



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



ISEL
INSTITUTO SUPERIOR DE
ENGENHARIA DE LISBOA



**ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA**
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA APLICAÇÃO EM BIOMEDICINA

Daniela José dos Santos Teixeira

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadores

Doutora Elisabete C. B. A. Alegria

Doutor Alessandro Fantoni

Doutor Miguel Fernandes

Lisboa

Fevereiro 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



ISEL
INSTITUTO SUPERIOR DE
ENGENHARIA DE LISBOA



**ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA**
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA APLICAÇÃO EM BIOMEDICINA

Daniela José dos Santos Teixeira

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadores

Doutora Elisabete C. B. A. Alegria

Doutor Alessandro Fantoni

Doutor Miguel Fernandes

Júri

Presidente: Doutor Manuel Matos

Arguente: Doutora Ana Paula da Costa Ribeiro

Lisboa

Fevereiro 2018

Dedicatória

Aos meus pais,
pelo apoio incondicional em todas as fases do trabalho.

Ao meu filho,
pela forma carinhosa e constante de incentivo.

Agradecimentos

Muito me orgulho de ver concluído o meu trabalho final de Mestrado, que no seu desenvolvimento necessitou de grandes incentivos para que fosse uma etapa com conclusão bem sucedida. Deste modo, gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus orientadores, Doutora Elisabete Alegria, Doutor Alessandro Fantoni e Doutor Miguel Fernandes pela ajuda, orientação e disponibilidade. Acima de tudo pela paciência que demonstraram ao longo de todo o trabalho. Só assim foi possível a realização do mesmo.

Um grande agradecimento à Doutora Ana Ribeiro por toda a sua ajuda, disponibilidade e apoio prestados nas diversas fases do trabalho, sugestões e resoluções de problemas, sem as quais não seria possível a resolução deste trabalho.

Agradeço especialmente ao Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico (CQE / IST) que me disponibilizou toda a componente laboratorial, essencial e fundamental para a execução prática deste trabalho, bem como a todos os colegas de laboratório, especialmente Inês Matias, Mohamed Soliman, Francesco e Daniela, que sempre deram força e ânimo para a continuação do trabalho desenvolvido.

Um especial agradecimento ao Rui Silva do Instituto superior Técnico pela sua disponibilidade e precioso contributo para continuidade deste trabalho.

Gostaria também de agradecer a todos os meus amigos do percurso académico de Mestrado, especialmente Marta, Helena e Ricardo, pelo seu apoio, incentivo e força demonstrada.

Ao João Mendes, pela insistência e perseverança de manter a constância nos momentos finais.

Um agradecimento muito especial ao meu filho Guilherme, pela sua força e paciência durante todo o processo de desenvolvimento do trabalho e pelas horas que me dispensou.

Do mesmo modo agradeço aos meus pais e à minha família pelo permanente apoio e compreensão.

Grata à ciência por me permitir desenvolver, crescer e evoluir.

Resumo

Na última década verifica-se um crescente interesse da comunidade científica relativamente ao ramo da nanociência, nomeadamente a possibilidade de controle sobre os componentes estruturais de dispositivos em escalas de tamanho bem inferiores às convencionais, bem como as intrigantes mudanças das propriedades físicas de determinados sólidos quando as suas dimensões se reduzem à escala nanométrica. O devido controle sobre a morfologia das partículas na escala nano, compreendida na faixa de 1 a 100 nm, é um tópico bastante intrigante devido aos efeitos impressionantes que pequenas modificações nos tamanhos e nas formas das nanopartículas podem provocar nas propriedades de determinado composto.

Parte do fascínio sobre este assunto prende-se com as nanopartículas metálicas devido às inúmeras possibilidades que apresentam em diversas aplicações, tais como construção de biossensores, microeletrónica e catálise, entre outras. Esta versatilidade de aplicações, deve-se às suas intrínsecas propriedades óticas, magnéticas e catalíticas. De particular interesse são as propriedades óticas, uma vez que a diversidade de cores observada nestes materiais está relacionada com as oscilações dos eletrões de condução, em ressonância com a luz incidente, denominada ressonância de plasmão de superfície. Do mesmo modo, as propriedades magnéticas que as nanopartículas metálicas possuem permitem a sua interação com a radiação eletromagnética, realçando o facto de que este fenómeno de ressonância de plasmão de superfície não ocorre em qualquer nanopartícula, uma vez que há necessidade da existência de eletrões livres de condução na sua superfície. Exemplo deste tipo de nano partículas são as nanopartículas de ouro.

Desenvolvendo um pouco este tema, surge este estudo no âmbito de um projeto entre duas equipas de pesquisa, pertencentes ao Departamento de Eletrónica, Telecomunicações e Computadores (ADEETC) e Departamento de Química (ADEQ) do Instituto Superior de Engenharia (ISEL), onde o objetivo final se prende com o desenvolvimento e realização de um biossensor ótico, com base nas propriedades óticas das nanopartículas metálicas, nomeadamente a ressonância de plasmão localizada de superfície, com uma matriz de incorporação de silício amorfo. Uma vez que a forma e o tamanho das nanopartículas determinam a assinatura espectral da sua ressonância plasmónica localizada (LSPR), a capacidade de alterar estes dois parâmetros e estudar o efeito LSPR é um importante desafio experimental. Este projeto resume-se a três fases fundamentais:

- 1- Produção e caracterização de nanopartículas;

- 2- Simulação computacional de LSPR induzida por nanopartículas;
- 3- Integração das nanopartículas numa matriz de material semiconductor (a-Si:H).

O presente trabalho incide maioritariamente na fase de nanofabricação e caracterização das nanopartículas sintetizadas. Como a forma e tamanho de uma nanopartícula determinam a assinatura espectral da sua ressonância plasmónica, a capacidade de controlar estes dois parâmetros e verificar o efeito LSPR é um grande desafio experimental.

A síntese das nanopartículas de Fe_3O_4 foi executada por métodos de precipitação.

A síntese de nanopartículas de ouro foi realizada em 3 etapas fundamentais: síntese de sementes de ouro; crescimento e modelagem das nanopartículas de ouro e purificação das nanopartículas de ouro.

Os metais de interesse para a composição das nanopartículas são alumina e ouro. Uma vez que a alumina não é magnética, efetuaram-se misturas de nanopartículas Al_2O_3 com nano partículas de Fe_3O_4 recorrendo ao método de síntese de *ball milling*.

A caracterização das nanopartículas produzidas foi realizada por medição de suscetibilidade magnética, microscopia eletrónica de transmissão (TEM) e microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e por espectroscopia de UV-Vis UV-Vis.

A determinação das propriedades óticas das nanopartículas produzidas fez-se através de medições de transmissão de luz e verificação de existência de ressonância plasmónica, através de espectroscopia de UV-Vis.

A suscetibilidade magnética das nanopartículas foi medida segundo o método de Gouy, usando uma Balança apropriada.

As formas, tamanhos e distribuição das nanopartículas de ouro foram verificadas através de estudos de microscopia eletrónica de transmissão (TEM) e microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Foram visualizadas maioritariamente partículas esféricas e triangulares, mas também algumas formas hexagonais e pequenos poliedros.

Este trabalho contribuiu para a publicação de 3 artigos científicos em revistas internacionais especializadas e 2 apresentações em painel em conferências internacionais-

Palavras-Chave: Nanopartículas metálicas, Ressonância plasmónica (LSPR)

Abstract

In the last decade there has been a growing interest of the scientific community in nanoscience, namely the possibility of control over the structural components of devices in scales of size well below the conventional ones, as well as the changes of the physical properties of certain solids when its dimensions are reduced to the gauge scale.

Part of the fascination on this subject concerns the metallic nanoparticles due to the innumerable possibilities they present in various applications, such as biosensor construction, microelectronics and catalysis, among others. This versatility of applications is due to its intrinsic optical, magnetic and catalytic properties. Of particular interest are the optical properties, since the color diversity observed in these materials is related to the oscillations of the conduction electrons in resonance with the incident light, called surface plasmon resonance. In the same way, the magnetic properties that the metallic nanoparticles possess allow their interaction with the electromagnetic radiation, emphasizing the fact that this phenomenon of surface plasmon resonance does not occur in any nanoparticle, since there is a need for the existence of free electrons driving on its surface. Example of this type of nano particles are the gold nanoparticles.

Developing a little this theme, this study arises in the scope of a project between two research teams, belonging to the Department of Electronics, Telecommunications and Computers (ADEETC) and Chemistry Department (ADEQ) of the Higher Institute of Engineering (ISEL) where the final objective is related to the development and realization of an optical biosensor, based on the optical properties of the metallic nanoparticles, namely localized surface plasmon resonance, with an amorphous silicon incorporation matrix. Since the shape and size of the nanoparticles determine the spectral signature of its localized plasmon resonance (LSPR) the ability to change these two parameters and study the LSPR effect is an important experimental challenge. This project boils down to three fundamental phases.

- 1- Production and characterization of nanoparticles;
- 2- Computational simulation of LSPR induced by nanoparticles;
- 3- Integration of the nanoparticles into a matrix of semiconductor material (a-Si: H).

The present work focuses mainly on the phase of nanofabrication and characterization of the synthesized nanoparticles. Thus, it is intended a preparation and synthesis of metal nanoparticles where the techniques of synthesis allow a production of nanoparticles by well defined, simple and reproducibly feasible methods.

The synthesis of the Fe₃O₄ nanoparticles was done by synthetic precipitation methods.

The synthesis of gold nanoparticles followed the procedure described in the literature, summarized in 3 fundamental steps: synthesis of gold seeds; growth and modeling of gold nanoparticles; purification of the gold nanoparticles.

The metals of interest for the composition of the nanoparticles are alumina and gold. Since the alumina was not magnetic, mixtures of Al₂O₃ nanoparticles were carried out with Fe₃O₄ nanoparticles using the ball milling synthesis method.

The determination of the optical properties of the developed nanoparticles was made through measurements of transmittance and verification of existence of plasmon resonance, through UV-Vis spectroscopy.

The magnetic susceptibility of the nanoparticles was measured according to the Gouy method, using the appropriate Scale.

The shapes, sizes and distribution of the gold nanoparticles were verified through transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). Most spherical and triangular particles were visualized, but also some hexagonal forms and small polyhedral.

Of this work resulted in 3 scientific publications and 2 poster presentations in International Congresses.

Key words:

Metal Nanoparticles, Plasma Resonance (LSPR)

Glossário

NPs Au	Nanopartículas de ouro
NPs Al ₂ O ₃	Nanopartículas de alumina
NPs Fe ₃ O ₄	Nanopartículas de magnetite
LSPR	Banda de ressonância plasmônica de superfície (do inglês <i>Surface Plasmon Resonance</i>)
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês <i>Transmission Electron Microscope</i>)
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento (do inglês <i>Scanning Electron Microscope</i>)
UV-Vis	Espectroscopia de UV-Visível
M	Peso molecular
a-Si:H	Silício amorfo
DDA	Método de Aproximação Dipolar Discreto
DDSCAT	Software livremente disponível (método DDA)
CTAC	Cloreto de hexadeciltrimetilamônio
CTAB	Brometo de metiltrimetilamônio

Índice Geral

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Glossário	xi
Índice de Figuras.....	xv
Índice de Tabelas	xviii
Capítulo I.....	1
1. Introdução	3
1.1. Objetivos.....	3
1.2. Organização e metodologia de estudo adotada.....	4
Capítulo II.....	5
2. Enquadramento Teórico.....	7
2.1. Nanopartículas e suas aplicações em Biomedicina.....	7
2.2. Nanopartículas metálicas com propriedades magnéticas.....	10
2.3. Nanopartículas magnéticas e interação com a radiação eletromagnética.....	15
2.4. Nanopartículas de ouro	18
2.5. Ressonância plasmônica	24
Capítulo III.....	27
3. Técnicas de síntese e de caracterização	28
3.1. Síntese de NPs por <i>Ball Milling</i>	28
3.2. Síntese de NPs com solventes.....	29
3.3. Suscetibilidade Magnética	31
3.4. Espectroscopia UV-Vis.....	33
3.4.1. Sólidos/Filmes	33
3.4.2. Líquidos	34
3.5. Microscopia Eletrônica	34
3.5.1. TEM.....	35
3.5.2. SEM.....	35
3.6. Técnicas de Simulação computacional	37
Capítulo IV	38
4. Resultados e Discussão.....	40

4.1. Material e Reagentes.....	40
4.1.1. Reagentes	40
4.2. Síntese e caracterização de NPs de Fe_3O_4	40
4.3. Síntese e caracterização de NPs de Al_2O_3	42
4.4. Preparação de misturas de NPsFe_3O_4 + NPsAl_2O_3	48
4.5. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro (NPsAu).....	51
5. Conclusões	67
5.1. Perspetivas Futuras	70
6. Publicações e comunicações científicas no âmbito deste trabalho.	71
Referências Bibliográficas	73

Índice de Figuras

Figura 1 – Ilustração da produção de nanoestruturas multifuncionais magnéticas	7
Figura 2 – Ilustração de nanoestruturas (da esquerda para a direita): casca-caroco, heterodímeros e núcleo-satélites	8
Figura 3 – Representação esquemática da escala nanométrica	11
Figura 4 – Representação dos movimentos eletrônicos da orbital (a) e spin (b)	14
Figura 5 – Os diferentes tipos de comportamento magnético	15
Figura 6 – Ilustração das orientações dos movimentos magnéticos em material paramagnético (a), ferromagnético (b) e superparamagnético (c)	16
Figura 7 – Estrutura molecular do dendrímero	21
Figura 8 – Ilustração esquemática da estabilização de partículas pelo efeito eletrostático (a) e estérico (b)	24
Figura 9 – Ilustração do fenômeno de ressonância plasmônica	24
Figura 10 – Representação da relação do SHL com o diâmetro das nanopartículas e campo magnético	31
Figura 11 – Balança para medição de Suscetibilidade Magnética	32
Figura 12 – Síntese de nanopartículas de Fe_3O_4	40
Figura 13 – Comportamento das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 na presença de um campo magnético exterior	41
Figura 14 – Síntese de nanopartículas de Al_2O_3 para caracterização	42
Figura 15 – Espectro de UV-Vis das cuvetes de quartzo, plástico e sílica	44
Figura 16 – Espectro de UV-Vis de $NPsAl_2O_3$ em água	45
Figura 17 – Espectro de UV-Vis de $NPsAl_2O_3$ com ácido oleico	46
Figura 18 – Espectro de UV-Vis das $NPsAl_2O_3$ e das misturas A,B e C em água	49
Figura 19 – Esquema de síntese de nanopartículas de ouro	52
Figura 20 – Espectro de UV-Vis das $NPsAu$ sintetizadas na presença de NaI	53

Figura 21 – Espectro de UV-Vis das NPsAu na fase I do processo de síntese.....	54
Figura 22 – Espectro de UV-Vis das NPsAu na fase I do processo de síntese, diluídas 1:10 e 1:100	54
Figura 23 – Espectro de UV-Vis de diferentes quantidades de NPsAu transferidas da fase I	55
Figura 24 – Espectro de UV-Vis da amostra de NPsAu na fase III do processo de síntese	56
Figura 25 – Espectro de UV-Vis da amostra de NPsAu na fase III do processo de síntese diluídas 1:10 e 1:100.....	56
Figura 26 – Espectro de UV-Vis do sobrenadante e do precipitado da amostra de NPsAu na fase III do processo de síntese.....	57
Figura 27 – Espectro de UV-Vis das NPsAu comerciais, de 60 e 100 nm.....	58
Figura 28 – Imagens TEM das NPsAu sintetizadas	59
Figura 29 – Imagens SEM das NPsAu sintetizadas	60
Figura 30 – Espectro de extinção de luz obtido por leituras de transmissão das NPsAu sintetizadas comparativamente aos resultados da simulação ..	61
Figura 31 – Espectro de comparação das leituras de transmissão das NPsAu de 60 nm comerciais com os dados da simulação	62
Figura 32 – Espectro de comparação das leituras de transmissão das NPsAu de 100 nm comerciais com os dados da simulação	62

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Condições de moagem para cada teste.....	43
Tabela 2 – Quantidades de NPs Al_2O_3 em diferentes estados misturadas com as NPs Fe_3O_4 sintetizadas para preparação de soluções.....	3 47

Capítulo I

1. Introdução

Nos últimos anos foi dada muita atenção ao uso de nanopartículas metálicas incorporadas em materiais semicondutores devido à possibilidade de aumentar a absorção de luz no material semicondutor através do aprimoramento plasmónico do campo próximo. Este aumento é esperado nas energias dos fotões na proximidade da condição de ressonância de plasmão de superfície localizada (LSPR) da nanopartícula metálica. Esta condição LSPR depende das propriedades do metal/interface, do tamanho e forma da partícula e da distância média na distribuição das partículas (C.F. Bohren and D.R. Huffman, 2008; S.A. Maier, 2007).

As nanopartículas metálicas interagem fortemente com os fotões na zona do espectro visível e infravermelho. A interação ótica mais forte ocorre numa ressonância, sendo a condição de ressonância em função do tamanho, forma e tipo de metal das nanopartículas, bem como o ambiente dielétrico local (Temple et al., 2011). As propriedades óticas fortes e sintonizáveis das nanopartículas metálicas levaram a uma variada gama de aplicações.

1.1. Objetivos

Este trabalho foi realizado no âmbito de um projeto de colaboração entre dois grupos de pesquisa integrados: um na Área Departamental de Engenharia Química (ADEQ) e o outro na Área Departamental de Engenharia de Eletrónica e Telecomunicações e de Computadores (ADEETC) do ISEL. – Projeto MANASE – Nanopartículas magnéticas e semicondutores: Design e caracterização de efeitos plasmónicos locais em estruturas fotónicas.

O projeto visa o desenvolvimento de um dispositivo, baseado na interação, controlo e adaptação dos efeitos de ressonância plasmónica superficial local (LSPR) introduzidos pela presença de nanopartículas metálicas (NPs) embutidas numa matriz de material semicondutor de silício amorfo. A ressonância de plasmão de superfície localizada (LSPR) produz um pico na fotossensibilidade do material em comprimentos de onda que estão dependentes não só do material usado, mas também do tamanho e da forma das nanopartículas.

Assim o objetivo principal será a realização de um sensor ótico com capacidades aprimoradas em comprimentos de onda selecionados.

1.2. Organização e metodologia de estudo adotada

A metodologia de estudo adotada engloba três fases principais:

- 1- Produção e caracterização de nanopartículas
- 2- Simulação computacional de LSPR induzida por nanopartículas
- 3- Integração das nanopartículas numa matriz de material semiconductor (a-Si:H).

Este trabalho incide maioritariamente na fase de nanofabricação e caracterização das nanopartículas sintetizadas. Assim, pretende-se uma preparação de nanopartículas metálicas onde as técnicas de síntese permitam uma produção de nanopartículas por métodos bem definidos, simples e exequíveis de forma reprodutível (ponto 1), e está organizado em capítulos da seguinte forma:

Capítulo I: Introdução ao tema proposto, definição de objetivos e metodologia adotada.

Capítulo II: Breve enquadramento teórico

Capítulo III: Revisão de literatura sobre as técnicas de síntese e de caracterização

Capítulo IV: Resultados e Discussão

Capítulo V: Conclusões e perspectivas a desenvolver em trabalho futuro

O estudo teórico detalhado, obtido por meio da simulação computacional sobre a influência da forma e tamanho das nanopartículas e o desenvolvimento e realização da estrutura plasmónica, com base na interação das nanopartículas metálicas com uma matriz de incorporação de silício amorfo (fase 2 e 3), será efetuado pela equipe do departamento ADEETC.

Capítulo II

2. Enquadramento Teórico

2.1. Nanopartículas e suas aplicações em Biomedicina

A aplicação de nanopartículas em pesquisas na área de biomedicina tem sido recorrente nos últimos anos. Particularmente as nanopartículas magnéticas são aquelas que despertam mais o interesse da comunidade científica pelas suas propriedades únicas, como o superparamagnetismo (Gao, Gu & Xu, 2009; Hao et al., 2010). As nanopartículas são sintetizadas com diferentes composições e fases cristalinas, incluindo óxidos de ferro e metais puros (Li et al., 2005; Puentes, Krishnan & Alivisatos, 2001). Por outro lado, é possível aumentar as funcionalidades das nanopartículas pela combinação com outros nanomateriais que apresentem propriedades distintas. Destes nanomateriais destacam-se os pontos quânticos e compostos ou moléculas luminescentes, com propriedades óticas e eletrônicas que podem ser monitorizadas pelas suas propriedades plasmônicas, assim como outros tipos de moléculas e biomoléculas que fornecem seletividade e biosseletividade às nanoestruturas (Gao, Gu & Xu, 2009; Shi et al., 2006; Xu et al., 2008). As potenciais aplicações das nanopartículas encontram-se sintetizadas na Figura 1, funcionando a partir da combinação de diferentes propriedades.

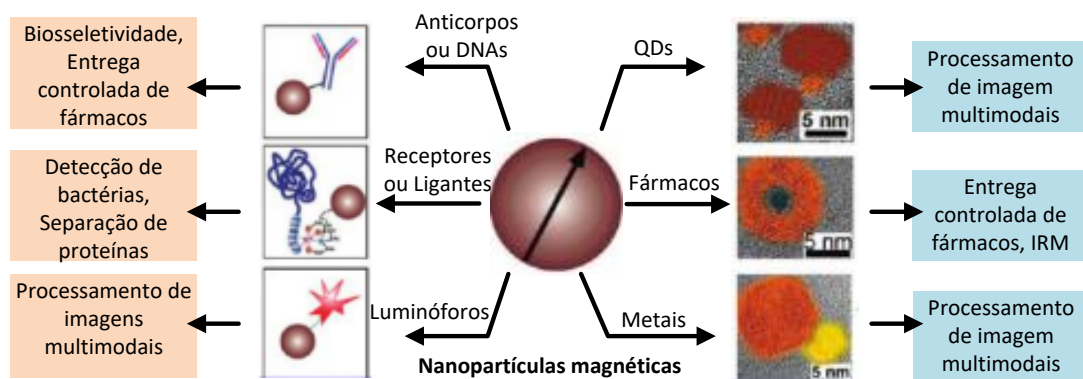


Figura 1 – Ilustração da produção de nanoestruturas multifuncionais magnéticas.

(Fonte: Gao, Gu e Xu, 2009).

Para obter nanoestruturas multifuncionais é necessário utilizar materiais híbridos de nanopartículas com estruturas diferentes, como ilustrado na Figura 2. Não obstante, os sistemas devem ter a mínima toxicidade possível, ser biocompatíveis e, se possível, apresentar biosseletividade para alguns tecidos.

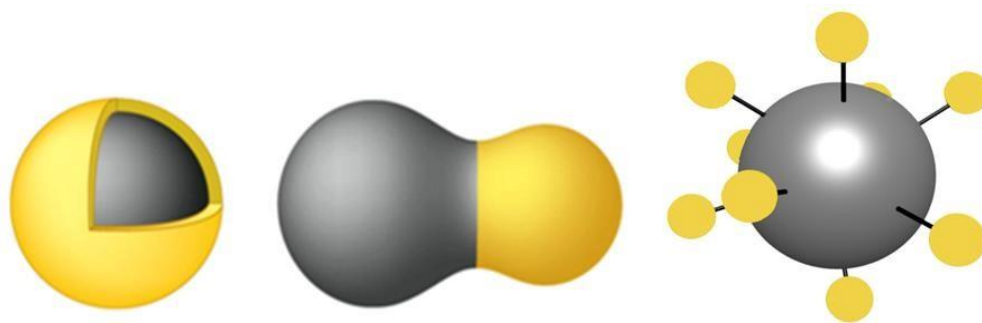


Figura 2 - Ilustração de nanoestruturas (da esquerda para a direita): casca-caroço, heterodímeros e núcleo-satélites.

Todas as estruturas apresentadas têm particularidades pelo que todos os tipos de estrutura devem ser escolhidos de forma a combinar propriedades de dois ou mais materiais distintos. A escolha torna-se dependente das particularidades que se pretendem no tipo de aplicação desejada e não apenas das propriedades intrínsecas dos materiais envolvidos.

Por conseguinte, com a combinação de dois ou mais materiais distintos com diferentes estruturas é possível obter propriedades diferenciadas entre si, por exemplo numa nanoestrutura de casca-caroço $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, o núcleo Fe_3O_4 providencia uma funcionalidade magnética e a camada externa de ouro é o componente de atividade plasmónica e confere proteção ao núcleo por ser quimicamente inerte quando comparado com o óxido de ferro. Mais ainda, o ouro na camada mais externa da nanoestrutura torna a superfície favorável para a ligação de várias biomoléculas (Wang et al., 2005; Xu, Hou & Sun, 2007).

Já numa nanoestrutura do tipo heterodímero onde a nanopartícula de ouro se encontra ligada à superfície do óxido diretamente, mas não a recobre por completo, pelo que não protege o núcleo. Porém, esta nanoestrutura apresenta duas superfícies com diferentes composições químicas onde as moléculas se podem ligar. As propriedades desta nanoestrutura foram descritas por Xu, Hou e Sun (2007) onde esta poderá agir carregada com drogas específicas aplicadas no tratamento de cancro.

Atualmente utilizam-se sistemas conjugados núcleo-satélites com envolvimento de nanopartículas magnéticas e plasmónicas, como nanopartículas de sílica no núcleo e nanopartículas magnéticas os satélites (Lee et al., 2006).

Com um revestimento de superfície adequado as nanopartículas magnéticas podem ser dispersas em solventes, formando suspensões homogêneas, os fluidos magnéticos.

Consequentemente, as nanopartículas magnéticas são tidas como agentes de contraste na ressonância magnética, como carregadores de fármacos guiados por campo magnético no tratamento de tumores via hipertermia, na separação biomolecular magnética e em diagnóstico (Schlorf et al., 2011; Yuan et al., 2010; Vo-Dinh, 2007; Ferguson, Minard & Krishnan, 2009).

Na ressonância magnética, as nanopartículas magnéticas melhoram a diferenciação dos tecidos saudáveis dos patológicos pela inclusão de partículas magnéticas no interior do tecido gerando um sinal muito intenso obtido pelo scanner da ressonância magnética. O principal requisito desta técnica é a captação de partículas magnéticas suficientes por parte das células a partir de mecanismos de endocitose (Brigger, Dubernet & Couvreur, 2002).

A hipertermia por indução magnética é uma das terapêuticas utilizadas no tratamento do cancro, onde os tecidos tumorais são expostos a um campo magnético alterado. Este campo magnético não é absorvido pelos tecidos vivos e pode ser aplicado em regiões mais profundas do organismo. Num campo magnético variável as nanopartículas magnéticas geram algum calor pela perda de histerese magnética. A natureza do material magnético e os parâmetros do campo magnético influenciam a quantidade de calor gerado. Quando as partículas magnéticas se encontram à volta da área tumoral e são submetidas a um campo magnético oscilante estas aumentam a temperatura, dependendo das propriedades magnéticas do material utilizado, da intensidade do campo magnético, frequência de oscilação e capacidade de arrefecer do fluxo sanguíneo na área tumoral. Enquanto as células tumorais são destruídas quando aplicadas temperaturas superiores a 43°C, as células normais conseguem sobreviver a temperaturas mais elevadas (Hafeli & Chastellain, 2006).

Uma das áreas mais promissoras da aplicação de nanopartículas magnéticas é o transporte de fármacos com libertação numa localização específica. Neste método o fármaco pode encontrar-se ligado à superfície da nanopartícula ou dentro da própria nanopartícula. Diversos fatores influenciam não só o tempo de circulação na corrente sanguínea como na biodisponibilidade das nanopartículas no organismo, como o tamanho, carga e composição química (Chouly et al., 1996).

Uma das grandes vantagens da aplicação de nanopartículas magnéticas na administração de fármacos é a diminuição do risco de efeitos colaterais, com o aumento da eficácia terapêutica pela inclusão de intervalos prolongados de administração, diminuição da citotoxicidade, reduzida dosagem e maior adesão, com aumento não só da atividade como da estabilidade do fármaco (Thassu, Deleers & Pathak, 2007).

Quando o direcionamento das nanopartículas ocorre pela presença de campo magnético é necessário atender a alguns problemas. Apesar do direcionamento específico para uma célula poder ocorrer através de revestimentos dirigidos, o tempo que as nanopartículas permanecem na membrana celular pode ser reduzido. Mais ainda, a capacidade de concentração das nanopartículas num local depende da velocidade do fluxo sanguíneo e da intensidade do campo magnético. Desta forma, o sucesso da terapêutica depende, em grande parte, da disponibilidade de campos magnéticos fortes, que produzam grandes gradientes de campo magnético nos locais alvo (Lubbe, Alexiou & Bergemann, 2001).

As nanopartículas magnéticas possuem diversas aplicações nas ciências médicas, tais como agentes de contraste para ressonância magnética, imunoenaios, separação celular, carregamento de fármacos e hipertermia magnética. Especialmente, a magnetita (Fe_3O_4) tem sido intensivamente pesquisada, dada a sua biocompatibilidade e alta saturação magnética (Chigusa et al., 2012). E ainda, são capazes de serem direcionadas para uma área específica do corpo pela ação de um campo magnético externo. O calor gerado pela desmagnetização das nanopartículas pode induzir a lise de células tumorais. As células cancerígenas são destruídas ao serem expostas a temperaturas maiores que $43^{\circ}C$, ao passo que células saudáveis são mais resistentes (Ajay et al., 2005).

Mais recentemente têm sido desenvolvidas investigações na aplicação de nanopartículas magnéticas na terapia genética. A terapia genética ainda não demonstrou muitos benefícios porque ainda não foi possível encontrar um transportador de material genético ideal. Nesta terapia as nanopartículas magnéticas são associadas ao ADN do vetor e transfectadas para células para a influência de um campo magnético externo (Scherer et al., 2002).

2.2. Nanopartículas metálicas com propriedades magnéticas

O domínio científico e tecnológico da escala nanométrica tem crescido rapidamente nos últimos anos, com o aparecimento de novas ferramentas de pesquisa e recentes progressos quer teóricos como experimentais, Figura 3.

O crescimento na nanociência ocorre essencialmente pelo desenvolvimento de novos produtos e processos industriais, com o surgimento de novas categorias de mecanismos e sistemas micro e nanoproduzidos.

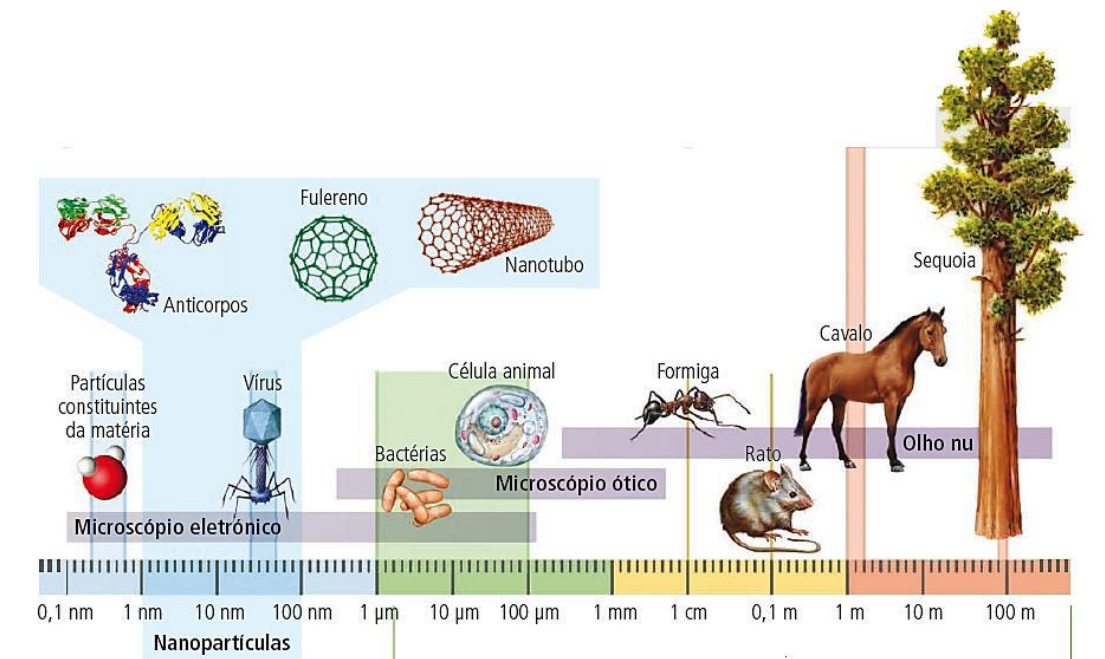


Figura 3 - Representação esquemática da escala manométrica
(fonte: Pestana, Castelão & Aguiar Santos, 2014)

As nanopartículas metálicas possuem propriedades distintas quando comparadas macroscopicamente com outros materiais, tornando-as relevantes na aplicação em biossensores, eletrocatalise e desenvolvimento de dispositivos eletrônicos (Welch & Compton, 2006). Diversos materiais têm sido empregues com sucesso na área da biomedicina como o ouro, prata, platina, paládio e ruténio, destacando-se a aplicação do ouro e da platina (Coronado et al., 2008; Jana, Gearheart & Murphy, 2001; Perez-Juste et al., 2005; Solla-Gullón et al., 2008; Yang et al., 2004).

De forma geral a preparação de nanopartículas magnéticas ocorre por métodos químicos em solução (Perez-Juste et al., 2005; Solla-Gullón et al., 2008; Yang et al., 2004). Este procedimento envolve a utilização de um sal de metal em solução com a adição de um agente redutor, como o citrato de sódio ou borohidreto de sódio (Jana, Gearheart & Murphy, 2001; Solla-Gullón et al., 2008). De acordo com Chen et al., (2005), a presença em solução de uma espécie que adsorve na superfície das nanopartículas de ouro permite estabilizar e funcionalizar as nanopartículas formadas. A ação deste agente, que pode ser o próprio redutor, tem um importante papel no controlo da agregação, tamanho, forma e orientação cristalográfica superficial das nanopartículas. Os métodos com mais ênfase para a síntese de partículas de ouro são a redução direta e crescimento a partir de sementes de reduzidas dimensões.

Na síntese de nanopartículas de platina, um dos redutores mais usados é o hidrogénio, apesar destas nanopartículas de 4 nm possam ser obtidas pela redução com hidrazina ou borohidreto de sódio em microemulsões ou soluções de citrato de sódio (Solla-Gullón et al., 2008). Quando as nanopartículas de platina são de dimensões maiores e forma e estrutura cristalográfica superficial específica formam-se por métodos coloidais, com ajuste das condições de síntese (Solla-Gullón et al., 2008).

Relativamente às propriedades eletrocatalíticas das nanopartículas de platina e ouro o tamanho, forma e a orientação cristalográfica da superfície afetam a resposta eletroquímica e têm um papel fundamental, especialmente em reações sensíveis aos domínios cristalinos da superfície dos elétrodos.

As nanopartículas de ouro têm sido aplicadas no desenvolvimento de biossensores de ADN, quer em solução, com a automontagem de oligonucleótidos tiolados na superfície das nanopartículas, quer imobilizadas (Wang et al., 2003). As nanopartículas de ouro apresentam propriedades óticas que permitem a deteção da hibridação de sequências de ADN de cadeia simples, com grupos tiol e imobilizadas na superfície das nanopartículas, complementares à sequência presente na solução (Hurst, Lytton-Jean & Mirkin, 2006).

Existem diversos métodos para a deteção eletroquímica da hibridação de sequências de ADN a partir de nanopartículas revelando-se um meio vantajoso quanto a custo, sensibilidade e tempo de resposta. Por outro lado, as nanopartículas de ouro possibilitam o aumento da área superficial dos elétrodos e maximiza a imobilização do ADN, bem como a redissolução das nanopartículas de ouro ou prata imobilizadas por hibridação da sequência de ADN ligada às nanopartículas por complementaridade (Li et al., 2010; Wang et al., 2003).

As nanopartículas de ouro são determinantes na amplificação do sinal na microbalança de cristal de quartzo na deteção piezoelétrica da hibridação (Patolsky et al., 2000). As superfícies modificadas com nanopartículas de platina, combinadas com nanotubos de carbono, juntam as vantagens destes materiais, como a transferência eletrónica e atividade eletrocatalítica, aliado ao aumento da sensibilidade do biossensor de ADN.

As nanopartículas metálicas apresentam importantes propriedades óticas, destacando-se o fenómeno de superparamagnetismo em nanopartículas de materiais ferromagnéticos ou ferrimagnéticos, consequentes do reduzido tamanho e em função de alguns fatores. Importa destacar a elevada relação superfície/volume, elevada energia de superfície, confinamento espacial e efeitos quânticos do tamanho (Cao, 2004).

Para compreender o comportamento magnético das nanopartículas é necessário compreender a origem do magnetismo em termos atômicos, assim como a relação do magnetismo com o comportamento magnético macroscópico demonstrado pelos materiais e, posteriormente, compreender a variação do tamanho, em termos nanométricos, que influenciam estas propriedades.

As forças magnéticas são descritas em termos de campo, geradas pelo movimento de partículas eletricamente carregadas (Callister, 2007). Quando no átomo as forças magnéticas são geradas por dois movimentos diferentes dos elétrons, um movimento orbital ao redor do núcleo que gera um pequeno campo magnético e um movimento magnético ao longo do eixo de rotação, e o segundo movimento ocorre em torno do seu próprio eixo (*spin*) gerando um movimento magnético ao longo deste eixo (Figura 4).

Apesar do núcleo ser constituído por partículas carregadas e, por isso, apresentar um pequeno momento magnético, esta é desprezível quando comparada com o momento magnético dos elétrons (Callister, 2007; Cullity & Graham, 2009).

Macroscopicamente um material pode apresentar cinco tipos de magnetismo, como se pode observar na Figura 5: o diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo e antiferromagnetismo e ferrimagnetismo, subclasses de ferromagnetismo.

Os domínios magnéticos são formados de forma a diminuir a energia magnetostática, relacionada com a magnetização do material, e é tanto menor quanto menor é a magnetização. Por conseguinte, sob o ponto de vista energético devem-se formar domínios visto que estes diminuem a magnetização do material. Contudo, quando se formam multidomínios promove-se a produção de paredes de domínios que associados a uma energia que se contrapõe ao ganho energético da formação de domínios (Cullity & Graham, 2009). Com a redução do tamanho do material obtém-se um diâmetro crítico a partir do qual o ganho energético, resultado da formação de domínios, é menor que o gasto energético para a formação das paredes.

A intensidade da coercividade de um material altera-se em função do seu tamanho, passando por um máximo nas proximidades do diâmetro crítico. Esta relação ocorre porque os fatores que afetam a coercividade do material, como o número e tamanho de domínios e mecanismos de desmagnetização do material, quer por rotação de *spin* como por movimentação das paredes de domínio, ambos influenciados pelo tamanho do material (Cullity & Graham, 2009).

De acordo com Beck (2011), o supermagnetismo tem aplicações importantes em biomedicina, essencialmente por as partículas não se encontrarem sujeitas a fortes interações magnéticas, pelo que apresentam uma agregação magnética nula e estabilidade coloidal num meio fisiológico, com uma resposta rápida aos campos magnéticos de baixa intensidade (Beck, 2011).

A penetração dos campos magnéticos nos tecidos e a capacidade de detetar e manipular remotamente o material magnético também tem sido amplamente investigada (Iro et al., 2005).

A utilização de materiais magnéticos de reduzidas dimensões apresenta diversas vantagens, tornando-os aptos para o desenvolvimento de técnicas terapêuticas e de diagnóstico. A coercividade é um dos parâmetros magnéticos das nanopartículas que pode ser ajustada pela redução do tamanho e, conseqüentemente, otimizar o desempenho biomédico da amostra.

O supermagnetismo é mais vantajoso nas experiências *in vivo* pela ausência de coercividade e pelo facto de as nanopartículas não possuírem magnetização depois das medições de diagnóstico ou da terapia, prevenindo a potencial agregação das nanopartículas que poderia causar a formação de embolias nos vasos sanguíneos (Figuerola et al., 2010).

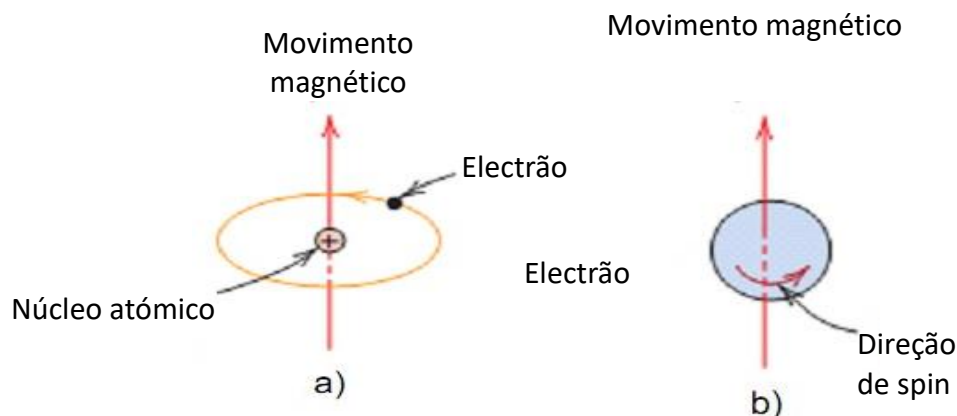


Figura 4- Representação dos movimentos eletrônicos da orbital (a) e spin (b).
(Fonte: Callister, 2007).

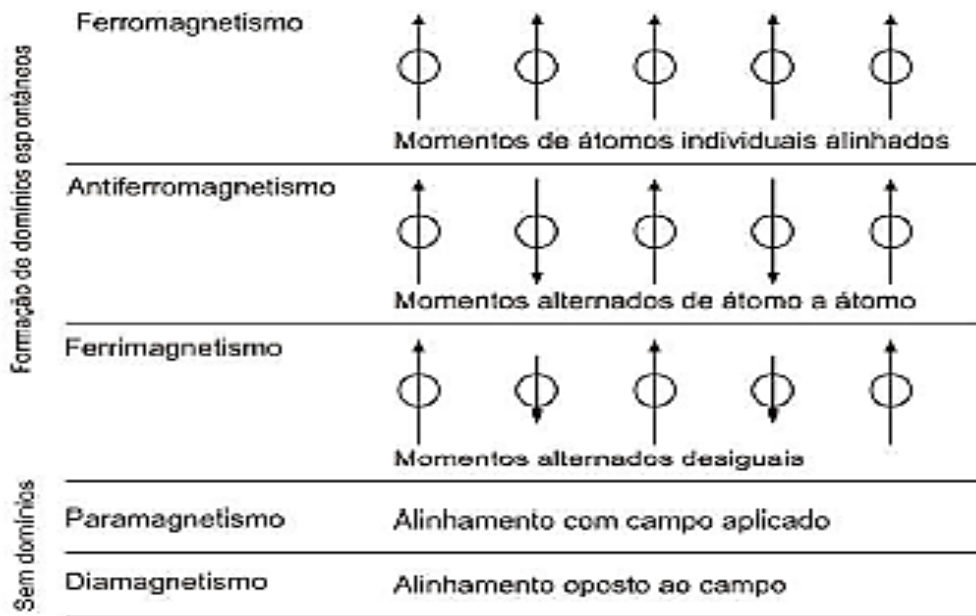


Figura 5 - Os diferentes tipos de comportamento magnético.

(Fonte: Harris, 2002).

2.3. Nanopartículas magnéticas e interação com a radiação eletromagnética

O comportamento magnético encontra-se entre as propriedades físicas das nanopartículas, como a magnetização de saturação, energia de anisotropia, temperatura de ordenamento magnético e transição de fases magnéticas e cristalinas.

As propriedades magnéticas encontram-se essencialmente relacionadas com o comportamento dos *spins*. O comportamento magnético de materiais diferentes é classificado como diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo e superparamagnetismo e ainda antiferromagnetismo e ferrimagnetismo.

Os materiais diamagnéticos não apresentam um momento de *spin* mas sim um momento orbital, pelo facto de os eletrões apresentarem tendência para se agruparem em pares com *spins* orientados em direções opostas, onde cada par apresenta um *spin* total nulo e, por conseguinte, o campo de indução magnética é oposto ao campo externo, com a promoção da repulsão do campo externo.

Os materiais paramagnéticos, como ilustrado na (Figura 6a), possuem eletrões desemparelhados e ordenados aleatoriamente que se alinham quando expostos a um campo magnético externo (Vendrame et al., 2012).

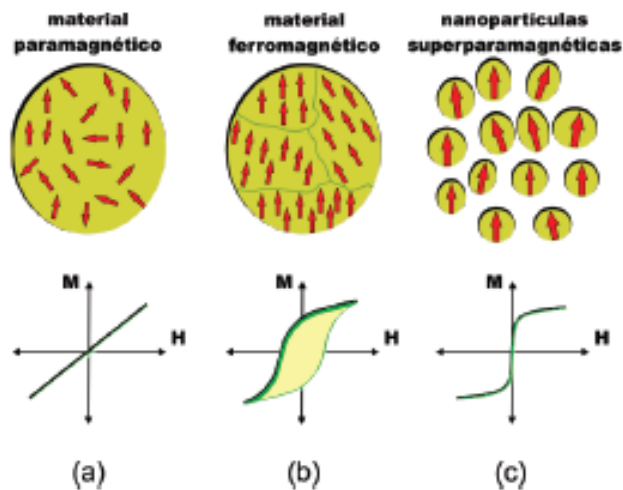


Figura 6 - Ilustração das orientações dos movimentos magnéticos em material paramagnético (a), ferromagnético (b) e superparamagnético (c).

(Legenda: setas vermelhas – orientação dos momentos magnéticos; Gráfico M e H – curvas de histerese magnética para os diferentes comportamentos magnéticos.) (Fonte: Vendreame et al., 2012).

Os materiais ferromagnéticos (Figura 6b) possuem os elétrons desemparelhados e por norma apresentam uma magnetização diferente de zero, que reagem fortemente a um campo magnético externo, com uma estrutura organizada de domínio magnético em estado de magnetização uniforme (Vo-Dinh, 2007). A orientação deste material é aleatório, mas quando exposto a um campo magnético alinha-se de acordo com este tendencialmente e, depois de se remover o campo, assiste-se a uma magnetização remanescente. Para voltar a conseguir a aleatoriedade deve ser fornecida mais energia através de um campo magnético externo de direção oposta, a um campo coercivo, obtendo-se novamente a magnetização nula (Hafeli & Chastellain, 2006).

A energia térmica pode ser suficiente, dependendo do tamanho da partícula, para que o momento magnético oscile em diversas direções, verificando-se um comportamento superparamagnético, ou seja, com maior magnetização (Figura 6c). A estrutura da partícula e forma da superfície pode definir o superparamagnetismo (Hafeli & Chastellain, 2006; Vo-Dinh, 2007).

Quando o diâmetro de um material está abaixo de determinado valor este não retém a magnetização pela falta de estrutura de domínios, mas têm resposta para um campo magnético. Este tamanho crítico depende do material e da forma das partículas, e essa variação pode ser de poucas dezenas de nanómetros para alterar a condição do material para superparamagnética e não ferromagnética (Xiao, Luo & Zhang, 2010).

Por conseguinte, o tamanho, composição e forma de síntese das nanopartículas é determinante para a sua aplicação. Apesar de as partículas superparamagnéticas, ferro e ferrimagnéticas, serem utilizadas no transporte de fármacos, estas são favoráveis para aplicações biomédicas pelo seu comportamento não magnético na ausência de aplicação de um campo magnético externo, evitando a aglomeração (Hafeli & Chastellain, 2006).

O desempenho magnético de um sistema de nanopartículas é condicionado por propriedades físicas individuais das partículas e do ambiente em que se insere. Como já referido, as propriedades mais determinantes são o tamanho, distribuição do tamanho e morfologia das partículas, bem como parâmetros intrínsecos dos materiais, como anisotropia magnetocristalina e magnetização de saturação, e a interação entre a superfície e a interface (Schettino Junior, 2009).

Quando uma amostra, de qualquer material, é submetida a um campo magnético uniforme, gerado por polos de um eletroímã, é induzido um momento de dipolo. Quando a amostra vibra sinusoidalmente gera-se uma corrente elétrica sinusoidal que pode ser induzida em bobinas bem posicionadas. Por sua vez, o sinal apresenta a mesma frequência de vibração e a amplitude pode ser proporcional ao momento magnético e posição relativa do sistema de bobinas. Pela medição do campo podemos obter a curva de histerese do material que fornece o comportamento de magnetização do material (M) em função do campo magnético aplicado (H), ilustrado a Figura 6.

As nanopartículas de óxidos de ferro apresentam um complexo comportamento magnético, regra geral superparamagnético. Este comportamento ocorre pelo facto de estas partículas apresentarem poucos nanómetros de diâmetro, levando as partículas a apresentar grandes áreas superficiais contribuindo, assim, para a anisotropia magnética de superfície na resposta magnética das mesmas. Pelo seu complexo comportamento estrutural e magnético é necessário obter informações mais precisas das propriedades das nanopartículas, além das técnicas convencionais de difração de raios X e medidas de magnetização, por exemplo. Uma alternativa para o estudo de nanopartículas de óxidos de ferro é a espectroscopia Mössbauer que fornece importantes informações do estado do núcleo de ferro (Fonseca et al., 2006).

2.4. Nanopartículas de ouro

A utilização de soluções coloidais de ouro, na coloração de materiais em vidro, datam do período romano (Tauran et al., 2013).

As propriedades dos diferentes tipos de nanopartículas dependem do processo de produção, determinantes no contexto da sua aplicação. Por conseguinte, as nanopartículas podem ser cúbicas, hexagonais, *nanorods* ou esféricas, sendo a última a forma mais comum. Em algumas formas, pelas extremidades afiadas e pontiagudas, o campo magnético encontra-se aumentado, como é o caso das nanopartículas com superfícies espigadas ou com arestas e em forma de estrelas ou *nanorods* (Mieszawska et al., 2013).

As nanopartículas de materiais nobres, em particular as de ouro, apresentam propriedades especiais que as tornam excelentes para a utilização em dispositivos de aplicações médicas, como na imagiologia, sistemas de diagnóstico e processos terapêuticos (Mieszawska et al., 2013).

A interação das nanopartículas de ouro com a luz é uma das propriedades que estas apresentam tanto de útil como de peculiar, comprovado pelas cores intensas e brilhantes observadas nos coloides (Tauran et al., 2013). Quando na presença de um campo eletromagnético oscilatório de luz, a banda de eletrões livres sofre uma oscilação coletiva. O movimento referido apresenta ressonância a uma frequência particular, denominado de oscilação localizada e ressonante do plasmão de superfície. A oscilação ressonante do plasmão pode decair por radiação da energia, resultando numa dispersão de luz, ou decair de forma não radioativa com a transformação de energia em calor. Algumas características como a intensidade do campo magnético, dispersão e absorção são mais fortes na frequência relativa à ressonância plasmão, sendo que no caso do ouro a frequência está localizada na gama do visível (Tauran et al., 2013).

A dispersão ótica determina a utilização das nanopartículas em diferentes tipos de microscopia e, conseqüentemente, têm sido aplicadas na obtenção de imagens por tomografia computadorizada e como adjuvantes na radioterapia, sendo que o ouro pode atuar como atenuador de sinais de raio X (Mieszawska et al., 2013).

Quando as nanopartículas de ouro absorvem luz verifica-se um aumento da sua temperatura, tornando-as agentes importantes para o contraste em imagem foto-acústica e na terapia foto-térmica (Mieszawska et al., 2013).

Pela sua versatilidade, a aplicação das nanopartículas de ouro foi alargada a diversas áreas, tornando-se mais importante especialmente no diagnóstico e terapia integrada, juntando-se ao processo pela combinação de diversas propriedades, utilizado na obtenção de imagem, marcação de alvos de tratamento e entrega de fármacos em determinadas patologias. Já as nanopartículas marcadas com o isótopo Au-198 podem ser utilizadas em radioterapia (Mieszawska et al., 2013), existindo já alguns ensaios em fase clínica para viabilizar a sua utilização nas ciências da vida, sendo por isso fundamental a avaliação da sua toxicidade.

Alguns estudos de toxicidade demonstram que as nanopartículas de ouro são importantes pela interação com as células, sendo que este fenómeno determina a sua maleficência ou beneficência. As características mais importantes neste fenómeno são o tamanho, forma, química da superfície, área da superfície, carga superficial e composição metálica das partículas (Tauran et al., 2013).

Mieszawska et al. (2013) consideram que as nanopartículas de ouro com os tamanhos utilizados na aplicação, são inertes, biocompatíveis e não tóxicas. Mas existem autores que verificam que apesar do ouro no seu estado *bulk* ser tido como seguro são necessários mais estudos para avaliar a sua biocompatibilidade e impacto ambiental em casos onde as nanopartículas são produzidas em grande escala e utilizadas *in vivo* (Murphy et al., 2008).

No estudo de Murphy et al. (2008), os autores verificam que o tipo de células que contactam com as nanopartículas é determinante no tipo de resposta. Estes verificaram que as nanopartículas de ouro são capazes de induzir a morte celular em linhas celulares de carcinoma de pulmão humano, enquanto noutras linhas celulares de rim de rato e no carcinoma hepatocelular humano não existem alterações.

Por outro lado, como já anteriormente visto, a carga superficial das nanopartículas influencia fortemente a resposta celular. As nanopartículas catiónicas são mais citotóxicas do que as aniónicas, podendo o fenómeno ser explicado pela origem da interação electrostática entre as nanopartículas e a membrana carregada negativamente (Tauran et al., 2013).

2.4.1. Síntese e funcionamento de nanopartículas de ouro

Muitas são as estratégias utilizadas na preparação das nanopartículas de ouro. Tradicionalmente a síntese dos sais de ouro ocorre por ação de um agente redutor, o que provoca a nucleação e, por conseguinte, o crescimento das partículas. Contudo, é importante a presença de um estabilizante que pode ser absorvido ou ligado quimicamente à superfície das nanopartículas (Sperling et al., 2008).

Segundo Turkevich, Stevenson & Hillier (1951), o método mais comum de síntese refere que as nanopartículas são sintetizadas na presença de ácido cítrico ou citrato de sódio, atuando não só como agente redutor, mas também como agente estabilizante. Os métodos de síntese semelhantes podem envolver a utilização de solventes orgânicos (Jana & Peng, 2003). As nanopartículas podem ser sintetizadas através de um processo de redução bifásica na qual o sal de metal nobre, como é o caso do ouro, é dissolvido em água e extraído por transferência de fase num solvente orgânico e ocorrendo posteriormente a redução (Brust et al., 1995).

Na produção de nanopartículas de ouro a redução química pode ser conseguida pelo método de Turkevich (Turkevich et al., 1951) e de Brust-Schiffrin (Brust et al., 1994), métodos distintos e muito difundidos, para síntese em meio aquoso e em solvente orgânico, respetivamente.

No método de Turkevich, o cloreto de ouro é dissolvido em água que posteriormente é aquecida até ferver, acrescentando-se citrato de sódio e, conseqüentemente, o sal de ouro é reduzido e formam-se núcleos de ouro com diferentes tamanhos (15 a 150 nm) revestidos de citrato. Contudo, este método não é muito viável em soluções alcalinas e as nanopartículas necessitam de uma funcionalização para que tenham sucesso em aplicações biológicas (Mieszawska et al., 2013). Já no método de Brust-Schiffrin o sal de ouro é transferido da água para o tolueno por transferência química de fase. Um elemento com enxofre (*dodecanetion* por exemplo) é adicionado como um agente de *capping*, sendo que com a adição de borohidreto de sódio o ouro é reduzido e formam-se as nanopartículas. As nanopartículas formadas são muito estáveis, de tamanho inferior ao obtido no método de Turkevich (1 a 5nm) e solúveis em solventes não polares. Para as nanopartículas formadas serem utilizadas em sistemas biológicos é necessário proceder a uma mudança de ligante ou funcionalização adicional com lípidos ou polímeros anfílicos (Mieszawska et al., 2013).

Existem ainda outros métodos sintéticos e biológicos que culminam na produção de nano partículas de ouro, como a utilização de radiação ultravioleta ou micro-ondas e recorrendo a micro-organismos ou extratos de plantas, as sínteses verdes. As variações efetuadas nos processos determinam a obtenção de partículas com diferentes características (Mieszawska et al., 2013).

Em solução, estes procedimentos químicos podem ser efetuados em contacto com superfícies funcionalizadas com moléculas ligantes, agindo como intermediárias na formação dos *clusters* de átomos do elemento a depositar. As moléculas ligam-se aos *clusters* e evitam a agregação das partículas no material em estado *bulk*, controlando o tamanho das nanopartículas produzidas. Os sistemas que permitem controlar o tamanho dos *clusters* podem ser de diversos tipos, nomeadamente monocamadas hidrofóbicas, monocamadas carregadas positiva ou negativamente e camadas de polímeros. Com a associação das nanopartículas a outras moléculas obtém-se funcionalidades químicas que resultam num sistema capaz de reconhecer ou ter afinidades, com várias moléculas e ditar a estrutura e agregação dessas partículas. Nesta fase as nanopartículas ganham novas propriedades resultantes da interação com agentes de *capping*. (Katz & Willner, 2004).

O controlo dos processos acima descrito é muito importante pela importância do total controlo do tamanho, forma, propriedades da superfície e propriedades óticas das nanopartículas, conseguindo-se assim uma maior homogeneidade e manipulação de acordo com as especificidades da sua aplicação. Isto é, a absorvância das nanopartículas de ouro é superior no estado de *bulk* e pode variar da zona do visível até ao *near-infrared* de acordo com o tamanho e morfologia das partículas. Consequentemente, é conferido um grande potencial na área de diagnóstico, uma vez que o tecido biológico apresenta pouca absorção nestes comprimentos de onda (Mieszawska et al., 2013).

Para a aplicação dos nanomateriais em biomedicina, é necessário torná-los híbridos orgânicos/inorgânicos de modo a permitir ajustar os parâmetros como: o tamanho, a forma e os grupos funcionais à superfície pela seleção adequada do polímero na superfície (Tuncel & Demir, 2010).

Dos polímeros utilizados, os dendrímeros são vastamente utilizados no encapsulamento e estabilização de nanopartículas metálicas, tratando-se de macromoléculas com baixa polidispersividade e arquitetura tridimensional regular e altamente ramificada (Crooks et al., 2001; Wang et al., 2010). Os grupos terminais dos dendrímeros podem ser alterados de forma a controlar a solubilidade do nanocompósito, facilitar a ligação a superfícies e outras moléculas (Tokuhisa et al., 1998). Na Figura 7 é apresentada a estrutura do dendrímero.

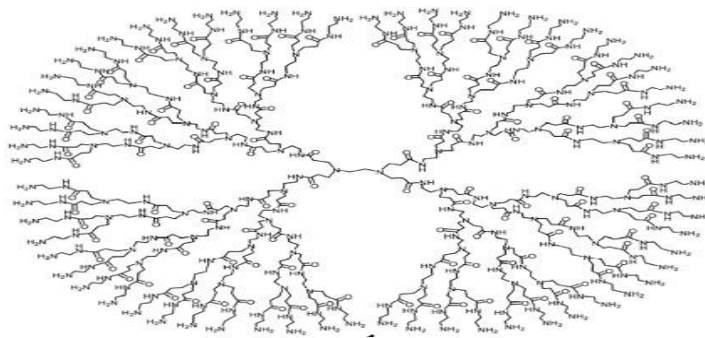


Figura 7 - Estrutura molecular do dendrímero.

(Fonte: Wang et al.,2010)

A aplicação de nanopartículas de ouro na biomedicina é permitida pela ressonância do plasmão de superfície e depende de vários parâmetros como, as propriedades físicas do meio onde estão dispersas, do seu tamanho e geometria. Na água a absorção de nanopartículas de ouro com tamanho entre os 3 e 80 nm apresentam um pico bem definido a 570 nm (Tauran et al., 2013).

As nanopartículas de ouro com diâmetro superior a 2 nm apresentam propriedades elétricas no estado *bulk*. Desta forma, o transporte de elétrões passa por níveis contínuos de energia. Em suma, sabe-se que nas propriedades eletrônicas importa essencialmente o tamanho e constante dielétrica do meio envolvente. Porém, a carga superficial e o transporte de elétrões pode ser compreendido através de equações clássicas de diagramas de circuitos eletrônicos resistência/condensador. Já nos casos de nanopartículas semicondutoras o transporte de elétrões é explicado pela descrição mecânica quântica, permitindo às partículas a integração em sensores elétricos e *chips* (Tauran et al., 2013).

Pelas propriedades mencionadas as nanopartículas de ouro podem ser consideradas para uso em deteção de moléculas, como droga ou células com marcadores químicos superficiais (Mieszawska et al., 2013). Esta sensibilidade deve-se principalmente à elevada sensibilidade das nanopartículas em determinados comprimentos de onda, bem como à intensidade do plasmão de ressonância e estado de agregação (Tauran et al., 2013).

Segundo Katz e Willner (2004), os estados de agregação podem ser classificados em três tipos: adsorção electroestática, adsorção química e métodos de afinidade.

A adsorção electrostática é a adsorção de moléculas carregadas positivamente nas nanopartículas estabilizadas com ligadores negativos. Este tipo de agregação é usualmente utilizado em trabalhos com proteínas, sendo que mesmo tratando-se de um método simples e fácil, este é muito suscetível de flutuações ambientais como o pH e força iónica, assim como é restrito o leque de moléculas funcionalizantes (Tauran et al., 2013).

A adsorção química obtém-se pela afinidade dos metais nobres com grupos de enxofre, através da preparação de ácidos nucleicos com grupos de enxofre “pendentes” pela síntese da fase sólida, que auxilia a sua ligação a nanopartículas metálicas. De facto, depois das proteínas, os ácidos nucleicos as biomoléculas mais estudadas e utilizadas no *capping* de nanopartículas de metais, apresentando como vantagem a utilização com base na afinidade e tratar-se de uma técnica robusta que permite a orientação para moléculas à superfície das nanopartículas. Contudo, apresenta como desvantagem a modificação das moléculas em muitas situações (Tauran et al., 2013).

Os métodos de afinidade, como as ligações covalentes podem ser obtidos por um ligante bifuncional que funciona como âncora entre a molécula de interesse e a nanopartícula. Este fenómeno depende de um processo bifásico onde, inicialmente, se procede à ativação com formação de uma camada na superfície da nanopartícula que funciona como âncora e que expõe os grupos funcionais a que as moléculas se ligam covalentemente. Posteriormente, procede-se à funcionalização onde as biomoléculas são ligadas e criam um sistema de reconhecimento. Por norma a molécula utilizada na funcionalização é específica e fornece um local de elevada afinidade para a molécula a que se vai ligar. Por norma, os métodos de afinidade são utilizados na ligação específica de proteínas e oligonucleótidos, sendo que as proteínas são muito utilizadas na funcionalização das nanopartículas pela sua elevada versatilidade e importância biológica. No caso das nanopartículas de ouro estas podem ser funcionalizadas com streotavidina que desencadeia a ligação de proteínas, por afinidade, como de imunoglobulinas e albuminas do soro, ou oligonucleótidos ligados a biotina (Tauran et al., 2013). As nanopartículas de ouro podem ser encapsuladas em lipossomas ou otimizar as técnicas de diagnóstico pelo transporte de sondas (Mieszawska et al., 2013).

Importa salientar a importância da estabilidade das nanopartículas em solução, uma vez que pode ser uma grande problemática a agregação das nanopartículas. Esta agregação deve-se ao somatório das forças repulsivas e atrativas geradas entre as partículas. Se prevalecerem as forças atrativas, irão formar-se os chamados *clusters*, uma vez que é promovida a agregação. Pelo contrário, se prevalecerem as forças repulsivas prevenir-se-á essa agregação.

Esta estabilidade dos nanomateriais em suspensão aquosa pode ser obtida por mecanismos eletrostático e/ou estérico, Figura 8. A estabilização eletrostática (Figura 8a) prevê a obtenção de estabilidade pelo balanço entre as forças atrativas de Van der Waals e repulsivas eletrostáticas (Kumar, 2005). Este método permite que as nanopartículas se mantenham estáveis, não se agreguem, e a intensidade da força eletrostática repulsiva é tanto maior quanto maior a intensidade da força atrativa de Van der Waals, isto é, as nanopartículas não se agregam quando apresentam densidade de carga suficiente na superfície. Por sua vez, na estabilização estérica (Figura 8b) as camadas de moléculas longas, que podem ser polímeros ou tensioativos não iônicos, absorvidos na superfície da partícula e repelem-se uns aos outros por repulsão estérica, impedindo a agregação das partículas.



Figura 8 – Ilustração esquemática da estabilização de partículas pelo efeito eletrostático (a) e estérico (b).

2.5. Ressonância plasmónica

As propriedades óticas das nanopartículas de ouro foram desde o tempo romano empregues nas obras de artesãos, como no cálice de Licurgo, datado do século IV a.c. que refletia verde apesar da cor transmitida ser o vermelho, retratando o efeito plasmónico (Jain et al., 2006).

Os primeiros estudos de síntese de dispersão coloidal de nanopartículas de ouro datam do século XIX, onde as cores intensas apresentadas pelos colóides são provenientes da

interação do campo eletromagnético da luz incidente com os elétrons livres da banda de valência das nanopartículas Figura 9.

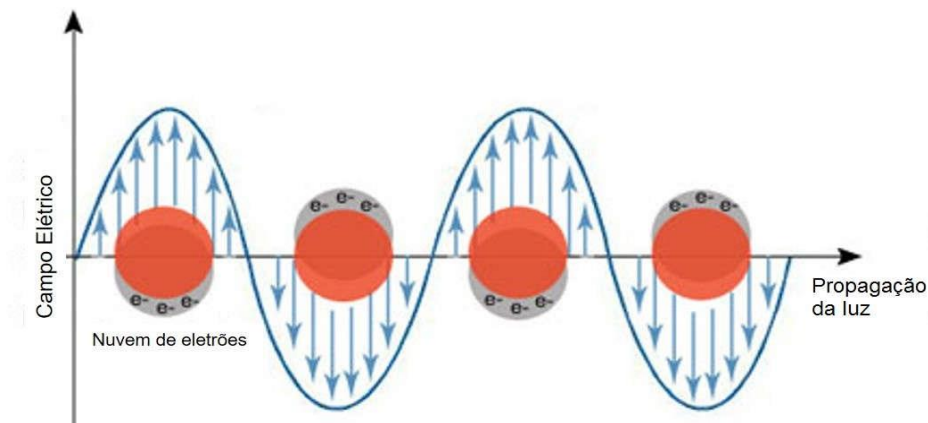


Figura 9 – Ilustração do fenômeno de ressonância plasmônica.

(Fonte: Jain et al.,2006)

Quando se verifica uma oscilação eletrônica em ressonância com a frequência de radiação incidente verifica-se interação entre a luz e a matéria, sendo estas oscilações em ressonância designadas de plasmões. Os plasmões podem ser descritos como dipolos elétricos cuja energia depende essencialmente da morfologia e dimensão das nanopartículas.

A ressonância plasmônica é então, a responsável pelos coeficientes altíssimos de absorção e dispersão na região do visível, assim como as propriedades permitem maior sensibilidade, em métodos de detecção óticos do que os corantes orgânicos convencionais (Mie, 1908).

Mie (1908) formalizou e descreveu o fenômeno da ressonância plasmônica pela resolução das equações de Maxwell de forma a explicar a absorção e dispersão da radiação eletromagnética por partículas esféricas. Posteriormente verificou-se que a solução analítica de Mie não era aplicável em geometrias mais complexas, tornando-se necessário recorrer a outros métodos numéricos para a resolução da condição de ressonância.

Nas partículas não esféricas verifica-se um desfasamento dos elétrons de condução e um atraso no campo dipolar através de dois métodos, a aproximação do dipolo discreto e a diferença finita no domínio do tempo (Fong & Yung, 2013). Os métodos descritos permitem prever de forma matemática os espectros de extinção de coloides de nanopartículas esféricas

e não esféricas, onde os cálculos da frequência de ressonância se traduzem no surgimento de uma ou mais ressonâncias plasmônicas, respetivamente.

A ressonância plasmónica apresenta-se localizada na região do visível do espectro eletromagnético e o posicionamento exato do comprimento de onda depende de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos às nanopartículas, como a composição, o tamanho, a forma e a cristalinidade, a distancia entre partículas e/ou a interação das nanopartículas com o meio envolvente (Murphy et al.,2005).

As nanopartículas de ouro em forma de estrela são um ótimo exemplo da existência de múltiplos modos de ressonância plasmónica degenerados. No espectro do visível e ultravioleta estas nanopartículas apresentam mais do que uma ressonância plasmónica, por norma duas, mas estas podem apresentar um número variável de pontas, isto é, de alteração de simetria, ou as últimas apresentam tamanhos diferentes. Provavelmente as ressonâncias plasmónicas apresentam diferentes intensidades que se podem sobrepor e formar uma banda muito alargada (Liz-Marzán, 2006).

Capítulo III

3. Técnicas de síntese e de caracterização de nanopartículas metálicas (MNPs)

Técnicas de síntese

3.1. Síntese de NPs por *Ball Milling*

A moagem em moinho de bolas (*ball milling*), é uma técnica de síntese de nanopartículas, nomeadamente nanopartículas magnéticas de diferentes composições (Kadogan, Hadjipanayis & Sellmyer, 2009). Este processo é influenciado por diferentes parâmetros tais como: o tempo de milling, a velocidade (rpm), o número de esferas, o tamanho das esferas e a quantidade de amostra (Zeng et al., 1999).

Quando no *ball milling* é utilizado um elevado número de esferas relativamente ao peso da amostra, por exemplo numa proporção de 20:1 e/ou 40:1, haverá tendência à formação de agregados (Zeng et al., 1999).

A adição de surfactante aumenta a eficiência do *ball milling* impedindo que haja agregação ou oxidação das partículas durante o processo. Contudo, a utilização deste método ainda apresenta algumas limitações tais como a granulometria e o grau de amorfização das partículas bem como a possível contaminação (Kadogan, Hadjipanayis & Sellmyer, 2009).

O tipo e a quantidade de surfactante influenciam não só o tamanho das partículas obtidas, mas também a sua forma e pureza (Suryanarayana, 2001). De acordo com Myers et al., (2006) quando o surfactante entra em contacto com um sólido, verifica-se a sua adsorção à superfície, com a formação de uma camada protetora. Desta forma, o surfactante reduz a energia interfacial com a promoção da formação de partículas de menores dimensões durante o processo.

No trabalho desenvolvido por Zeng et al., (1999) a aplicação de ácido esteárico (surfactante) durante o processo de *ball milling* da liga magnética neodímio-ferro-boro, preveniu a aglomeração das partículas, mas não conseguiu melhorar as suas propriedades magnéticas.

No *ball milling* é utilizado um moinho para centrifugação e um recipiente de moagem. Neste recipiente o material sofre um impacto e é moído por esferas, onde o recipiente e o seu

suporte giram em sentidos opostos para que as forças de centrifugação atuem de forma alternada na mesma direção e na direção oposta (Fritsch, 2007).

3.2. Síntese de NPs com solventes

A síntese de nanopartículas metálicas com recurso a solventes é uma forma de síntese simples e flexível, que permite controlar o tamanho, a composição química e, em alguns casos, a forma das nanopartículas (Gupta & Gupta, 2005).

Esta metodologia tem por base o controlo da nucleação e crescimento dos produtos de reação. Neste processo, as reações ocorrem em ambientes controlados durante o processo de reação, através da ligação de ligandos à superfície das nanopartículas magnéticas (Figuerola et al., 2010).

Existem várias técnicas de síntese com solventes, tais como a coprecipitação, decomposição térmica, reação solução-gel e síntese de microemulsão.

A coprecipitação é a técnica de síntese com solventes mais utilizada na obtenção de nanopartículas magnéticas devido à sua simplicidade e eficácia (Laurent et al. 2008). As nanopartículas podem ser obtidas a partir de um sal precipitado numa solução aquosa com a adição de uma base, sendo que a composição, tamanho e forma das nanopartículas magnéticas depende do pH, forma iónica e sais utilizados, como cloretos, sulfatos, nitratos e percloratos, por exemplo (Hadjipanayis & Siegel, 1994). Na coprecipitação é necessário ter especial cuidado no controlo dos valores de pH. Mais ainda, pelo aumento da relação área superficial/volume, as nanopartículas em meio líquido agregam-se para reduzir a energia superficial (Teja & Koh, 2009). Este último fenómeno é o responsável pelos picos de dispersão estreitos que continuam a representar um desafio nesta técnica. A limitação do controlo da dispersão provém dos fatores cinéticos relacionados com o controlo do crescimento do cristal. Para o controlo da cinética da reação é necessário que a síntese ocorra num ambiente livre de oxigénio, com a utilização de um gás inerte, como o azoto e argón, por exemplo. Desta forma, consegue-se abrandar a oxidação e reduzir o tamanho das nanopartículas, comparativamente à reação realizada na presença de oxigénio (Gupta & Curtis, 2004).

A coprecipitação decorre em duas fases: a nucleação e o crescimento do núcleo. A fase da nucleação é rápida e ocorre quando se atinge a supersaturação crítica da solução, enquanto o crescimento do núcleo ocorre pela difusão lenta dos solutos na superfície dos cristais (Schwertmann & Cornell, 1991). Estas fases devem ocorrer de forma isolada, e durante o

período de crescimento não se deve verificar nucleação que, por sua vez, deve ser estritamente controlada de forma a produzir monodispersões e um crescimento lento. Por conseguinte, o tamanho das nanopartículas monodispersas é controlado na curta etapa de nucleação onde se obtém o número de nanopartículas final e que não se altera durante o crescimento. Recorre-se frequentemente à adição de soluções estabilizadoras e/ou redutoras (por exemplo, álcool polivinílico) com o surfactante otimiza a reação (Lee et al., 1996).

A decomposição térmica utiliza precursores em solventes a elevadas temperaturas de ebulição, a rondar os 250-500°C, juntamente com estabilizadores surfactantes. Podem ser precursores organometálicos os acetilacetatos metálicos e ferronatos metálicos (Geng et al., 2007), enquanto os surfactantes mais comuns são os ácidos gordos e a hexadecilamina. As nanopartículas magnéticas obtidas nesta metodologia têm entre 3 a 60 nm (Cheng & Sun, 2010).

O método por reação solução-gel envolve a hidrólise e condensação de precursores moleculares em solução. Por norma o solvente utilizado é a água, mas a hidrólise dos precursores também pode ocorrer por ação de um ácido ou uma base. O processo de hidrólise e polimerização inorgânica criam uma rede tridimensional de óxidos metálicos, o gel coloidal (Lam et al., 2008). As reações de hidrólise mais lentas e com os parâmetros mais controlados, como a temperatura, concentração dos sais precursores, pH e agitação, geram partículas mais pequenas (Dai et al., 2005). De acordo com Chanéac et al., (1995), uma das principais vantagens deste método é permitir a produção de materiais amorfos com várias formas e monodispersões. Por outro lado, a reação solução-gel permite controlar o tamanho das nanopartículas e adicionar moléculas que mantêm a estabilidade e propriedades no interior da matriz solução-gel.

A capacidade da água, a temperaturas e pressões elevadas, em hidrolisar e desidratar sais metálicos, bem como o facto de nestas condições os óxidos metálicos produzidos serem pouco solúveis na água, causando supersaturação, constitui a base da síntese hidrotermal. As reações desta síntese ocorrem em reatores ou autoclaves, em meios aquosos, com pressões e temperaturas superiores a 2000 psi e 200°C, respetivamente (Tavakoli et al., 2007).

A síntese em microemulsão é uma dispersão isotrópica termodinamicamente estável que ocorre em dois líquidos imiscíveis que são estabilizados por um surfactante (Pillai et al., 1995). As micelas são as estruturas mais usadas na forma normal, óleo em água, e na forma inversa, água em óleo, sendo que em ambas as formas a fase dispersa são gotas

monodispersas entre 1 a 100 nm. Quando um metal solúvel é adicionado à microemulsão água em óleo da fase aquosa este permanece nas microgotas aquosas rodeadas por óleo. As microgotas colidem, coalescem e quebram-se novamente, sendo que através do ajuste do tamanho dos núcleos das micelas consegue-se obter nanopartículas de tamanhos diferentes (Tavakoli et al., 2007).

Dentro da síntese com solventes as várias técnicas permitem controlar o tamanho, a distribuição do tamanho, a forma, a estrutura cristalina e superficial, bem como as propriedades magnéticas das nanopartículas. Das técnicas apresentadas aquela que possibilita maior controle é a síntese hidrotermal, mas o método de coprecipitação é aquele que apresenta um protocolo mais simples, não necessitam de equipamento e possuem um custo baixo.

Técnicas de Caracterização

3.3. Suscetibilidade Magnética

Quando as alterações no momento magnético, induzidas por um campo magnético externo, levam mais tempo do que o tempo de relaxação, as partículas apresentam um comportamento supermagnético. A frequência do campo alternado influencia a passagem do estado ferromagnético para superparamagnético. Quando os valores de frequência são muito elevados a magnetização não acompanha o campo magnético e fica desfasada deste. Nestas situações a suscetibilidade magnética é um número complexo que fornece a diferença de fase que pode ser medido através de um magnetómetro. Este dispositivo tem como base o sinal induzido pelas amostras introduzidas numa bobina de deteção quando estas são expostas a um campo magnético criado pelas bobinas do sistema de hipertermia (Dutz & Hergt, 2014). Dutz e Hergt (2014), afirmam também que na suscetibilidade magnética a componente imaginária encontra-se diretamente relacionada com a componente de magnetização que não se altera com o campo aplicado e retrata a energia dissipada.

O cálculo da suscetibilidade magnética também pode ser efetuado pela determinação das perdas do ciclo de histerese magnética na curva M (H) e determinar o Specific Hysteresis Losses (SHL) pelo cálculo da área do ciclo de histerese (Dutz & Hergt, 2014). Na figura 10 encontra-se representada a dependência do SHL com o diâmetro das nanopartículas, neste caso específico de magnetite, e a amplitude do campo magnético usado.

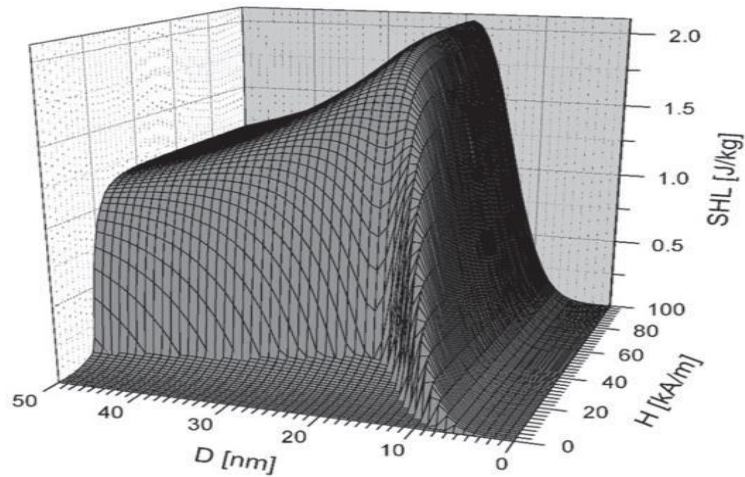


Figura 10- Representação da relação do SHL com o diâmetro das nanopartículas e campo magnético.

(Fonte: Dutz & Hergt, 2014).

Pela interpretação da imagem 10 podemos afirmar que o SHL aumenta com o aumento do campo magnético utilizado e com a diminuição do diâmetro das partículas magnéticas (Dutz & Hergt, 2014).

O tamanho das nanopartículas também influencia o calor dissipado, isto é, numa distribuição mais estreita observa-se uma potência calorífica dissipada mais eficaz. Este fenómeno deve-se à seleção da amplitude e frequência do campo que são feitas de forma a otimizar o processo (Dutz & Hergt, 2014).

Outro procedimento para efetuar medições de suscetibilidade magnética numa amostra, pode ser seguindo o Método de Gouy onde é usada uma balança específica (*Balança de Gouy*), inventada pelo físico Francês *Louis Georges Gouy*, que serve para medir a atração ou repulsão por um gradiente de campo magnético, derivado da mudança energética produzida por este campo. Segundo Saunderson A., (1968), a amostra é introduzida num recipiente cilíndrico, suspenso na balança entre os polos de um íman. A balança mede a variação aparente de massa, quando a amostra é repelida ou atraída para a região de maior campo magnético entre os polos. A força que constitui a variação aparente de peso está relacionada com a suscetibilidade por:

Seguindo o procedimento descrito pelo Método de Gouy:

$$X_g = \frac{C_{Ball} \cdot l \cdot (R-R_0)}{10^9 \cdot m} \text{ c.g.s (cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1})$$

Onde:

Constante da balança (C_{Ball}) = 1,101; l = altura (cm); m = massa (g); R = leitura; R_0 = Leitura do tubo vazio.



Figura 11 - Balança para medição de suscetibilidade magnética.

3.4. Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia UV-Vis avalia a capacidade de uma determinada amostra absorver uma radiação de comprimento de onda na região do ultravioleta (UV) e/ou visível (Vis). Sendo que, parte da radiação é absorvida pela amostra e medida através de um espectrofotômetro e a restante atravessa a referida amostra. Esta técnica permite quantificar a concentração de substâncias numa solução quando expostas a radiação da zona do ultravioleta e visível, de acordo com a lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon c l$$

Por conseguinte, a absorvância (A) encontra-se relacionada com o coeficiente de extinção molar (ϵ), concentração (c) e percurso ótico (l), sendo que é necessário conhecer a constante ótica das nanopartículas (Valcárcel & López-Lorente, 2014).

3.4.1. Sólidos/Filmes

Desde os primeiros estudos de Yoshimura, Waki e Ohashi (1976), a utilização da espectroscopia em fase sólida tem sido desenvolvida e aplicada pela sua simplicidade e baixos limites de deteção. Contudo, para a aplicação desta técnica em amostras sólidas são necessários alguns pré-requisitos como a reversibilidade (quando se inverte o sentido de propagação da luz, a sua trajetória não muda), estabilidade da fase sólida no meio da amostra, cinética de retenção e transparência do suporte sólido (Teixeira et al., 2001).

A sensibilidade dos resultados obtidos depende de alguns fatores relacionados com o percurso ótico percorrido e o volume da amostra analisada (Matsuoka, Yoshimura & Tateda, 1995).

3.4.2. Líquidos

A sensibilidade da espectroscopia UV-Vis reflete a capacidade de o instrumento medir a quantidade mínima de amostra, refletindo a concentração do composto em solução.

Para as amostras líquidas o espectro de absorção é obtido pela monitorização da intensidade da radiação incidente (I_0) e transmitida (I) – Lei de Lambert-Beer, sendo a absorvância calculada pela razão: I/I_0 . Em suma, a absorvância é calculada em função num determinado comprimento de onda.

A lei de Lambert-Beer refere ainda que existe uma relação entre a absorvância de uma solução e a sua concentração, quando atravessada por uma radiação luminosa monocromática.

3.5. Microscopia Eletrónica

Pela microscopia eletrónica é possível obter a seguinte informação:

- Topográfica – detalhes e textura da superfície de uma amostra;
- Morfológica – tamanho e forma da superfície da amostra;
- Composicional – elementar e abundância relativa;
- Cristalográfica – arranjo atómico dos componentes da amostra.

A microscopia eletrónica utiliza um feixe de eletrões focado e monocromático, de elevada energia que é excitado por um campo elétrico positivo antes de incidir na amostra.

Os eletrões podem interagir de formas distintas com a amostra, originando eletrões retro-difundidos, secundários, Auger e raios-X e transmitidos, de acordo com a espessura da amostra.

3.5.1. TEM

Na análise morfológica por TEM (Microscopia Eletrônica de Transmissão) o microscópio tem como principais características a fonte de elétrons num feixe monocromático focado através de um sistema de lentes e condensadores que controlam o tamanho do feixe incidente na amostra (Marc De Graef, 2003).

O feixe transmitido pela amostra é focado por uma objetiva numa imagem, ampliada por um sistema de lentes antes de se visionar. As zonas escuras representam áreas mais espessas ou densas, enquanto as zonas claras refletem áreas mais finas ou menos densas que, na amostra, refletem a transmissão de mais ou menos elétrons, respetivamente.

Com a técnica de TEM é possível avaliar o tamanho, forma e arranjo das partículas da amostra. A técnica permite a junção de diferentes detetores, como detetores de emissão de raios-X específicos dos elementos presentes na amostra que, por sua vez, permitem a análise estrutural e composicional da mesma.

A lei de Bragg que interpreta a difração das ondas eletromagnéticas por um cristal, onde o processo de difração é a reação das ondas em contato com um obstáculo que não é totalmente transparente, permite compreender melhor esta técnica. Esta lei baseia-se na equação:

$$\lambda = 2d \sin\theta$$

Onde o ângulo de difração (θ) depende da natureza dos átomos da amostra, da distância interatômica (d), pelo que os elétrons difratados no mesmo ângulo podem ser utilizados na formação de padrões de pontos onde cada um é uma distância interatômica específica, ou seja, um plano de difração, gerando informação da orientação, arranjos atômicos e fases de uma amostra.

Não obstante esta é uma técnica que apresenta algumas desvantagens, como a complexidade e morosidade da preparação de amostras, aliado à baixa área de análise que poderá não representar a globalidade da amostra.

3.5.2. SEM

Na análise SEM (Microscopia Eletrônica de Varrimento, do inglês *Scanning*) é utilizado um microscópio com uma fonte de elétrons de alta energia monocromática, por um sistema de lentes, condensadores e objetiva que focam o feixe na amostra, e onde são feitos

varrimentos utilizando detetores para os sinais de interesse e sistemas de vácuo e arrefecimento (Gabriel, 1985).

Emprega igualmente um feixe de eletrões, mas em vez de estes atravessarem a amostra, colidem com a sua superfície, previamente metalizada, e libertam eletrões secundários (Gabriel, 1985). Assim, os eletrões secundários são gerados quando o eletrão incidente se aproxima de um átomo da amostra de forma a transferir energia para os eletrões menos energéticos. Desta forma, é criada uma perda de energia e desvio do trajeto do eletrão incidente e ionização do eletrão no átomo da amostra, gerando energia cinética muito baixa no átomo (5 eV). A produção de eletrões secundários está relacionada com a topografia da amostra, sendo que como apresenta uma energia muito baixa só podem ser analisados os eletrões secundários próximos da superfície da amostra (menos 10 nm). Daí o poder de resolução dos SEM ser da ordem de 10nm, e a ampliação atinge valores da ordem de 20.000x.

Os eletrões secundários e retrodifundidos são ambos utilizados na obtenção da imagem. Os eletrões secundários apresentam um contraste topográfico forte, importante para ilustrar a morfologia da amostra, já os eletrões retrodifundidos são importantes na ilustração de contrastes na composição de amostras multifásicas. Estes últimos possibilitam a distinção de regiões de átomos leves e pesados na amostra, com a visualização clara da rugosidade das amostras pelo seu efeito de sombra. Mais ainda, os eletrões retrodifundidos não são alterados pelos efeitos locais de fraca condutividade dos materiais (FCUL, 2009).

A SEM é uma técnica que não destrói a amostra e permite obter imagens com elevada resolução dos detalhes da superfície da amostra, mapear os elementos da mesma, bem como obter uma análise química de pontos na superfície, a partir de um sistema de espectroscopia de raios-X de dispersão, e discriminar fases de acordo com o número atómico (Gabriel, 1985).

Nesta técnica é necessário utilizar amostras sólidas com dimensões apropriadas para a câmara do microscópio, com condutibilidade, mesmo que relativamente reduzida, e estáveis em sistema de vácuo, apesar de já existirem microscópios que funcionam em vácuo baixo e condições ambientais. Caso as amostras não sejam condutoras, e o microscópio seja convencional, pode revestir a amostra com uma camada fina de um metal condutor, como carbono ou ouro.

3.6. Técnicas de Simulação computacional

As técnicas de simulação usadas refletem um estudo teórico das propriedades plasmônicas das nanopartículas. As propriedades plasmônicas das nanopartículas são determinadas, principalmente pela sua forma. As variações de formas não esféricas dão origem a novas propriedades e peculiaridades diferentes das formas esféricas. A capacidade de controlar as formas das nanopartículas permite o controle das suas propriedades óticas e comportamento ao longo do comprimento de onda, determinando a resposta no espectro característico.

No entanto, a solução analítica das equações que descrevem esses efeitos, tem uma resolução complexa que só é possível para geometrias simples. Formas diferentes da esfera só podem ser analisadas recorrendo a simulação computacional.

As técnicas de simulação usadas para a nossa análise são a formulação da teoria de Mie, baseada na função Riccati-Bessel para avaliar os coeficientes de Mie (a_n , b_n) apresentados por Bohren e Huffman, onde a extinção total (Q_{ext}), a eficiência de dispersão (Q_{sca}) e de absorção (Q_{abs}) são calculadas como séries infinitas. Estas eficiências adimensionais Q_{ext} , Q_{sca} e Q_{abs} , podem ser facilmente convertidas para as secções transversais correspondentes C_{ext} , C_{sca} e C_{abs} multiplicando-se com a área de secção transversal geométrica da nanopartícula ($\sigma = 4\pi R^2$), uma vez que é conhecido o raio (R) da nanoesfera (Bohren et Huffman, 2008).

A simulação para outras geometrias foi realizada recorrendo ao método de Aproximação Dipolar Discreto (DDA) pela versão DDSCAT, um software disponível livremente (Flatau et. Draine, 2014) que produz o espectro sobre a absorção ótica e dispersão de nanopartículas de qualquer geometria arbitrária num formato comparável à teoria de Mie.

As simulações baseadas no software DDSCAT serão comparadas com medidas experimentais de soluções de nanopartículas metálicas.

Todos os estudos relacionados com estas técnicas de simulação computacional foram realizados pela equipa ADEETC.

Capítulo IV

4. Resultados e Discussão

4.1. Material e Reagentes

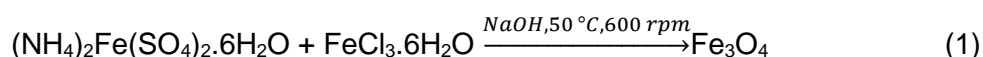
Descreve-se neste capítulo o procedimento experimental detalhado referente aos procedimentos utilizados na execução deste trabalho, bem como os diferentes equipamentos e técnicas usadas para caracterização.

4.1.1. Reagentes

A maioria dos reagentes usados são da marca Sigma-Aldrich tais como: $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Etanol absoluto (EtOH; purity of 99.9%), boro-hidreto de sódio (NaBH_4 , 99,9%), hidróxido de sódio, ácido oleico e $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{AL}(\text{OH})_2$, cloreto de hexadeciltrimetilamónio (CTAC), tetrahidrato de hidrogénio tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4\text{H}_2\text{O}$, 99,9%), ácido L-ascórbico (99,9%), iodeto de sódio (99,5%), hexano (95%) .O acetato de Etilo (99.9%), éter dietílico (99.97%) e acetonitrilo (ACN, 99.99%) da Fisher Scientific, alumina da Aldrich, Austrália, com 99,9%.da Aldrich

4.2. Síntese e caracterização de NPs de Fe_3O_4

A síntese de nanopartículas magnéticas de ferro (Fe_3O_4) baseou-se na metodologia de coprecipitação (Wang, 2015). Num balão de fundo redondo adicionou-se 1 mmol (0,39 g) de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 2 mmol (0,5406 g) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 80 mL de H_2O . A solução esteve sob agitação (600 rpm) em banho de óleo a 50 °C durante 1 hora (Figura 1). Posteriormente preparou-se uma solução de NaOH 1 M, a qual se adicionou à solução em agitação até obtenção de um pH de 10. Neste momento, observa-se a formação instantânea de nanopartículas Fe_3O_4 (precipitados negros), como ilustrado na seguinte reação (Wang, 2015).



De seguida, parou-se a reação e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. O precipitado de Fe_3O_4 é isolado por filtração e lavado com várias porções de água destilada e etanol várias vezes. As partículas de Fe_3O_4 obtidas foram secas na estufa e isoladas para posterior utilização e caracterização (Wang, 2015).

As NPs Fe_3O_4 encontram-se no estado sólido e exibem uma cor castanha escura.



Figura 12 – Síntese de NPsFe_3O_4

Para a sua caracterização por espectroscopia por UV-Vis, foi necessário preparar soluções de concentrações diferentes.

Foram preparadas duas soluções em água de concentrações 1 mM (m $\text{NPsFe}_3\text{O}_4 = 0,8$ mg) e 5 mM (m $\text{NPsFe}_3\text{O}_4 = 3.99$ mg) para um volume total de 5 mL.

Sabendo que: $M = \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ e $\text{mM} = \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}$

$M(\text{Fe}_3\text{O}_4) = 159,69$ g/mol

Realizaram-se medições de suscetibilidade magnética, à temperatura ambiente, as quais nos permitem saber se as amostras magnéticas sintetizadas são ou não paramagnéticas. Para tais medições, recorreu-se a uma balança de suscetibilidade magnética representada na Figura 11.

Valores de suscetibilidade magnética obtidos para as NPsFe_3O_4 :

$$X_g \text{ c.g.s} = 7,09 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$$

De acordo com o valor de suscetibilidade obtido as NPsFe_3O_4 apresentam propriedades paramagnéticas, o que é indicativo da existência de electrões desemparelhados. O valor obtido está coerente com o seu comportamento ferrimagnético.

O magnetismo da amostra foi também confirmado na presença de um superíman (Figura 3).



Figura 13 - Comportamento das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 sintetizadas na presença de um campo magnético exterior

4.3. Síntese e caracterização de NPs de Al_2O_3

As nanopartículas de Al_2O_3 utilizadas neste trabalho foram sintetizadas de acordo com o descrito na literatura (Reid et al., 2008): foi utilizado um pó comercial de alumina da Aldrich, Austrália, com 99,9% de pureza, moído a seco no ar através do misturador/moinho SPEX 8000 de alta energia, usando frascos e bolas de moagem construídos a partir de diversos materiais (Reid et al., 2008).

Em aplicações biomédicas, a contaminação pode ser um fator limitante de uso, uma vez que os contaminantes são uma fonte potencial de degradação biológica do componente.

Neste trabalho, a moagem de pó de alumina foi estudada usando vários meios de moagem, para comparar o grau de contaminação de cada um e examinar a eficácia destes na redução do tamanho de cristais dos pós.

Foram elaborados cinco testes de acordo com as condições de moagem apresentadas na tabela 1. No trabalho de Reid et al., (2008), os tempos de moagem foram determinados nos testes iniciais das amostras com os meios de moagem selecionados, procurando determinar um tempo de moagem comum onde todas as amostras poderiam ser comparadas.

Aproximadamente 30% de cada pó moído foi embebido em solução de HCl em ebulição, dissolvendo grande parte da contaminação de Fe. O procedimento é baseado na dissolução

de ferro (Fe) produzindo uma solução de FeCl_3 que é decantada para deixar um pó limpo de alumina.

Tabela 1 - Condições de moagem para cada teste.

Teste	Amostra	Bola	Carga (CR)	Tempo (h)
1	Aço Endurecido (Fe)	Aço Endurecido	10:1	32
2	Carboneto de tungstênio (Wc)	Wc	10:1	32
3	Zircônia parcialmente estabilizada (ZrO_2)	Ytria estabilizada com zircônia policristalina tetragonal (TZP)	10:1	32
4	Alumina (Al_2O_3)	Al_2O_3	10:1	4
5	Al_2O_3	TZP e Al_2O_3	10:1	4

(Fonte: Reid et al., 2008)

As NPs Al_2O_3 exibem uma cor branca e encontram-se no estado sólido.



Figura 14 - Síntese NPs de Al_2O_3

Para a sua caracterização por espectroscopia por UV-Vis, foi necessário preparar soluções de concentrações diferentes.

Sabendo que: $M = \frac{\text{mol}}{l}$ e $\text{mM} = \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}$

$$M(\text{Al}_2\text{O}_3) = 101,96 \text{ g/mol}$$

$$1 \text{ mM} \Rightarrow 1 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$5 \text{ mM} \Rightarrow 5 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$0,001 \text{ M} = \frac{n}{0,005 \text{ L}}$$

$$0,005 \text{ M} = \frac{n}{0,005 \text{ L}}$$

$$\Leftrightarrow n = 0,5 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

$$\Leftrightarrow n = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

$$= 0,5 \times 10^{-2} \text{ mmol}$$

$$= 2,5 \times 10^{-2} \text{ mmol}$$

$$= 0,005 \text{ mmol}$$

$$= 0,025 \text{ mmol}$$

$$0,005 \text{ mmol} \times 101,96 = 0,50 \text{ mg}$$

$$0,025 \text{ mmol} \times 101,96 = 2,55 \text{ mg}$$

Foram preparadas duas soluções em água, de concentrações 1 mM ($m \text{ NPsAl}_2\text{O}_3 = 0,5 \text{ mg}$) e 5 mM ($m \text{ NPsAl}_2\text{O}_3 = 2,55 \text{ mg}$) para um volume total de 5 mL.

A partir da solução 1 mM foram preparadas duas soluções de menores concentrações: diluição 1:10 (0,5 mL solução + 4,5 mL H_2O) e diluição 1:100 (0,05 mL solução + 4,95 mL H_2O)

Realizaram-se medições de suscetibilidade magnética para as nanopartículas as quais nos permitem saber se as amostras magnéticas sintetizadas são ou não paramagnéticas. Para tais medições, recorreu-se a uma balança de suscetibilidade magnética representada na Figura 11.

Valores de suscetibilidade magnética obtidos para as NPsAl_2O_3 :

$$X_g \text{ c.g.s} = -3,7 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$$

Os valores obtidos das NPsAl_2O_3 mostram o seu perfil diamagnético.

Espectroscopia UV-Vis

Os espectros de medição ótica foram registados usando um espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 750 UV-Vis.

Foram efetuadas leituras de água em três tipos de cuvetes de materiais diferentes, quartzo, plástico e sílica, para selecionar a mais transparente à luz, com o objetivo de minimizar qualquer interferência do material de suporte na leitura das soluções contendo nanopartículas.

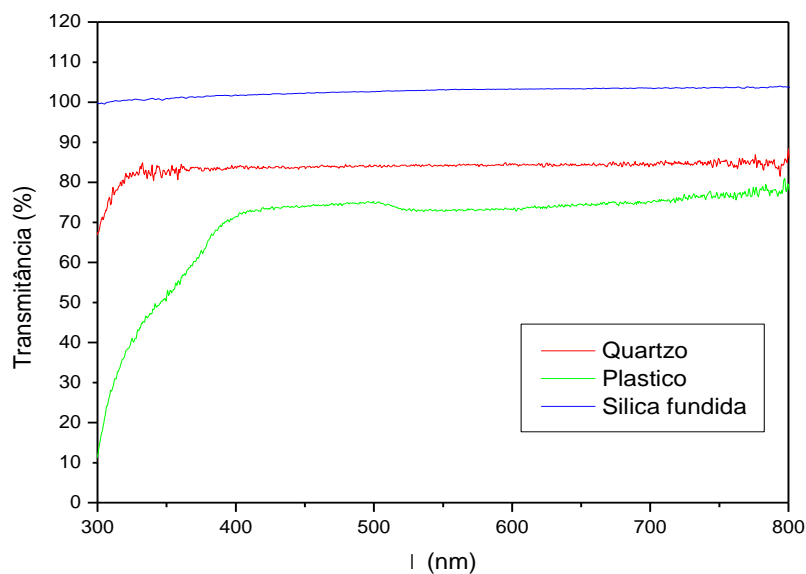


Figura 15 - Espectro de UV-Vis de três tipos de cuvetes diferentes (Quartzo, plástico e sílica fundida), contendo água destilada.

Pelos dados representados na figura 15 verificamos que a cuvete de sílica apresenta valores de transmitância de 100% e não apresenta variações ao longo do comprimento de onda. A cuvete de quartzo apresenta valores de transmitância na ordem dos 80%, com algumas variações ao longo do espectro. A cuvete de plástico apresenta valores oscilantes e grandes variações ao longo do comprimento de onda, principalmente na faixa de 300 nm a 400 nm, e valores de transmitância na ordem dos 70%. A cuvete de sílica é a que apresenta maiores valores de transmitância, verificando-se regular em toda a região do espectro. Assim, a escolha da cuvete de sílica para posteriores leituras prende-se com o facto de esta ser a que apresenta maior transmitância, logo a mais transparente e consequentemente

menos interferente nos resultados de leitura referentes à caracterização ótica das nanopartículas sintetizadas.

Após a síntese das nanopartículas mediu-se a solução coloidal no espectrofotômetro. Colocou-se a amostra a analisar na cuvete própria para observação em espectroscopia UV-Vis. Fez-se passar o feixe de luz pela cuvete com a amostra.

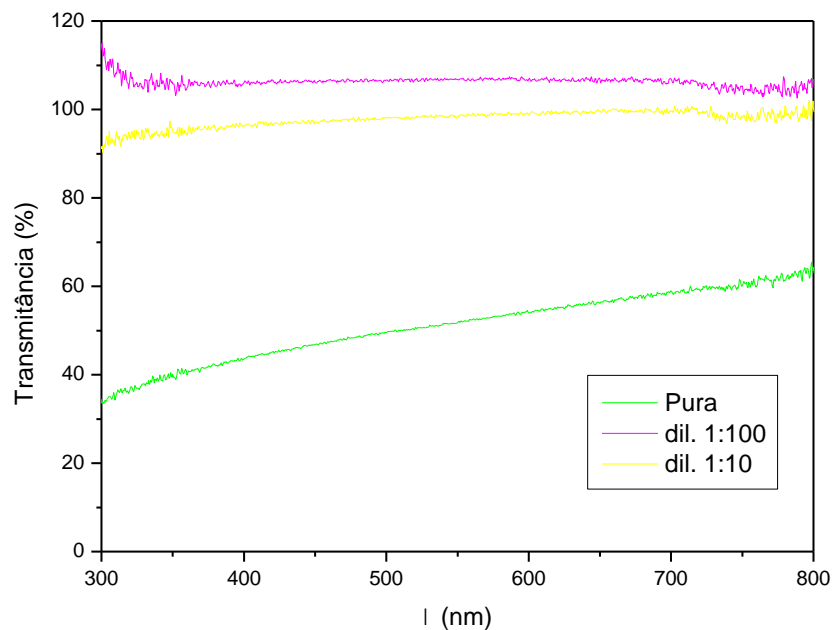


Figura 16 - Espectro de UV-Vis das NpsAl₂O₃ em água e em duas diluições diferentes (1:10 e 1:100).

As alterações dos valores de transmitância verificados nas diferentes leituras correspondentes a diferentes amostras, dependem da concentração da amostra, sendo que para concentrações mais elevadas são observados valores de transmitância mais baixos, uma vez que quanto maior o número de partículas existentes em solução, mais luz absorvem e menos transmitem, independentemente do comprimento de onda, pelo que a transmitância é menor. Assim, a amostra contendo NpsAl₂O₃ em menor concentração – (diluição 1:100, linha roxa) apresenta valores de transmitância superiores à amostra de concentração superior (diluição 1:10, linha amarela). Esta por sua vez apresenta valores de transmitância mais altos relativamente à amostra de Nps Al₂O₃ mais concentrada (sem diluição, linha verde). Esta representação está assim, de acordo com o esperado.

Pelos dados obtidos das leituras efetuadas representadas na figura 16, verifica-se que a transmitância das NPsAl₂O₃ varia ligeiramente com o comprimento de onda, apresentando valores na ordem dos 35% para comprimentos de onda mais baixos (300-350 nm) e valores

de transmitância crescentes até 60%, para comprimentos de onda maiores (650-800 nm). Não se verifica nenhum pico de transmitância, pelo que a amostra é transparente ao longo de todo o comprimento de onda, não se verificando picos de ressonância plasmónica.

Decorrentes das leituras óticas das NPsAl_2O_3 em água, verificou-se que existe deposição das NPsAl_2O_3 ao longo do tempo, pelo que sentimos necessidade de preparar uma solução com adição de um surfactante (estabilizador) para as manter em dispersas em solução, impedindo que o fator “tempo” fosse um interferente na caracterização destas nanopartículas, A solução preparada foi de 0,05% m/m NPsAl_2O_3 e 0,5 % m/m de ácido oleico num volume total de 10 mL de água. Pesou-se 50 mg de ácido oleico com 5 mg de NPsAl_2O_3 e 10 mL de água. A partir desta solução preparam-se duas soluções de maiores concentrações:

- 100 mg de ácido oleico + 10 mg de NPsAl_2O_3 + 10 mL de água (2X)
- 200 mg de ácido oleico + 20 mg de NPsAl_2O_3 + 10 mL de água (4X)

Colocaram-se 30 minutos no banho de ultrassons para agitação.

Após a preparação, mediu-se a solução coloidal no espectrofotómetro. Colocou-se a amostra a analisar na cuvete própria para observação em espectroscopia UV-Vis. Fez-se passar o feixe de luz pela cuvete com a amostra.

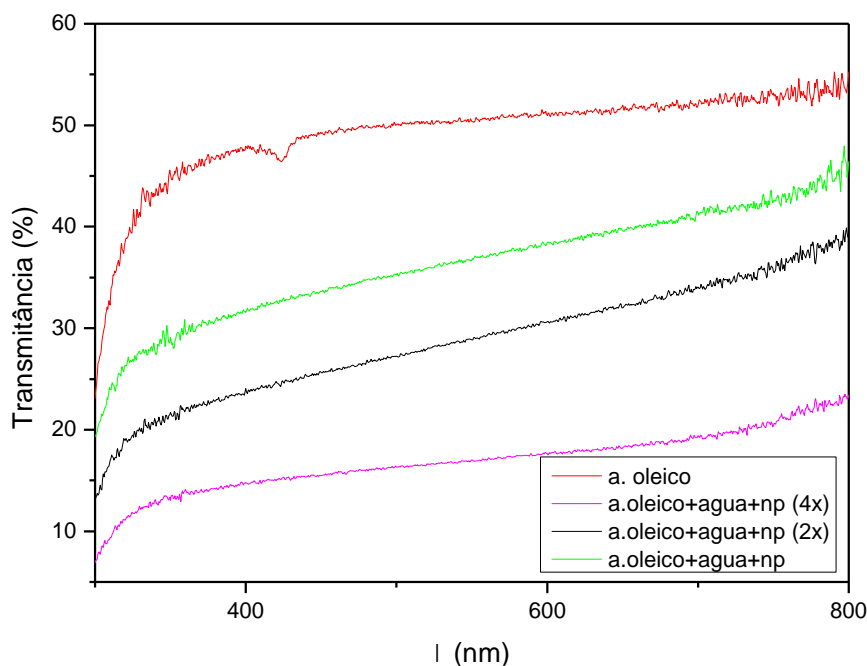


Figura 17 - Espectro de UV-Vis das NpsAl₂O₃ em água e ácido oleico, em três concentrações diferentes

Na figura 17 estão representadas as leituras de transmitância correspondentes às soluções preparadas e descritas anteriormente, bem como ácido oleico puro. O espectro correspondente ao ácido oleico puro (linha vermelha) apresenta variação crescente ao longo do comprimento de onda, verificando-se um pico aos 450 nm. A linha verde corresponde à solução menos concentrada de NPsAl₂O₃ com ácido oleico, pelo que apresenta valores de transmitância mais altos, comparativamente às duas soluções mais concentradas (linha preta e linha roxa). Também aqui se verifica como a variação da concentração da amostra influencia os valores de transmitância, sendo que maior concentração implica menor luz transmitida. Do mesmo modo que na figura 16 podemos verificar que as soluções de NPsAl₂O₃ apresentam ligeiras variações ao longo do comprimento de onda, uma vez que os valores de transmitância não são constantes, mas não se verificam picos de ressonância plasmónica.

4.4. Preparação de misturas de NPsFe₃O₄ + NPsAl₂O₃

Foi necessário preparar uma mistura das nanopartículas anteriormente sintetizadas pelos métodos descritos, uma vez que as NPsAl₂O₃ por si só não apresentam propriedades magnéticas. Assim, utilizaram-se quantidades diferentes das duas amostras na proporção de 1:3, ou seja 33% de NPsFe₃O₄ com 67% de NPsAl₂O₃ representadas na tabela 2. Foram misturadas pelo processo de *Ball Milling* tal como descrito previamente.

A síntese foi efetuada à temperatura ambiente e ao ar.

Tabela 2 – Quantidades de NPsAl₂O₃ em diferentes estados com as NPsFe₃O₄ sintetizadas para preparação de 3 soluções.

	Amostra A (Al ₂ O ₃ pó)	Amostra B (Al ₂ O ₃ emulsão)	Amostra C (pó após secagem da emulsão)	Total
67% Al ₂ O ₃	100,5 mg	100,5 mg	100,5 mg	150 mg
33% Fe ₃ O ₄	49,5 mg	49,5 mg	49,5 mg	150 mg

A Amostra B (emulsão de NPsAl_2O_3) foi obtida pela mistura de 400 mg de NPsAl_2O_3 com 200 μL de água destilada, mexendo até obter uma mistura homogênea. Desta, retirou-se 200 mg, colocou-se na estufa a 100 °C durante 24 horas, obtendo a Amostra C.

Para a sua caracterização por espectroscopia por UV-Vis, foi necessário preparar soluções de concentrações diferentes.

Foram preparadas duas soluções em água, de concentrações 1 mM (33% NPsFe_3O_4 + 67% $\text{NpsAl}_2\text{O}_3 = 0,60$ mg) e 5 mM (33% NPsFe_3O_4 + 67% $\text{NpsAl}_2\text{O}_3 = 3,025$ mg) para um volume total de 5 mL.

Sabendo que: $M = \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ e $\text{mM} = \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}$

$$M (\text{Al}_2\text{O}_3) = 101,96 \text{ g/mol}$$

$$M (\text{Fe}_3\text{O}_4) = 159,69 \text{ g/mol}$$

$$M (33\% \text{Fe}_3\text{O}_4 + 67\% \text{Al}_2\text{O}_3) = 121,0109 \text{ g/mol}$$

$$1 \text{ mM} \Rightarrow 1 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$0,001 \text{ M} = \frac{n}{0,005 \text{ L}}$$

$$\Leftrightarrow n = 0,5 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

$$= 0,5 \times 10^{-2} \text{ mmol}$$

$$= 0,005 \text{ mmol}$$

$$0,005 \text{ mmol} \times 121,0109 = 0,60 \text{ mg}$$

$$5 \text{ mM} \Rightarrow 5 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$0,005 \text{ M} = \frac{n}{0,005 \text{ L}}$$

$$\Leftrightarrow n = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

$$= 2,5 \times 10^{-2} \text{ mmol}$$

$$= 0,025 \text{ mmol}$$

$$0,025 \text{ mmol} \times 121,0109 = 3,025 \text{ mg}$$

Realizaram-se medições de suscetibilidade magnética, as quais nos permitem saber se as amostras sintetizadas são ou não paramagnéticos. Para tal, recorreu-se a uma balança de suscetibilidade magnética, representada na Figura11.

Valores de suscetibilidade magnética obtidos para as 33% NPsFe_3O_4 + 67% NpsAl_2O_3

$$X_g \text{ c.g.s } (\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}) = 6,04 \times 10^{-5}$$

Os valores de suscetibilidade magnética correspondentes à mistura de NPs (33% NPsFe_3O_4 + 67% NpsAl_2O_3) são mais baixos comparativamente ao valor obtido para as NPsFe_3O_4 , devendo-se possivelmente a uma menor quantidade de NPsFe_3O_4 nesta mistura.

Espectroscopia UV-Vis

Os espectros de medição ótica foram registados usando um espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 750 UV-Vis.

Após a síntese das NPs, estas foram analisadas por espectroscopia UV-Vis. Colocou-se a amostra a analisar na cuvete própria para observação em espectroscopia UV-Vis. Fez-se passar o feixe de luz pela cuvete com a amostra.

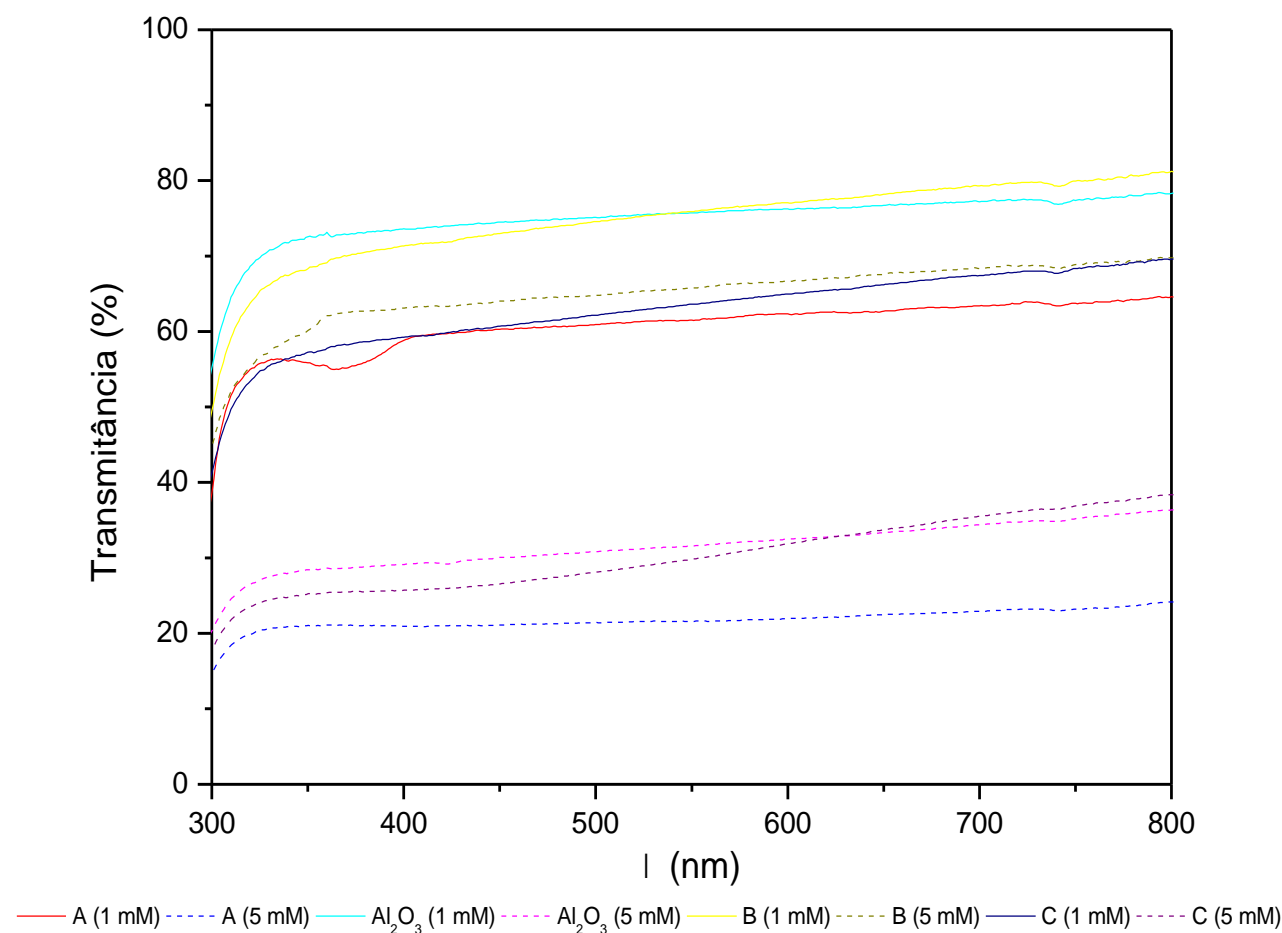


Figura 18 - Espectro de UV-Vis das NPsAl₂O₃ e das misturas A, B e C em água.

Legenda: A 1 mM - 33% NPsFe₃O₄ + 67% NpsAl₂O₃ em pó, concentração 1 mM
A 5 mM - 33% NPsFe₃O₄ + 67% NpsAl₂O₃ em pó, concentração 5 mM
B 1 mM - 33% NPsFe₃O₄ + 67% NpsAl₂O₃ emulsão, concentração 1 mM
B 5 mM - 33% NPsFe₃O₄ + 67% NpsAl₂O₃ emulsão, concentração 5 mM
C 1 mM - 33% NPsFe₃O₄ + 67% NpsAl₂O₃ após secagem emulsão
C 5 mM - 33% NPsFe₃O₄ + 67% NpsAl₂O₃ após secagem emulsão

Nos dados representados na figura 18, verifica-se que os valores da transmittância de uma determinada amostra não variam ao longo do comprimento de onda. Varia somente de

acordo com a concentração da amostra. As amostras de maior concentração apresentam valores de transmitância menores.

Não se observam picos ao longo do espectro, pelo que não há ressonância plasmónica. Justifica-se pelo facto destas NPs não serem metálicas. Uma vez que não se verificam picos LSPR, estas nanopartículas não têm interesse para continuação do nosso estudo, perspetivando o objetivo final de realização de um sensor ótico com nano partículas com respostas LSPR bem definidas.

4.5. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro (NPsAu)

A síntese destas nanopartículas realizou-se de acordo com o descrito na literatura (Scarabelli et al.,2014).

O método de síntese de NPsAu utilizado foi o descrito no procedimento de Scarabelli et al., (2014). Este método é baseado na separação temporal de nucleação e crescimento para um melhor controlo da síntese. As sementes precursoras, por norma partículas esféricas com tamanhos inferiores a 5 nm, atuam tanto como catalisador como ponto de nucleação para o crescimento de nanopartículas de ouro. A redução $Au(III) \rightarrow Au(I)$ nas sementes das partículas é controlada de forma a provocar uma rutura da simetria, originando assim um método vantajoso para o crescimento das partículas com formas anisotrópicas.

No método utilizado por Scarabelli et al., (2014), o anião iodeto em solução promove o crescimento anisotrópico das sementes revestidas por cloreto de cetiltrimetilamónio (CTAC). As sementes iniciais de Au com 7 nm crescem até aos 40 nm num meio de crescimento intermédio e são, posteriormente, transferidas para uma solução de crescimento final, com um rendimento de 30% e elevada polidispersão. Assim, a preparação de NPs Au envolve 3 etapas essenciais: preparação de sementes, crescimento e moldagem e por fim purificação.

Fase I - Síntese de sementes de Au: foi realizada usando o procedimento padrão de CTAC/ $NaBH_4$, no qual se adicionou 25 μ l de $HAuCl_4$ (0,05 M) a 4,7 μ l de solução de CTAC (0,01 M) . À solução anterior, adicionou-se rapidamente 300 μ l de borohidreto de sódio ($NaBH_4$) sob agitação vigorosa. A solução foi deixada à temperatura ambiente durante 2 horas, em repouso, até reagir o excesso de $NaBH_4$.

Fase II - Crescimento e modelação de NPsAu com 2 soluções diferentes.

- Solução A “ Solução de crescimento” – 1,6 µl de CTAC (0,1 M), 40 µl de H_{AuCl}₄ (0,05 mM) e 15 µl de NaI em 8 mL de água Milli-Q (água ultrapura, purificada num sistema Milli-Q, por resinas de troca iónica sintéticas de alta eficiência).

- Solução B “ Solução de moldagem” – 40 µl de CTAC (0,05 M), 500 µl de H_{AuCl}₄ e 300 µl de NaI.

Antes da utilização, adicionaram-se 40 µl e 400 µl de ácido ascórbico (0,1 M) às soluções A e B respetivamente. Misturou-se manualmente até obter soluções incolores.

As amostras com composições diferentes foram preparadas variando o passo de crescimento das sementes. Diferentes quantidades da solução de sementes foram adicionadas à solução A, agitou-se manualmente durante alguns segundos. Depois da homogeneização, adicionou-se 3,2 mL da solução resultante à solução B e procedeu-se a nova agitação manual. Ficou em repouso à temperatura ambiente durante 1 hora (Figura19).

Fase III - Purificação das NPsAu: para induzir a floculação das NPsAu, adicionaram-se progressivamente à solução, diferentes quantidades de brometo de metiltrimetilamónio (CTAB) até obter uma concentração final de CTAC+CTAB 0,135M. A solução ficou em repouso durante a noite para floculação dos nanotriângulos.

Os principais passos estão esquematizados sucintamente na Figura 19.

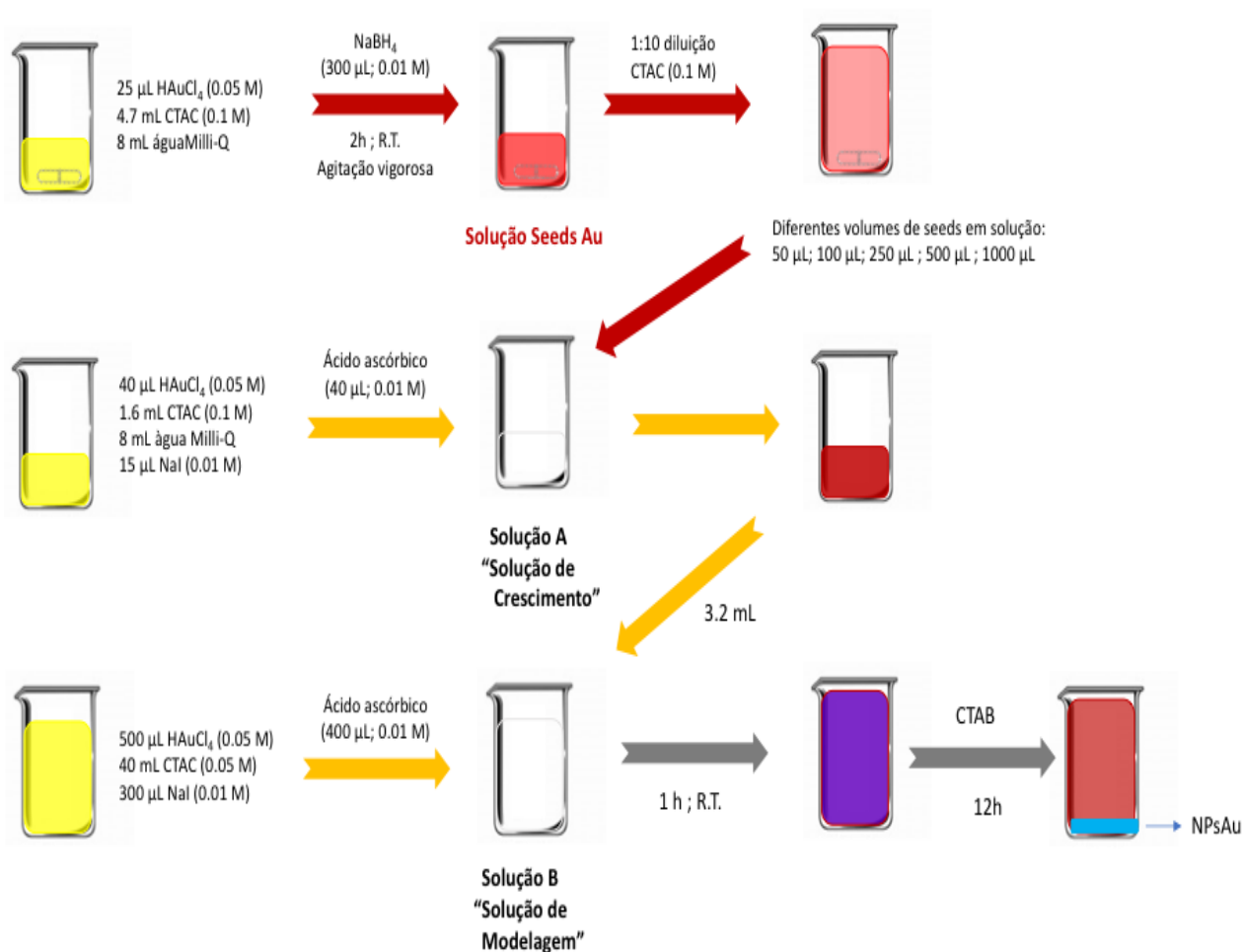


Figura 19 – Esquema de Síntese de NPs Au

Espectroscopia UV-Vis

Após a síntese das NPs Au, analisaram-se as diferentes soluções coloidais através da espectroscopia de UV-Vis. A amostra foi analisada em cubete própria para observação em espectroscopia UV-Vis.

Os espectros de medição ótica foram registados usando um espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 750 UV-Vis.

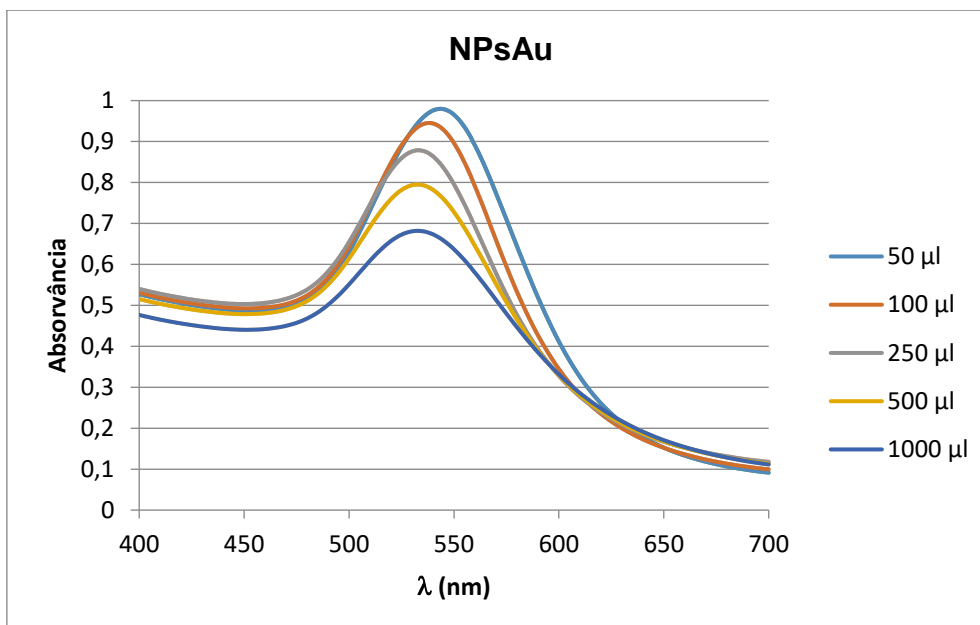


Figura 20 - Espectro de UV-Vis das NPsAu sintetizadas na presença de NaI. Diferentes volumes de sementes Au em solução (50 µl; 100 µl; 250 µl; 500 µl; 1000 µl).

Nos espectros de leitura da absorção de luz das diferentes amostras, verifica-se um pico de ressonância plasmônica no comprimento de onda de 535 - 550 nm. Variando a concentração de sementes transferidas para a solução de crescimento (50 µl; 100 µl; 250 µl; 500 µl; 1000 µl) na presença do anião iodeto, o pico de ressonância plasmônica mantém-se, variando ligeiramente ao longo do comprimento de onda. O iodeto tem forte efeito sobre o crescimento das sementes.

Foram feitas medições espectroscópicas de UV-Vis durante todo o processo de síntese. Assim, estão representados nas figuras 21 e 22 os espectros de leitura correspondentes à fase I.

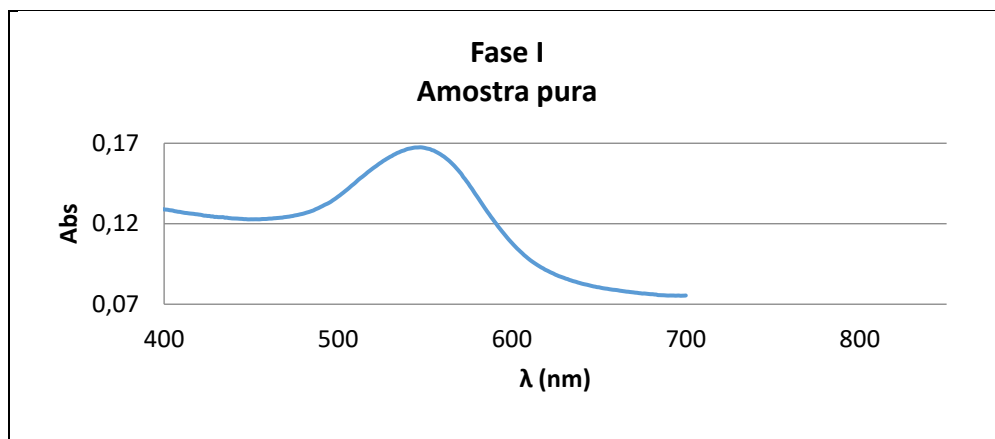


Figura 21 – Espectro de UV-Vis das NPs Au na fase I do processo de síntese

Verifica-se a presença de ressonância plasmónica na amostra, com um pico localizado aos 550 nm, logo estão presentes nanopartículas de ouro nesta solução polidispersa.

Foram efetuadas duas soluções mais diluídas (1:10 e 1:100) a partir da amostra pura para verificarmos a existência ou não de pico de LSPR (Figura 22).

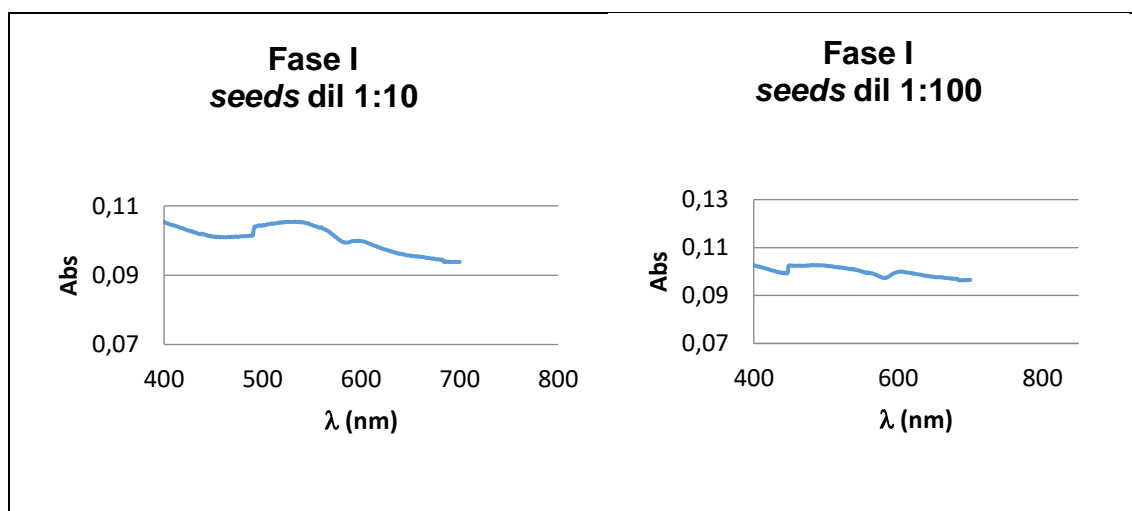


Figura 22 – Espectro de UV-Vis das NPs Au sintetizadas durante a fase I, diluídas 1:10 e 1:100 respetivamente

Nesta representação das leituras efetuadas das respetivas diluições, não se verificam picos de ressonância plasmónica, talvez devido a amostra estar demasiado diluída.

A fase II compreende o processo de crescimento das sementes. Pipetaram-se diferentes quantidades de sementes (*seeds*) da fase I, respetivamente 50 µl, 100µl, 250 µl, 500 µl e

adicionou-se o ácido ascórbico, a solução de ouro e o CTAC nas mesmas quantidades mencionadas no procedimento de síntese.

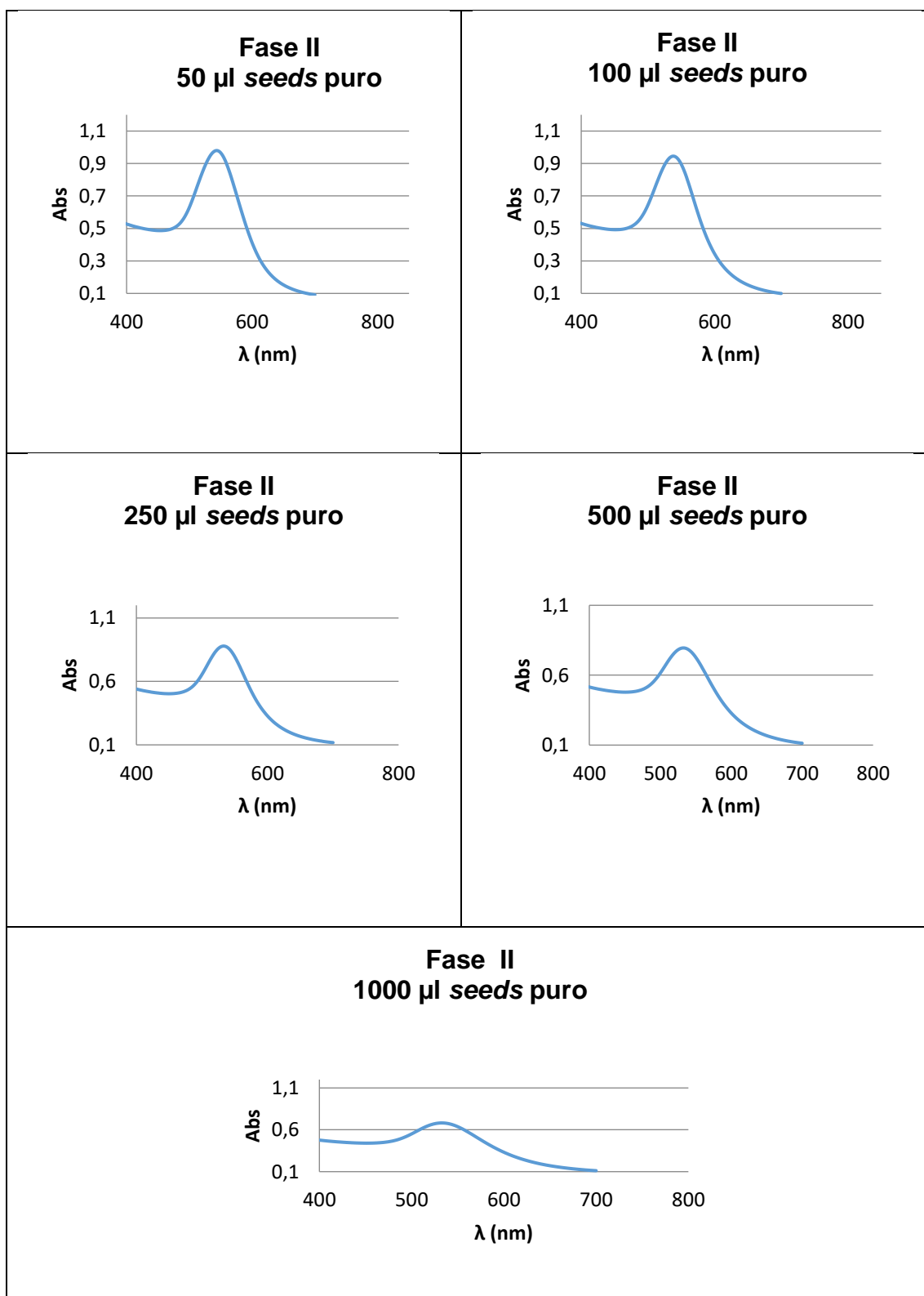


Figura 23 – Espectro de UV-Vis das amostras individuais, correspondentes a diferentes quantidades de sementes de Au transferidas da fase I (50 µl; 100 µl; 250 µl; 500 µl; 1000 µl)

Nesta fase as amostras contêm elevada polidispersidade, com grande anisotropia uma vez que contêm nanopartículas de ouro de variadas formas. Em todas as representações gráficas anteriores os picos correspondentes à ressonância plasmónica das NPsAu, independente da forma, foram detetados aos 550 nm.

Na fase III pretende-se moldar a forma das nanopartículas existentes em solução. Retirou-se 50 μl da solução da fase II e adicionou-se CTAC.

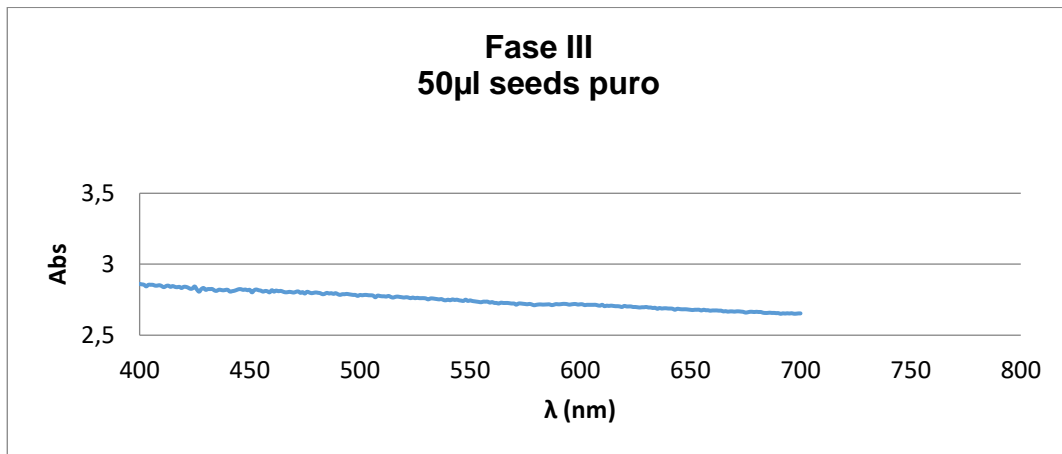


Figura 24 - Espectro de UV-Vis da amostra NPsAu na fase III do processo de síntese

Nos espectros de UV-Vis representados nas Figuras 24 e 25 correspondentes à amostra na fase III, não são visíveis picos de ressonância plasmónica devido à elevada concentração da amostra, a solução apresenta uma cor demasiado escura, pelo que é necessário diluir 10x e 100x (Figura 25).

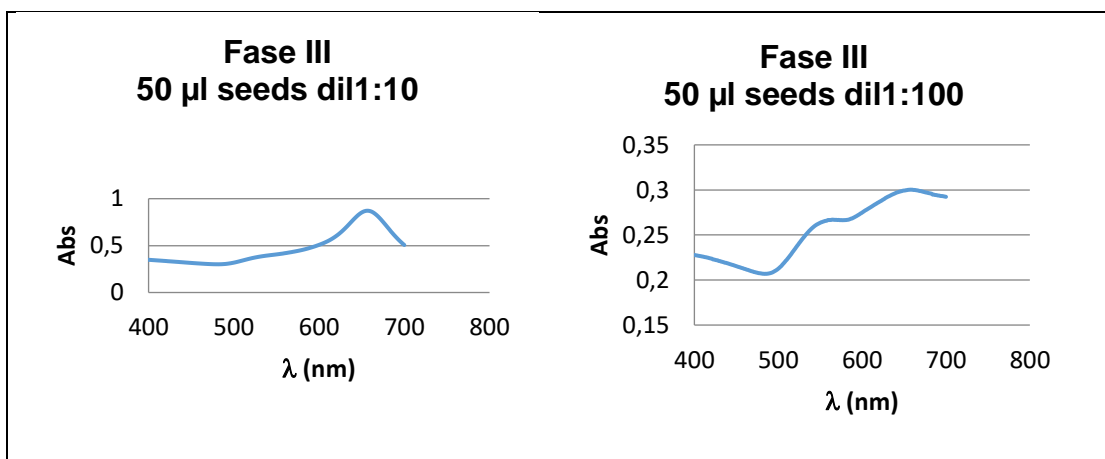


Figura 25 - Espectro de UV-Vis da amostra NPsAu na fase III do processo de síntese, correspondentes às diluições 1:10 e 1:100, respetivamente.

Nos espectros representados na figura 25, para amostra diluída 1:10 verifica-se novamente o pico de ressonância plasmónica esperado para as nanopartículas de ouro. O espectro da amostra de diluição 1:100 não apresenta um pico bem definido, provavelmente devido ao facto de a solução estar muito diluída.

Nesta fase III de purificação, aumenta-se a concentração de CTAC para precipitar os triângulos, ficando as esferas em suspensão.

Separaram-se as duas fases e analisaram-se em individualmente.

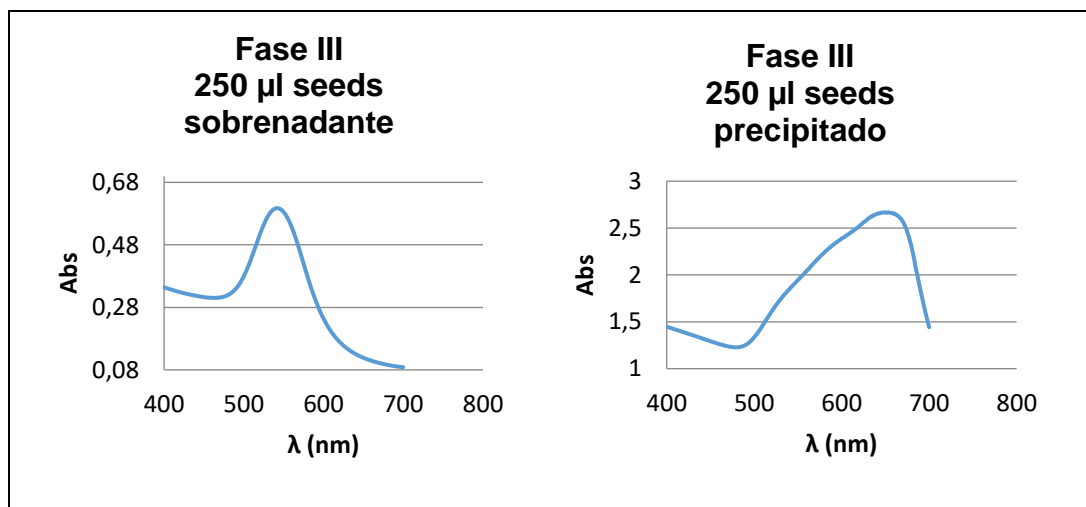


Figura 26 - Espectro de UV-Vis do sobrenadante e do precipitado da amostra na fase III do processo de síntese.

Na fase sobrenadante estão as nanopartículas de forma esférica, com picos de LSPR bem definidos e localizados aos 550 nm. No precipitado estão as formas triangulares com pico de ressonância plasmónica localizado aos 660 nm.

Demonstra-se aqui que a forma-rendimento e a monodispersão das nanopartículas foram significativamente melhoradas com processo de purificação utilizado.

Foi realizado um estudo usando nanopartículas de ouro comerciais, de tamanhos e formas bem definidas, estabilizadas pelo método de síntese definido pela empresa, para verificação de picos de ressonância plasmónica, bem como alterações de comportamento ao longo do comprimento de onda. Foram realizadas leituras de transmissão de luz destas nanopartículas de ouro, esféricas, diluídas em água, de dois tamanhos diferentes, soluções comercializadas por “BBI Solutions”. Na figura 27 estão representados os espectros obtidos.

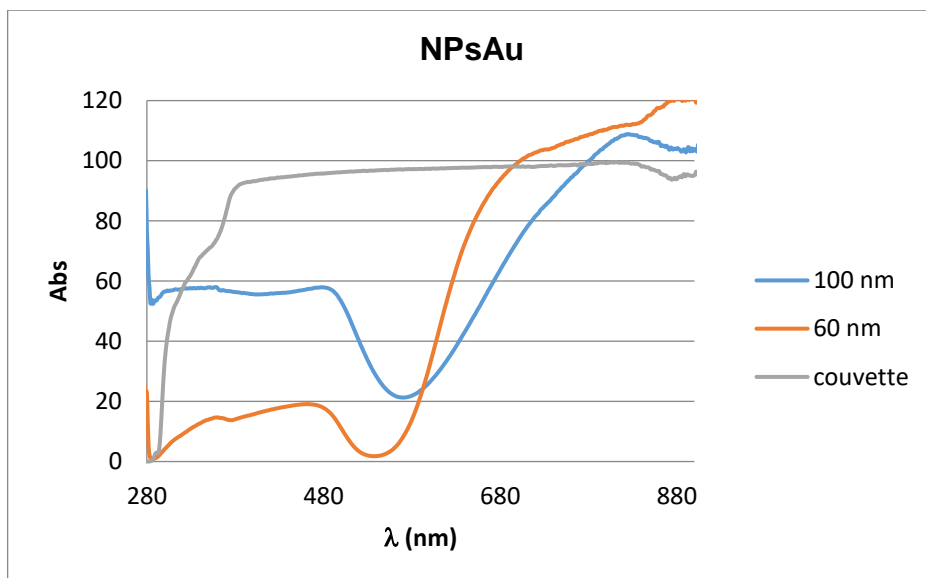


Figura 27 - Espectro de UV-Vis das NPAu comerciais, de dois tamanhos diferentes: 60 nm e 100 nm.

Pelos dados obtidos verificamos que a cuvete vazia tem 100% de transmitância, tal como esperado, uma vez que se pretende que haja o mínimo de interferentes na leitura das soluções de nanopartículas.

O pico de ressonância é claramente observável e localizado na parte vermelha do espectro e o aumento do tamanho da nanopartícula produz uma mudança da ressonância para comprimentos de onda mais longos.

As NPsAu de diferentes tamanhos apresentam pico de ressonância plasmônica em comprimentos de onda diferentes (NPsAu 60 nm - 550 nm; NPsAu 100 nm - 580 nm), pelo que o tamanho da nanopartícula influencia a saída do pico de ressonância plasmônica ao longo do comprimento de onda. Os valores de comprimento de onda localizados no espectro para estas nanopartículas de ouro esféricas (550 - 580 nm) são coincidentes com os apresentados para as nanopartículas esféricas sintetizadas pelo método experimental desenvolvido neste trabalho.

Microscopia eletrônica

- **TEM**

As imagens de TEM foram obtidas num microscópio eletrônico de transmissão Hiatchi 8100 com elementos de luz ThermoNorane detector EDX com aquisição de imagem digital, utilizando grelhas de cobre de malha quadrada (Scarabelli et al., 2014).

A preparação das amostras consistiu na sua deposição em grelhas de cobre.

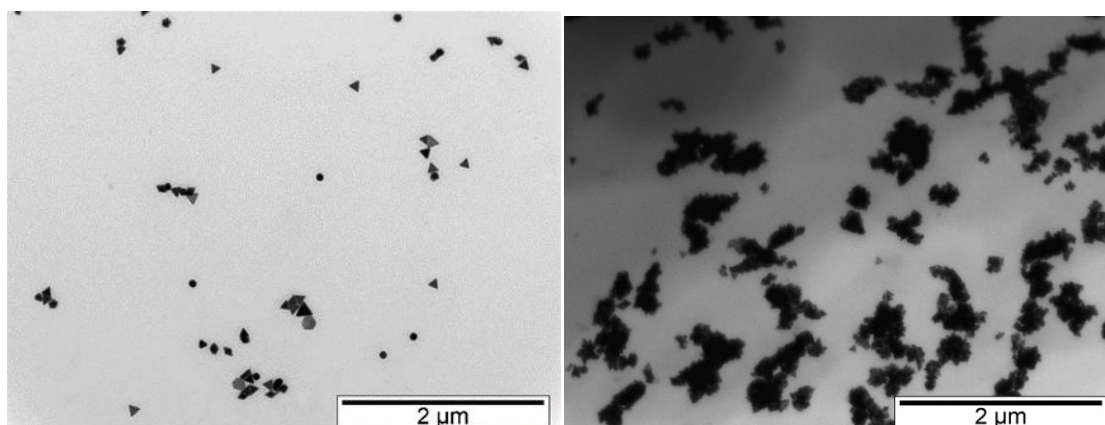


Figura 28 - Imagens TEM de NPsAu sintetizadas

Verificamos nas imagens uma amostra polidispersa, com formação de nanopartículas de ouro de diferentes formas, esféricas e triangulares. Assim este método possibilita a síntese de nanopartículas de formas diferentes. Verifica-se que quase 60% da amostra é composta por nanopartículas de forma triangular (Scarabelli et al., 2014).

No trabalho desenvolvido por Scarabelli et al., (2014) é possível verificar imagens de TEM das várias soluções preparadas, que demonstram a otimização de diversos tamanhos ao longo do processo de síntese.

- **SEM**

Para avaliar a morfologia das nanopartículas de ouro sintetizadas procedeu-se a uma caracterização por microscopia eletrônica de varrimento (SEM). As imagens de SEM foram obtidas num microscópio eletrônico de varrimento JEOL 7001F com detetor EXD de

elementos de luz Oxford e detetor EBSD. As amostras foram preparadas com um revestimento em solução coloidal num substrato silicon, anteriormente limpas em solução de piranha (Scarabelli et al., 2014).

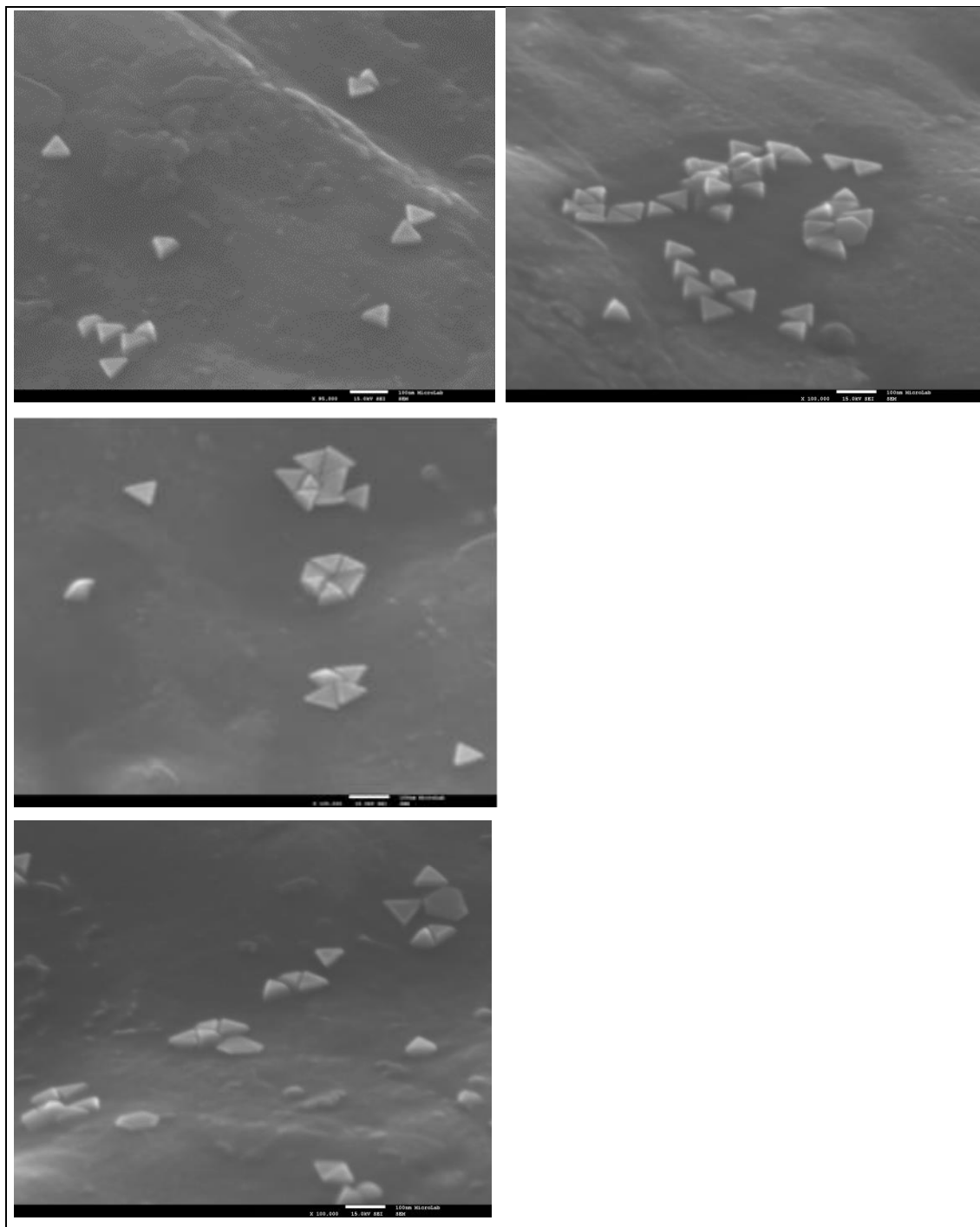


Figura 29 - Imagens SEM de NPs Au sintetizadas

As imagens representativas de microscopia eletrónica evidenciam a pureza das nanopartículas de ouro, mostram que maioritariamente são formas triangulares, embora o processo também tenha produzido uma pequena quantidade de nanoestruturas hexagonais planares de ouro.

A análise SEM revela claramente a formação de nanopartículas triangulares, após o processo de purificação. Antes da purificação as nanopartículas eram maioritariamente esféricas.

Os triângulos de ouro são muito uniformes na distribuição de comprimento de 3 nm e exibem alturas até 40 nm (Scarabelli et al., 2014).

- **Resultados das simulações**

No seguimento dos resultados experimentais deste trabalho, o grupo de investigação do departamento ADEETC executou diversos estudos teóricos de simulação, usando o software disponível (DDSCAT) comparativamente com a resposta das nanopartículas sintetizadas

Os espectros de transmissão de luz produzidos pelas NPsAu sintetizadas foram medidos na faixa IR e são demonstrados na figura 30, comparativamente com a simulação.

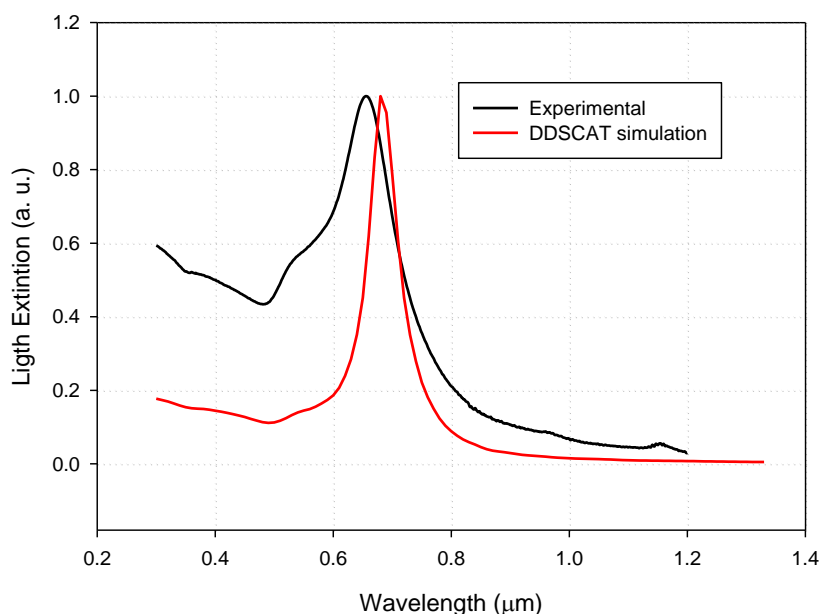


Figura 30 - Extinção de luz obtida por leituras de transmissão das NPsAu sintetizadas comparativamente aos resultados da simulação.

Os dados mostram que existe uma diferença de 20nm entre a medida experimental e a simulação. Esta diferença pode ser atribuída ao fato da simulação realizar um cálculo baseado numa nanopartícula isolada, enquanto as medidas experimentais são realizadas numa solução que contém um grande número de nanopartículas. Verifica-se uma boa correlação entre os dados obtidos da síntese experimental com os obtidos pela simulação.

- Foram realizadas leituras de transmissão de luz de nanopartículas de ouro, esféricas, diluídas em água, soluções comercializadas por BBI e comparadas com as técnicas de simulação computacional, demonstradas nas figuras 31 e 32.

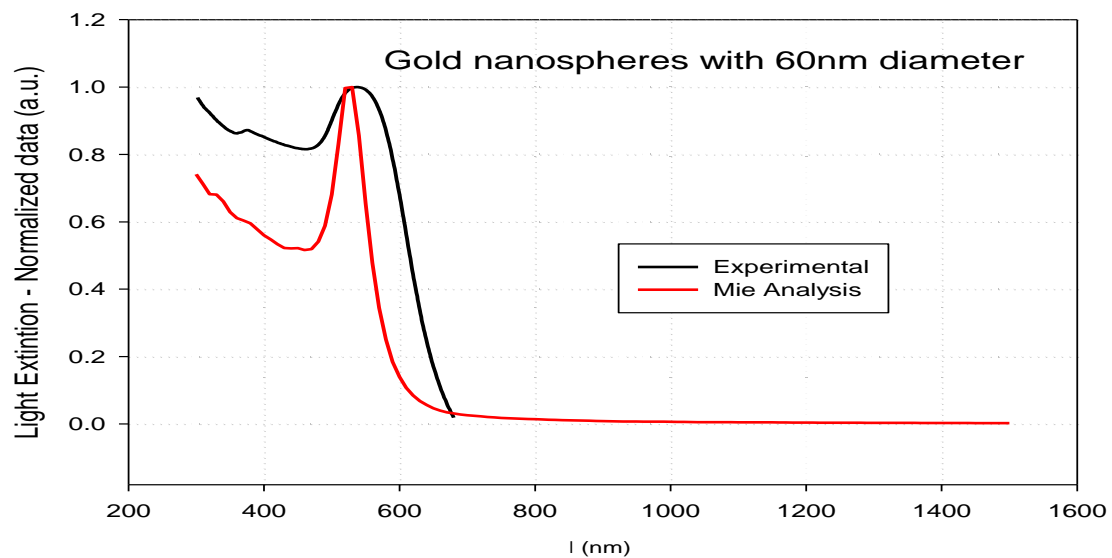


Figura 31 - Comparação das leituras de transmissão das NPsAu de 60 nm comerciais com dados da simulação.

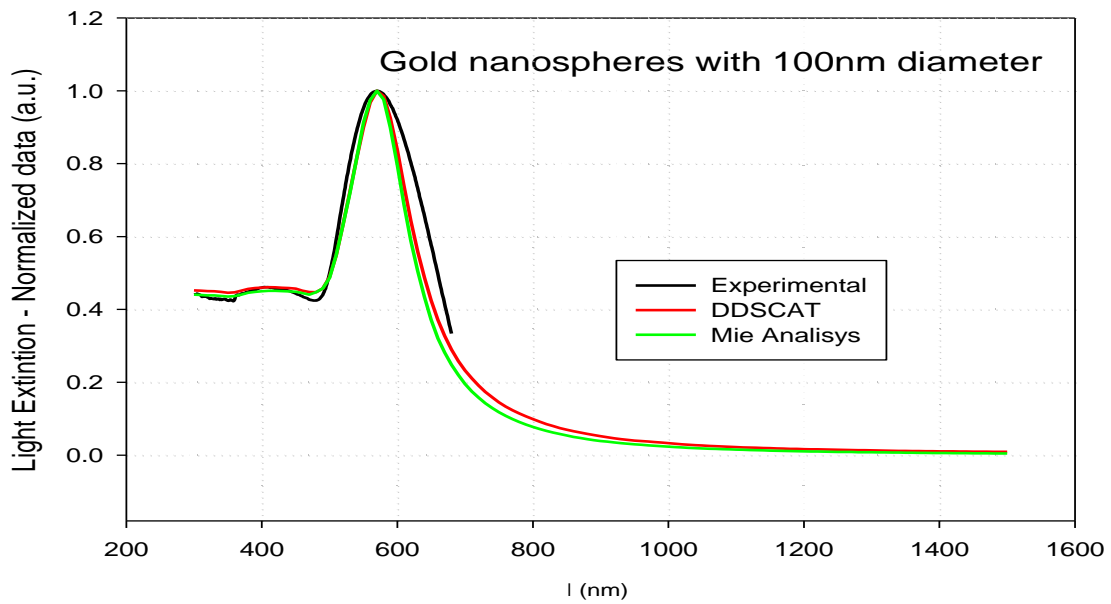


Figura 32 - Comparação das leituras de transmissão das NPsAu de 100 nm comerciais com dados da simulação.

Os dados obtidos mostram uma boa correlação entre as medições de transmissão de luz das nanopartículas experimentais dispersas em água, com os dados da simulação. O pico de ressonância é observável na zona vermelha do espectro e o aumento do tamanho das nanopartículas produz mudança para valores de comprimento de onda mais altos. Para as NPsAu 60 nm o pico verifica-se nos 540 nm enquanto para as NPsAu 100 nm o pico de ressonância verifica-se aos 570 nm, logo o tamanho das nanopartículas varia a saída do pico de ressonância plasmónica.

Capítulo V

5. Conclusões

Este trabalho incidiu principalmente na síntese de nanopartículas metálicas com controlo sobre o tamanho e forma, que apresentem ressonância plasmónica, para incorporação num material semiconductor. Sintetizaram-se nanopartículas de Al_2O_3 , nano partículas de Fe_3O_4 e nanopartículas de ouro. O controlo de tamanho e forma foi evidenciado no método de síntese mediado por sementes usado para as nanopartículas de ouro. Estes parâmetros dependem das condições de preparação, da natureza das sementes e essencialmente da presença de aditivos na solução de crescimento.

A síntese de nanopartículas seguiu os procedimentos da literatura e obtiveram-se quantidades suficientes para realização dos procedimentos posteriores de caracterização.

As nanopartículas sintetizadas foram caraterizadas por UV-Vis, SEM, TEM e no caso das NPs Fe_3O_4 e NPs Al_2O_3 também foi medida a suscetibilidade magnética.

Iniciou-se com o estudo das nanopartículas de alumina. A necessidade de serem colocadas em solução para caraterização por espectroscopia UV-vis levou à preparação de soluções com diferentes concentrações. Nos resultados obtidos nos espectros de transmissão de luz não se verificaram picos de ressonância plasmónica, pelo que estas nanopartículas não se adequam ao nosso propósito. Verificamos que se depositavam ao longo do tempo, pelo que a leitura de transmissão de luz não era constante. Procedeu-se então à preparação de soluções destas NPs Al_2O_3 com adição do surfactante ácido oleico, a fim de obtermos uma solução com as nanopartículas em suspensão. Após as leituras obtidas da caraterização UV-Vis verificamos que não apresentavam pico de ressonância plasmónica pelo que não seriam indicadas para o nosso objetivo.

Procedeu-se à síntese de NPs de Fe_3O_4 que decorreu de forma simples, seguindo os procedimentos descritos na literatura. Verificou-se o seu magnetismo pelos métodos descritos.

Pelo processo de "Ball milling" descrito, misturaram-se as NPs de Fe_3O_4 com as NPs de Al_2O_3 , uma vez que por si só as NPs de Al_2O_3 não são magnéticas.

Para a caraterização ótica, preparam-se soluções com duas concentrações distintas. Nesta caracterização espetroscópica por UV-Vis, verificou-se como passo limitante o tempo de leitura, já que as nanopartículas não se mantêm em suspensão sem agitação permanente,

depositando-se ao longo do tempo. Diminui assim a concentração da amostra, pelo que os valores obtidos de transmitância aumentam. Deste modo torna-se necessário a adição de surfactantes para se manterem em suspensão, alterando as condições do meio circundante e aumentando os passos e tempo de execução. Optou-se pelo surfactante ácido oleico e verificou-se o seu comportamento no espectro visível. Apesar de apresentarem magnetismo, pelos espectros de leitura de transmissão de luz verifica-se que não apresentam ressonância plasmónica pelo que não são promissoras para aplicações em biossensores de materiais semicondutores.

Do mesmo modo verifica-se que também as NPs de Al_2O_3 não apresentam picos de ressonância plasmónica.

Das nanopartículas sintetizadas verifica-se que as únicas que apresentam ressonância plasmónica são as NPsAu, pelo que só estas têm interesse para aplicação em biossensores.

Apesar de existirem vários métodos de síntese para as NPsAu descritos na literatura, estas aplicações têm sido dificultadas pela falta de métodos de síntese sintéticos eficientes que produzam uma monodispersidade de tamanho e forma. Usamos neste trabalho uma literatura que aborda um protocolo de síntese e purificação que tenta resolver estes parâmetros. Um método de síntese mediado por sementes precursoras verificou-se eficaz na produção de NPsAu de diferentes formas e tamanhos.

Verifica-se ainda que os passos de purificação utilizados no método de síntese de NPsAu são eficazes na diferenciação de formas esféricas e obtenção de formas triangulares, pelo que a síntese química permite o controlo da dimensão e forma das nanopartículas resultantes.

Os dados obtidos pelas medições de transmissão de luz das NPsAu diluídas em água comparados com os valores das simulações mostram uma boa correlação.

Do estudo realizado pode concluir-se que o tamanho das nanopartículas influencia o pico de ressonância plasmónica, variando ao longo do comprimento de onda. O raio da esfera maior corresponde a uma resposta seletiva mais ampla, em comprimento de onda, enquanto uma nanoesfera de menores dimensões produz um pico mais afiado e localizado. Quando diluídas em água observa-se uma resposta de ressonância plasmónica de superfície

localizada (LSPR) clara na zona vermelha do espectro, para valores de 660 nm, pelo que podemos concluir que o ouro é a escolha perfeita na região infravermelha.

A caracterização por microscopia eletrónica para avaliar a morfologia das NPsAu sintetizadas, revela que é possível a obtenção regular de formas triangulares das nanopartículas. O processo também produziu pequenas partículas poliédricas e alguns hexágonos após o processo de purificação.

As imagens de TEM e SEM mostram uma amostra onde a pureza das nanopartículas de Au é evidente.

O objetivo primordial deste trabalho de sintetizar nanopartículas com comprimentos de onda selecionados considera-se atingido seguindo o método de síntese mediado por sementes. Atendendo aos dados comparativos com as simulações computacionais feitas que apresentam boas correlações com os valores obtidos da síntese experimental será facilitado o avanço para os passos seguintes do projeto.

Nos artigos científicos publicados, decorrentes em simultâneo com este trabalho experimental, verificamos mais profundamente os estudos de simulações efetuadas relativamente às propriedades óticas e verificação de ressonância plasmónica das nanopartículas sintetizadas. Outro estudo analisa os vários materiais possíveis para utilizar numa matriz de silício amorfo, permitindo assim a realização da aplicação biomédica planeada – um sensor de baixo custo, compacto e descartável, após funcionalização adequada com anticorpos seletivos. Nestes estudos foi apresentada uma análise de simulação dos efeitos LSPR produzidos por nanoesferas de ouro e alumínio com diferentes dimensões, incorporadas em silício amorfo, comparando com água. Os resultados da simulação mostram que, mesmo que os efeitos LSPR produzidos pelas NPsAu sejam de maior intensidade, para a faixa de comprimento de onda de interesse, as nanopartículas de alumínio apresentam maior compatibilidade com a sensibilidade espectral a-Si:H, isto é, o ouro torna-se a escolha perfeita para a região infravermelha, enquanto as nanopartículas de alumínio de reduzidas dimensões são mais adequadas para o alcance visível.

5.1. Perspetivas Futuras

Como trabalho futuro prevê-se imobilizar estas nanopartículas no substrato sólido semiconductor e verificar a existência de fenómenos plasmónicos, viabilizando posteriormente a realização do sensor ótico pretendido como objetivo principal do projeto associado a este trabalho experimental.

Será interessante aprofundar o estudo detalhado sobre os efeitos mútuos causados pelas nanopartículas vizinhas em outras nanopartículas, tema não abordado neste estudo.

Na mesma linha de interesse, uma vez que as formas hexagonais das nanopartículas de ouro podem ser precursores para a formação de mais triângulos, serão necessários estudos mais detalhados no futuro.

Relativamente à síntese de nanopartículas de alumínio de pequenas dimensões são necessários estudos mais profundos, uma vez que apesar de ser um processo de baixo custo, representando um grande desafio, o alumínio combina-se facilmente com o oxigénio, levando à formação de alumina, um material não plasmónico.

6. Publicações e comunicações científicas no âmbito deste trabalho

Artigos publicados em revistas internacionais referenciadas no ISI Web of Science:

1 - Fantoni, A., Fernandes, M., Vygranenko, Y., Louro, P., Vieira, M., Alegria, E., Ribeiro, A., Teixeira, D. (2017) A simulation study of surface plasmons in metallic nanoparticles: dependence on the properties of an embedding a-Si:H matrix. *Phys. Status Solidi*, 215, 1700487. <http://dx.doi.org/10.1002/pssa.201700487>

2 - Fantoni, A., Fernandes, M., Vygranenko, Y., Louro, P., Vieira, M., Teixeira, D., Ribeiro, A., Alegria, E. (2017) Simulation of localized surface plasmon in metallic nanoparticles embedded in amorphous silicon, *Proc. SPIE 10453, Third International Conference on Applications of Optics and Photonics*, 104530D. <http://dx.doi.org/10.1117/12.2271552>

3 - Fantoni, A., Fernandes, M., Vygranenko, Y., Louro, P., Vieira, M., Teixeira, D., Ribeiro, A., Silva, R., Prazeres, M., Alegria, E. (2018) Simulation, measurement and synthesis of metallic nanoparticles for optoelectronic applications, *Optical and Quantum Electronics*, *aceite*.

Comunicações em painel em conferências internacionais

1 - Fantoni, M. Fernandes, Y. Vygranenko, P. Louro, M. Vieira, E. Alegria; A. Ribeiro, D. Teixeira, Simulation of localized surface plasmon in metallic nanoparticles embedded in amorphous silicon, III International Conference on Applications in Optics and Photonics (AOP 2017), 8-12 Maio 2017, Faro, Portugal.

2 - Alessandro Fantoni; Miguel Fernandes; Yuriy Vygranenko; Paula Louro; Manuela Vieira; Elisabete Alegria; Ana Ribeiro; Daniela Teixeira, A simulation study of surface plasmons in metallic nanoparticles: dependence on the properties of an embedding a-Si:H matrix, 2017 E-MRS Spring Meeting and Exhibit, 22-26 Maio 2017, Strasbourg, France. P1_24.

Referências Bibliográficas

- Ajay, K. G. Mona, G. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26, 3995-4021.
- Bohren, C. F., Huffman, D. R. (2008). Absorption and scattering of light by small particles, John Wiley & Sons
- Brigger, I., Dubernet, C. & Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Del Rev*, 54, 631–51.
- Brust, M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, D. & Kiely, C. (1995). Synthesis and reactions of functionalized gold nanoparticles. *J Chem Society-Chemical Communications*, 16, 1655-1656.
- Brust M., Fink, J., Bethell, D., Schiffrin, DJ, Whyman R. (1994). Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *Chem Commun*, 801-802.
- Callister, W. (2007). *Materials science and engineering: an introduction*. 7. ed. New York: John Wiley, 832 p
- Cao, G. (2004). *Nanostructures & nanomaterials synthesis properties and applications*. London: Imperial College Press, 433 p.
- Cha, H., Kim, Y., Kim, C., Kwon, H: & Kang, Y. (2007). Characterization and magnetic behavior of Fe and Nd-Fe-B nanoparticles by surfactant-capped high-energy ball mill. *J Physical Chemistry C*, 111, 1219-1222.
- Chanéac, C., et al. (1995). Thermal behavior of spinel iron oxide-silica composites. *Nanostructured Materials*, 6 (5-8), 715-718.
- Chen, Y., Gu, X., Nie, C., Jiang, Z., Xie, Z. & Lin, C. (2005). Shape controlled growth of gold nanoparticles by a solution synthesis. *Chem Commun*, 7 (33), 4181-3.
- Cheng, K. & Sun, S. (2010). Recent advances in syntheses and therapeutic applications of multifunctional porous hollow nanoparticles. *Nano Today*, 5(3), 183-196.
- Chigusa, S. Hong, Z. Takuya, N. Tetsuya, O. Cytotoxicity evaluation of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in mouse embryonic stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 97

(2012) 221– 225.

Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, P. & Pellet, J. (1996). Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particles size, charge and surface nature on biodistribution. *J Micro-Encapsul*, 13, 245–55.

Coronado, E., Ribera, A., García-Martínez, J., Linares, N. & Liz-Marzán, L. (2008). Synthesis, characterization and magnetism of monodispersed water soluble palladium nanoparticles. *J Matr Chem*, 46, 5682.

Crooks, R., Zhao, M., Sun, L., Chechik, V. & Yeung, L. (2001). Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to catalysis. *Accounts of Chem Research*, 34(3), 181-190.

Cullity, B. & Graham, C. (2009). *Introduction to magnetic materials*. 2. ed. New Jersey: John Wiley, 544 p.

Dai, Z., et al. (2005). Nanoengineering of iron oxide and iron oxide/silica hollow spheres by sequential layering combined with a sol–gel process. *J Colloid Interface Sci*, 288 (1), 298-300.

Dutz, S. & Hergt, R. (2014). Magnetic particle hyperthermia—a promising tumour therapy?. *Nanotechnology*, 25, 452001-452029.

Eastoe, J., Hollamby, M. & Hudson, L. (2006). Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128, 5-15.

Fantoni, A., Fernandes, M., Vygranenko, Y., Louro, P., Vieira, M., Alegria, E., Ribeiro, A., Teixeira, D. (2017). A simulation study of surface plasmons in metallic nanoparticles: dependence on the properties of na embedding a-Si:H matrix. *Phys. Status Solidi*, 215, 1700487.

Fantoni, A., Fernandes, M., Vygranenko, Y., Louro, P., Vieira, M., Teixeira, D., Ribeiro, A., Alegria, E. (2017). Simulation of localized surface plasmon in metallic nanoparticles embedded in amorphous silicon. In *Third International Conference on Applications of Optics and Photonics* (Vol. 10453, p. 104530D).

Fantoni, A., Fernandes, M., Vygranenko, Y., Louro, P., Vieira, M., Teixeira, D., Ribeiro, A., Silva, R., Prazeres, M., Alegria, E. (2018). Simulation, measurement and synthesis of metallic nanoparticles for optoelectronic applications, *Optical and Quantum Electronics*.

FCUL. Faculdade de Ciências Universidade de Lisboa. (2009). In <http://micelectro.fc.ul.pt/page2/page2.html> (consultado a 2017, 13 de Novembro).

Ferguson, R., Minard, K. & Krishnan, K. (2009). Optimization of nanoparticle core size for magnetic particle imaging. *J Magn Magn Mater*, 321, 1548-51.

Figuerola, A., Corato, R., Manna, L. & Pellegrino, T. (2010). Iron Oxide Nanoparticles Towards Advanced Iron-Based Inorganic Materials Designed for Biomedical Applications. *Pharmacol. Res*, 62, 126–143.

Fong, K. & Yung, L. (2013). Localized surface plasmon resonance: a unique property of plasmonic nanoparticles for nucleic acid detection. *Nanoscale*, 5 (24), 12043-12071.

Fonseca, L., Rinaldi, A., Rubira, A., Cotica, L., Medeiros, S., Paesano, A., et al. (2006). Structural, magnetic, and electrochemical properties of poly(o-anisidine)/maghemite thin films. *Mater Chem Phys*, 97, 252-5.

Fritsch. (2007). Planeten–Mikromühle Pulverisette 7 premim line Operating Manual. Alemanha.

Gabriel, B. (1985). *SEM: A User's Manual for Materials Science* Multifunctional magnetic nanoparticles. Ed. American Society for Metals, USA.

Gao, J., Gu, H. & Xu, B. (2009): Multifunctional Magnetic Nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications. *Accounts of Chemical Research*, 42 (8), 1097-1107.

Geng, B., et al. (2007). A new nonhydrolytic single-precursor approach to surfactant-capped nanocrystals of transition metal sulfides. *Materials Science Engineering*, B145 (1-3), 17-22.

Gupta, A. & Curtis, A. (2004). Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials*, 25 (15), 3029-3040.

Gupta, A. & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterial*, 26 (18), 3995-4021.

Hadjipanayis, G. & Siegel, R. (1994). *Nanophase materials: synthesis - properties - applications*. Dordrecht; London, Kluwer Academic.

Hafeli, O. & Chastellain, M. (2006). *Nanoparticulates as drug carriers*. London: Imperial College Press, p, 397-411.

Hao, R., Xing, R., Xu, Z., Hou, Y., Gao, S. & Sun, S. (2010). Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. *Advanced Materials*, 22 (25), 2729-2742.

Harris, L. (2002). *Polymer stabilized magnetite nanoparticles and poly(propylene oxide) modified styrene-dimethacrylate networks.*, in *Philosophy in Chemistry*. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University: Virginia.

Hurst, S., Lytton-Jean, A. & Mirkin, C. (2006). Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Anal Chem*, 78(24), 8313-8.

Ito, A., Shinkai, M., Honda, H. & Kobayashi, T. (2005). Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng*, 100, 1-11.

Jain, P., Lee, K., El-Sayed, I. & El-Sayed, M. (2006). *The Journal of Physical Chemistry B*, 110 (14), 7238-7248.

Jana, N., Gearheart, L. & Murphy, C. (2001). Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Advanced materials*, 13 (18), 1389-1393.

Jana, N. & Peng, X. (2003). Single-phase and gram-scale routes toward nearly monodisperse Au and other noble metal nanocrystals. *J Amer Chem Soc*, 125 (47), 14280-14281.

Kadogan, N.; Hadjipanayis, G. & Sellmyer, D. (2009). Anisotropic PrCo₅ nanoparticles by surfactant-assisted ball milling. *IEEE Transactions on Magnetism*, 45 (10), 4417-4419.

Katz, E. & Willner, I. (2004). Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 43(45), 6042-108.

- Kumar, C. (2005). *Biofunctionalization of nanomaterials*. Weinheim: Wiley-VCH, v.1.
- Lam, U., et al. (2008). Processing of Iron Oxide Nanoparticles by Supercritical Fluids. *Indust Engineering Chemistry Res*, 47(3), 599-614.
- Laurent, S., et al. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Rev*, 108 (6), 2064-2110.
- Lee, J., et al. (1996). Magnetic properties of ultrafine magnetite particles and their slurries prepared via in-situ precipitation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 109, 121-127.
- Lee, J., Jun, Y., Yeo, S., Shin, J & Cheon, J. (2006). Dual-mode nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance and fluorescence imaging of neuroblastoma. *Angewandte Chemie-International Edition*, 45 (48), 8160-8162.
- Li, F., Feng, Y., Dong, P. & Tang, B. (2010). Gold nanoparticles modified electrode via a mercapto-diazoaminobenzene monolayer and its development in DNA electrochemical biosensor. *Biosens Bioelectron*, 25(9), 2084-8.
- Li, Z., Wei, L., Gao, M. & Lei, H. (2005). One-pot reaction to synthesize biocompatible magnetite nanoparticles. *Advanced Materials*, 17 (8), 1001-1005.
- Liz-Marzán, L. (2006). Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir*, 22 (1), 32-41.
- Lubbe, A., Alexiou, C. & Bergemann, C. (2001). Clinical applications of magnetic drug targeting. *J Surg Res*, 95, 200–6.
- Marc De Graef. (2003). *Introduction to conventional Transmission Electron Microscopy*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K..
- Matsuoka, S., Yoshimura, K. & Tateda, A. (1995). Application of ion-exchanger phase visible light absorption to flow analysis. Determination of vanadium in natural water and rock. *Anal Chim Acta*, 317, 207-213.
- Mie, G. (1908). *Ann Phys*, 330 (3), 377-445.

Mieszawska, A., Mulder, W., Fayad, Z. & Cormode, D. (2013). Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease. *Mol Pharm*, 10(3), 831-47.

Murphy, C., Gole, A., Stone, J., Sisco, P., Alkilany, A., Goldsmith, E. & Baxter, S. (2008). Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. *AccChem Res*, 41, 1721-1730.

Murphy, C., Sau, T., Gole, A., Orendorff, C., Gao, J., Gou, L., Hunyadi, S. & Li, T. (2005). Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *J Phys Chem B*, 109 (29), 13857-70.

Patolsky, F., Ranjit, K., Lichtenstein, A. & Willner, I. (2000). Dendritic amplification of DNA analysis by oligonucleotide-functionalized Au-nanoparticles. *Chem Commun*, 12.

Pestana, I., Castelão, R., & Aguiar Santos, L. (2014). *A nanotecnologia*, S. Portugal, Editor. Portugal.

Perez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I., Liz-Marzan, L. & Mulyaney, P. (2005). Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coordination Chem Rev*, 249, 1870–1901.

Pillai, V., et al. (1995). Preparation of nanoparticles of silver halides, superconductors and magnetic materials using water-in-oil microemulsions as nanoreactors. *Adv Colloid Interface Sci*, 55, 241-269.

P. J. Flatau and B. T. Draine, "Light scattering by hexagonal columns in the discrete dipole approximation," *Opt. Express* 22, 21834-21846 (2014).

Puntes, V., Krishnan, K. & Alivisatos, A. (2001). Colloidal nanocrystal shape and size control: the case of cobalt. *Science*, 291 (5511), 2115-2117.

Reid, C., Forrester, J., Goodshaw, H., Kisi, E. & Suaning, G. (2008). A study in the mechanical milling of alumina powder. *Ceramics International*, 34, 1551–1556.

Saunderson, A. (1968). A Permanent Magnet Gouy Balance. *Physics Education* 3: 272-273.

S. A. Maier, (2007) *Plasmonics Fundamentals and Applications*, Springer

Scarabelli, L., Coronado-Puchau, M., Giner-Casares, J., Langer, J. & Liz-Marza, L. (2014). *Monodisperse Gold Nanotriangles: Size Control, Large-Scale Self-Assembly, and Performance in Surface-Enhanced Raman Scattering*. Doi: 10.1021/nn500727w.

Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Kruger, A., et al. (2002). Magnetofection enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther*, 9, 102–9.

Schettino Junior, M. (2009). *Obtenção e caracterização de nanopartículas magnéticas inseridas em materiais carbonosos porosos a partir da decomposição do pentacarbonil ferro*. Tese de Doutorado Física. Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo.

Schlorf, T., Meincke, M., Kossel, E., Glüer, C., Jansen, O. & Mentlein, R. (2011). Properties of iron oxide nanoparticles for cellular and molecular magnetic resonance imaging. *Internacional J Mol Sci*, 12-23.

Shi, W., Zeng, H., Sahoo, Y., Ohulchanskyy, T., Ding, Y., Wang, Z., et al. (2006). A general approach to binary and ternary hybrid nanocrystals. *Nano Letters*, 6 (4), 875-881.

Schwertmann, U. & Cornell, R. (1991). *Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization*. Weinheim.

Solla-Gullón, J., Vidal-Iglesias, F., López-Cudero, A., Garnier, E., Feliu, J. & Aldaz, A. (2008). Shape-dependent electrocatalysis: methanol and formic acid electrooxidation on preferentially oriented Pt nanoparticles. *Phys Chem Chem Phys*, 10(25), 3689-98.

Sperling, R., Rivera Gil, O., Zhanf, F., Zanella, M. & Parak, W. (2008). Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Review*, 37 (9), 1896- 1908.

Suryanarayana, C. (2001). Mechanical alloying and milling. *Progress Materials Scienc*, 46, 1-184.

Tavakoli, A., et al. (2007). A review of methods for synthesis of nanostructured metals with emphasis on iron compounds. *Chem Papers*, 61 (3), 151-170.

Teixeira, L., Costa, A., Assis, J., Ferreira, S., Korn M. (2001). Solid Phase Spectrophotometry for the Determination of Cobalt in Pharmaceutical Preparations. *Microchimica Acta*, 137, 29-33.

Teja, A. & Koh, P. (2009). *Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles*. *Progr Crystal Growth Characterizat Material*, 55 (1-2), 22-45.

- Temple, T. L. and Bagnall, D. M. *Optical properties of gold and aluminium nanoparticles for silicon solar cell applications*, *Journal of Applied Physics*, 109, 084343 (2011)
- Thassu, D., Deleers, M. & Pathak, Y. (2007). *Nanoparticulate drug delivery systems*. New York: Informa Healthcare, p. 382.
- Tauran, Y. et al. (2013). Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles. *World journal of biological chemistry*, 4(3), 35–63.
- Tokuhsa, H., Zhao, M., Baker, L., Phan, V., Dermody, D., Garcia, M., et al. (1998). Preparation and characterization of dendrimer monolayers and dendrimer-alkanethiol mixed monolayers adsorbed to gold. *J American Chem Soc*, 120 (18), 4492-4501.
- Tuncel, D. & Demir, H. (2010). Conjugated polymer nanoparticles. *Nanoscale*, 2 (4), 484-494.
- Turkevich, J., Stevenson, P. & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55.
- Valcárcel, M. & López-Lorente, Á. (2014). *Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry*. 1st ed. Elsevier B.V.
- Vendream, S., Cótica, L., Freitas, V., Dias, G., Santos, I., Khalil, N., et al. (2012). Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and assessment of their effects on blood cells. *J Magn Magn Mater*, 324, 559-563.
- Vo-Dinh, T. (2007). *Nanotechnology in biology and medicine: methods, devices and applications*. Boca Raton: Taylor & Francis. p. 762.
- Wang, J. (2015). *Nanocatalysts for sustainable industrial processes*. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Nanoquímica e Nanomateriais. Faculdade de Ciências Exatas e de Engenharia. Centro de Química da Madeira.
- Wang, L., Luo, J., Fan, Q., Suzuki, M., Suzuki, I., Engelhard, M., et al. (2005). Monodispersed core-shell Fe₃O₄@Au nanoparticles. *J Physical Chem B*, 109 (46), 21593-21601.
- Wang, M., Sun, C., Wang, L., Ji, X., Bai, Y., Li, T. & Li, J. (2003). Electrochemical detection of DNA immobilized on gold colloid particles modified self-assembled monolayer electrode with silver nanoparticle label. *J Pharm Biomed Anal*, 33(5), 1117-25.

- Wang, P., Zhao, X., Wang, Z., Meng, M., Li, X. & Ning, Q. (2010). Generation 4 polyamidoamine dendrimers is a novel candidate of nano-carrier for gene delivery agents in breast cancer treatment. *Cancer Letters*, 298 (1), 34-49.
- Welch, C. & Compton, R. (2006). The use of nanoparticles in electroanalysis: a review. *Anal Bioanal Chem*, 384(3), 601-19.
- Xiao, S., Luo, K. & Zhang, L. (2010). The structural and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles formed in situ in silica matrix. *Mater Chem Phys*, 123, 385-9.
- Xu, C., Xie, J., Ho, D., Wang, C., Kohler, N., Walsh, E., et al. (2008). AuFe₃O₄ dumbbell nanoparticles as dual-functional probes. *Angewandte Chemie International Edition*, 47 (1), 173-176.
- Xu, Z., Hou, Y. & Sun, S. (2007). Magnetic core/shell Fe₃O₄/Au and Fe₃O₄/Au/Ag nanoparticles with tunable plasmonic properties. *Journal of the American Chemical Society*, 129 (28), 8698-8699.
- Yang, J., Deivarai, T., Too, H. & Lee, J. (2004). Acetate stabilization of metal nanoparticles and its role in the preparation of metal nanoparticles in ethylene glycol. *Langmuir*, 20 (10), 4241-5.
- Yoshimura, K., Waki, H. & Ohashi, S. (1976). Ion-exchanger colorimetry—I: Micro determination of chromium, iron, copper and cobalt in water. *Talanta*, 23 (6), 449-454.
- Yuan, H., Wang, Y., Shao, M., Liu, L., Chen, X., Lou, S., et al. (2010) Low-temperature preparation of superparamagnetic CoFe₂O₄ microspheres with high saturation magnetization. *Nano Express*, 5, 1817-21.
- Zeng, Q., Xiao, Y., Dong, S., Liu, X., Qiu, B., Zhang, Z. & Wang, R. (1999). Influence of milling conditions on magnetic properties of Nd(Fe,Mo)₁₂N_x compounds. *J Magnetism Magnetic Materials*, 192, 321-324.