS, 0,1 M, pH 7,4) a 37 °C. O ensaio foi realizado depositando 2 ml do sangue fresco, em cada uma das cinco superfícies de teste. Após o tempo de contato de 180 s a 37 °C, as superfícies foram lavadas suavemente com tampão PBS para remover as plaquetas não aderidas e fixadas em solução de glutaraldeído (2,0%). A seguir as amostras foram mergulhadas em solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) e lavadas por 15 min por três vezes. A desidratação das amostras foi feita deixando imersas por 15 min em cada uma das soluções de concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90, 95 e 100%). O estudo da morfologia das plaquetas aderidas sobre a superfície das amostras foi realizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Neste estudo foi utilizado o vidro como controle.

A quantidade de plaquetas aderidas à superfície dos polímeros depois da exposição com o sangue foi avaliada pela atividade do lactato desidrogenase (LDH). Sangue humano foi coletada de um voluntário saudável e misturada com 3,8% de anticoagulante citrato-ácido (9:1) e centrifugada a 1500 rpm durante 15 min para preparar o plasma rico em plaquetas (PRP); 1 ml de PRP foi incubado com cada superfície de polímero durante 1 h a 37 °C, depois foram lavadas com PBS para remover as plaquetas, que não foram ligadas à superfície do polímero. Posteriormente 50µl de solução Triton-X100 (1%) foi adicionada à superfície de cada amostra durante 5 min à temperatura ambiente (25 °C) para desprender as plaquetas aderidas, e imediatamente avaliar a atividade LDH pela diferença de absorção a 340 nm, esperando 1 min para a medição da absorção. Os resultados foram calculados baseados no kit de atividade LDH.

5.14 TROMBORRESISTÊNCIA

A tromborresistência das superfícies dos materiais foi avaliada pelo método adaptado da cinética do tempo de coagulação. O sangue foi coletado de um voluntário saudável. Foram adicionados 0,5 ml de sangue na superfície de cada material. Depois de um tempo predeterminado, de 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min, os materiais foram transferidos para placas de Petri contendo 20 ml de PBS pH 7,4 e incubou-se durante 5 min. As células vermelhas do sangue, que não foram aderidas na superfície do material, foram hemolisadas, e a hemoglobina livre foi dispersa em água. A concentração de hemoglobina livre em água foi espectrofotometricamente medida por monitoramento da absorbância a 540 nm. Os valores de absorbância foram representados graficamente em função do tempo de contato com o sangue.

5.15 ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS

A adsorção de proteínas de um fluido biológico em uma superfície sólida é um problema de interesse em vários processos biológicos, médicos e tecnológicos. Este fenômeno é um dos primeiros eventos que ocorre quando materiais sintéticos são colocados em contato com um sistema biológico. Em cerca de menos de 1 segundo após o contato do material sintético, proteínas já são observadas nas superfícies dos mesmos. Em questão de minutos, uma monocamada de proteína adsorve na maioria das superfícies. Portanto, o desempenho desses materiais dependerá, primeiramente, da camada de proteína adsorvida, pois esta camada de proteína interage diretamente com os componentes do sistema biológico. As

células entram em contato com a camada de proteína ao invés da superfície do biomaterial. Como essas células respondem especificamente a proteínas, a formação do filme interfacial de proteína pode ser o evento que controla posteriores biorreações a materiais sintéticos.

A adsorção de proteínas em materiais sintéticos localizados na corrente sanguínea ocorre sob condições que são complexas, visto que o plasma é constituído por uma variedade de proteínas diferentes. Além disso, cada proteína está presente no plasma em uma concentração característica.

Nesta pesquisa, foram utilizadas as proteínas do plasma sanguíneo, albumina humana (HSA) e fibrinogênio humano (HFb) de procedência Sigma-Aldrich. Para cada medição, uma solução de proteína de uma concentração de 0,1 mg/ml foi recém-preparada em uma solução 10 mM de tampão de fosfato (PBS, pH = 7,4).

Apropriadas células de adsorção de Teflon® contendo as superfícies poliméricas foram injetados com PBS para deslocar o ar e produzir um ambiente fisiológico para a adsorção de proteínas. Em seguida, as células de adsorção foram equilibradas a 37 °C, e uma bomba peristáltica foi utilizada para conduzir o fluxo de PBS para dentro da célula de adsorção, a uma taxa de 500 µl/min de soluções de HSA ou HFb, para determinar a cinética do processo de adsorção de proteínas nas superfícies dos polímeros. Estas condições foram mantidas, durante tempos predeterminados de 10, 30, 60, 90 e 120 min, e após terminar cada tempo foi extraída uma amostra de 50 µl de solução de proteína.

As soluções extraídas foram misturadas com 2 ml de Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB-G250) no ensaio de proteína, de acordo com o método de Bradford. O princípio do ensaio de Bradford baseia-se no deslocamento máximo de absorbância de 465 nm a 595 nm para CBB G-250, quando ocorre a ligação entre as proteínas. O corante liga-se a CBBG arginina e aos resíduos de aminoácidos aromáticos presentes na proteína, ocorrendo uma mudança de cor do corante, em resposta às várias concentrações de proteína. A concentração de proteínas das amostras isoladas foi estimada usando uma curva padrão. O grau de adsorção foi determinado subtraindo a concentração de proteína após a experiência à concentração da proteína inicialmente adicionada. As medições foram realizadas em triplicata para cada tempo e analisadas estatisticamente, utilizando o teste t de Student. O significado estatístico foi considerado a um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5.16 ESTUDO DA CITOTOXIDADE *IN VITRO*

Foram utilizadas células tipo osteoblastos MG63 (ATCC) para a avaliação do comportamento de biocompatibilidade devido à sua elevada taxa de proliferação e simplicidade na sua cultura. O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo uso de exposição específica da resina DGEBA a células MG63 recomendadas em ISO 109935 para exposição celular. As culturas de MG63 foram mantidas em meio essencial mínimo (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) em frasco de 25 cm², em incubadora de CO₂ a 37 °C, até 80% de confluência.

Realizou-se colheita celular utilizando tripsina-EDTA e as subculturas iniciou-se em placas de petri através de ensaios de contato direto a densidade de 2x 10⁵ células / placa. As amostras de DGEBA foram fixadas nas placas de cultura a 5 mm do bordo interno do prato. Foi utilizado o controle positivo (cultura de células tratadas com 50% de fenol) e culturas de controle negativo (frasco de cultura de células sem material de teste).

Após 24 horas de exposição, as culturas foram examinadas e o meio de cultura foi substituído por meio fresco isento de soro e foi adicionado ácido [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenilo) -2H-tetrazólio, sal interno] (MTS). A redução de MTS foi expressa como densidade óptica a 490 nm (DO490).

A citotoxicidade foi determinada por comparação das absorbâncias resultantes com a média de absorbância dos poços de controle (sem DGEBA, considerada 100% de viabilidade), e foi expressa em percentagem de viabilidade celular.

5.17 VIABILIDADE CELULAR POR MICROSCOPIA DE LUZ E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As células MG63 foram mantidas em meio essencial mínimo (MEM) suplementado com soro fetal bovino a 10% (FBS) 50 U.ml⁻¹. Penicilina, 50 µg.ml⁻¹ de estreptomicina, 1% de L-glutamina e 1% de aminoácidos não essenciais a 37 °C em 5% de CO₂ foram subcultivadas em placas de 24 poços durante 24 horas antes da incubação com as amostras de DGEBA.

As amostras foram colocadas em contato direto com as células MG63 a uma densidade celular de 2,0x10⁴ células/cm², previamente colocadas em placas de 12 poços e incubadas com MEM e 10% de FBS a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, o material de teste foi removido de cada placa. Os frascos de cultura de células

juntamente com controle negativo (frasco de cultura de células sem material de teste) e controle positivo (cultura de células tratadas com fenol a 50%) foram incubados durante 3 dias. Após 3 dias de incubação, o meio foi separado e as células foram analisadas para avaliação qualitativa.

As células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) e foram separadas por tripsinização seguida de centrifugação a 800 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 500 µl de meio de cultura para formar uma suspensão celular.

A morte celular foi avaliada após 24h de incubação ou deixada a recuperar durante 48 horas adicionais. O ensaio de morte das células foi realizado por microscopia de contraste de fase após coloração por fluorescência de laranja de acridina (AO) e brometo de etídio (EtBr), respectivamente. O AO É um corante vital que mancha as células vivas e mortas. O EtBr apenas mancha as células que perderam a integridade da membrana. Após incubação, lavaram-se as amostras duas vezes com PBS, as quais foram misturadas, suavemente com uma mistura de AO (1 µg / ml) e EtBr (1 µg / ml) solução de corante durante um minuto como descrito por Spector et al.

Em seguida, os discos contendo as amostras, foram observados e fotografados sob um microscópio de fluorescência (Axioskop 40[®]/Axioskop 40 FL[®], Carl Zeiss) equipados com filtro de 590 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 RESULTADOS OBTIDOS NA SÍNTESE DO MATERIAL DE REVESTIMENTO

O material de revestimento base do DGEBA, foi caracterizado por Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Os ensaios biológicos realizados foram a tromborresistência, adsorção de proteínas, adesão de plaquetas, ensaios de citotoxicidade *in vitro* e viabilidade celular por microscopia de luz e microscopia de fluorescência.

6.2 ESPECTROSCOPIA FT-IR E DETERMINAÇÃO POR DSC DA MATRIZ EPÓXIDICA

6.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das amostras após a cura são mostrados na Figura 29. Nestes espectros aparecem as bandas de adsorção típicas divulgadas na literatura para o Éter Diglicídílico do Bisfenol A (DGEBA) ligado a compostos com grupos amina alifática como:

- a) Bandas de adsorção em 3390 cm^{-1} atribuídas à vibração do grupo hidroxila $-\text{OH}$, e bandas de adsorção em 2911 e 2865 cm^{-1} associadas às vibrações de estiramento de ligações C-H do tipo sp^3 , atribuídas a compostos alifáticos.
- b) Banda associada com o anel cicloalifático em 1451 cm^{-1} .
- c) Bandas de adsorção em 1605 , 1580 e 1508 cm^{-1} e 827 cm^{-1} atribuídas com o anel aromático e à substituição 1,4.
- d) Bandas de adsorção entre 1290 e 1450 cm^{-1} associadas aos grupos metilo e metileno.
- e) Bandas associadas ao grupo éter C-O-C em 1031 cm^{-1} .

Observa-se que não aparece a banda de adsorção em 915 cm^{-1} que corresponde à banda de vibração fundamental do grupo epóxi.

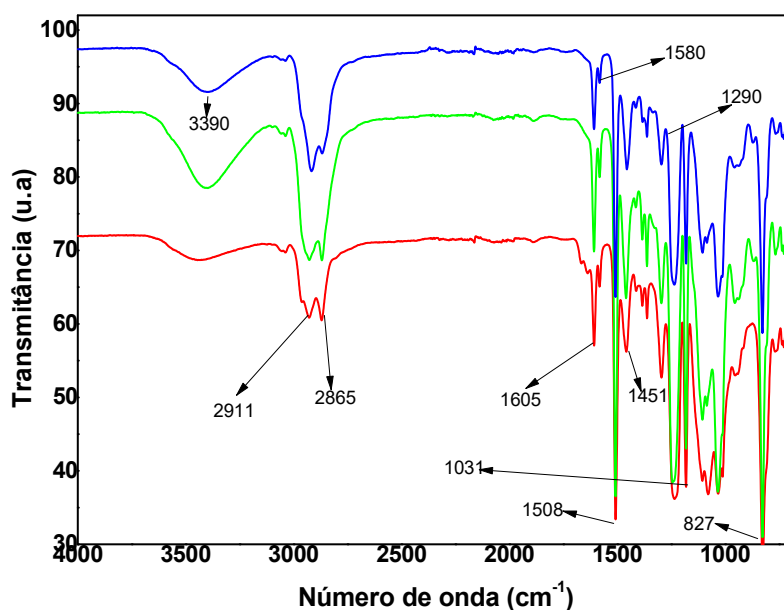
Os espectros de FTIR sugerem que todas as formulações chegaram a uma alta conversão, e que não há diferenças significativas nas bandas de adsorção para os três materiais poliméricos. O resumo das principais vibrações está demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Resumo das principais atribuições das bandas de absorção para o DGEBA, ligado a compostos com grupos amina alifática.

Frequência vibracional (cm^{-1})	Atribuições
3390	Deformação angular do grupo -OH
2911-2865	Estiramento C-H do carbono SP^3
1451	Anel cicloalifático
1605-1508-827	Substituição 1,4 do anel aromático
1290-1450	Grupos metilo e metileno
1031	Ligação éter: C-O-C

Fonte: Autoria própria.

Figura 29 - Espectros FTIR dos polímeros epóxi: DGEBA/3DCM (azul), DGEBA/IPD (verde) e DGEBA/4MPip (vermelho).



Fonte: Autoria própria.

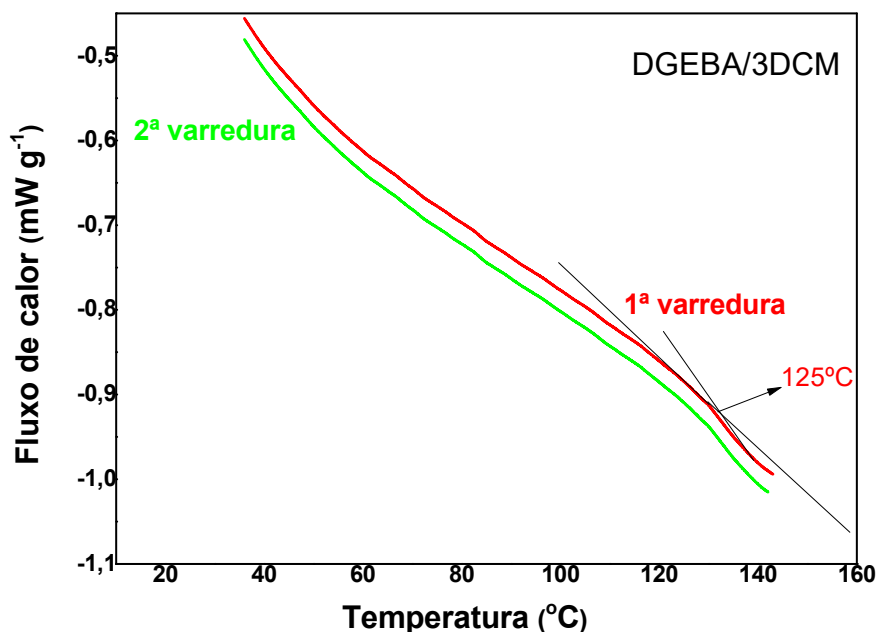
6.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Este ensaio consiste em medir a quantidade de energia necessária para estabelecer o equilíbrio térmico entre uma amostra e um material inerte de referência. É necessário varrer uma faixa de temperatura na qual se espera encontrar um fenômeno interesse que é a transição vítrea. A temperatura de transição vítrea T_g , é frequentemente expressa como a temperatura

do movimento cooperativo das cadeias poliméricas é atingido, fazendo com que o material passe de sólido rígido para borrachoso. Isso permite que as cadeias deslizem umas sobre as outras quando uma força é aplicada.

Antes do início da transição vítrea, a capacidade térmica do material varia linearmente; ao longo da faixa de temperatura em que ocorre a transição, varia de modo a formar uma curva; e após a transição, volta a variar linearmente, mas com coeficiente angular diferente. Neste contexto, a T_g é a temperatura que corresponde ao ponto de intersecção dos dois segmentos de reta. As curvas de DSC do material DGEBA/3DCM são apresentadas na Figura 45. Depois da primeira, e segunda varredura foi obtido o mesmo valor da temperatura vítrea de 125 °C, para a formulação DGEBA/3DCM. Resultados semelhantes foram encontrados para cada uma das outras formulações, e nenhum calor residual (ΔH) foi observado. Esses resultados sugerem que a cura alcançada foi total, ou melhor, que a T_g do material alcançou seu valor máximo. Os sistemas onde foi utilizado o agente de cura 3DCM e IPD apresentam maiores valores de T_g , devido ao fato de que estes promovem formação de redes poliméricas mais rígidas. Baixos valores de T_g refletem a baixa densidade de reticulação destes polímeros.

Figura 30 - Curvas de DSC para o polímero DGEBA/3DCM após o programa de cura.



Fonte: Autoria própria.

A Tg obtida para os outros materiais está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Temperatura de transição vítrea dos materiais determinada por DSC, após o programa de cura.

Formulações epoxídicas	1ª varredura (T °C)	2ª varredura (T °C)
DGEBA/4MPip	55,5	55,3
DGEBA/IPD	100,2	100,3
DGEBA/3DCM	125,0	125,1

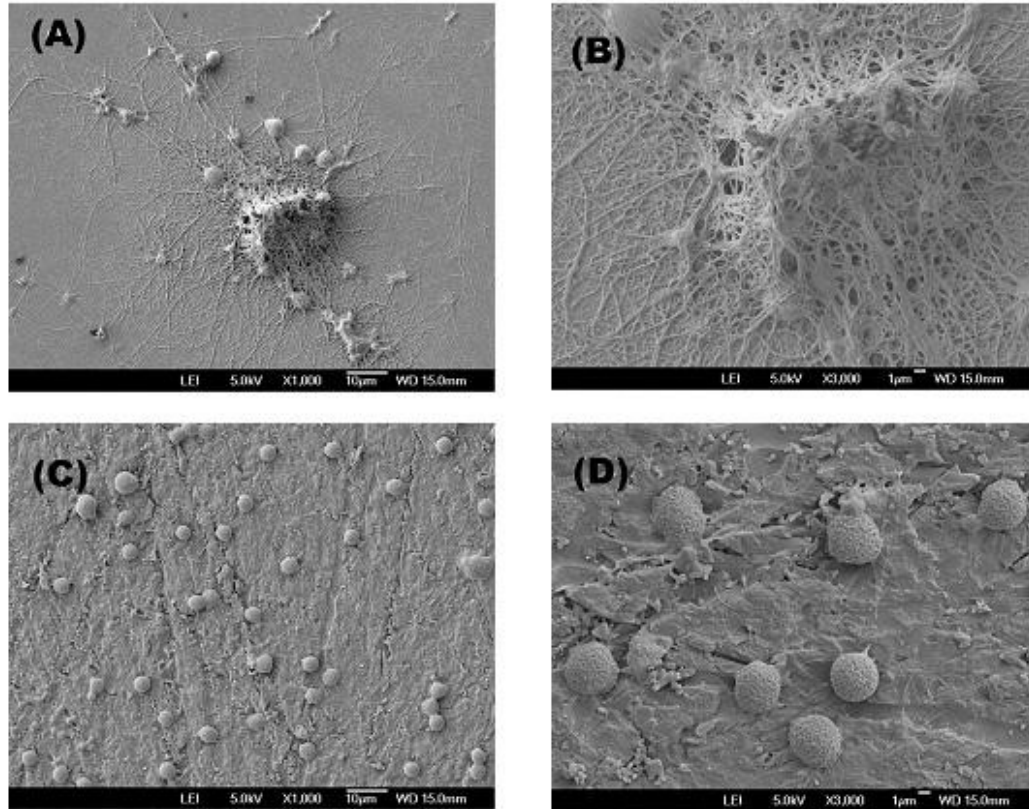
Fonte: Autoria própria.

6.2.3 Adesão de plaquetas e ativação

As morfologias das plaquetas observadas nas imagens obtidas por MEV usando ampliações de 1000x e 3000x são apresentadas nas Figuras 31 e 32.

A superfície de vidro (Figura 31 A e B) mostrou o maior número de plaquetas ativadas deixando evidente uma maior agregação de plaquetas, grande número de malha de fibrina e formação de trombos quando comparada às superfícies dos polímeros. Este resultado era esperado, pois o vidro foi utilizado como controle nestas experiências, devido à sua propriedade trombogênica bem conhecida [63,64].

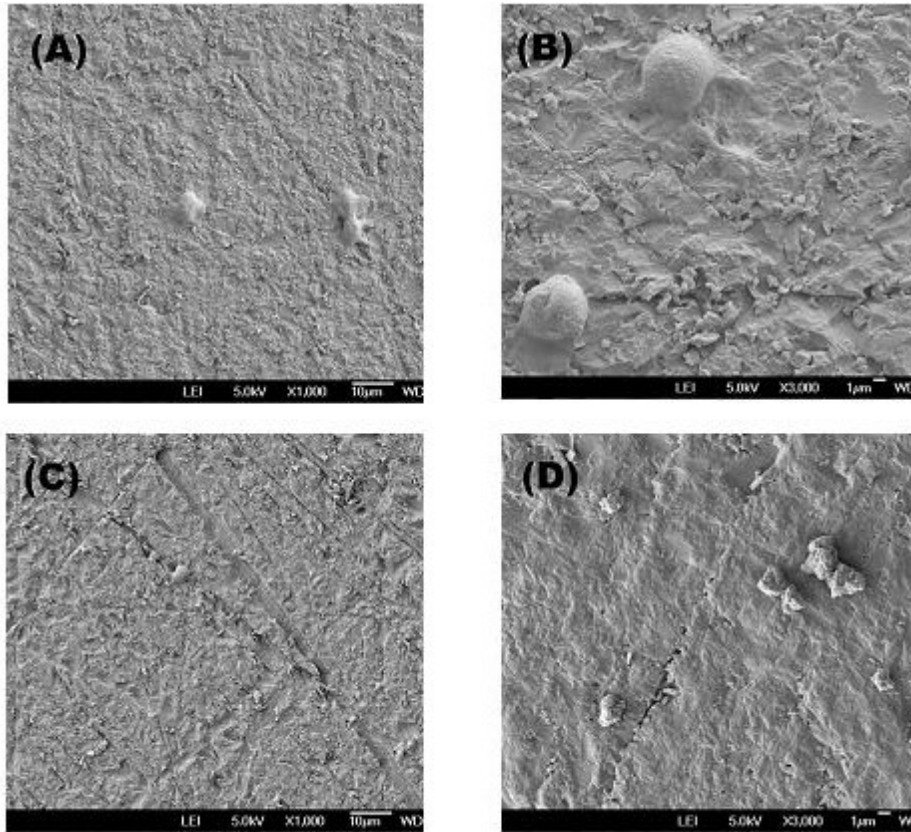
Figura 31 - Micrografias MEV das superfícies do vidro e do polímero DGEBA/IPD depois de um tempo de incubação de 180 s com o sangue: A e B - (Vidro) e (C e D) - Polímero DGEBA/IPD.



Fonte: Autoria própria.

A microscopia eletrônica de varredura da superfície do material DGEBA/IPD (Figura 32 C e D) após o contato com o sangue apresentou propriedades mais adequadas de hemocompatibilidade considerando que exibe um maior número de plaquetas aderidas com morfologia arredondada. Já nas superfícies dos materiais poliméricos DGEBA/3DCM (Figura 32 A e B) e DGEBA/4MPip (Figura 32 C e D) foi evidente um menor número de plaquetas aderidas também com morfologia arredondada, o que sugere em todos os materiais estudados as plaquetas foram menos ativadas. Pois antes da ativação, as plaquetas do sangue humano são discóides. Após a ativação, exibem uma progressão de morfologias de discóides para esféricas, e para dendríticas inteiramente espalhadas como relatado na literatura [65-71].

Figura 32 - Micrografias MEV das superfícies dos polímeros DGEBA/3DCM e DGEBA/4MPip depois de um tempo de incubação de 180 s com o sangue: (A e B) – Polímero DGEBA/3DCM e (C e D) – Polímero DGEBA/4MPip.

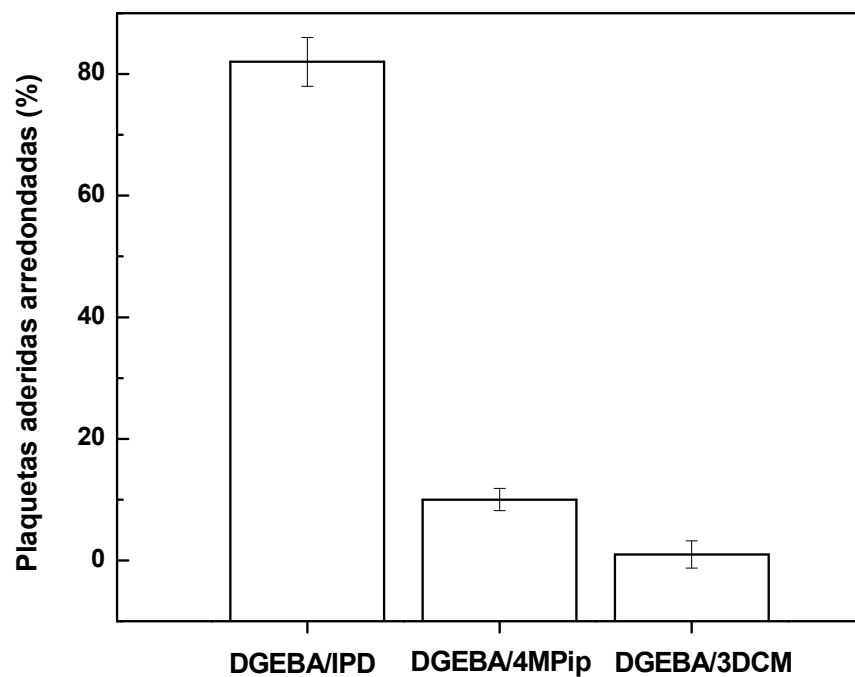


Fonte: Autoria própria

A Figura 33 mostra a porcentagem de plaquetas aderidas com morfologia discóides/esféricas que são mais desejáveis do ponto de vista de maior hemocompatibilidade para uma superfície sintética com o sangue [72]. O número total de plaquetas em cada imagem foi obtido pela soma do número de plaquetas com esta morfologia, e os valores calculados são o resultado da média de mais de duas imagens da superfície de cada material polimérico. Observou-se que a porcentagem de plaquetas com esta morfologia foi maior para o material DGEBA/IPD, o que sugere que dos materiais estudados este apresenta a maior potencialidade de compatibilidade com o sangue.

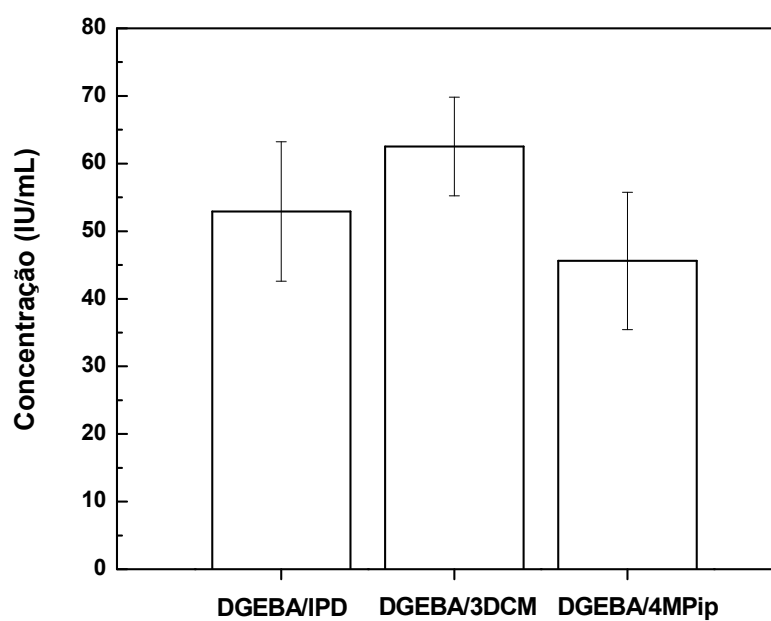
A adesão de plaquetas na superfície dos materiais foi também avaliada pela atividade do lactato desidrogenase (LDH), com o objetivo de investigar o potencial das superfícies dos materiais poliméricos para capturar e ativar plaquetas. Níveis elevados de LDH estão associados à adesão de plaquetas e agregados [73]. Os resultados são apresentados na Figura 34.

Figura 33 - Porcentagem de plaquetas aderidas na superfície dos polímeros com morfologia arredondada depois do contato com o sangue.



Fonte: Autoria própria,

Figura 34 - Adesão de plaquetas humanas nas superfícies dos polímeros. Determinado pelo ensaio LDH.



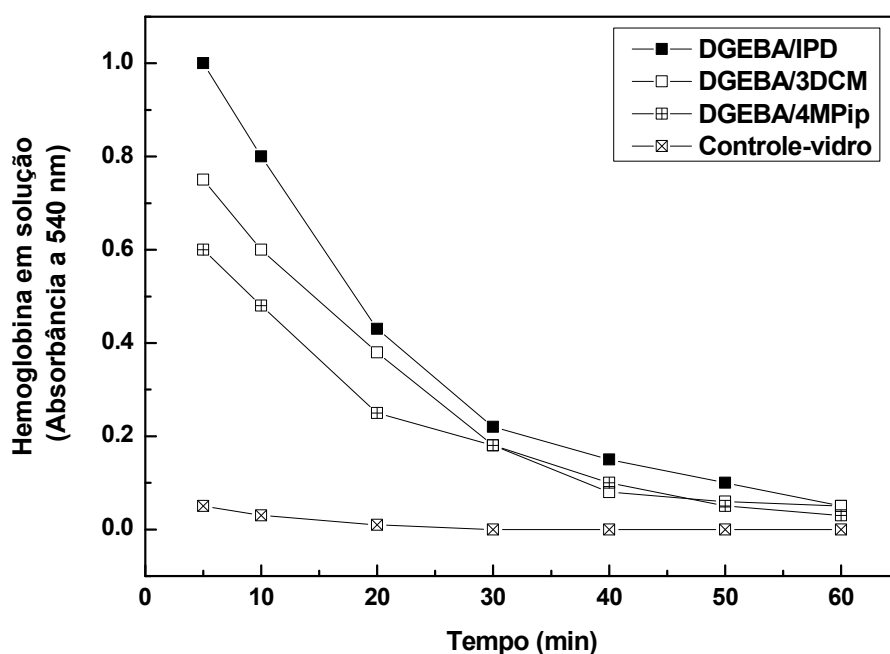
Fonte: Autoria própria.

A resposta da superfície dos materiais poliméricos determinada pelo ensaio LDH revelou uma maior adsorção de plaquetas em ordem crescente para os materiais poliméricos DGEBA/4MPip, DGEBA/IPD e DGEBA/3DCM o que pode estar relacionado à topografia superficial [74], e às características intrínsecas tais como; composição química, cristalinidade, hidrofobicidade e energia livre superficial.

6.2.4 Tromboresistência

A Figura 35 mostra o comportamento da coagulação do sangue para as superfícies dos polímeros e do vidro. A absorbância da solução de hemoglobina hemolisada varia com o tempo e quanto maior o valor de absorbância, maior o trombo. O tempo de coagulação foi definido no momento em que a absorbância é igual a 0,1 e um tempo de coagulação maior implica melhor hemocompatibilidade.

Figura 35 - Formação de trombos versus tempo nas superfícies dos materiais polímeros e o vidro.



Fonte: Autoria própria.

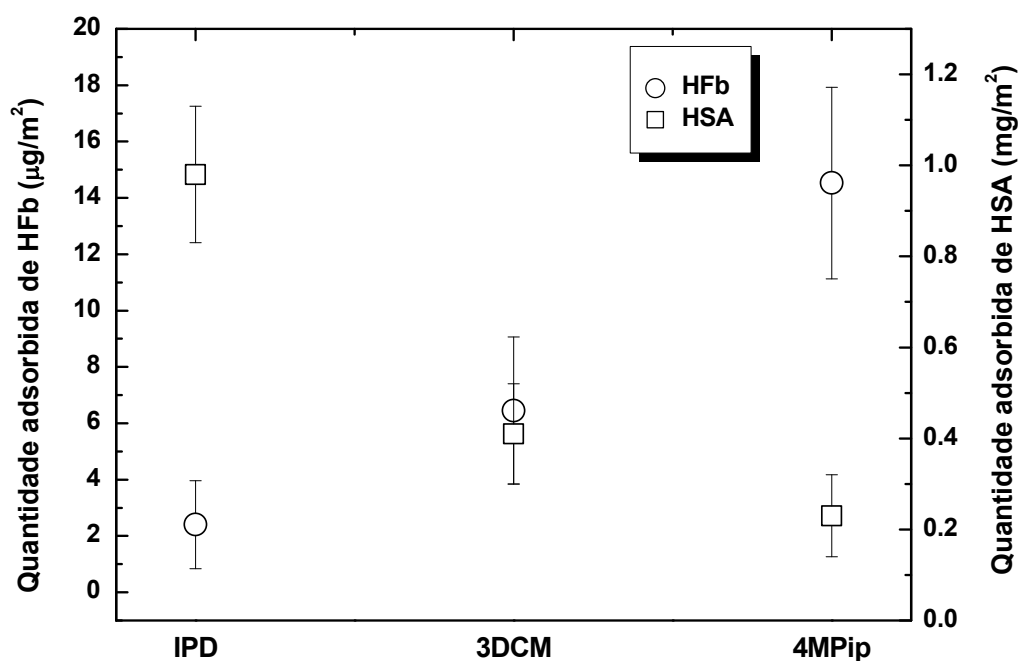
Os tempos de coagulação das superfícies dos materiais DGEBA/IPD e DGEBA/3DCM resultaram maiores do que os tempos de coagulação da superfície do material

DGEBA/4MPip, indicando que a coagulação destes dois materiais poliméricos resulta mais lenta e, portanto, estes materiais são menos trombogênicos. Estes resultados também indicam um menor potencial para a ativação pela via extrínseca, e coagulação para as superfícies dos materiais DGEBA/IPD e DGEBA/3DCM.

6.2.5 Adsorção de proteínas

Os resultados são mostrados na Figura 36. A adsorção das proteínas HSA e HFb na superfície dos materiais poliméricos foram estudadas com o objetivo de examinar a extensão da interação das superfícies com as proteínas em solução fisiológica (PBS, pH 7,4). Quando uma superfície de material sintético é colocada em contato com o sangue, o primeiro evento a ocorrer é a adsorção das proteínas do plasma sob a superfície, seguido de adesão de plaquetas e ativação [75,76].

Figura 36 - Quantidade de HSA e HFb adsorvida para os materiais DGEBA/IPD, DGEBA/3DCM e DGEBA/4MPip.



Fonte: Autoria própria.

Na superfície do material DGEBA/IPD foi observada uma maior adsorção de HSA quando comparada à adsorção de HFb, o que sugere um comportamento não-trombogênico [75]. A superfície do material DGEBA/3DCM mostrou também uma maior adsorção de HSA quando comparada à adsorção de HFb, mas neste caso menos significativa quando comparada à adsorção do material DGEBA/IPD o que sugere um menor comportamento não-trombogênico. O material DGEBA/4MPip exibe baixa adsorção de HSA e maior adsorção de HFb, indicando um comportamento mais trombogênico entre os materiais estudados.

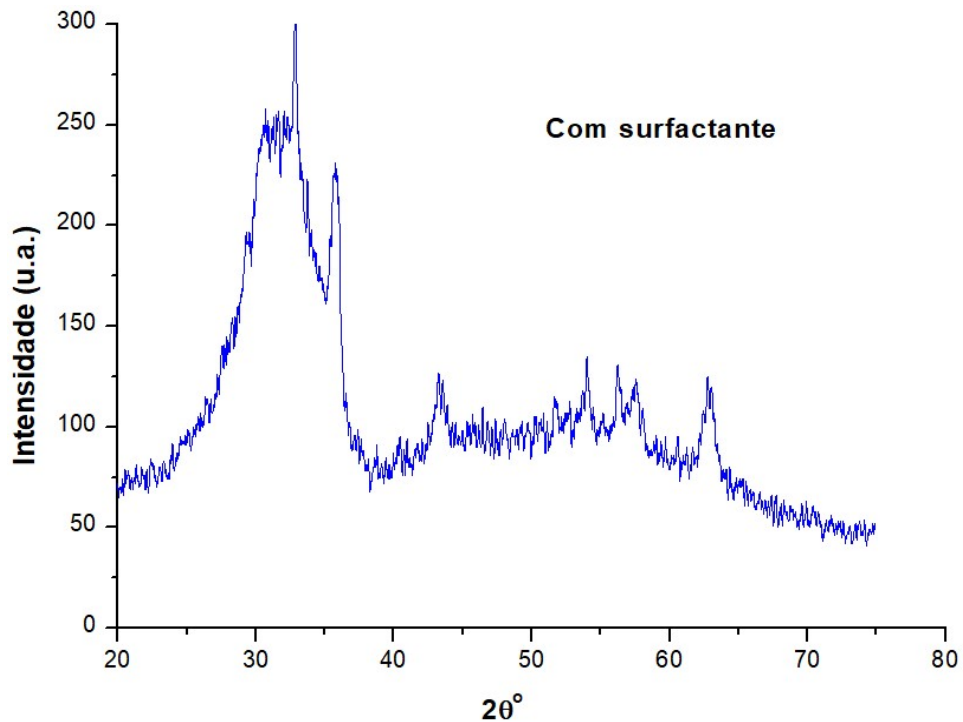
Sabe-se que o tipo e quantidade de proteínas do sangue adsorvidas na interface biomaterial/sangue dita em grande parte a ativação das plaquetas induzidas pela superfície. Neste sentido, a adsorção de fibrinogénio (HFb) nas superfícies de materiais sintéticos é conhecida por acelerar a adesão e ativação de plaquetas, no entanto, a adsorção de albumina (HSA) pode inibir a ativação de plaquetas e, portanto, não promover a formação de coágulos [75,76]. Assim, a relativa maior adsorção de HSA quando comparada à adsorção de HFb dos materiais epoxídicos pode ser um bom indicativo de baixa adesão e ativação de plaquetas por estas superfícies poliméricas.

6.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

6.3.1 Difractometria de Raios-X (DRX)

Para a obtenção de nanopartículas com a fase desejada, ou seja, cristalina e estrutura tipo espinélica cúbica de ferrita de zinco, alguns testes foram realizados. Na Figura 37, foi feito um ensaio usando-se como surfactante o CTAB. Observa-se que a baixa cristalinidade do material obtido se deve a presença do composto orgânico e, além disso, por ser um tensoativo, prejudica a formação da fase cristalina, o que é evidenciado pela baixa cristalinidade a longa distância interatômica. O tensoativo tende a diminuir a energia superficial, prejudicando a formação de um cristal, então o difratograma se assemelha a um material com características de um material quase-amorfo.

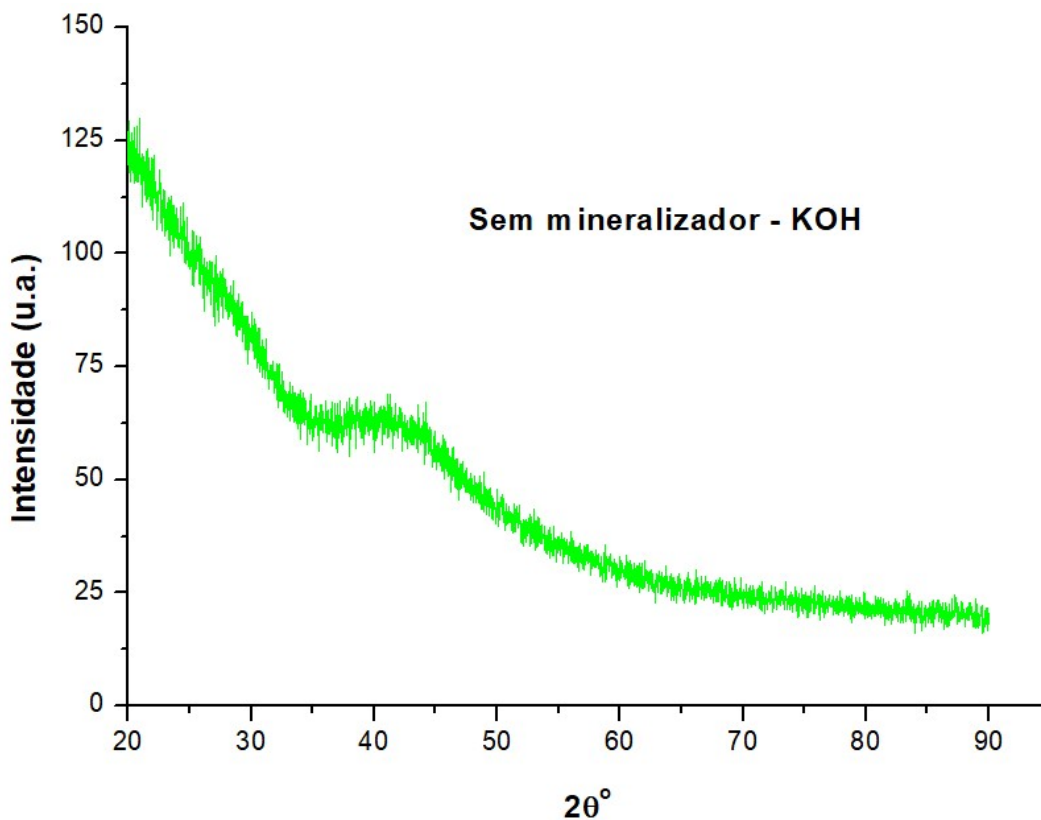
Figura 37 - Nanopartículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas via hidrotermal micro-ondas com surfactante (CTAB).



Fonte: Autoria própria.

Já na Figura 38, tem-se a rota de síntese sem a adição de um agente mineralizador como o KOH. Como é possível observar, nenhum pico foi formado, portanto, é possível inferir que a fase esperada para a ferrita de zinco não foi obtida. A explicação para tal fato deve-se a estrutura que a ferrita de zinco possui. Ao ter, como modificador de rede o Zn^{+2} , a estrutura que é obtida é diferente quando comparado, por exemplo, com o óxido de zinco, que é do tipo hexagonal wurtzita. Com a estrutura sendo diferente, o mineralizador terá uma ação diferente no processo de dissolução - recristalização do material. Assim, esses fatores corroboram com a não formação da fase de ferrita de zinco.

Figura 38 - Nanopartículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas via hidrotermal micro-ondas sem adição de agente mineralizador (KOH).



Fonte: Autoria própria.

Análise quantitativa de fases das nanopartículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas a 140°C por 32 minutos, sem surfactante e com mineralizador, são mostradas na Figura 39. Todos os picos foram indexados com o padrão da ZnFe_2O_4 relatado na ficha catalográfica PCPDF # 73-1963 e nenhum pico não indexado foi observado. Esses picos revelaram que os cristalitos tinham uma estrutura de espinélio pertencente ao grupo espacial $\text{Fd}3\text{m}$ [77] indicando a eficiência da técnica hidrotérmica para produzir nanopartículas cristalinas cúbicas puras.

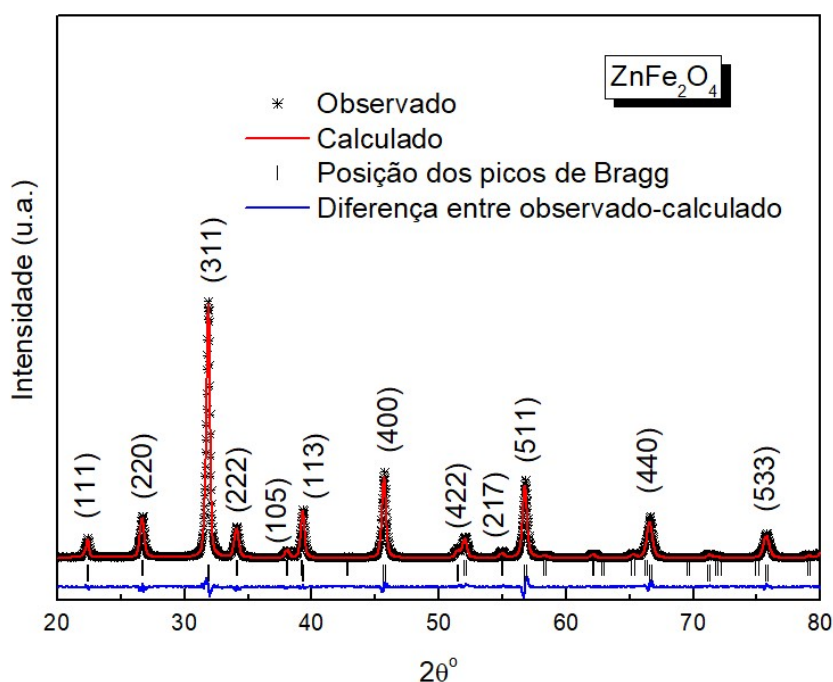
No método hidrotermal assistido por micro-ondas, o mecanismo de formação das nanoestruturas é explicado pelas reações de dissolução-recristalização. A primeira etapa consiste na dissolução dos precursores no solvente, formando íons de (Zn^{2+}) e (Fe^{3+}). Em seguida, adiciona-se o mineralizador (KOH). A dissolução dos mineralizadores é um processo exotérmico que libera íons hidroxila (OH^-) na solução, que reagem rapidamente com os íons, formando precipitados na forma de hidróxidos de zinco ($\text{Zn}(\text{OH})_2$) e hidróxidos de ferro ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) devido à baixa solubilidade destes compostos. A presença de um meio alcalino durante a síntese é essencial, pois, mediante às altas temperaturas e pressões, auxilia no

processo de oxidação e desidratação dos hidróxidos, formando as partículas cerâmicas insolúveis. A dissociação dos hidróxidos e a formação de complexos iônicos previnem e limitam o crescimento das nanoestruturas.

Devido ao tamanho nanométrico, a razão superfície/volume aumenta significativamente, permitindo que as nanoestruturas tenham elevada área de superfície específica e sejam mais reativas. Portanto, de modo a diminuir a energia de superfície, as nanoestruturas tendem a formar grandes aglomerados, como será observado posteriormente pelas micrografias. Nanopartículas de formato esférico geralmente são as primeiras formadas durante a síntese, devido à sua morfologia que minimiza a energia de superfície por apresentar a menor razão entre superfície/volume.

Pequenas variações observadas no padrão de raios X podem estar associadas a distorções na rede que possivelmente podem estar associadas à cinética de formação rápida de pós de ZnFe_2O_4 devido à influência da radiação de microondas durante o processamento [78]. O método de Rietveld empregado indica um bom ajuste entre os padrões calculados e obtidos experimentalmente, o que é suportado pelos parâmetros estatísticos (R_{bragg} , R_{wp} e R_{exp}), Tabela 7.

Figura 39 - Análise da fase quantitativa de nanopartículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas via hidrotermal micro-ondas com mineralizador.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 7 - Parâmetros de Rede (RB = R-Bragg, Rwp = R-Perfil Ponderado, Rexp = R-esperado e GoF=Goodness-of-fit).

Fórmula Refinada ZnFe ₂ O ₄	Parâmetros de Rede Indexados		Refinamento				
	a = b = c (Å)	$\alpha = \beta = \gamma$	Vol. Cél. Unitária (Å ³)	R _B (%)	GoF (%)	R _{wp} (%)	R _{exp} (%)
ZnFe ₂ O ₄	8,4134 (6)	90	595,54 (6)	3,06	1,05	12,18	9,04

Fonte: Autoria própria.

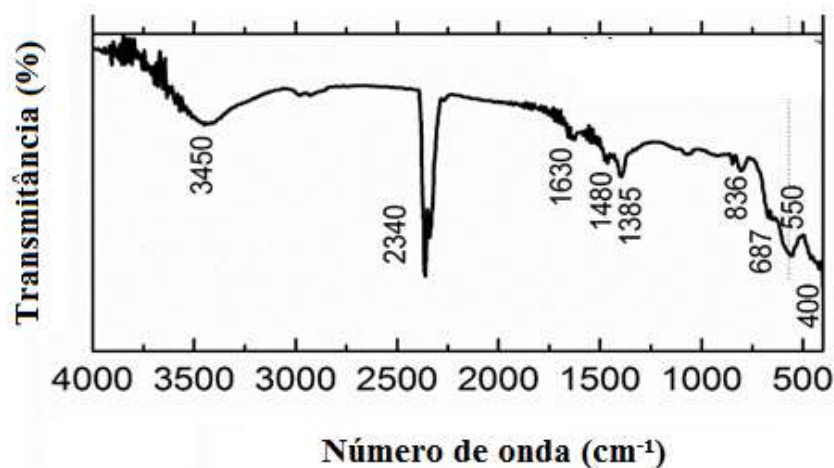
Os valores de GoF evidenciam que o refinamento está de acordo com foi divulgado na literatura . O parâmetro da rede (a) e os volumes unitários de células da estrutura experimental estão muito próximos da ficha catalográfica PCPDF # 73-1963 para o pó de ZnFe₂O₄, no qual o teor teórico é $\approx 8,4407$ Å [79] e com os parâmetros recentemente publicados no literatura. Pequenas variações entre esses valores podem estar relacionadas ao método de síntese, que pode ser afetado pela temperatura e tempo de processamento, taxa de aquecimento e solventes. Além disso, essas variáveis podem aumentar ou reduzir a ocorrência de defeitos eletrônicos como as vacâncias de oxigênio. Além do refinamento, foi alcançado o tamanho de cristalito (d) calculado pela equação de Debye Scherrer e o valor observado foi de 10,42 nm. Observa-se que os valores obtidos para os parâmetros de rede são consistentes com a ficha catalográfica e estão de acordo com os valores citados na literatura. Os defeitos causam um aumento da energia da superfície e podem levar ao encolhimento dos parâmetros de rede [80]. Além disso, também foi relatada uma diminuição no parâmetro de rede das ferritas com maior grau de inversão dos cátions [81]. O parâmetro de rede relativamente menor pode refletir essa tendência, conforme discutido mais adiante no contexto das medidas magnéticas.

6.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho (Figura 40) permitiu mostrar os espectros FT-IR de pós de ZnFe₂O₄ cristalinos derivados da reação hidrotérmica. A banda larga a 3000-3600 cm⁻¹ é o resultado do alongamento antissimétrico e simétrico dos grupos de ligação H₂O e OH⁻¹, enquanto uma banda a 1630 cm⁻¹ corresponde às vibrações de flexão de H₂O. Especificamente, picos de absorção fortes a 400-600 cm⁻¹ são atribuídos à vibração de estiramento e flexão da ligação Fe-O que é característica dos grupos octaédricos de FeO₆. A formação de uma estrutura cristalina pode ser confirmada pela presença da banda de metal-oxigênio. A água residual e os grupos hidroxí são usualmente detectados nas amostras cultivadas e é necessário tratamento térmico adicional para a sua eliminação (pela evaporação,

por exemplo). É bem conhecido que a hidroxilação de íons metálicos e a desprotonação podem ser aceleradas aumentando a temperatura ou a pressão da solução. No processamento de micro-ondas hidrotermal, a radiação eletromagnética de alta frequência interage com o dipolo permanente do líquido (H_2O) que inicia o aquecimento rápido a partir da rotação molecular resultante, e dipolos permanentes ou induzidos na fase dispersa causam aquecimento rápido das partículas, o que resulta em uma temperatura de reação superior à temperatura de superaquecimento localizada no líquido envolvente. Das duas bandas, a banda de alta frequência (ν_1) é atribuída à ligação tetraédrica metal-oxigênio e a segunda frequência (ν_2) à ligação octaédrica metal-oxigênio correspondente a: (1) vibração de alongamento $\text{Me}_\text{T}\text{-O-Me}_\text{O}$ $600\text{-}550\text{ cm}^{-1}$ (2) $\text{Me}_\text{O}\leftrightarrow\text{O}$ vibração de estiramento $450\text{-}385\text{ cm}^{-1}$ aqui O é oxigênio, Me_O é metal no sítio octaédrico e Me_T no sítio tetraédrico. As bandas de absorção de metal-oxigênio (1) e (2) são pronunciadas para todas as estruturas de espinélio e essencialmente para ferritas, que também são vistas nestas amostras. Os dados espectrais de FT-IR revelam dois picos na extensão de $578\text{-}564\text{ cm}^{-1}$ e $472\text{-}443\text{ cm}^{-1}$ que estão de acordo com o valor relatado. Bandas características de traços de carbonato poderiam ser atribuídas ao contato da amostra com o ambiente próximo de 1500 cm^{-1} [82].

Figura 40 - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier da ZnFe_2O_4 .



Fonte: Autoria própria.

6.3.3 Espectroscopia de Espalhamento Raman

A técnica de espectroscopia Raman provou ser extremamente importante para identificar estruturas locais. Nesse caso, os espectros Raman de nanopartículas de ferrita de

zinco obtidas pela via hidrotérmica mostrada na Figura 40. Ao analisar, observamos uma fase de espinélio com estrutura cúbica, pertencente ao grupo espacial Oh7 (Fd-3m). A célula unitária completa contém 56 átomos ($Z = 8$), mas a menor célula Bravais contém 16 átomos ($Z = 2$). Assim, por meio da análise fatorial, os seguintes modos previstos no espinélio ZnFe_2O_4 :

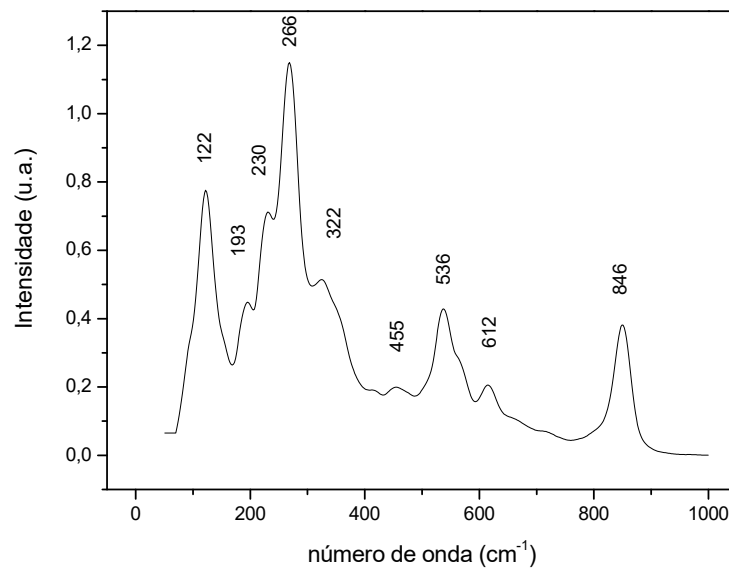
$$A_{1g}(\text{R}) + E_g(\text{R}) + F_{1g} + 3F_{2g}(\text{R}) + 2A_{2u} + 2E_u + 4F_{1u}(\text{IR}) + 2F_{2u}$$

Observamos 5 modos ativos Raman de primeira ordem (sob condições ambientais), que são: $A_{1g} + E_g + 3F_{2g}$. No caso de espinélio cúbico (como ferrita), modos maiores que 600 cm^{-1} são característicos dos movimentos de oxigênio nos locais tetraédricos (AO4)[83]. Assim, o modo de 612 cm^{-1} pode ser considerado até certo ponto como simetria de A_{1g} . Para modos de baixa frequência, eles representam as características do local octaédrico (BO_6).

Os modos de primeira ordem 266, 536 e 846 cm^{-1} podem demonstrar características amplas. No entanto, a ampliação desses modos permanece incerta. Provavelmente, a rápida organização do pó de ferrita de zinco processada hidrotérmicamente assistida por micro-ondas pode ser justificada pelo aquecimento que ocorre internamente em direção à superfície. A interação entre moléculas e átomos com o campo eletromagnético transforma a energia de micro-ondas em calor. Essa interação causa aquecimento volumétrico e interno, gerando gradientes de temperatura e, conseqüentemente, fluxos de calor [84].

Finalmente, os resultados do Raman são consistentes com os resultados obtidos nos raios X. As pequenas variações observadas provavelmente estão relacionadas ao método de preparação, tamanho médio do cristal e / ou grau de ordem estrutural. A difração de raios X exhibe uma estrutura ligeiramente invertida [85] o que implica que uma certa quantidade de desordem dos cátions Zn e Fe ocorre nos sítios tetraédricos e octaédricos. Portanto, as vibrações relacionadas a esses dois tipos de cátions no mesmo local podem exibir dois modos Raman de primeira ordem separados. Se os dois modos tiverem frequências vibracionais muito próximas, deve-se observar um pico amplo sobreposto com seu valor médio. Na estrutura espinélio da ZnFe_2O_4 levemente invertida, os íons Zn e Fe se distribuem no mesmo local de cristal atômico, tanto o tetraédrico quanto o octaedro, e resultam nas vibrações correspondentes com frequências diferentes. Como essas duas vibrações têm comprimentos de onda muito próximos, os três modos de espalhamento Raman são de primeira ordem, como observados na Figura 41 da ZnFe_2O_4 .

Figura 41 - Espectroscopia Raman de nanopartículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas via hidrotermal micro-ondas.



Fonte: Autoria própria.

6.3.4 Isotermas de Adsorção

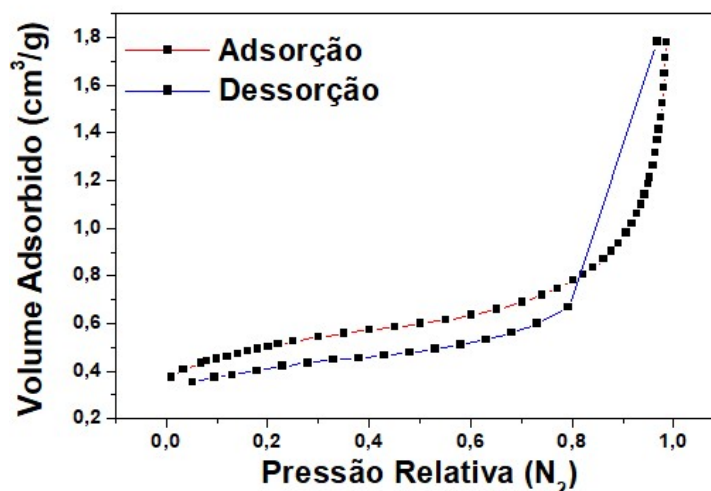
Ao observar a isoterma de adsorção, ilustradas na Figura 42, é possível verificar pouca diferença na porosidade das partículas em função da morfologia heterogênea. Considerando a classificação das isotermas segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) pode-se identificar para estes pós, um comportamento de isotermas do tipo III. Estas isotermas são marcadas essencialmente por um grande volume de gás adsorvido a altas pressões relativas. Isotermas do tipo III são comuns em materiais sinterizados, com calor de adsorção praticamente nulos, envolvendo pequeno volume de gás, e baixa área específica [86-87].

Pelo conceito de “isotermo padrão” é possível verificar a existência e a distribuição de tamanho de poros, por meio da relação entre a espessura da camada gasosa adsorvida (t) e a pressão relativa p/p_0 . Para sólidos não porosos observa-se uma variação linear de t com o volume, V , de gás adsorvido:

$$t = e \cdot V/V_M$$

Onde e é a espessura estatística de uma camada molecular de gás.

Figura 42 - Isotermas de adsorção e dessorção de N_2 de nanopartículas de $ZnFe_2O_4$ sintetizadas via hidrotermal micro-ondas.



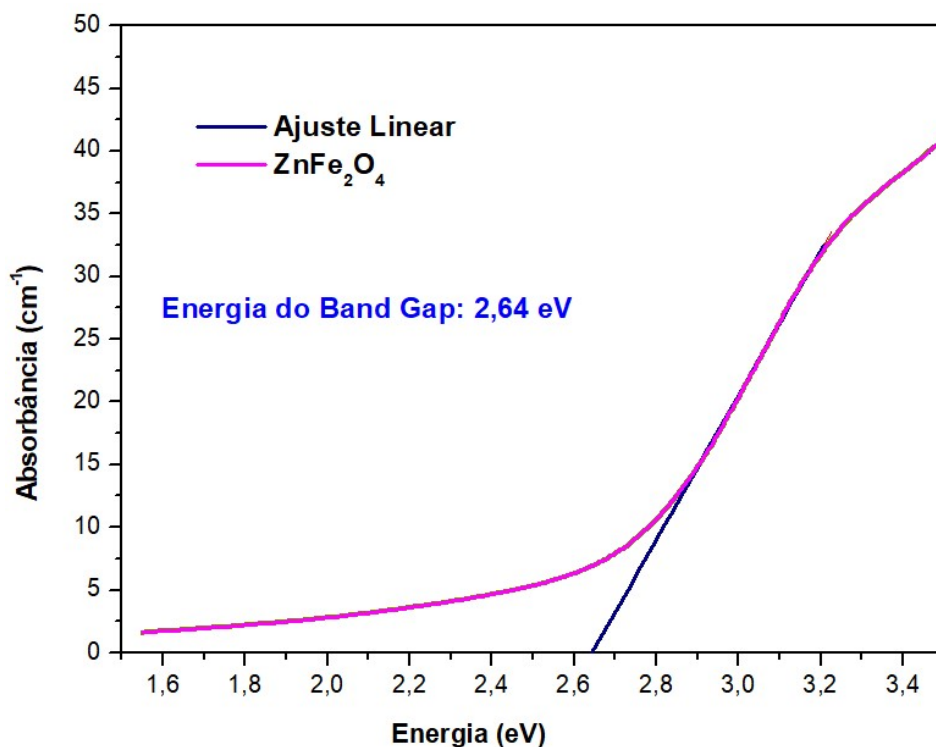
Fonte: Autoria própria.

6.3.5 Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Para obter informações sobre a relevância entre a morfologia e o band gap, recorreremos à espectroscopia UV-Vis, pois a absorvância óptica está relacionada à estrutura eletrônica e, portanto, é o fator principal para determinar o band gap óptico. A Figura 43 mostra o gráfico de Tauc para as nanopartículas de $ZnFe_2O_4$, juntamente com o respectivo intervalo de energia. O band gap é determinado pela região linear do gráfico e, pelo aspecto seu aspecto, revela uma estrutura de band gap não uniforme com níveis intermediários de energia entre as bandas de valência e de condução.

A $ZnFe_2O_4$ possui uma transição mais ampla, provavelmente indicando níveis mais intermediários de energia entre as bandas. O band gap corresponde à diferença de energia entre o nível de energia mais alto da banda de valência (E_v) e o nível de energia mais baixo da banda de condução (E_c).

Figura 43 - UV-Visível de nanopartículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas via hidrotermal assistido por micro-ondas.



Fonte: Autoria própria.

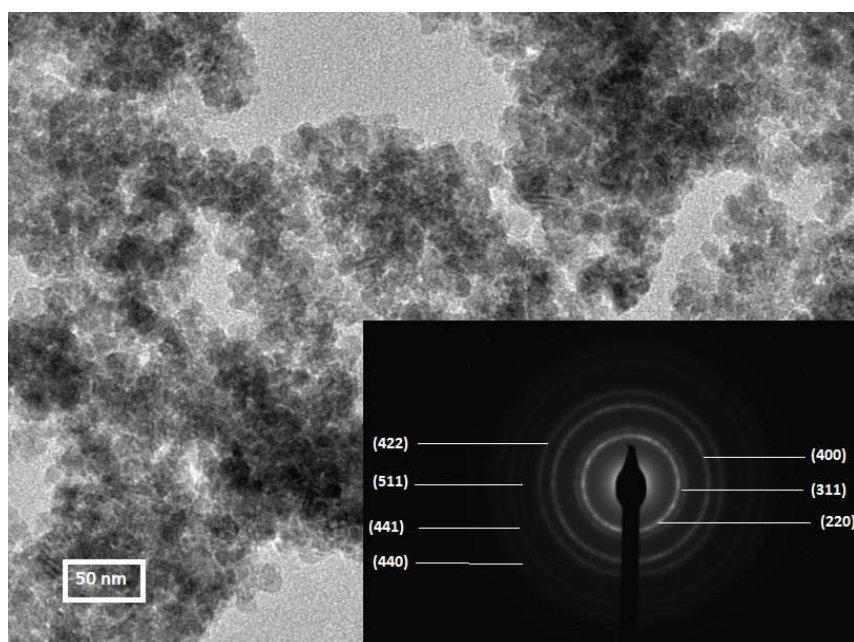
As bandas de energia do ZnFe_2O_4 podem ser explicadas considerando que a parte superior da banda de valência consiste principalmente nos estados de Zn-3d, Fe-3d e O-2p, enquanto a parte inferior da banda de condução é contribuída pelo estado Fe-3d juntamente com o estado O-2p, o que é consistente com o resultado de Yao et al. [88]. A transição direta de elétrons no *band gap*, portanto, deve ser principalmente de O-2p para Fe-3d. Ferritas com absorção na região visível é legitimada pela excitação de elétrons do estado O-2p para o estado Fe-3d. O desvio para o vermelho demonstra a diferença de energia da amostra (por exemplo, 2,6 eV) e, portanto, a configuração é em nanopartícula, enquanto que no bulk a diferença de banda do material é de 1,9 eV. Embora o *band gap* seja afetado por diversos fatores, como a presença de impurezas, tamanho de cristalitos e parâmetros estruturais, no nosso caso, o pH desempenha um papel vital no controle de todos esses parâmetros acima [89].

6.3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A imagem de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de ZnFe_2O_4 é apresentada na Figura 44. As nanopartículas de ZnFe_2O_4 são esféricas, monodispersas, com tamanho médio de 11 a 13 nm e quase não possuem agregação, com uma distribuição homogênea de tamanho, conforme apresentado na Figura 45. O padrão correspondente de Difração de Elétrons de Áreas Seleccionadas (SAED) indica alta cristalinidade das nanopartículas sintetizadas.

Esses anéis podem ser indexados para (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1), (4 4 1) e (4 4 0) planos da ferrita de zinco com espinélio cúbico. Pode-se observar que a posição de todos os picos característicos combina bem com a amostra padrão de ZnFe_2O_4 [JCPDS-73-1963]. Os picos de difração são intensos e nítidos, confirmando que a ZnFe_2O_4 sintetizada é bem cristalina. Todos os círculos de difração pertencem à estrutura do tipo espinélio, confirmando que o produto é ZnFe_2O_4 , o que é consistente com o resultado de raios X. Os círculos de difração são compostos por muitos pontos brilhantes, sugerindo que as partículas são muito pequenas e com estrutura cristalina bem ordenada. O cristalino perfeito é induzido principalmente pelo efeito de aquecimento da radiação eletromagnética do microondas que faz com que os átomos, inclusive os que estão em ponte, se organizem.

Figura 44 - MET de Alta Resolução de nanopartículas de ZnFe_2O_4 e, inserido, mostra a imagem de difração de área selecionada de nanopartículas de ZnFe_2O_4 .



Fonte: Autoria própria.

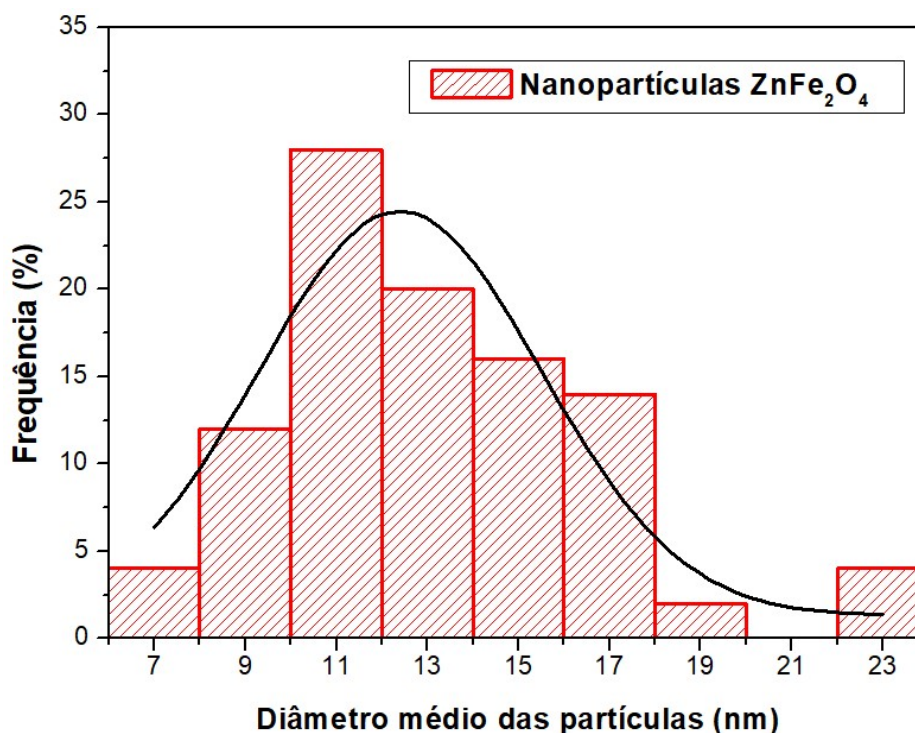
A alta pureza da fase ZnFe_2O_4 e a boa cristalinidade, demonstram que a estrutura - obtida por condições hidrotérmicas apresenta uma ordem ou periodicidade de longo alcance (estrutura completamente ordenada). O processo hidrotermal assistido por microondas mostrou eficiência para desidratar a água adsorvida e diminuir o efeito da ligação de hidrogênio, deixando pouco aglomerado de ferrita de zinco. Alternativamente, como a solução foi mantida básica, ocorre a cristalização do gel amorfo através de uma precipitação por dissolução, porque a solubilidade do hidróxido de zinco é muito alta em solução básica forte. Esse comportamento indica que as nanopartículas de ZnFe_2O_4 mostrou uma quantidade menor de água nas superfícies das partículas, de modo que as ligações de hidrogênio não podem ser formadas entre as partículas que se aproximam.

No processo de aquecimento por microondas, a introdução da radiação eletromagnética oferece vantagens significativas sobre o método de aquecimento convencional. Além disso, o aquecimento rápido sob condições hidrotérmicas de pressão e temperatura oferece maior mobilidade de íons e moléculas dissolvidos e acelera partículas sólidas a altas velocidades, aumentando a taxa de colisão e a fusão efetiva no ponto de colisão [90-91].

6.3.7 Diâmetro Médio das Partículas

Na Figura 45, podemos ver que o diâmetro da maioria das partículas é de cerca de 11-13 nm, próximo ao tamanho médio de partícula estimado pelos padrões de raios X. Vale ressaltar que as partículas sintetizadas estão bem dispersas. De fato, os pós produzidos pelo método assistido por microondas diretamente não podem impedir a agregação sem a ajuda do agente dispersante ou de qualquer tratamento térmico subsequente [92–95]. Em geral, no processo assistido por microondas, as partículas menores geralmente devem uma energia superficial mais alta que as torna mais facilmente agregadas uma vez que o campo de microondas é uma união do campo magnético e do campo elétrico, mudando de direção a uma frequência de 2,45 GHz.

Figura 45 - Distribuição do diâmetro médio das partículas.

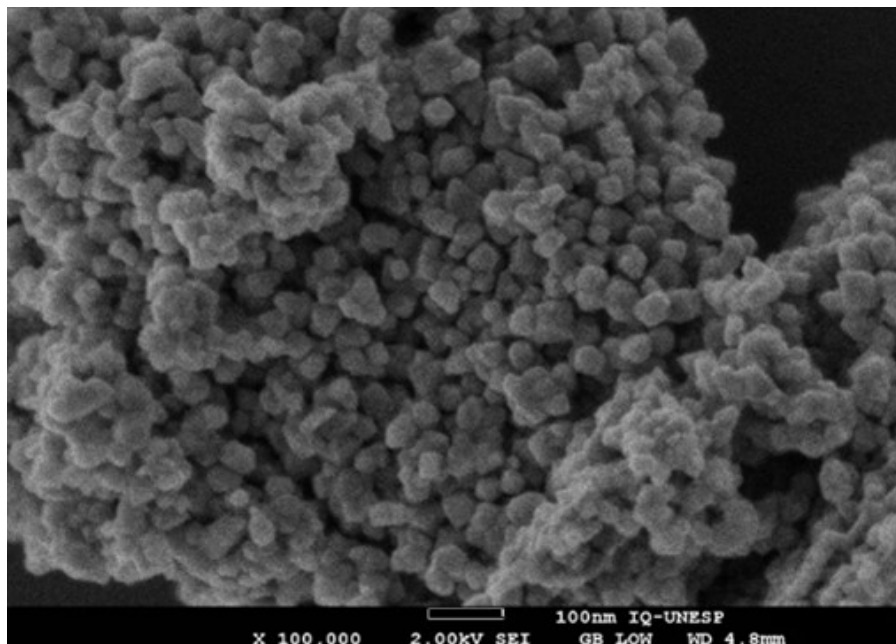


Fonte: Autoria própria.

6.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias de FEG-SEM das nanopartículas de ZnFe_2O_4 são mostradas na Figura 46. O processo de síntese pelo método hidrotérmal assistido por microondas acelera a cristalização, o que leva à formação de material a baixa temperatura e a um curto tempo de reação. Embora a aglomeração em ferrita ocorra porque as partículas primárias possuem alta energia superficial e, portanto, um estado estável é alcançado por agregação, no nosso caso, observa-se uma agregação fraca entre as partículas, indicando que os precursores foram transformados em ZnFe_2O_4 após o tratamento hidrotérmico e as forças de Van der Waals foram reduzidas. Durante o tratamento hidrotérmico, os hidróxidos de Zn^{2+} e Fe^{3+} foram dissolvidos a altas temperaturas e pressões, e depois precipitados como partículas insolúveis de óxido no fluido hidrotérmico supersaturado.

Figura 46 - Partículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas a 140°C por 32 minutos usando o método hidrotérmico assistido por micro-ondas.



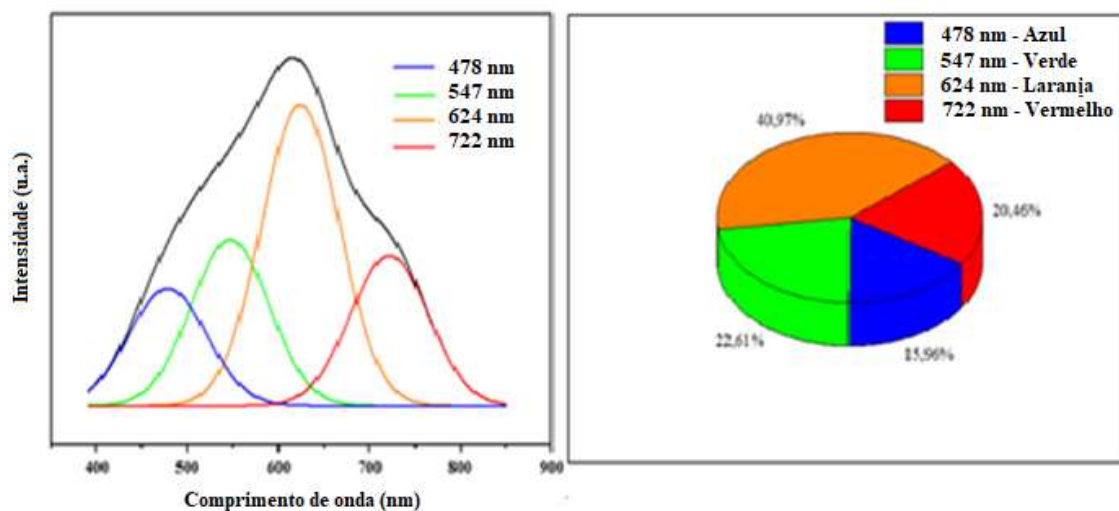
Fonte: Autoria própria.

Além disso, a distribuição apresentada evidencia um aspecto homogêneo com pontos de aglomerações. A presença de aglomerações deve-se ao método de síntese, portanto, pode-se justificar pela ação das Forças de Van der Waals. Embora a imagem apresente uma certa variação com relação a distribuição do tamanho do diâmetro médio, os valores obtidos estão em torno de 11 a 13 nm. A importância de se obter partículas em escala nano, no caso, é devido sua grande vantagem para aplicações magnéticas, pois partículas menores têm uma área de superfície maior e são de grande importância para uma melhor interação das moléculas no meio líquido.

6.3.9 Fotoluminescência (PL)

Para melhor entender a natureza dos defeitos, juntamente com sua influência no comportamento magnético da ZnFe_2O_4 , a resposta fotoluminescente foi medida (Figura 47).

Figura 47 - Espectros de fotoluminescência à temperatura ambiente de nanopartículas de ZnFe_2O_4 sintetizadas a 140°C por 32 minutos usando o método hidrotérmico assistido por micro-ondas.



Fonte: Autoria própria.

Os espectros de fotoluminescência a temperatura ambiente da amostra de ZnFe_2O_4 foram medidos usando um Cobolt/Zouk de 355 nm como fonte de excitação, Figura 48. A síntese hidrotérmica pode intensificar a dinâmica da transferência de carga e a formação de dipolos permanentes, modificando as propriedades fotoluminescentes desse óxido. Geralmente, a emissão para óxidos semicondutores está relacionada a defeitos na rede cristalina, principalmente com a presença de vacâncias de oxigênio, causando transferência de carga devido à presença de níveis energéticos adicionais na região do *band gap* [96-98].

Os defeitos são classificados de acordo com os níveis de energia criados entre a banda de valência (BV) e a banda de condução (BC). Defeitos rasos são aqueles localizados perto de BV e BC, causando emissões na região mais energética, azul [99]. Defeitos profundos estão nos níveis de energia mais distantes de BV e BC, resultando em emissão em regiões menos energéticas, vermelho [100]. A partir de nossos resultados, podemos observar uma forte preferência pela região laranja-esverdeado (547-624 nm), que está associada ao aumento de defeitos superficiais. Esses resultados indicam que o estado de desordem dos aglomerados na estrutura tende a manter a presença de vacâncias de oxigênio monoionizadas, $\text{VO}^\bullet$, características de defeitos rasos [101-102]. A radiação de microondas pode afetar a formação de defeitos superficiais nos quais a interação de elétrons e fônons no local da rede pode levar ao auto-aprisionamento. Em tal situação, os elétrons polarizam suas moléculas vizinhas e ficam presos em poços de potenciais auto-induzidos, devido ao campo de polarização gerado pelos elétrons em movimento transportados pela rede.

O tratamento realizado no microondas forneceu energia a um grande número de elétrons que estavam facilmente disponíveis para condução, alterando assim o comportamento da fotoluminescência. Alguns elétrons, que são excitados no processo fotoluminescente, absorvem a energia dos fótons ($h\nu$) e são promovidos dos estados de oxigênio 2p para o ferro 3d, favorecendo a formação de níveis intermediários de energia no intervalo do band gap [103]. Algo que deve ser considerado é que a emissão azul é menos pronunciada devido à diminuição das cargas auto-aprisionadas, menor interação entre elétron e buraco e recombinação doador-receptor. Portanto, todo o sistema será caracterizado por uma distribuição de defeitos profundos e rasos, atribuídos principalmente a vacâncias de oxigênio monoionizadas, $\text{VO}^\bullet$.

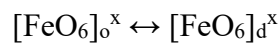
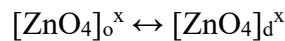
O espectro da amostra de ZnFe_2O_4 exibe uma “banda-larga” que se origina dos estados de defeito existentes extensivamente entre a recombinação direta de elétrons nas bandas de condução de Zn 4p, Fe 3d com orifícios na banda de valência O 2p. Esses defeitos possivelmente atuam como centros de recombinação radiativa para elétrons inicialmente excitados da banda de valência para as bandas 4p e Fe3d do Zn e Fe, respectivamente. A “banda-larga” é típica da desordem estrutural na rede e indica que, no decaimento radioativo, ocorre um processo multifotônico, ou seja, a emissão ocorre por várias rotas, relacionando estados dentro da banda proibida, originados por defeitos intrínsecos [104-105].

Os estados de defeito no gap proibido (mobilidade) podem atuar como armadilhas de elétrons, dependendo de seus estados de ocupação. A introdução de níveis quase-Fermi para elétrons presos permitem a classificação dos estados de aprisionamento como armadilhas rasas ou profundas. O envolvimento dos estados de elétrons no processo de reação diminui com o aumento da energia do nível quase-Fermi para elétrons presos até a borda da banda de condução ou com a diminuição da energia do nível quase-Fermi para buracos presos até o topo da banda de valência. Os elétrons livres que caírem em um desses estados de captura serão reemitidas com alta probabilidade de volta à banda da qual elas vieram. Esses estados estão vazios e geralmente são denominados estados rasos.

Evidentemente, a temperatura do estabelecimento do grau de ocupação determinará se ele atua como uma armadilha rasa. Usa-se essa definição de um estado de captura superficial como “estatístico” em contraste com a distinção entre estados de captura superficial e profunda fornecida por argumentos físicos, a saber, que as armadilhas rasas são caracterizadas por uma energia de ionização muito pequena, da ordem das energias dos fônons. Armadilhas profundas são aquelas cuja energia de ionização é muitas vezes a do fônon e, conseqüentemente, a captura de transportadora livre pode envolver transições multifônicas.

Razoavelmente, a temperaturas acima de vários graus Kelvin, os estados de captura rasos estão vazios; nesse caso, as duas definições de armadilhas rasas são idênticas.

Por outro lado, em temperaturas elevadas, os estados de aprisionamento profundo podem se transformar em armadilhas rasas "estatisticamente". Esse tipo de defeito pode ser observado pela técnica de fotoluminescência [106]. Então, as espécies $[\text{ZnO}_4]_{\text{o}}^{\text{x}}$, $[\text{ZnO}_4]_{\text{d}}^{\text{x}}$, $[\text{FeO}_6]_{\text{o}}^{\text{x}}$, $[\text{FeO}_6]_{\text{d}}^{\text{x}}$, correspondem à ordem e desordem estrutural, respectivamente, que podem ser designadas como armadilhas rasas e são visíveis em altas energias.

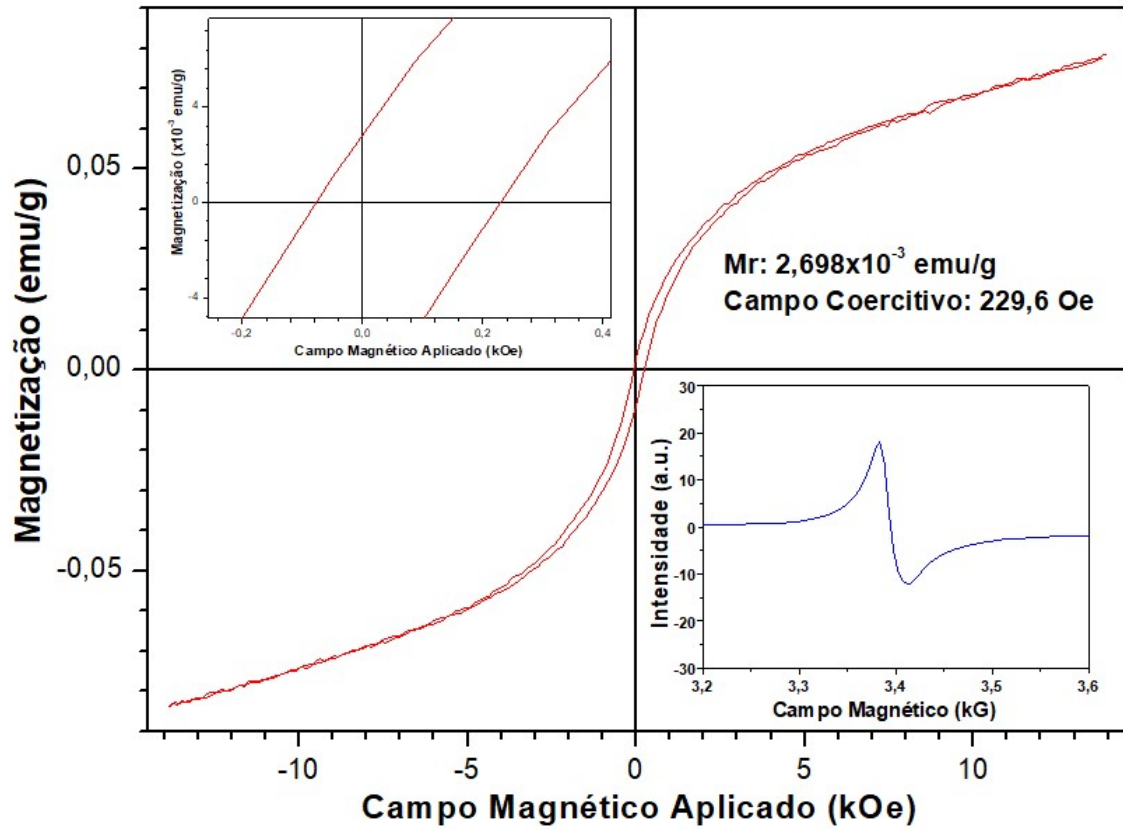


Um sistema organizado significa que possui a máxima simetria, ou seja, uma distribuição homogênea da densidade de elétrons. Por outro lado, um sistema desordenado tem uma distribuição eletrônica não homogênea devido à variação da ligação ou ângulo de ligação, ou polarização devido a aglomerados vizinhos.

6.3.10 Comportamento Magnético

A curva de histerese magnética (dependência entre M-H) foi medida utilizando o magnetômetro de amostra vibratória (VSM). A Figura 48 mostra a curva de histerese das nanopartículas de ZnFe_2O_4 registradas à temperatura ambiente.

Figura 48 - Curva M-H da nanopartícula de ZnFe_2O_4 sintetizada a 140°C por 32 minutos usando o método hidrotérmico assistido por micro-ondas e, inserido, ilustra os resultados de espectroscopia paramagnética eletrônica do nanopó.



Fonte: Autoria própria.

O comportamento magnético das nanopartículas de ZnFe_2O_4 revelaram um campo coercitivo de 229,6 Oe e a magnetização remanescente (M_r) de $2,698 \times 10^{-3}$ emu/g. Assim, os resultados indicam claramente o comportamento levemente ferromagnético devido ao pequeno tamanho das partículas observadas por MET, estando abaixo de um valor crítico (inferior a 50 nm) [107]. Com um campo magnético aplicado em torno de 14 kOe, o valor observado de magnetização (M_s) é de 0,079 emu/g. A natureza cristalina influencia as propriedades magnéticas das nanopartículas. O campo interno pode ser gerado devido à distribuição assimétrica de vacâncias de oxigênio. Este efeito induz o alinhamento de dipolos complexos e a distribuição assimétrica de vacâncias de oxigênio, isto é; vacâncias de oxigênio positivamente (Vo^{oo}) próximas ao eletrodo negativo que mantém os elétrons próximos ao eletrodo positivo. Os spins dos íons Fe^{3+} são alinhados antiferromagneticamente por meio de uma forte interação de super-troca, pois o ângulo $\text{Fe}^{3+} - \text{O}^{2-} - \text{Fe}^{3+}$ é de 180° . No ZnFe_2O_4 , os íons Fe^{3+} têm um ambiente local octaédrico distorcido e a distorção causa uma inclinação do octaedro na direção do eixo c.

Neste estudo, a magnetização aumentou na medida que o campo magnético foi aplicado, formando um pequeno campo coercitivo, característico dos ferromagnéticos. A curva é típica do tipo de variação ferromagnético (mesmo com um pequeno campo coercitivo) em que a magnetização se aproxima lentamente da saturação. Normalmente, esse composto mostra a natureza paramagnética quando se apresenta no estado de bulk devido à sua estrutura normal de espinélio. No entanto, a troca entre os cátions nos locais octaédrico e tetraédrico pode dar origem à ocorrência de comportamento levemente ferromagnético.

Durante o tratamento hidrotérmico, se as condições de temperatura e pressão forem cuidadosamente mantidas durante o experimento, não será observada a formação de uma segunda fase, como previamente detectado por raios X. Além disso, o processo de agregação aleatória entre as pequenas partículas pode estar relacionado a um aumento nas taxas de colisão efetivas entre pequenas partículas pela radiação de micro-ondas, o que indica que a energia de microondas favorece um crescimento anisotrópico causado pelas diferenças nas energias da superfície nas diferentes faces cristalográficas. Possivelmente, as imperfeições ou diferenças entre a altura e a largura dessas partículas podem estar associadas à influência da energia de microondas durante o processo de crescimento de fase. Nesse contexto, sugerimos que a razão $S = M_r/M_s$ poderia ser usada como um parâmetro funcional para avaliar o limite do tamanho de domínio único dos materiais em pó magnéticos de tamanho nanométrico. É por isso que as nanopartículas obtidas no reator hidrotermal podem ter vários tamanhos de domínio e H_c , M_r , S será diferente de zero.

Uma vez que o campo coercitivo difere de zero e uma curva de histerese aberta é observada em combinação com a magnetização, espera-se que a temperatura de transição ferromagnética esteja acima da temperatura ambiente. É necessário o cuidado com a temperatura devido a mudança de comportamento magnético que pode ser verificado. A temperatura de Curie trata-se de um limite máximo de temperatura que os domínios magnéticos passam a ter uma organização aleatória e, por isso, ocorre a mudança do comportamento magnético. Caso seja superada a temperatura de Curie, o material passa ter um comportamento paramagnético, que não é adequado para aplicação para fins biomédicos. O gráfico inset na Figura 48 ilustra o sinal de EPR (Ressonância Paramagnética Eletrônica) da ZnFe_2O_4 . Em geral, os sinais de EPR podem resultar de espécies de oxigênio adsorvidas em íons de ferro ou de vacâncias preenchidas de oxigênio, que formam um ambiente com diferentes simetrias [108-109]. Os espectros têm um comportamento típico de amostras com elétrons não emparelhados, o que corresponde a apenas um evento de absorção, plotado como sua primeira derivada. O sinal observado, em um campo magnético próximo a $B_0 = 0,3388 \text{ G}$, referente à presença de espécies paramagnéticas como Fe^{3+} , de acordo com relatórios anteriores [110]. O padrão de pico altamente simétrico, característico de um sistema isotrópico, é consistente com a alta simetria observada nos resultados de DRX. O sinal é característico de nenhum acoplamento de estrutura hiperfina, típico de materiais com rotação total $(S) = \frac{1}{2} [111]$ com uma quantidade intrínseca de defeitos em uma estrutura cúbica. O sinal pode ser atribuído às transições de $s = -1/2 \leftrightarrow s = +1/2$ de elétrons não emparelhados de íons Fe^{3+} , que são mais favoráveis em termos energéticos devido a defeitos estruturais [111], como vacâncias de oxigênio localizadas no posições vizinhas mais próximas.

Uma vez que tenhamos um primeiro espectro derivado com a largura das formas de linha idênticas, é razoável considerar uma relação simples da área = $(\text{largura})^2 \times (\text{altura})$ proporcional ao conteúdo de espécies paramagnéticas, conforme indicado por [111]. A detecção por EPR de defeitos complexos em ZnFe_2O_4 foi discutido em muitas publicações por outros compostos [112-113] e refere-se principalmente à linha $g=2$, que é observada do ambiente a temperaturas muito altas, o que não é típico para íons de terras raras, exceto os de estado S. O fator g foi estimado a partir da relação $g = h \cdot f / (B_0 \cdot \beta)$, onde h corresponde à constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34} \text{ J.s}$), f a frequência da radiação (9 GHz), β o magneto de Bohr $9,274 \times 10^{-24} \text{ J/T}$ e B_0 o valor do campo magnético em $y = 0$ (consulte a Tabela 8).

Tabela 8 - Valores medidos retirados do EPR.

Amostra	B₀ (Tesla - T)	Fator-g
ZnFe ₂ O ₄	0,3388	1,897

Fonte: Autoria própria.

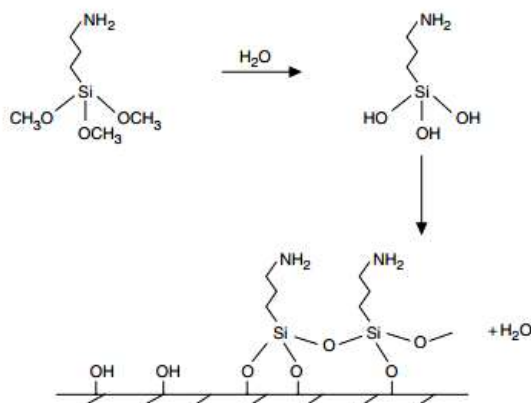
O fator g experimental ($g=1,89$) foi ligeiramente deslocado do valor g teórico=2 da posição do sítio cúbico de Fe^{3+} na estrutura do espinélio cúbico, indicando a existência de acoplamento spin-órbita. Os valores g ligeiramente deslocados podem ser atribuídos a alterações no acoplamento de elétrons das espécies do tipo superóxido de superfície (O_2^-) devido ao aquecimento por microondas que induz mais vacâncias de oxigênio ionizadas, gerando mais espécies de oxigênio ativas na superfície.

6.4 NANOPARTÍCULA FUNCIONALIZADA POR SILANIZAÇÃO

6.4.1 FT-IR da nanopartícula funcionalizada

A reação entre um alcoxissilano (R-Si(OR')_3) e um material sólido não envolve um único mecanismo, e muitos intermediários diferentes são possíveis [93-94]. Nesta etapa da pesquisa, um procedimento de silanização ácida de etanol foi usado para depositar aminopropilalcoxissilano ($\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{Si(OCH}_3)_3$) na superfície das nanopartículas de ferrita de zinco. O mecanismo, como mostra a Figura 49 a seguir, consiste em, primeiramente, colocar o organossilano em solução alcoólica (etanol) de ácido, que atuará como catalizador. Assim, após hidrólise, ocorre condensação para formar o polímero de silano. Na hidrólise, os grupos alcóxido ($-\text{OCH}_3$) são substituídos por hidroxilas ($-\text{OH}$) para formar grupos reativos de silanol, que se condensam com outros grupos silanol para produzir ligações siloxano (Si-O-Si). Como subprodutos dessa etapa, tem-se álcool e água formados. Além disso, ocorre desidratação e adsorção de polímeros de silano para o material cerâmico. É importante salientar que na segunda etapa, o polímero se associa às nanopartículas formando uma ligação covalente com os grupos OH.

Figura 49 - Mecanismo para ocorrer a silanização.

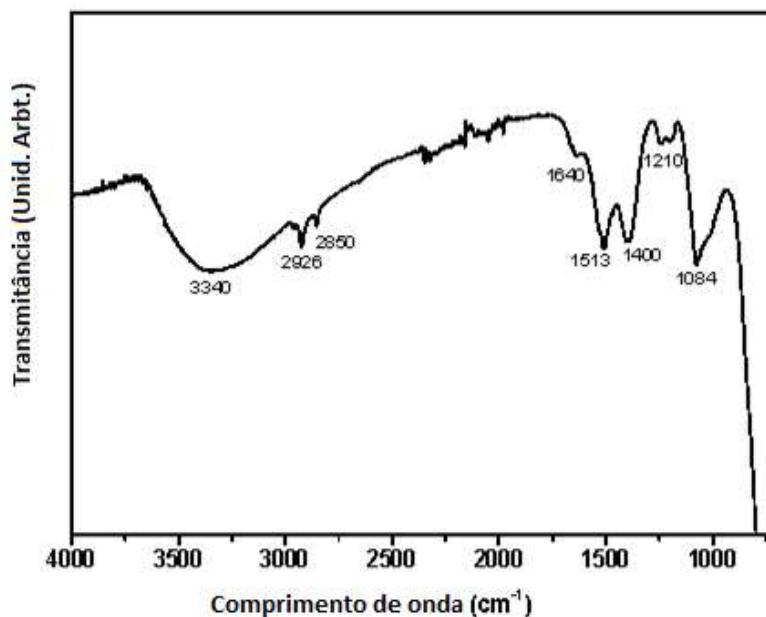


Fonte: Hosni (2014); House (2015).

Basicamente, o que ocorreu foi o processo de funcionalização do substrato cerâmico. A seguir, é apresentado o espectro de infravermelho (FTIR) do material cerâmico e do polímero após funcionalização para comparar com o espectro de FTIR do composto cerâmico sem esse processo.

Afim de confirmar o sucesso do processo de funcionalização, foi obtido o FTIR (Figura 50) da superfície do material cerâmico e das matrizes epóxi/amina. Para essa interação entre polímero e superfície das nanopartículas cerâmica, as bandas que apareceram no FTIR foram cuidadosamente analisadas: bandas de 3610 cm^{-1} a 3670 cm^{-1} atribuídas ao grupo hidroxila – OH. Bandas de 2926 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} associadas às vibrações de estiramento das ligações C-H. Banda associada ao anel cicloalifático a 1400 cm^{-1} . O espectro exibe três bandas de 1513 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} atribuídas ao anel aromático. Bandas a 1470 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} e 2960 cm^{-1} associadas aos grupos metilo e metileno. Uma banda associada ao grupo de éter C-O-C a 1084 cm^{-1} e uma banda a 1210 cm^{-1} correspondendo a éter alifático.

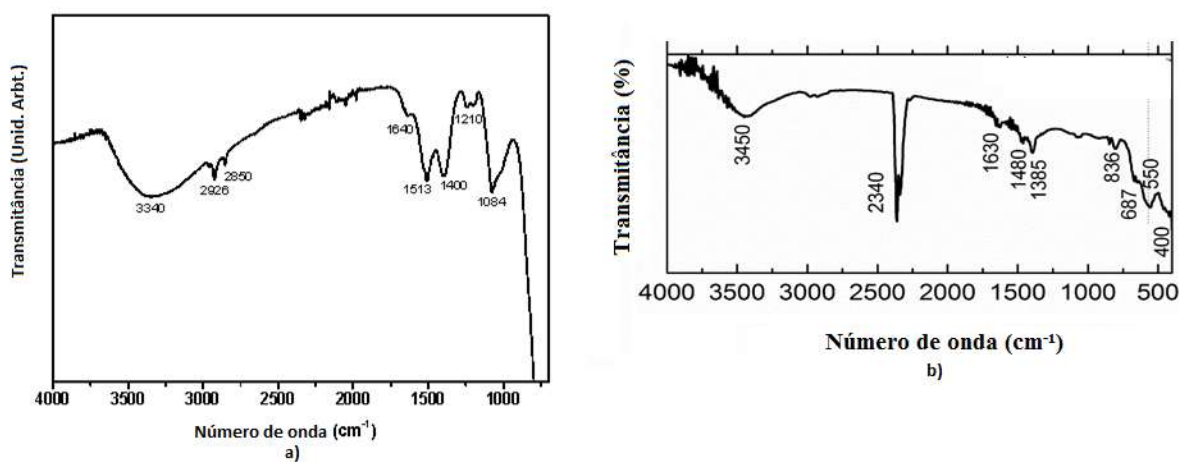
Figura 50 - FTIR da ferrita de zinco após silanização.



Fonte: Autoria própria.

A título de comparação, foi inserido o espectro de FTIR do material cerâmico antes e após a silanização (figura 51a e b). É bom salientar que o objetivo é funcionalizar o polímero e a superfície da cerâmica para analisar a resposta magnética que se obtém e auxiliar no estudo da citotoxicidade. Observa-se que houve uma ligeira alteração, mas de fundamental importância para garantir a propriedade magnética atuante após encapsular e uma boa interação com a matriz polimérica.

Figura 51 - a) Cerâmica após silanização. b) Cerâmica pura.



Fonte: Autoria própria.

6.5 NANOPARTÍCULAS DE ZnFe_2O_4 APÓS ENCAPSULAMENTO

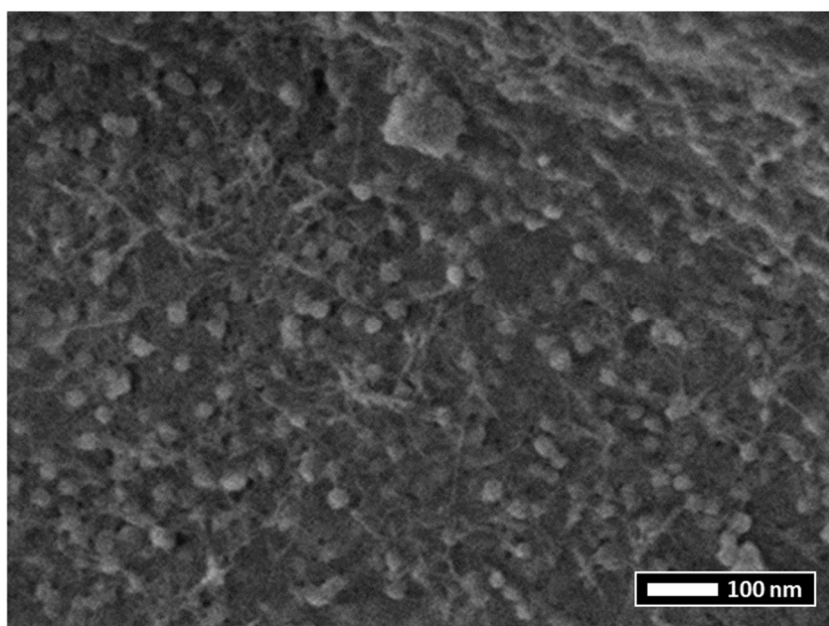
Foi empregado microscopia de varredura de emissão de campo para analisar a morfologia das nanopartículas após o revestimento com PHEMA (Figura 52a). A amostra possui morfologia esférica e o tamanho das partículas varia de 20 a 70 nm (Figura 52b). Este resultado sugere que as nanopartículas se tornaram esféricas após o revestimento com o polímero epóxi. Além disso, embora as nanopartículas tenham se tornado maiores após o encapsulamento, sua distribuição homogênea de tamanho e morfologia esférica é apropriada para uso contra células epiteliais embrionárias de rim humano, uma vez que as veias (ou artérias) presentes em alguns tipos de câncer têm aproximadamente milímetros de diâmetro e atingem os capilares 4 a 16 μm .

Neste trabalho, mostra-se que condições desfavoráveis frequentemente matam até mesmo células cancerosas. Tumores grandes geralmente têm centros necróticos, mas as células tumorais situadas na periferia podem ser mantidas pela difusão de gases e nutrientes dos tecidos normais vizinhos, um problema frequentemente encontrado em tratamentos antiangiogênicos. O uso de um número finito de células, encapsuladas para torná-las isoladas imunologicamente dentro de tumores, exigia que essas células fossem ainda mais resistentes do que as células cancerosas na sobrevivência à hipóxia, pois também seriam necessárias para gastar energia produzindo grandes quantidades de citocinas e sobreviver enquanto o tumor ao redor deles morre. Portanto, como as nanopartículas são menores que os capilares, sua circulação não seria prejudicial e não haveria problemas com impedimentos espaciais causados pelo calibre dos capilares. Para o desenvolvimento dos estudos de biocompatibilidade e mecanismos de morte celular, inicialmente, realizamos a cultura das células HEK. Essa linhagem de células é caracterizada por sua morfologia epitelial, observada por meio de projeções do citoplasma. É indispensável a ocorrência de adesão entre as células, pois é um processo fundamental para o seu desenvolvimento. Além disso, as propriedades aderentes tornam essas células ideais para cultivo em laboratório, pois permitem a adesão entre as células e a superfície das placas de cultura.

O objetivo dos estudos de citotoxicidade foi avaliar o potencial tóxico em cultura de células HEK das nanopartículas sintetizadas. O primeiro teste consistiu na utilização de um kit de reagentes (FVS450) que permite diferenciar células viáveis de células mortas. Este fluorocromo (FVS450) reage e se liga covalentemente às aminas presentes no meio intracelular ou na superfície das células. Células em necrose apresentam permeabilidade celular alterada, o que favorece a difusão do corante em seu meio intracelular e,

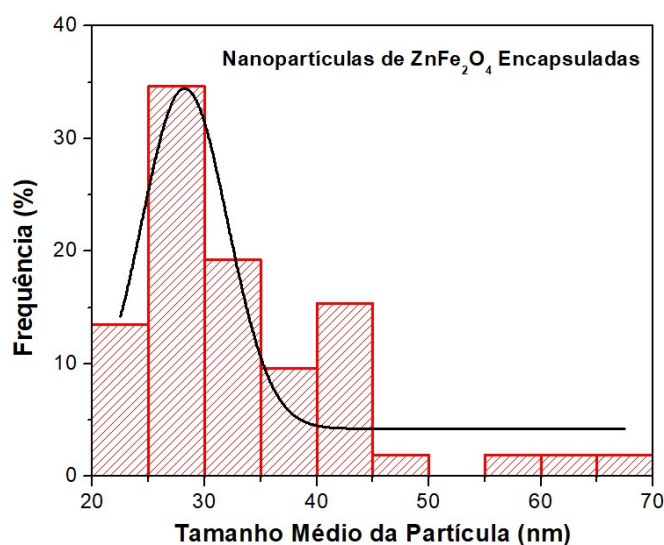
consequentemente, maior taxa de ligação às aminas intracelulares de células em morte celular do que de células impermeáveis viáveis. As células em processo de morte celular têm uma intensidade de fluorescência de 2 a 3 ordens de magnitude maior em comparação com as células viáveis. A biocompatibilidade de três concentrações de nanopartículas de ferrita de zinco em cultura de células HEK foi monitorada usando microscopia óptica (Figuras 53 c-e).

Figura 52 - FEG-SEM das nanopartículas de ZnFe_2O_4 silanizadas com grupos organossilano e encapsuladas em resina epóxi/amina.



Fonte: Autoria própria.

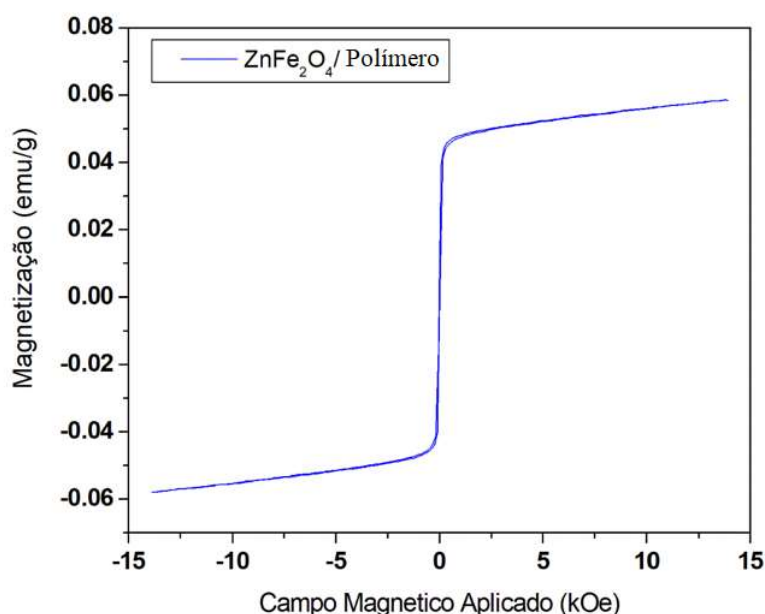
Figura 53 - Histograma do diâmetro médio das nanopartículas de ZnFe_2O_4 encapsuladas.



Fonte: Autoria própria.

Como eram esperadas, as propriedades magnéticas das cerâmicas revestidas não foram alteradas pelo revestimento, devido ao fato de que o material polimérico a base de polímeros epóxi, não possuem nenhuma propriedade magnética. Os mesmos valores de M_s , M_r e H_c , foram encontrados (Figura 54).

Figura 54 - Curva M-H da nanopartícula de $ZnFe_2O_4$ sintetizada a $140^\circ C$ por 32 minutos usando o método hidrotérmico assistido por micro-ondas, após o revestimento DGEBA/IPD.



Fonte: Autoria própria.

6.6 CÉLULAS HEK

Para verificar as alterações na morfologia celular e a presença de células mortas, primeiramente, as placas de cultura devidamente tratadas foram submetidas à análise de viabilidade celular por observação direta ao microscópio óptico. A Figura 56 ilustra a micrografia dos poços das placas de cultura contendo células HEK submetidas a diferentes tratamentos. A figura 56a mostra o grupo de controle negativo usado para preparar as suspensões de nanopartículas de ferrita de zinco, onde as células foram tratadas com o solvente PBS. Observa-se a coexistência de células HEK aderidas ao fundo da placa de cultura (seta vermelha) com morfologia epitelial normal e células HEK não aderentes (seta branca). Neste trabalho, a linhagem de células possui morfologia epitelial (observada por meio de projeções de seu citoplasma) e, conseqüentemente, propriedades aderentes. Portanto, aderem à superfície das placas de cultura e, após atingirem o crescimento adequado, aderem

intimamente entre si. A seguir, a Figura 48a representa as células HEK em processo de crescimento na placa de cultura, naturalmente, com equilíbrio entre as células que conseguiram aderir a apresentar morfologia epitelial normal e outros sobrenadantes no meio de cultura, devido ao estresse mecânico causado pela a transferência de células de um frasco de cultura para uma placa de cultura [114].

Na Figura 56b, também é possível observar o grupo controle positivo, onde as células foram tratadas com um solvente citotóxico, DMSO [115]. Nesta imagem, observa-se o predomínio de células mortas (seta branca), que apresentam alteração significativa em sua morfologia quando comparadas às células vivas com formato epitelial (Figura 55a), sendo também notada a presença de fragmentos celulares (seta vermelha). A cor do meio de cultura é outra diferença clara entre a imagem que representa as células viáveis (Figura 55a, controle negativo) e a imagem que representa as células mortas (Figura 55b, controle positivo), de modo que a primeira (Figura 55a) tem um a cor verde clara, enquanto a segunda tem uma cor verde mais escura. A mudança de cor do meio de cultura utilizado nos testes de viabilidade celular deve-se à presença de um indicador de pH. Culturas celulares contendo células com crescimento normal apresentam alterações da coloração verde escura para tons mais claros, passando pelo vermelho em pH próximo a 7, pois as células consomem os nutrientes do meio e nele liberam seus metabólitos também devido à liberação do conteúdo citoplasmático das células, rico em proteínas metabólicas, principalmente, como visto na figura 55e. As figuras 55c, 55d e 55e representam células HEK tratadas com nanopartículas de ferrita de zinco em concentrações de 1,0, 10 e 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente.

Nota-se a coexistência de células normais aderidas e células sobrenadantes. Comparando essas imagens com a figura 55b (controle positivo), não foi observado células mortas ou fragmentos celulares de forma significativa. Assim, a análise da viabilidade celular por meio da observação direta com o auxílio de microscópio óptico sugere a ausência de citotoxicidade para nanopartículas nas concentrações de 1,0, 10 e 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ contra células HEK, uma vez que não foram observadas alterações significativas na morfologia celular. A partir desses resultados, e considerando a morfologia das nanopartículas de ferrita de zinco, pode-se apontar que a interação das nanopartículas com células de diferentes tecidos de organismos vivos é diretamente influenciada por suas propriedades físicas e químicas, como composição, estrutura cristalina, tamanho, carga superficial, propriedades elétricas, pKa, grau de ionização, entre outros. Uma vez presentes na circulação sanguínea, as nanopartículas podem interagir com várias macromoléculas presentes no plasma sanguíneo (como as proteínas plasmáticas) e com macromoléculas que são constituintes das células (como

receptores, DNA, entre outros). Além disso, a interação entre as nanopartículas e essas macromoléculas depende de fatores relacionados ao organismo, entre os quais espécies, fatores genéticos, fatores imunológicos, estado nutricional, sexo, estado hormonal, idade, massa corporal, estado emocional, estado patológico.

Figura 55 - a) Células HEK, 48 horas após a inoculação com PBS (controle negativo); (b) DMSO (controle positivo); (c) 1,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$, (d) 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$, e (e) 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de nanopartículas de ZnFe_2O_4 ; Setas vermelhas indicam células HEK aderidas ao fundo da placa.

(continua)

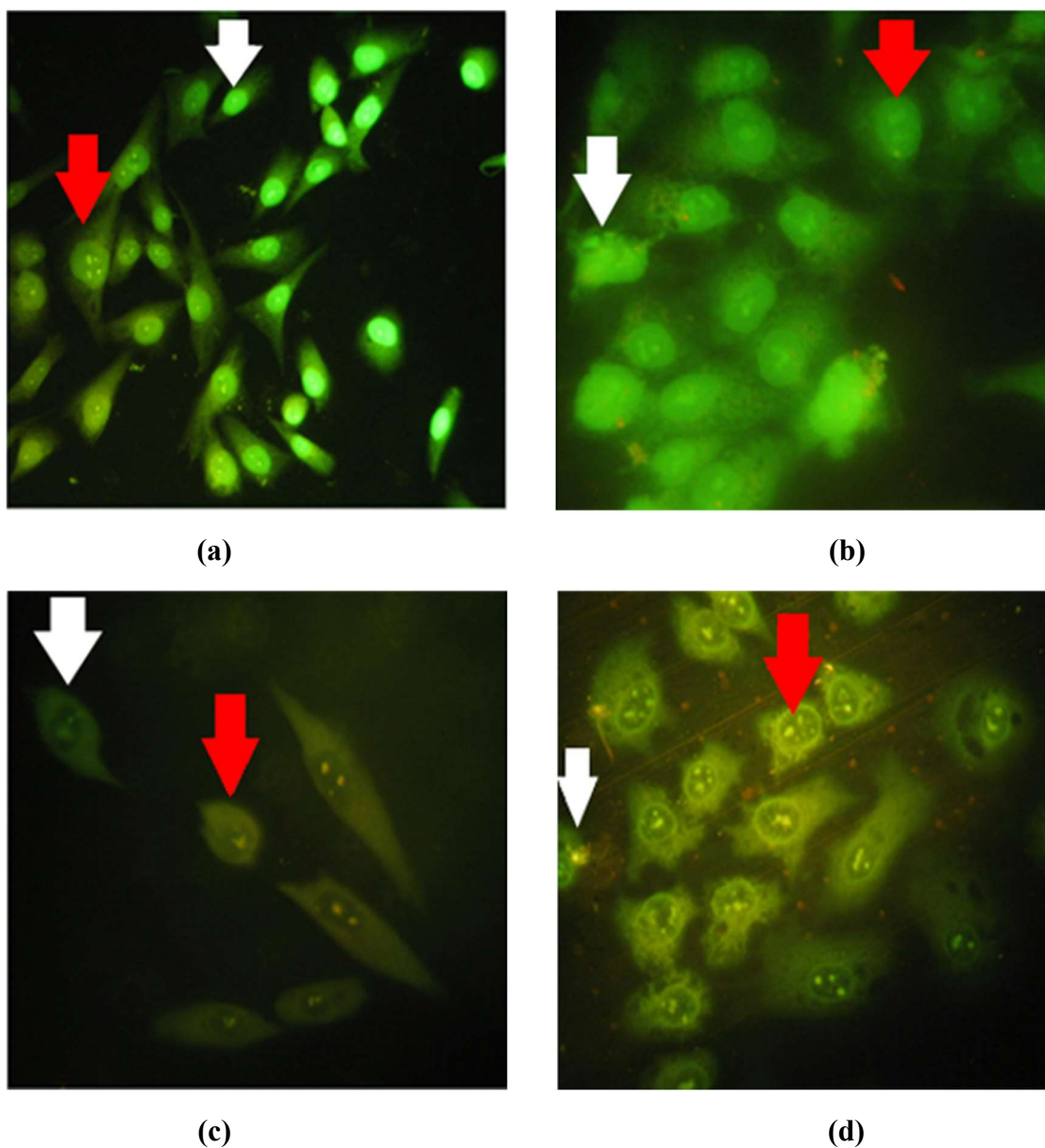
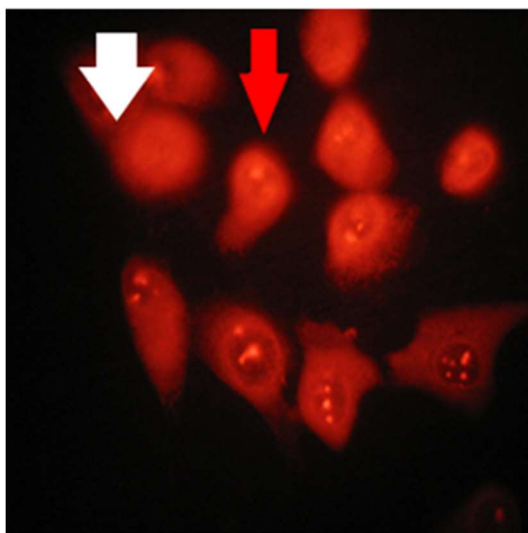


Figura 56 - a) Células HEK, 48 horas após a inoculação com PBS (controle negativo); (b) DMSO (controle positivo); (c) 1,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$, (d) 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$, e (e) 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de nanopartículas de ZnFe_2O_4 ; Setas vermelhas indicam células HEK aderidas ao fundo da placa.

(conclusão)



(e)

Fonte: Autoria própria.

7 CONCLUSÃO

Nesse trabalho observou-se que as formulações epoxidicas estudadas para revestimento das nanopartículas, ficou evidenciada pelos resultados de FT-IR e DSC que, com o programa de cura utilizado, todos os materiais alcançaram alta conversão.

Os resultados das interações biológicas *in vitro* entre a superfície dos materiais com o sangue mostraram alta adsorção de albumina e baixa adsorção de fibrinogênio, assim como a supressão de ativação de plaquetas, atividade do Lactato Desidrogenase (LDH) e boas propriedades de tromborresistência para os materiais DGEBA/IPD e DGEBA/3DCM, indicando que estes materiais são promissores para aplicações biomédicas.

O estudo das citotoxicidade *in vitro* das amostras DGEBA/IPD, DGBA/DCM e DGBA/IPDG apresentam boas propriedades biocompatíveis em contato direto com células MG63 e não revelaram qualquer diminuição da viabilidade de células semelhantes a osteoblastos.

Os espectros de FT-IR das cerâmicas silanizadas mostram bandas de absorção a 920 cm^{-1} e 870 cm^{-1} indicando a presença de grupos Si-O-H e vibrações de OH na superfície das cerâmicas. As duas bandas largas a 3500 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , também confirmam a silanização, pois revelam a presença dos grupos N-H e NH_2 do grupo NH_2 livre, respectivamente.

Quanto aos espectros FT-IR das cerâmicas revestidas, aparecem as bandas vibracionais de adsorção em boa concordância com a literatura para o Éter Diglicidílico do Bisfenol A (DGEBA) ligado a compostos com grupos amina alifática.

A síntese das nanopartículas pelo método hidrotermal, a 140°C e 32 minutos permitiu a obtenção de pós de ZnFe_2O_4 na presença do agente mineralizador KOH.

Dados de Espalhamento Raman de primeira ordem indicam a formação de uma estrutura tipo espinélio de ZnFe_2O_4 levemente invertido, onde os íons Zn e Fe se distribuem no mesmo local do cristal atômico, tanto o tetraédrico quanto o octaedro, e resultam nas vibrações correspondentes com frequências diferentes.

A microscopia eletrônica de transmissão sugere partículas muito pequenas (entre 11 e 13 nm) e com estrutura cristalina bem ordenada. O cristalino perfeito é induzido principalmente pelo efeito de aquecimento do microondas que faz com que os átomos, inclusive os que estão em ponte, se organizem em uma ordem perfeita.

Ensaio de fotoluminescência indicam uma forte preferência pela região laranja-esverdeado (547-624 nm), que está associada ao aumento de defeitos superficiais. Esses

resultados indicam que o estado de desordem dos aglomerados na estrutura tende a manter a presença de vacâncias de oxigênio monoionizadas, $\text{V}_{\text{O}}^{\bullet}$.

A histerese magnética revela que as coercividades das nanopartículas de ZnFe_2O_4 revelaram um campo coercitivo de 229,6 Oe e a magnetização remanescente (M_r) de $2,698 \times 10^{-3}$ emu/g. Assim, os resultados indicam claramente o comportamento levemente ferromagnético das amostras preparadas devido ao tamanho das partículas abaixo de 50 nm).

Dados de espectroscopia paramagnética eletrônica (EPR) indicam um valor de g experimental ($g=1,89$) que pode ser atribuído a alterações no acoplamento de elétrons das espécies do tipo superóxido de superfície ($\text{O}_2^{\bullet-}$), devido ao aquecimento por microondas que induz mais vacâncias de oxigênio ionizadas individualmente, gerando mais espécies de oxigênio ativas na superfície.

As propriedades magnéticas das cerâmicas revestidas não foram alteradas, devido ao fato de que o material de revestimento não possui nenhuma propriedade magnética.

Células HEK tratadas com nanopartículas de ferrita de zinco em diversas concentrações (1,0, 10 e 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$) sugerem ausência de citotoxicidade. Assim, o estudo mostrou que a interação das nanopartículas com células de diferentes tecidos de organismos vivos é diretamente influenciada por suas propriedades físicas e químicas (por exemplo: composição, carga superficial, propriedades elétricas, pK_a , grau de ionização, entre outros). Por fim, as nanopartículas encapsuladas apresentaram um grande potencial para aplicação em hipertermia e seu auxílio em tratamentos de diversos adenocarcinomas e *Drug Delivery*.

8 SUGESTÕES PARA ATIVIDADES FUTURAS

Com o objetivo de se aprimorar os estudos para utilização das nanopartículas revestidas (NPR) com matriz epóxi na medicina oncológica utilizando hipertermia magnética e liberação de quimioterápico simultaneamente, faz-se necessário aprofundar os conhecimentos sobre o processo de síntese e seu comportamento em condições *in vitro* e *in vivo*. Espera-se que este trabalho forneça as ferramentas iniciais para o desenvolvimento de NPR versáteis quanto à sua atuação na medicina oncológica. Sendo assim, as perspectivas futuras desse trabalho são:

- i) Aperfeiçoar e padronizar as condições de síntese das NPM, buscando uma estequiometria que satisfaça o comportamento magnético desejável;
- ii) Analisar de forma mais completa o comportamento biocompatível das NPR, com o objetivo de se investigar a biocompatibilidade e sua hemocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*;
- iii) Avaliar de modo mais completo a eficácia *in vitro* e *in vivo* das nanopartículas através de testes de hipertermia e liberação de calor utilizando modelo de experimentação animal;
- iv) Acoplamento de fármacos anticancerígenos às superfícies das nanopartículas revestidas;
- v) Estudo da liberação controlada *in vitro* de fármaco anticancerígeno.

REFERÊNCIAS

- [1] CASTRO, V. F.; CELESTINO, J.; QUEIROZ, A. A. A.; GARCIA, F. G. Propriedades magnéticas e biocompatíveis de nanocompósitos para utilização em magneto-hipertermia. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, n. 1, p. 79-82, 2010.
- [2] TARTAJ, P.; MORALES, M. P, VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S., GONZALES-CARREÑO, T.; SERNA, J. C. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics**, v. 36, p. 182-197, 2003.
- [3] HERGT, R.; DUTZ, S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, n. 1, p. 187-192, 2007.
- [4] PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONE S. K. Institute of physics publishing journal of physics d: applied physics applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics**, v. 36, p.167-181, 2003.
- [5] GRASSET, F.; MORNET, S.; DEMOURGUES, A. Synthesis, magnetic properties, surface modification and cytotoxicity evaluation of $Y_3Fe_{5-x}Al_xO_{12}$ ($0 \leq x \leq 2$) garnet submicron particles for biomedical applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 33, p. 409-418, 2001.
- [6] GARCIA, F.G.; LEYVA, M.E.; QUEIROZ, A. A. A.; HIGA, O. Z. Epoxy networks for medicine applications: mechanical properties and in vitro biological properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, p. 1215-1225, 2009.
- [7] WEINBERG R.A. **The biology of cancer** CL. New York: Garland Science, 2006.
- [8] SHUBIK P. Vascularization of tumors: a review. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 103, n. 3, p. 211-226, 1982.
- [9] THULER, L. C. S. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 2. ed. Rio de Janeiro: Inca, 2012.
- [10] PASSOS, E. D. **Síntese e caracterização de microesferas magnéticas para utilização em hipertermia**. 2006. Dissertação (Mestrado em Materiais) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2006.
- [11] DJULBEGOVIĆ, B.; LIVINGSTONE, C. **Decision-making in oncology. evidence-based management**. Nova Iorque: Churchill Livingstone, 1997.
- [12] OVERGAARD J.; OVERGAARD M. Hyperthermia as an adjuvant to radiotherapy in the treatment of malignant melanoma. **Internacional Journal of Hyperthermia**, v. 3, p. 483-501, 1987.
- [13] BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação-Geral de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em:

<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 14 maio 2021.

- [14] CHAN G. C. F. Update on Targeted Therapy for Cancer. **Drug Review**, v. 9, n. 11, p. 1-4, 2004.
- [15] VERNON C. Hyperthermia in cancer growth regulation Phase III. **Biotherapy**, v. 4, n. 4, p. 307-315, 1992.
- [16] TARTAJ P.; MORALES M. P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER S.; GONZALES-CARREÑO T.; SERNA J. C. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal Physics**, v. 36, p. 182-197, 2003.
- [17] KLAHR S. Oxygen radicals and renal diseases. **Mineral Electrolyte Metabolism**, v. 3, n. 23, p. 40-43, 1997.
- [18] S. LAURENT, S.; DUTZ, U. O.; M. MAHMOUDI. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 166, n. 8, 2011.
- [19] SHLIOMIS, M. I. Magnetic fluids. **Soviet Physics Uspekhi**, v. 17, n. 153, 1974.
- [20] ROSENSWEIG, R.E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, p. 370-374, 2002.
- [21] GILCHRIST, R. K. Selective inductive heating of lymph nodes. **Annals of Surgery**, v. 146, n.4, p. 596-606, 1957.
- [22] JORDAN, A. *et al.* 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**, v. 225, p. 118-126, 2001.
- [23] IM, J. M.; YOU, H. J.; YOON, Y. S.; SHIN, D. W. Synthesis of nano-crystalline $Gd_{0.1}Ce_{0.9}O_{2-x}$ for IT-SOFC by aerosol flame deposition. **Division of materials science and engineering**, v. 34, n. 4, p. 877-881, 2007.
- [24] CRUZ, C.J.D. **Síntese bottom up de nanopartículas magnéticas core-shell do tipo γ - $Fe_2O_3@CoFe_2O_4$ visando aplicações em magneto-hipertermia**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais). Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- [25] FALLEIROS, J. P. B.; BRANDL, A. L.; DA FONSECA, A. R. A. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. **Nucleus**, v. 8, n. 1, p. 151-170, 2011.
- [26] GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSEL, W. C. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **Journal of General Virology**, v. 36, n. 1, p. 59-76, 1977
- [27] KANNO, T.; YAMAMOTO, Y.; YAGUCHI, T. The linoleic acid derivate DCP-LA selectively activates PKC-epsilon, possibly binding to the phosphatidylserine binding site. **Journal of Lipid Research**, v. 47, n. 6, p. 1146-1156, 2006.

- [28] LI, T.; PAUDEL, H. K. Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. **Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 3125-3133, 2006.
- [29] MUSTAFA, H.; STRASSER, B.; RAUTH, S.; IRVING, R. A.; WARK, K. L. Identification of a functional nuclear export signal in the green fluorescent protein asFP499. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, n. 4, p. 1178-1182, 2006.
- [30] TARTAJ, P.; MORALES, M. P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; GONZALES-CARREÑO, T.; SERNA, J. C. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal Physics D: applied physics**, v. 36, p. 182-197, 2003.
- [31] LOHR, M.; HOFFMEYER, A.; KROGER, J.; FREUND, M.; HAIM, J.; HOLLE, A. Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma. **The Lancet**, v. 357, p. 1591-1592, 2001.
- [32] STERGAR, J.; JIRÁK, Z.; VEVERKA, P. Mn-Zn ferrite nanoparticles coated with mesoporous silica as core material for heat-triggered release of therapeutic agents. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 475, p. 429-435, 2019.
- [33] SABALE, S.; JADHAV, V.; KHOT, V.; ZHU, X.; XIN, M.; CHEN, H.; Superparamagnetic MFe₂O₄ (M = Ni, Co, Zn, Mn) nanoparticles: synthesis, characterization, induction heating and cell viability studies for cancer hyperthermia applications. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, New York, v. 26, p.5466, 2015.
- [34] MOZAFFARI, M.; ARANI, M. E.; AMIGHIAN, J. The effect of cation distribution on magnetization of ZnFe₂O₄. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 21, n. 322, p. 3240-3244, 2010.
- [35] SHAH, S. A.; HASHMI, M. U.; ALAM S.; SHAMIM A. Magnetic and bioactivity evaluation of ferrimagnetic ZnFe₂O₄ containing glass ceramics for hyperthermia treatment of cancer. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, n. 3, p. 375-381, 2010.
- [36] MATHEW, D. S.; JUANG, R. S. An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions. **Chemical Engineering Journal**, v. 1, n. 129, p. 51-65, 2007.
- [37] THORAT, N. D. *et al.* Multifunctional Magnetic Nanostructures for Cancer Hyperthermia Therapy. **Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting**. Elsevier Inc, v. 1, p. 589-612, 2016.
- [38] AKHTAR, M. J.; NADEEM, M.; JAVAID, S.; ATIF M. Cation distribution in nanocrystalline ZnFe₂O₄ investigated using x-ray absorption fine structure spectroscopy. **Journal of Physics: condensed matter**, v. 21, n. 9, p. 405303, 2009.
- [39] BIAN, B.; LIU, Q.; YU, S. Peroxidase mimetic activity of porphyrin modified ZnFe₂O₄/reduced graphene oxide and its application for colorimetric detection of H₂O₂ and glutathione. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 181, p. 567-575, 2019.

- [40] SHI, W. *et al.* Carbon dots decorated magnetic ZnFe₂O₄ nanoparticles with enhanced adsorption capacity for the removal of dye from aqueous solution. **Applied Surface Science**, v. 433, p. 790-797, 2018.
- [41] HOQUE, S. M. *et al.* Synthesis and characterization of ZnFe₂O₄ nanoparticles and its biomedical applications. **Materials Letters**, v. 162, p. 60-63, 2016.
- [42] BINI, M. *et al.* Superparamagnetic ZnFe₂O₄ nanoparticles: the effect of Ca and Gd doping. **Materials Chemistry and Physics**, v. 204, p. 72-82, 2018.
- [43] SEYFOORI, A. *et al.* Multifunctional magnetic ZnFe₂O₄-hydroxyapatite nanocomposite particles for local anti-cancer drug delivery and bacterial infection inhibition: an *in vitro* study. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 96, p. 503-508, 2018.
- [44] MIRZAEI, A.; NERI, G. Microwave-assisted synthesis of metal oxide nanostructures for gas sensing application: a review. **Sensors and Actuators B**, v. 237, p. 749-775, 2016.
- [45] CAO, W. **The development and application of microwave heating**, Beijing: IntechOpen, 2012.
- [46] FARMER, G.T.; COOK, J. Climate change science: a modern synthesis. **Earth's Energy Budget**, v. 1, p. 81-95, 2012.
- [47] ZHU, Y.J.; CHEN, F. Microwave-assisted preparation of inorganic nanostructures in liquid phase. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 6462-6555, 2014.
- [48] SOUSA, C. R. S. **Nanopartículas magnéticas recobertas com citrato e nanocápsulas contendo selol no tratamento do adenocarcinoma mamário de Ehrlich ortotópico em camundongo Swiss**, 2015. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, 2015.
- [49] PASSOS, P. de Q. S. **Modelo tridimensional in vitro de adenocarcinoma prostático humano produzido por levitação magnética**. 2020. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), 2020.
- [50] SILVA, A. L. de G. **Avaliação do potencial anti-tumoral de nanopartículas magnéticas conjugadas a azul de metileno para carcinoma de mama e ovário**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, 2020.
- [51] SOUSA, C. R. S. **Nanopartículas magnéticas recobertas com citrato e nanocápsulas contendo selol no tratamento do adenocarcinoma mamário de Ehrlich ortotópico em camundongo Swiss**. 2015. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, 2015.
- [52] PASSOS, P. de Q. S. **Modelo tridimensional in vitro de adenocarcinoma prostático humano produzido por levitação magnética**. 2020. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), 2020.

- [53] SILVA, A. L. de G. **Avaliação do potencial anti-tumoral de nanopartículas magnéticas conjugadas a azul de metileno para carcinoma de mama e ovário**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, 2020.
- [54] SOUZA, A. E. **Fotoluminescência e mecanismo de crescimento em titanatos nanoestruturados**. 2011. 154 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2011.
- [55] PINEDA, A. F. E. **Propriedades mecânicas, adesivas e adsorção de água de polímeros epoxídico**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2014.
- [56] TOGNOLO, A. C. T. **Funcionalização de nanopartículas superparamagnéticas com polímero termossensível para liberação controlada de fármaco e hipertermia magnética**. 2017. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.
- [57] LEE, H.; NEVILLE, K. **Handbook of Epoxy Resins: Characterization of epoxy-resin curing-agent systems**. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1967.
- [58] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM, Specification D 1652. **Standard test methods for epoxy content of epoxy resins**. Springer, 1997.
- [59] GONZÁLEZ, G. F.; SILVA, P. M.; SOARES, B. G.; RIEUMONT, J. Combined analytical techniques for the determination of the amine hydrogen equivalent weight in aliphatic amine epoxy hardeners. **Polymer Testing**, v. 26, n. 1, p. 95-101, 2007.
- [60] YONG, R. A. **The rietveld method**. Oxford: Oxford University Press, 1-13, 1993
- [61] SAKATA, M.; COOPER, M. J. An analysis of the Rietveld profile refinement method. **Journal of Applied Crystallography**, v. 12, n. 554, p.554-563, 1979.
- [62] BISH, D.L.; HOWARD, S.A. Qualitative phase analysis using the Rietveld method. **Journal of Applied Crystallography**, v. 21, p. 86-91, 1988.
- [63] JANSEN, E.; SCHÄFER, W.; WILL, G. R values in analysis of powder diffraction data using Rietveld refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 27, n. 4, p. 492-496, 1994.
- [64] SORNALATHA, D. J., MURUGAKOOTHAN, P. Characterization of hexagonal ZnO nanostructures prepared by hexamethylenetetramine (HMTA) assisted wet chemical method, **Materials Letters**, v. 124, p. 219-222, 2014.
- [65] BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-319, 1938.

- [66] RAKHMATULLIN, R. M.; PAVLOV, V. V.; SEMASHKO, V. V. EPR study of nanocrystalline CeO₂ exhibiting ferromagnetism at room temperature. **Physica Status Solidi**, v. 253, n. 3, p. 499-503, 2016.
- [67] WECKHUYSEN, B. M.; HEIDLER, R.; SCHOONHEYDT, R. A. Electron spin resonance spectroscopy. **Molecular Sieves**, v. 4, n. 1, p. 295-335, 2004.
- [68] NAKASHIMA, S.; FUJITA, K.; TANAKA, K.; HIRAO, K.; YAMAMOTO, T.; TANAKA, I.; First principles XANES simulations of spinel zinc ferrite with a disordered cation distribution. **Physical Review B**, v.75, p. 174-443, 2007.
- [69] O'NEILL, H. S.C.; NAVROTSKY, A. Simple spinels: crystallographic parameters, cation radii, lattice energies, and cation distribution. **American Mineralogist**, v. 68, p. 181-194, 1983.
- [70] NARAYANASAMY, A.; SIVAKUMAR, N. Influence of mechanical milling and thermal annealing on electrical and magnetic properties of nanostructured Ni-Zn and cobalt ferrites. **Bulletin of Materials Science**, v. 31, p. 373-380, 2008.
- [71] O'NEILL, H. S. C. Temperature dependence of the cation distribution in zinc ferrite (ZnFe₂O₄) from powder XRD structural refinements. **European Journal of Mineralogy**, v. 4, p. 571-580, 1992.
- [72] RUCKENSTEIN, E.; MARMUR, A.; RAKOWER, S. R. Sedimentation and adhesion of platelets onto a horizontal glass surface. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 36, n. 2, p. 334-342, 1976.
- [73] PACKHAM, M. A.; EVANS, G.; GLYNN, M. F.; MUSTARD, J. F. The effect of plasma proteins on the interaction of platelets with glass surfaces. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 73, n. 4, p. 686-697, 1969.
- [74] ALLEN, R. D.; ZACHARSKI, L. R.; WIDIRSKY, S. T.; ROSENSTEIN, R.; ZAITLIN, L. M.; BURGESS, D. R. Transformation and motility of human platelets: details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy. **The Journal of Cell Biological**, v. 83, n. 1, p. 126-142, 1979.
- [75] GOODMAN, S. L.; LELAH, M. D.; LAMBRECHT, L. K.; COOPER, S. L.; ALBRECHT, R. M. In vitro vs. ex vivo platelet deposition on polymer surfaces. **Scanning Electron Microscopy**, v. 1, p. 279-290, 1984.
- [76] GOODMAN, S. L.; GRASEL, T. G.; COOPER, S. L.; ALBRECHT, R. M. Platelet shape change and cytoskeletal reorganization on polyurethaneureas. **Journal of Biomedical Materials Research: part. A**, v. 23, n. 1, p. 105-123, 1989.
- [77] GEMMELL, C.; RAMIREZ, S.; YEO, E.; SEFTON, M. Platelet activation in whole blood by artificial surfaces: Identification of platelet-derived micro-particles and activated platelet binding to leukocytes as material-induced activation events. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 125, n. 2, p. 276-287, 1995.

- [78] ALVES, S. B.; QUEIROZ, A. A. A.; HIGA, O. Z. Digital image processing for biocompatibility studies of clinical implant materials. **Artificial Organs**, v. 27, n. 5, p. 444-446, 2003.
- [79] WEISENBERG, B. A.; MOORADIAN, D. L. Hemocompatibility of materials used in microelectromechanical systems: platelet adhesion and morphology in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research: part. A**, v. 60, n. 2, p. 283-291, 2002.
- [80] BAGHERI-KHOULENJANI, S.; MIRZADEH, H. Polystyrene surface modification using excimer laser and radio-frequency plasma: blood compatibility evaluations. **Progress in Biomaterials**, v. 1, n. 4, 1-8, 2012.
- [81] NAIR, B. N.; VARMA, H. K.; JOHN A. Platelet-rich plasma and fibrin glue-coated bioactive ceramics enhance growth and differentiation of goat bone marrow-derived stem cells. **Journal of Tissue Engineering: part. A**, v. 15, n. 7, p. 1619-1631, 2009.
- [82] HANGAI, B.; BORSARI, E.; AGUIAR, E. C.; GARCIA, F. G.; LONGO, E.; SIMÕES, A. Z. Superparamagnetic behaviour of zinc ferrite obtained by the microwave assisted method. **Journal of Materials Science: materials in electronics**, v. 28, n. 14, p. 10772-10779, 2017.
- [83] WANG, Z.W.; LAZOR, P.; SAXENA, S. K.; ARTIOLI, G. High pressure Raman spectroscopic study of spinel (ZnCr_2O_4). **Journal of Solid State Chemistry**, v. 165, p. 165-170, 2002.
- [84] ZHANG, H.; FU, X.; NIU, S.; XIN, Q. Synthesis and luminescent properties of nanosized $\text{YVO}_4: \text{Ln}$ ($\text{Ln}=\text{Sm}, \text{Dy}$). **Journal of Alloys and Compounds**, v. 457, p. 61-65, 2008.
- [85] O'NEILL, H. S. C. Temperature dependence of the cation distribution in zinc ferrite (ZnFe_2O_4) from powder XRD structural refinements. **European Journal of Mineralogy**, v. 4, p. 571-580, 1992.
- [86] DEUS, R. C.; CILENSE, M.; FOSCHINI, C. R.; RAMIREZ, M. A.; LONGO, E.; SIMÕES, A. Z. Influence of mineralizer agents on the growth of crystalline CeO_2 nanospheres by the microwave-hydrothermal method. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 550, p. 245-251, 2013.
- [87] SANTILLI, C.V.; PULCINELLI, S. H. Análise da textura de materiais cerâmicos a partir das isotermas de adsorção de gases. **Cerâmica**, v. 39, n. 259, p. 11-16, 1993.
- [88] YAO, J.; LI, X.; LI, Y.; LE, S. Density functional theory investigations on the structure and electronic properties of normal spinel ZnFe_2O_4 . **Integrated Ferroelectrics**, v. 145, p. 17-23, 2013.
- [89] KALE, R. B.; LOKHANDE, C. D. Influence of air annealing on the structural, optical and electrical properties of chemically deposited CdSe nano-crystallites. **Applied Surface science**, v. 223, p. 343-351, 2004.

- [91] YOO, J. **The effects of microstructure on $\text{Ba}_{1-x}\text{Sr}_x\text{TiO}_3$ pyroelectric materials for pyroelectric and bolometer infrared sensors.** 1999. Thesis (Ph.D of Chemistry) - University of Auckland, 1999.
- [92] SIMÕES, A. Z.; AGUIAR, E. C.; GONZALEZ, A. H. M.; ANDRÉS, J.; LONGO, E.; VARELA, J. A. Strain behavior of lanthanum modified BiFeO_3 thin films prepared via soft chemical method. **Journal of Applied Physics**, v. 104, p. 104115, 2008.
- [93] HOSNI, B. Structure and electro chemical hydrogen storage properties of Ti_2Ni alloy synthesized by ball-milling. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 615, p. 119-125, 2014.
- [94] HOUSE, S.D. *et al.* Effect of ball-milling duration and dehydrogenation on the morphology, microstructure and catalyst dispersion in Ni-catalyzed MgH_2 hydrogen storage materials. **Acta Materialia**, v. 86, p. 55-68, 2015.
- [95] RAHUL, M.; THANKACHAN, Enhanced lithium storage in $\text{ZnFe}_2\text{O}_4\text{-C}$ nanocomposite produced by allow-energy ball-milling. **Journal of Power Sources**, v. 282, p. 462-470, 2015.
- [96] SOUZA, A. E.; SANTOS, G. T. A.; BARRA, B. C. Photoluminescence of SrTiO_3 : influence of particle size and morphology. **Crystal Growth & Design**, v. 12, p. 5671-5679, 2012.
- [97] KAN, D.; TERASHIMA, T.; KANDA, R.; MASUNO, A.; TANAKA, K.; CHU, S.; KAN, H.; ISHIZUMI, A.; KANEMITSU, Y.; SHIMAKAWA, Y.; TAKANO, M. Blue-light emission at room temperature from Ar^+ -irradiated SrTiO_3 . **Natural Materials**, v. 4, n. 11, p. 816-819, 2005.
- [98] ZHANG, N.; XU, Y. Defective TiO_2 with oxygen vacancies: synthesis, properties and photocatalytic applications. **Nanoscale**, v. 5, p. 3601-3614, 2013.
- [99] LI, H.; GUO, Y.; ROBERTSON, J. Calculation of TiO_2 surface and subsurface oxygen vacancy by the screened exchange functional. **Journal of Physics Chemistry**, v. 119, p. 18160-18166, 2015.
- [100] AMORES, R. A. C.; TEODORO, V.; TEIXEIRA, G. F.; LI, M. S.; SIMÕES, A. Z.; PERAZOLLI, L.A.; LONGO, E.; ZAGHETE, M. A. Electrosteric colloidal stabilization for obtaining $\text{SrTiO}_3/\text{TiO}_2$ heterojunction: Microstructural evolution in the interface and photonics properties. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 38, n. 4, p. 1621-1631, 2018.
- [101] TEO, S. *et al.* The role of lanthanum in a nickel oxide-based inverted perovskite solar cell for efficiency and stability improvement. **Chemistry-Sustainability-Energy-Materials**, v. 12, p. 518-526, 2019.
- [102] SOUZA, A. E. *et al.* Photoluminescence activity of $\text{Ba}_{1-x}\text{Ca}_x\text{TiO}_3$: dependence on particle size and morphology. **Journal of Materials Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 7056-7070, 2014.

- [103] LONGO, V. M. *et al.* Structural conditions that leads to photoluminescence emission in SrTiO₃: an experimental and theoretical approach. **Journal of Applied Physics**, v. 104, p. 023515, 2008.
- [104] LEMINE, O. M. Synthesis, structural, magnetic and optical properties of nanocrystalline ZnFe₂O₄. **Physics B: condensed matter**, v. 406, p. 1989–1994, 2011.
- [105] LI, J.; HUANG, Z.; WU, D. Preparation and protein detection of Zn-ferrite with magnetic and photoluminescence properties. **Journal of Physics Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 1586-1592, 2010.
- [106] AISIDA, S. O.; AHMAD, I.; ZHAO, T.; MAAZA, M.; EZEMA, F. I. Calcination effect on the photoluminescence, optical, structural, and magnetic properties of polyvinyl alcohol doped ZnFe₂O₄. **Nanoparticle**, v. 59, n. 5, p. 295-308, 2020.
- [107] BALES, B. L. Correction for inhomogeneous line broadening in spin labels, II. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 48, p. 418-430, 1982.
- [108] CASTELEIJN, G.; BOSCH, T.; SMIDT, J. Error analysis of the determination of spin concentration with the electron spin resonance method. **Journal of Applied Physics**, v. 39, p. 4375-4380, 1968.
- [109] HEIBA, Z. K.; MOHAMED, M. B. The reflection of Cr/Fe substitution on the structural, magnetic and photoluminescence features of Zn-Ni based ferrite. **Journal of Superconductivity and Novel Magnetism**, v. 30, p. 3123-3128, 2017.
- [110] ABI-AAD, E.; BECHARA, R.; GRIMBLLOT, J.; ABOUKAIS, A. Preparation and characterization of ceria under an oxidizing atmosphere, thermal analysis, XPS, and EPR study. **Chemistry of Materials**, v. 5, p. 793-797, 1993.
- [111] OLIVA, C.; TERMIGNONE, G.; VATTI, F. P. Electron paramagnetic resonance spectra of CeO₂ catalyst for CO oxidation. **Journal of Materials Science**, v. 31, p. 6333-6338, 1996.
- [112] GOLUB A.A.; ZUBENKO A.I.; ZHMUD B.V. Stabilization of silica gel against hydrolysis by doping with F⁻ or Zr (IV). **Colloid Interface Science**, v. 179, p. 482-487, 1996.
- [113] CARVAJAL G. S.; LEYDEN D. E.; QUINTING G. R.; MACIEL G. E. Structural characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-modified silicas by silicon-29 and carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 1776-1786, 1988.
- [114] SHAHBAZ T. F.; DAADMEHR V.; REZAKHANI A. T. Structural, magnetic, and optical properties of zinc- and copper-substituted nickel ferrite nanocrystals. **Journal of Superconductivity and Novel Magnetism**, v. 25, p. 2443-2455, 2012.
- [115] YI-CHENG G. E.; ZHI-LONG W.; MAO-ZHONG Y. I.; LI-PING R. Fabrication and magnetic transformation from paramagnetic to ferrimagnetic of ZnFe₂O₄ hollow spheres. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 29, n. 7, p. 1503-1509, 2019.

[116] O QUE é câncer, como surge e diagnóstico. **Tua Saúde**, 2021. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/como-surge-o-cancer/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

[117] NIEMIES, A. **Medsimples**, 2021. Disponível em: <https://medsimples.com/cancer/>. Acesso em: 27 ago. 2021.