

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GREICI GUBERT

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE NITRETOS DE FERRO

CURITIBA, PR

2020

GREICI GUBERT

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE NITRETOS DE FERRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título Doutora em Física.

Orientador: Prof. Dante Homero Mosca Jr.

CURITIBA, PR

2020

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

G921s

Gubert, Greici

Síntese, caracterização e avaliação toxicológica de nanopartículas de nitretos de ferro [recurso eletrônico] / Greici Gubert. – Curitiba, 2020.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Física, 2020.

Orientador: Dante Homero Mosca Junior.

1. Nanopartículas. 2. Microscopia eletrônica de transmissão.

3. Raman, Espectroscopia de. I. Universidade Federal do Paraná. II. Mosca Junior, Dante Homero. III. Título.

CDD: 620.5

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FÍSICA - 40001016020P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FÍSICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GREICI GUBERT** intitulada: "**Síntese, caracterização e avaliação toxicológica de nanopartículas de nitretos de ferro**", sob orientação do Prof. Dr. DANTE HOMERO MOSCA JÚNIOR, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 06 de Fevereiro de 2020.

DANTE HOMERO MOSCA JÚNIOR
Presidente da Banca Examinadora

CARLOS EDUARDO MADURO DE CAMPOS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

ISMAEL LEANDRO GRAFF
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CLAUDIA ELIANA MARINO ZARBIN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MARCELA MOHALLEM OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

A todos os familiares, amigos, colegas e professores que
contribuíram para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Dante Homero Mosca Jr., por sua ilustre orientação, pela confiança referente ao presente trabalho, pela presença, pela paciência e atenção em todas as etapas desenvolvidas.

Aos meus colegas de laboratório, Ronei, Nicholas, Deize, Andreia e Aluizio. Além das inúmeras contribuições para este trabalho, agradeço pela amizade e por tornarem meus dias felizes na presença de vocês, meus queridos.

Aos demais professores dos laboratórios LANSEN e LSI, Prof. Dr. Varalda, Prof. Dr. Ismael e Prof. Dr. Wido. Agradeço a todas as sugestões e discussões a respeito deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos, Andressa, Iesus e Fernanda, pela companhia, pelos estudos e pelas conversas engraçadas no RU e nos intervalos.

À minha irmã, Profa. Dra. Priscila, pela sua colaboração neste trabalho e por ser sempre meu braço direito, dando-me bons exemplos, desafiando-me a ser uma pessoa melhor com suas críticas. Agradeço pela confiança e por todos os momentos de troca que tivemos juntas no desenvolvimento dos testes de toxicidade deste trabalho.

À Universidade Federal do Oeste da Bahia, à Universidade Federal de Pernambuco e à Universität Potsdam pelas colaborações realizadas com o presente trabalho.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) e à CAPES pelo suporte financeiro e pelas contribuições para que este doutorado fosse desenvolvido.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR e ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) por terem cedido seu espaço e tempo para a realização das medições do presente trabalho.

À minha enorme família Gubert e Matttana.

Ao querido lar em Augusto Pestana, Granja União, meu eterno refúgio, por sempre recompor minhas energias.

Aos meus pais Paulo, Neli e ao nosso grandioso Deus, pelo exemplo, por todo apoio durante estes anos de doutorado e pelo amor de vocês.

RESUMO

Nanoestruturas de nitreto de ferro foram sintetizadas por ablação a laser pulsado de um alvo de ferro metálico imerso em nitrogênio líquido usando o modo fundamental, o segundo, o terceiro e o quarto harmônicos de um laser Nd:YAG. As análises morfológicas e estruturais baseadas em microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelam a formação de nanoestruturas monofásicas de α'' -Fe₁₆N₂, ζ -Fe₂N e ϵ -Fe₃N, e em alguns casos uma mistura delas. Demonstramos que essas fases podem ser obtidas variando a fluência do laser entre 0,7 a 1,6 J/cm² com um comprimento de onda fixo em 1064 nm, ou mantendo a fluência fixa nos comprimentos de onda de 532 nm, 355 nm e 266 nm. Particularmente, o padrão de difração de elétrons em área selecionada revela a formação de nanoestruturas cristalinas de α'' -Fe₁₆N₂ produzidas com irradiações por 2 horas e meia nos comprimentos de onda do laser de 1064 nm, 532 nm e 355 nm. As nanopartículas produzidas e armazenadas em suspensão no álcool isopropílico mostraram-se estáveis por vários meses sem qualquer evidência de presença de óxidos de ferro. Isso demonstra uma eficácia específica para obtenção de uma fase de nitreto de ferro bastante complexa, como a α'' -Fe₁₆N₂. Notavelmente, as nanoestruturas de α'' -Fe₁₆N₂ apresentaram distribuições de tamanho das nanopartículas com caráter monodisperso com tamanho médio de 4 nm usando irradiação com laser no verde. As nanopartículas produzidas foram também caracterizadas pelas técnicas de absorvância na região do UV-Vis e de espectroscopia Raman, que são consistentes com as análises de MET, indicando a formação das fases de nitretos de ferro. Devido à alta magnetização de saturação e a forte anisotropia magnética relatadas para as nanoestruturas de α'' -Fe₁₆N₂, suspensões de nanopartículas de α'' -Fe₁₆N₂ em solução salina foram utilizadas para testes de biocompatibilidade voltados as aplicações biomédicas. O nematódeo *Caenorhabditis elegans* foi utilizado nos testes de toxicidade como um modelo animal alternativo. As nanopartículas de α'' -Fe₁₆N₂ não induziram toxicidade ao nematódeo, embora uma redução no comportamento reprodutivo tenha sido observada. A baixa toxicidade das nanopartículas de α'' -Fe₁₆N₂ indicam um alto potencial para o uso das mesmas como agentes carreadores de fármacos e no desenvolvimento de biossensores aplicáveis em tratamentos médicos e terapias alternativas.

Palavras-chave: Nanopartículas. Nitretos de ferro. Irradiação à laser. Toxicidade.

ABSTRACT

Iron nitride nanostructures were synthesized by pulsed laser ablation of the metallic iron target immersed in liquid nitrogen using the fundamental mode, second, third, and fourth harmonics of the Nd:YAG laser. The morphological and structural analysis based on transmission electron microscopy (TEM) reveals the formation of the monophasic nanostructures of the α'' -Fe₁₆N₂, ζ -Fe₂N, and ϵ -Fe₃N nanostructures, and in some cases a mixture of them. We demonstrate that these phases can be obtained by varying the fluence between 0.7 to 1.6 J/cm² with a fixed wavelength of 1064 nm or using a fixed fluence with different wavelengths such as 532 nm, 355 nm e 266 nm. Particularly, the selected area electron diffraction reveals the formation of the crystalline α'' -Fe₁₆N₂ nanostructures produced with irradiation for two hours and a half with laser wavelengths of 1064 nm, 532 nm, and 355 nm. The produced nanoparticles stored in isopropyl alcohol suspension have shown to be stable for several months without any evidence of iron oxides. This demonstrates a specific effectiveness for obtaining a very complex iron nitride phase, as α'' -Fe₁₆N₂. Noticeably, the α'' -Fe₁₆N₂ nanostructures presented size distributions of monodisperse nanoparticles with an average size of 4 nm using green laser irradiation. The nanoparticles produced were also characterized by UV-Vis absorbance and Raman spectroscopy techniques, which are consistent with TEM analysis, indicating the formation of iron nitride phases. Due to the high saturation magnetization and strong magnetic anisotropy reported for α'' -Fe₁₆N₂ nanostructures, suspensions of α'' -Fe₁₆N₂ nanoparticles in saline solution were used for biocompatibility testing for biomedical applications. The nematode *Caenorhabditis elegans* was used in toxicity tests as an alternative animal model. The α'' -Fe₁₆N₂ nanoparticles did not induce toxicity in the nematode, although a reduction in reproductive behavior was observed. The low toxicity of α'' -Fe₁₆N₂ nanoparticles indicates a high potential for their use as drug carriers and in the development of biosensors applied in medical treatments and alternative therapies.

Keywords: Nanoparticles. Iron nitrides. Laser irradiation. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas cristalinas dos principais nitretos de ferro, em (a) ζ -Fe ₂ N (esferas cinzas referem-se aos átomos do Fe e as pretas aos átomos de N), (b) ϵ -Fe ₃ N (esferas pretas referem-se aos átomos de Fe e as demais esferas remetem aos átomos de N), (c) γ' -Fe ₄ N (esferas brancas referem-se aos átomos de N e as demais indicam os átomos de Fe), e (d) α'' -Fe ₁₆ N ₂ (esferas cinza escuro indicam os átomos de N e as demais esferas indicam os átomos de Fe). As diferentes nuances das esferas para os átomos de Fe ou de N remetem aos diferentes sítios ocupados para cada conjunto de átomos. Imagem modificada da referência ⁴	23
Figura 2 - Histerese magnética de NPs de α'' -Fe ₁₆ N ₂ + ζ -Fe ₂ N na temperatura de 10 K. Imagem modificada da referência ¹⁴	24
Figura 3 - Diagrama de fases do sistema Fe-N. Imagem adaptada da referência ¹⁰	25
Figura 4 - Gráfico das entalpias de formação de nitretos de ferro FeN _x e óxidos de ferro FeO _x em relação ao teor x de N ou O. Imagem adaptada da referência ³¹	29
Figura 5 - Nanopartículas de Fe-N na fase (a) Fe ₂ N, (b) Fe ₃ N, (c) Fe ₄ N, (d) Fe ₈ N, (e) e (f) Fe ₁₆ N ₂ . Imagens adaptadas das referências ^{14,33-37} , respectivamente.	31
Figura 6 - Esquema ilustrativo das principais etapas do processo de irradiação à laser (para mais detalhes, veja o texto). Imagem adaptada da referência ⁴⁶	36
Figura 7 – Os quatro tipos de reações químicas que ocorrem dentro do plasma e do líquido, e entre a interface plasma/ líquido: reação do material do alvo dentro do plasma (M*), reação entre o material do alvo e as moléculas do líquido dentro do plasma (M* +L*), (M+L*) reação entre o material do alvo e o líquido na interface entre o plasma e o líquido (M+L*), reação no meio líquido entre o material do alvo e do líquido (M +L). Note que o * indica os estados excitados e / ou ionizados. Imagem adaptada da referência ⁴⁶	37
Figura 8 - Diagramas esquemáticos da ejeção de nanogotas de metal e formação de nanoestruturas: (a) formação de nanogotas no processo de ablação de um laser em milissegundos, (b) reações de nanogotas de metal ejetadas no líquido, (c) efeito da reatividade líquida e da frequência do laser na morfologia das nanoestruturas formadas no sistema Pb/S. Imagem adaptada da referência ⁵³	41
Figura 9 - Ilustração esquemática da configuração experimental usada para produzir NPs usando o método de ablação por laser em solução líquida.	42

Figura 10 - Diagrama esquemático do caminho percorrido pelo feixe de elétrons no interior da coluna de um MET básico.	46
Figura 11 - (a) Modo campo claro e (b) modo campo escuro do MET. Imagem adaptada da referência ⁵⁶	47
Figura 12 - Geometria da difração de elétrons por planos cristalinos de uma amostra e definição do comprimento da câmera, L. O comprimento de onda do elétron é λ , e a constante da câmera é λL . Imagem adaptada da referência ⁵⁶	49
Figura 13 - Imagens de MET em campo claro para NPs de (a) ζ -Fe ₂ N ⁵⁹ (b) ϵ -Fe ₃ N ⁶² (c) γ -Fe ₄ N ¹⁴ (d) α'' -Fe ₁₆ N ₂ ¹⁴ . Nas inserções das figuras estão apresentadas as imagens de SAED das correspondentes imagens de MET. Imagens adaptadas das referências ^{14,59,62}	50
Figura 14 – Mecanismos (a) do espalhamento Raman em comparação com o espalhamento Rayleigh e (b) do processo de espalhamento Raman Stokes e anti-Stokes. Imagem adaptada da referência ⁶⁸	54
Figura 15 - Resultados da Teoria do funcional da densidade de estruturas otimizadas para espécies moleculares de ferro- nitrogênio conforme Tabela 3. As distâncias são dadas em angstroms e os ângulos em grau nas espécies identificadas como: FeN, FeNN, NNFeNN lineares, FeNFe cíclica e NFeN. Imagem retirada da referência ⁷⁰	57
Figura 16 - Espectros Raman de (a) NPs de Fe ₂ N, (b) NPs dos sistemas Fe-N, Ni-N e Co-N, (c) NPs de Fe ₂ N, (d) filmes finos de Fe-N e (e) ϵ -Fe ₃ N em termos do aumento da temperatura em atmosfera ambiente. Imagem adaptada das referências ^{14,15,71-73}	58
Figura 17 - Espectros de absorção UV-Vis de (a) NPs de prata em isopropanol preparados utilizando feixe de laser de 1064 nm e 532 nm com 397 mJ/cm ² por 10 min e de (b) NPs coloidais de Cu preparados usando comprimentos de onda de 355 nm, 532 nm e 1064 nm com fluência de 12 J/cm ² e duração da ablação de 10 min. Imagem adaptada da referência ⁴³	62
Figura 18 - Espectros de absorção UV/Vis de nanopartículas de Fe dispersas na água (linha sólida em preto) e depois da exposição da amostra ao ar (linha tracejada em vermelho). Imagem retirada da referência ⁷⁷	63
Figura 19 - Imagem interna do espectrômetro UV-Vis utilizado neste trabalho mostrando o caminho óptico percorrido pelo feixe do laser produzido pela lâmpada de xenônio. É indicada a posição que a amostra permanece enquanto o feixe é	

transmitido através das partículas em suspensão em álcool isopropílico. Imagem adaptada do manual do equipamento⁷⁸.64

Figura 20 – (a) Micrografias de MET da amostra IR1, produzida com o comprimento de onda no infravermelho e utilizando a fluência do laser de 0,7 J/cm². A inserção em (a) apresenta o histograma de tamanhos de partículas representativo para a amostra IR1. (b) Imagem de SAED para a amostra IR1 referente a área selecionada mostrada em (a). Os pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos correspondentes as fases ϵ -Fe₃N (cor azul*) e ζ -Fe₂N (cor vermelha^Δ). ...65

Figura 21 – (a) Micrografias de MET da amostra IR2, produzida com o comprimento de onda no infravermelho e utilizando a fluência do laser de 1,0 J/cm². A inserção em (a) apresenta o histograma de tamanhos de partículas representativo da amostra IR2. (b) Imagem de SAED para a amostra IR2 referente a área selecionada mostrada em (a). Os pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos correspondentes as fases ϵ -Fe₃N (cor azul*) e α'' -Fe₁₆N₂ (cor branca[□]). ...66

Figura 22 – (a) Micrografias de MET da amostra IR3, produzida com o comprimento de onda no infravermelho e utilizando a fluência do laser de 1,3 J/cm². A inserção em (a) apresenta os histogramas de tamanhos de partículas representativos da amostra IR3. (b) Imagem de SAED para a amostra IR3 referente a área selecionada mostrada em (a). Os anéis e padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller de planos cristalinos correspondentes a fase α'' -Fe₁₆N₂ (cor branca[□]).67

Figura 23 - (a) Micrografias de MET da amostra IR4, produzida com o comprimento de onda no infravermelho e utilizando a fluência do laser de 1,6 J/cm². A inserção em (a) apresenta o histograma de tamanhos de nanopartículas representativo para a amostra IR4. (b) Imagem de SAED para a amostra IR4 referente a área selecionada mostrada em (a). Os anéis e padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller de planos cristalinos atribuídos a fase ζ -Fe₂N (cor vermelha^Δ). ..68

Figura 24 - (a) Micrografias de MET da amostra S1, produzida na fluência do laser de 1,0 J/cm² sob comprimento de onda do laser de 1064 nm. A inserção em (a) apresenta o histograma de tamanhos de partículas representativo para a amostra S1. (b) Imagem de SAED para a amostra S1 referente a área selecionada mostrada em (a). Os padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos atribuídos as fases α'' -Fe₁₆N₂ (cor branca[□]) e ϵ -Fe₃N (cor azul*).69

Figura 25 - (a) Micrografia de MET da amostra S2, produzida na fluência do laser de 1,0 J/cm² sob comprimento de onda do laser de 532 nm. A inserção em (a) apresenta

o histograma de tamanhos de partículas representativo para a amostra S2. (b) Imagem de SAED para a amostra S2 referente a área selecionada mostrada em (a). Os anéis e padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos atribuídos a fase α'' -Fe ₁₆ N ₂ (cor branca [□]).	69
Figura 26 - (a) Micrografias de MET da amostra S3, produzida na fluência do laser de 1,0 J/cm ² sob comprimento de onda do laser de 355 nm. A inserção superior em (a) apresenta o histograma de tamanhos de partículas representativo para a amostra S3. (b) Imagem de SAED para a amostra S3 referente a área selecionada mostrada em (a). Os anéis e padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos correspondentes a fase α'' -Fe ₁₆ N ₂ (cor branca [□]).	70
Figura 27 - (a) Micrografia de MET da amostra S4, produzida na fluência do laser de 1,0 J/cm ² sob comprimento de onda do laser de 266 nm. A inserção em (a) apresenta o histograma de tamanhos de partículas representativo para a amostra S4. (b) Imagem de SAED para a amostra S4 referente a área selecionada mostrada em (a). Os anéis e padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos correspondentes a fase ϵ -Fe ₃ N (cor azul*).	71
Figura 28 - Espectros Raman para as amostras IR1, IR2, IR3 e IR4 produzidas no comprimento de onda do laser de 1064 nm, usando as fluências do laser de 0,7 J/cm ² , 1,0 J/cm ² , 1,3 J/cm ² e 1,6 J/cm ² , respectivamente. As barras verticais indicam frequências das linhas Raman ativas calculadas no trabalho atual e as faixas de IR fornecidas pela referência ⁷⁰	75
Figura 29 - Espectros Raman para amostras S1, S2, S3 e S4 produzidas com uma fluência do laser de 1,0 J/cm ² e usando os comprimentos de onda do laser de 1064 nm, 532 nm, 355 nm e 266 nm, respectivamente. As barras verticais indicam as frequências das linhas Raman ativas calculadas no trabalho atual e as faixas de IR fornecidas pela referência ⁷⁰	76
Figura 30 - Imagem por microscopia eletrônica de transmissão e a inserção mostrando o correspondente padrão de difração de elétrons por área selecionada que demonstra a formação de nanoestruturas de óxido de ferro produzidas com o laser de comprimento de onda a laser de 1064 nm, usando uma fluência de 1,3 J/cm ² . Os anéis e pontos de difração são identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos e correspondem à fase de Fe ₂ O ₃ (maghemita).	77
Figura 31 - Espectros Raman comparativos de nanopartículas de nitreto de ferro (amostra S3) e das nanopartículas de óxido de ferro (amostra Fe ₂ O ₃).	78

Figura 32 - Espectros de absorção de UV-Vis obtidos a partir de suspensões de nanopartículas em álcool isopropílico das amostras IR1, IR2, IR3 e IR4. As setas verticais tracejadas foram inseridas para indicar as características peculiares e comuns nas curvas de absorção.....	79
Figura 33 - Espectros de absorção de UV-Vis obtidos a partir de suspensões de nanopartículas em álcool isopropílico das amostras S1, S2, S3 e S4. As setas verticais tracejadas foram inseridas para indicar as características peculiares e comuns nas curvas de absorção.	81
Figura 34 - Anatomia do <i>C. elegans</i> . (a) Micrografia óptica do <i>C. elegans</i> . Abaixo, temos uma representação esquemática da anatomia de <i>C. elegans</i> mostrando as partes de interesse para a avaliação de NPs. (b) O sistema reprodutor é formado por duas gônadas simétricas em forma de U, que são unidas ao útero e a um aparelho de colocação de ovos no meio do corpo. O sistema alimentar em (c) e (e) consiste em boca, intestino faríngeo, reto e ânus. (d) A cutícula é formada por cinco camadas, cuja função é de revestir e proteger os órgãos do nematódeo. Legenda: cutícula e epiderme em azul, sistema alimentar em verde, sistema reprodutor em laranja, pseudoceloma em azul claro, canais de entrada (boca) e saída (poro excretor, vulva, ânus) indicados em amarelo. Imagem adaptada da referência ³⁰	86
Figura 35 - Ciclo de vida do nematódeo <i>C. elegans</i> sob manutenção à 22 °C nos 4 estágios larvares (L1 a L4). As larvas L4 dão origem aos adultos jovens que posteriormente se tornam adultos reprodutivos. Estes sobrevivem por aproximadamente 3 semanas sob ótimas condições. Imagem adaptada da referência ⁹¹	87
Figura 36 - Imagens de microscopia óptica de NPs de Fe ₂ O ₃ (A e B) e Au (C e D) sendo visualizadas internamente ou externamente ao <i>C. elegans</i> . (A) As NPs de Fe ₂ O ₃ podem ser vistos dentro do corpo de vermes em marrom por observação direta. (B) Quando os vermes tratados são corados com o azul da Prússia (uma coloração de ferro), as NPs aparecem em azul e facilitam a visualização. (C) As NPs de Au aparecem em azul no sistema alimentar dos vermes tratados, indicando a agregação dos NPs em relação a suspensão (vermelha) devido à interação com <i>C. elegans</i> . (D) Quando o alimento a base de bactérias são reintroduzidos, os vermes excretam as NPs de Au. Figura adaptada da referência ³⁰	88

Figura 37 - Metodologias típicas para rastrear drogas, desde processos <i>in vitro</i> até uma crescente complexidade dos organismos modelo. Imagem adaptada da referência ³⁰	89
Figura 38 – Micrografias das amostras produzidas para fins de testes de toxicidade, segundo as análises MET realizadas nos períodos de (a)-(c) 07/2017 e (d) e (e) 11/2018.	92
Figura 39 - Imagem de difração de elétrons por área selecionada característica das NPs da Figura 38. Os planos cristalinos indexados no padrão de SAED confirmam a formação da estrutura α'' -Fe ₁₆ N ₂	93
Figura 40 - Espectros de absorção de UV-Vis obtidos a partir de suspensões de NPs de α'' -Fe ₁₆ N ₂ em soro fisiológico (ou solução salina). As setas foram inseridas com os respectivos valores de absorção e comprimento de onda referente a cada pico de absorção.....	93
Figura 41 - Relação entre a concentração das NPs de α'' -Fe ₁₆ N ₂ com o tempo de repouso da amostra de NPS em suspensão.	94
Figura 42 - Esquema ilustrativo para a exposição com as NPs de α'' -Fe ₁₆ N ₂ . Os animais grávidos foram sincronizados para a obtenção de ovos. Após a eclosão, vermes de mesmo estágio larval (L1) foram expostos às NPs de α'' -Fe ₁₆ N ₂ por 1 h ou ao veículo NaCl 0,9 % (controle). Os vermes foram lavados por centrifugação e transferidos para placas de petri com NGM e bactéria <i>E. coli</i> OP50. As observações comportamentais (L4), reprodução (Adulto), sobrevivência (L1 a L4), desenvolvimento (L1 a L4) e imagens (L1 e L4) foram realizadas em tempos determinados.	96
Figura 43 - Curva concentração-resposta da sobrevivência do <i>C. elegans</i> após da exposição aguda às NPs de α'' -Fe ₁₆ N ₂ . Animais sincronizados no estágio larval L1 foram expostos por 1 h, lavados e transferidos para placas NGM contendo bactéria <i>E. coli</i> OP50. Os vermes vivos e mortos foram contabilizados diariamente até o estágio larval L4. Os resultados foram apresentados em porcentagem da média de animais vivos \pm SEM (Erro padrão da média) de cinco experimentos independentes em duplicata. Nenhuma diferença estatística foi observada comparando os grupos ao controle (NaCl 0,9 %) por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni.	99
Figura 44 - Desenvolvimento larval do <i>C. elegans</i> após a exposição às NPs de α'' -Fe ₁₆ N ₂ . Animais sincronizados no estágio larval L1 foram expostos por 1 h, lavados e transferidos para placas NGM contendo bactéria <i>E. coli</i> OP50. Os estágios larvais foram avaliados diariamente: dia 1 (A), dia 2 (B), dia 3 (C) e dia 4 (D). Os resultados	

foram apresentados em porcentagem da média de animais em cada estágio larval \pm SEM (Erro padrão da média). Nenhuma diferença estatística foi observada comparando os grupos ao controle (NaCl 0,9 %) por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni. Os gráficos representam a média de 5 experimentos realizados em duplicatas. 100

Figura 45 - As NPs de α "-Fe₁₆N₂ não modificaram os comportamentos de movimento e ciclos de defecação no *C. elegans*. Animais sincronizados no estágio larval L1 foram expostos por 1 h, lavados e transferidos para placas NGM contendo bactéria *E. coli* OP50. Os ciclos de defecação (A) e curvaturas corporais (B) foram observadas em vermes no estágio larval L4 (44 h). Três tempos entre as defecações foram considerados e as curvaturas observadas por 20 s. Os resultados representam a média \pm SEM (Erro padrão da média) de três experimentos independentes, n=6. Nenhuma diferença estatística foi observada comparando os grupos ao controle (NaCl 0,9 %) por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni. 101

Figura 46 - Comportamento alimentar do *C. elegans* após a exposição às NPs de α "-Fe₁₆N₂. Animais sincronizados no estágio larval L1 foram expostos por 1 h, lavados e transferidos para placas NGM contendo bactéria *E. coli* OP50. O segundo bulbo da faringe indicado em (A) e a contagem de batimentos faríngeos (B) foram observados em vermes no estágio larval L4 por 10 s e normalizados para 1 min. O asterisco* indica a significância estatística (p < 0.05) por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni. Seis vermes são verificados em cada experimento e os ensaios realizados quatro vezes. 102

Figura 47 - Modificações reprodutivas após a exposição do *C. elegans* às NPs de α "-Fe₁₆N₂. Os animais sincronizados no estágio larval L1 foram expostos por 1 h, lavados e transferidos para placas NGM contendo bactéria *E. coli* OP50. A reprodução foi observada em vermes adultos (dia 1,72 h após o tratamento). Ovos dentro do útero (ovoprodução) e (B) e ovos postos (D) foram contados. A flecha vermelha indica a posição da vulva (A) e as azuis, os ovos (C). Seis vermes foram individualmente observados em três diferentes experimentos. Data foram apresentados em média \pm SEM (Erro padrão da média). * p<0,05, *** p<0,001, **** p< 0,0001 indicam diferenças significativas comparando os grupos tratados ao grupo controle por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni. 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo das condições de preparação das amostras sintetizadas estudadas neste trabalho.	43
Tabela 2 – Parâmetros estruturais das fases de Fe-N (segundo JCPDS fichas PDF 50-0958, PDF 49-1663 e referências ^{4,13,17,33}	52
Tabela 3 – Energias relativas, distâncias entre as ligações e frequências calculadas para as estruturas de FeN, FeN ₂ e Fe ₂ N usando a teoria do funcional da densidade. Tabela adaptada da referência ⁷⁰	56
Tabela 4 - Resumo das condições de preparação e identificação da fase nitreto nas amostras produzidas e estudadas neste trabalho.	72
Tabela 5 - Resumo dos resultados morfológicos e estruturais das amostras sintetizadas no comprimento de onda do laser fixo em 1064 nm.....	83
Tabela 6 - Resumo dos resultados morfológicos e estruturais das amostras sintetizadas na fluência do laser fixa em 1,0 J/cm ²	84
Tabela 7 – Exemplos de avaliação <i>in vivo</i> de NPs metálicas usando o modelo animal <i>Caenorhabditis elegans</i> . Tabela adaptada da referência ³⁰	90

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

NPs – nanopartículas

Fe – ferro

N – nitrogênio

α -Fe – ferrita

γ -Fe – austenita

Fe-N – nitretos de ferro

ζ -Fe₂N – nitreto de ferro do tipo ζ -Fe₂N com estrutura ortorrômbica

ϵ -Fe₃N – nitreto de ferro do tipo ϵ -Fe₃N com estrutura hexagonal

γ' -Fe₄N – nitreto de ferro do tipo Fe₄N com estrutura cúbica de face centrada

α'' -Fe₁₆N₂ – nitreto de ferro do tipo Fe₁₆N₂ com estrutura tetragonal de corpo centrado

α' -Fe₈N – nitreto de ferro do tipo martensita Fe₈N com estrutura tetragonal de corpo centrado

NH₃ – amônia

bcc – *body-centered cubic* (rede cúbica de corpo centrado)

fcc – *face-centered cubic* (rede cúbica de face centrada)

hcp – *hexagonal close-packed* (rede hexagonal compacta)

bct – *body-centered tetragonal* (rede tetragonal de corpo centrado)

MET – microscopia eletrônica de transmissão

SAED – *selected area electron diffraction* (difrac o de elétrons por área selecionada)

C. elegans – nematódeo *Caenorhabditis elegans*

nm – nan metro

ns – nanosegundo

ms – milissegundo

μs – microssegundo

ps – picossegundo

fs – fentossegundo

NM – nitretos de metais de transição

PI – processo de fotoionização

IB – efeito de Bremsstrahlung

UV – radiação ultravioleta

IR – radiação infravermelha

M – metal

L – líquido

Nd:YAG – *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*

YAG – $Y_3Al_5O_{12}$

PbS – sulfeto de chumbo

CCD – *charge-coupled device* (dispositivo de carga acoplada)

XRD – difração de raios-X

SEM – *scanning electron microscope* (microscópio eletrônico de varredura)

FESEM – *field emission scanning electron microscopy* (microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo)

UV-Vis – espectroscopia UV-visível

DFT – *Density Functional Theory* (teoria do funcional da densidade)

NGM – *nematode growth medium* (meio de cultura para nematódeos)

E. coli – *escherichia coli*

ANOVA – análise de variância

LISTA DE SÍMBOLOS

σ_{PI} – seção transversal do processo de fotoionização

σ_{IB} – seção transversal do efeito de Bremsstrahlung

$\kappa(E_o)$ – função da energia E_o

E_o – energia de ionização do estado excitado

κ_1 e κ_2 – funções da densidade de elétrons

T_e – temperatura dos elétrons

n_{ion} – densidade numérica dos íons

n_{atm} – densidade numérica dos átomos

λ – comprimento de onda

d – distância entre os planos de um cristal

r – distância entre os pontos cristalinos de difração

$L\lambda$ – constante da câmera CCD

Å – angstrom

ν – frequência

E_T – energia total

E_{vib} – energia de vibração

E_{rot} – energia de rotação

I_o – intensidade conhecida do laser

T – transmitância

A – absorbância

l – distância que a luz atravessa no meio material

C – concentração

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS	29
2.1	NANOPARTÍCULAS DE NITRETO DE FERRO.....	29
2.2	PROCESSO DE NITRETAÇÃO	32
2.3	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POR IRRADIAÇÃO À LASER	33
2.4	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS NESTE TRABALHO.....	41
3	FUNDAMENTOS DAS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	45
3.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	45
3.1.1	As técnicas de MET em campo claro, campo escuro e SAED.....	45
3.1.2	Revisão da literatura	50
3.1.3	Preparação das amostras neste trabalho.....	52
3.2	ESPECTROSCOPIA RAMAN	53
3.2.1	A técnica de RAMAN.....	53
3.2.2	Revisão da literatura	55
3.2.3	Preparação das amostras neste trabalho.....	59
3.3	ESPECTROSCOPIA UV-VIS	60
3.3.1	A técnica de UV-VIS.....	61
3.3.2	Revisão da literatura	61
3.3.3	Preparação das amostras neste trabalho.....	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
5	TESTES DE TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS	85
5.1	<i>C. ELEGANS</i> COMO MODELO EM AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS.....	85
5.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PARA OS TESTES DE TOXICIDADE	91
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS DAS AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS	95

5.3.1	Condições do crescimento e desenvolvimento do <i>C. elegans</i>	95
5.3.2	Exposição das nanopartículas e monitoramento da sobrevivência.....	95
5.3.3	Observação comportamental: batimento faríngeo, ciclos de defecação e curvaturas corporais.....	97
5.3.4	Perfil reprodutivo	97
5.3.5	Análise estatística	98
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES DAS AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS	98
5.4.1	Sobrevivência e desenvolvimento larval	98
5.4.2	Batimento faríngeo, ciclos de defecação e movimento	101
5.4.3	Perfil reprodutivo	102
6	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICE	118

1 INTRODUÇÃO

Nanopartículas (NPs) são objetos de diferentes formatos e com tamanhos típicos entre 1 e 100 nanômetros (nm). Uma definição menos rigorosa inclui objetos com pelo menos uma de suas dimensões nanométricas, como nanofios, e que podem ou não apresentar uma camada interfacial circundante de revestimento ou "casca"¹. A camada interfacial, quando presente nas NPs, é parte integrante da partícula, gerando um material quimicamente diferente do núcleo em todos os aspectos. O núcleo é essencialmente a porção central da nanopartícula. Entretanto, mesmo sem um revestimento interfacial, as NPs podem exibir propriedades significativamente diferentes do material macroscópico correspondente, ou material massivo². Devido a essas características tão excepcionais, a síntese e o estudo das NPs adquiriram grande interesse por pesquisadores em campos multidisciplinares³.

Neste trabalho focalizaremos nas nanopartículas de nitretos de ferro, que apresentam uma grande variedade de propriedades físicas importantes. Os nitretos de ferro formam uma classe interessante de compostos comercialmente importantes devido as suas propriedades magnéticas, elétricas, mecânicas e tribológicas⁴. Recentemente, os nitretos metálicos integrados em materiais à base de carbono, como nanotubos de carbono e grafeno, têm sido amplamente utilizados como materiais para eletrodos devido à sua excelente estabilidade eletroquímica e alta condutividade elétrica, e dispositivos portáteis de alta eficiência de armazenamento^{5,6}. Considerando elementos mais leves, como o hidrogênio, o boro, o carbono e o nitrogênio, estes podem ocupar as posições da rede intersticial dos metais de transição, como o ferro, o que possibilita, por exemplo, a inclusão dos átomos de carbono e de nitrogênio na rede cúbica de corpo centrado (bcc) do α -Fe (mais estável), cúbica de faces centradas (fcc) do γ -Fe ou hexagonal (hcp) do ϵ -Fe, podendo produzir uma série de materiais de estado sólido com aplicações práticas. Particularmente, o interesse pelos nitretos de ferro provém de suas propriedades físicas que potencializam as aplicações em cabeçotes de gravação magnética de alta densidade. Além de suas excelentes propriedades magnéticas, podem ser citadas boas performances em processo de catálise, dependendo da disponibilidade de sítios, em baterias de lítio e sódio, por apresentarem peso molecular relativamente baixo (Fe_2N e Fe_3N)⁷, em aplicações biomédicas, uma vez que os nitretos de ferro são

relativamente menos citotóxicos que os óxidos de ferro, e como revestimentos resistentes ao desgaste e resistentes à corrosão, tais como os aços inoxidáveis submetidos à nitretação^{4,8}.

A concentração de nitrogênio pode ser alterada sinteticamente para estabilizar as fases de Fe-N com diferentes estruturas cristalinas e, portanto, as propriedades mecânicas, químicas, eletrônicas e magnéticas podem ser ajustadas. Existe uma série de compostos Fe-N, cuja estrutura cristalina depende da concentração de nitrogênio. São elas: a fase γ -FeN_y (y = 0,9 - 1,0) com estrutura cristalina cúbica, a ζ -Fe₂N ortorrômbica, a ϵ -Fe₃N_{1+y} (y = 0 - 0,33) hexagonal (hcp), a γ' -Fe₄N cúbica (fcc), a martensita α' -Fe₈N tetragonal (bct) e a α'' -Fe₁₆N₂ tetragonal (bct). Enquanto a fase α' -Fe₈N apresenta a estrutura desordenada quimicamente com os átomos de nitrogênio localizados aleatoriamente, a fase α'' -Fe₁₆N₂ exibe uma estrutura cristalina com os átomos de nitrogênio localizados regularmente, sendo esta a principal diferença entre essas duas fases⁹. As principais estruturas cristalinas dos nitretos de ferro Fe-N estão ilustradas na Figura 1 (a)-(d)^{4,10}. Uma estrutura hexagonal típica de ϵ -Fe₃N exibe uma relação c/a = 1,633, e pode apresentar um valor de até 1,62 quando for referente às NPs. As mudanças nos parâmetros de rede dos materiais massivos com relação aqueles em tamanho nanométrico estão principalmente relacionadas à tensão na rede devido à redução de tamanho. Quando a concentração de N aumenta, os átomos de N preenchem os sítios da rede aleatoriamente até que a metade dos locais disponíveis estejam ocupados e, assim, ocorra a formação da estrutura ortorrômbica ζ -Fe₂N.

A formação da fase γ' -Fe₄N, com estrutura fcc do tipo antiperovskita (grupo espacial Pm3m), ocorre com os átomos de N ocupando um quarto dos interstícios octaédricos de forma ordenada. A estrutura cristalina de γ' -Fe₄N pode ser visualizada como uma rede fcc de Fe com os átomos de N no centro da célula unitária. Neste caso, existem dois locais ocupados pelos átomos de Fe, um ocupando os vértices (Fe I) e o outro nas faces (Fe II) do cubo, conforme mostra a Figura 1(c). Por outro lado, a fase α'' -Fe₁₆N₂ cristaliza-se no grupo espacial tetragonal I4/mmm e pode ser vista como um conjunto de oito células unitárias bcc de α -Fe, com duas octaédricas e os interstícios ocupados pelos átomos de N. Existem três posições de Fe: (0,1/2,1/4), (0,0,0.31) e (1/4,1/4,0) com sítios de simetrias 4d($\bar{4}m2$), 4e(4mm) e 8h(mm), respectivamente. Na estrutura α -Fe, a cavidade octaédrica está situada entre o octaedro vazio de quatro átomos de Fe vizinhos mais próximos no plano ab, e os dois

átomos de Fe centrados na célula cúbica são colocados ao longo do eixo c acima e abaixo do plano ab. Enquanto que no processo de fabricação da estrutura complexa de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$, o átomo de N fica dentro deste buraco, distorcendo o octaedro.

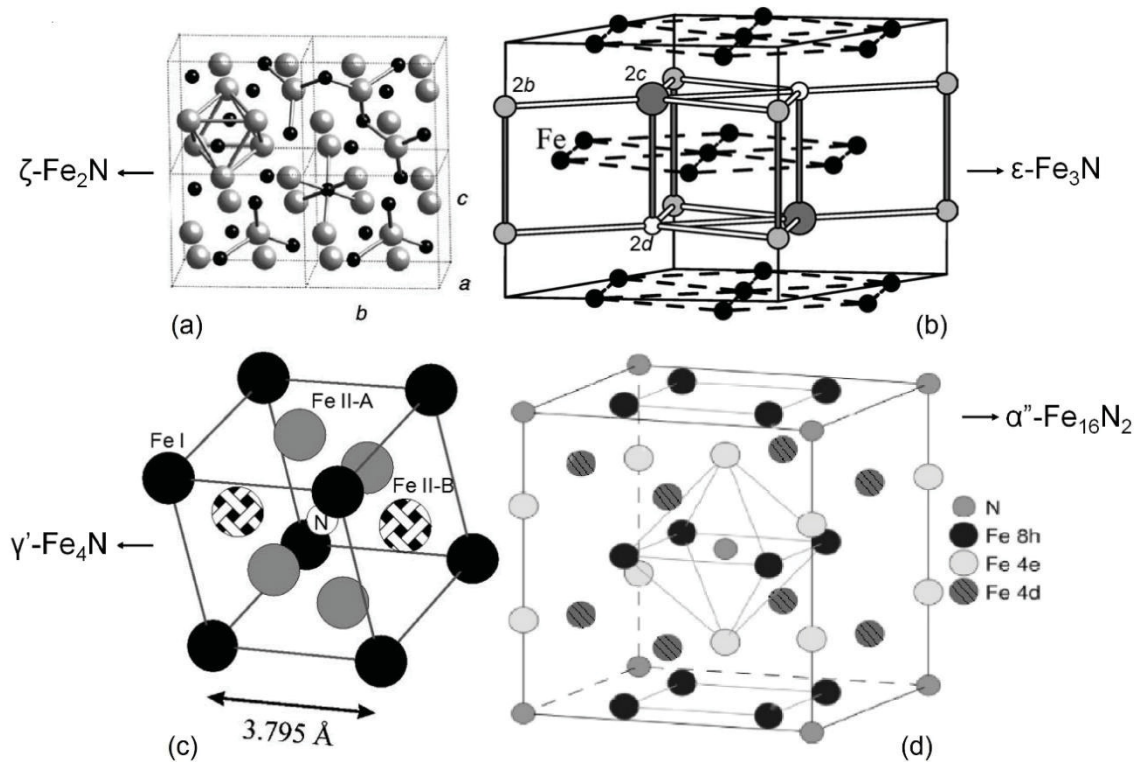


Figura 1 - Estruturas cristalinas dos principais nitretos de ferro, em (a) $\zeta\text{-Fe}_2\text{N}$ (esferas cinzas referem-se aos átomos do Fe e as pretas aos átomos de N), (b) $\epsilon\text{-Fe}_3\text{N}$ (esferas pretas referem-se aos átomos de Fe e as demais esferas remetem aos átomos de N), (c) $\gamma'\text{-Fe}_4\text{N}$ (esferas brancas referem-se aos átomos de N e as demais indicam os átomos de Fe), e (d) $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ (esferas cinza escuro indicam os átomos de N e as demais esferas indicam os átomos de Fe). As diferentes nuances das esferas para os átomos de Fe ou de N remetem aos diferentes sítios ocupados para cada conjunto de átomos. Imagem modificada da referência⁴.

Dentre os compostos Fe-N, apenas as fases com porcentagem atômica na rede de N ≤ 25 apresentam comportamento ferromagnético à temperatura ambiente. Os nitretos $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ e $\gamma\text{-Fe}_4\text{N}$ têm grandes aplicações potenciais e, em princípio, muito baixo custo devido à grande abundância desses elementos. Na forma de nanomagnetos podem ser usados, por exemplo, para polarização de cabeçotes de gravação magnética de alta densidade e, também, para eletrodos ferromagnéticos com alta polarização de spin de interesse para spintrônica^{4,11}. Devido ao seu elevado momento magnético, com relação aos demais nitretos e óxidos de Fe, a fase

metaestável* α'' -Fe₁₆N₂ atrai considerável atenção^{12,13}. Nanopartículas constituídas de α'' -Fe₁₆N₂ e ζ -Fe₂N apresentam uma magnetização de saturação ~ 510 emu/g (Figura 2). Esta estimativa da magnetização de saturação média para as nanopartículas de nitreto de ferro é cerca de 2,3 vezes maior que a magnetização de saturação do ferro maciço (217,2 emu/g)¹⁴. No entanto, a fase pura α'' -Fe₁₆N₂ é de extrema dificuldade de síntese exigindo, via de regra, métodos de preparação complexos e com várias etapas⁴. Por outro lado, embora as fases ricas em nitrogênio (Fe₂N e Fe₃N) possuam menor valor de magnetização de saturação, elas apresentam baixo peso molecular. Isso permite explorar outro tipo de aplicação que é a transferência do seu excesso de elétrons. Essas duas fases têm excelentes capacidades de descarga reversível para reações eletroquímicas de lítio ou sódio^{15,16}.

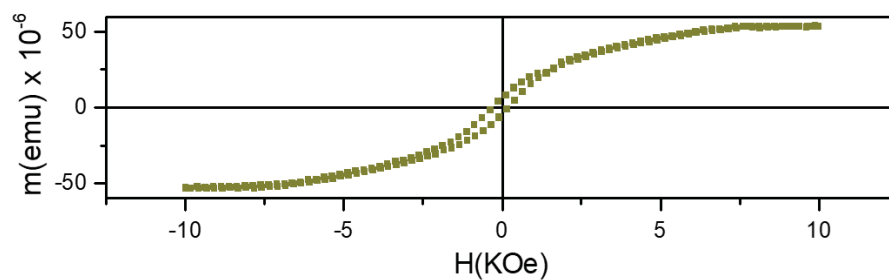


Figura 2 - Histerese magnética de NPs de α'' -Fe₁₆N₂ + ζ -Fe₂N na temperatura de 10 K. Imagem modificada da referência¹⁴.

A termodinâmica das fases de Fe-N e o diagrama de fases de Fe-N associados são de importância crucial para a compreensão do comportamento do material, quando observado durante o processo de nitretação de ferro e de aços. Ao lado do diagrama de fases Fe-C, o diagrama de fases Fe-N apresentado na Figura 3 é um dos diagramas de fase mais importantes em engenharia e ciência dos materiais¹⁰. Ele consiste em compostos químicos como, γ -Fe₄N, ζ -Fe₂N e FeN (cuja estrutura precisa e região de estabilidade estão ainda abertas) e fases metaestáveis (α' -Fe(N) e α'' -

* Uma abordagem geral para descrever metaestabilidade é baseada em termos energéticos (geralmente energia livre de Gibbs). As fases que apresentam este comportamento são metaestáveis à pressão normal, no sentido de que não correspondem a uma energia livre mínima de Gibbs para uma dada composição química. Também, uma fase metaestável pode ser caracterizada por um estado de não equilíbrio de uma substância, cujas propriedades mudam reversivelmente no momento de um experimento ou observação. A metaestabilidade é garantida pela existência de uma barreira de energia no caminho da transformação do sistema em estados de baixa energia¹².

Fe_{16}N_2)¹⁷. Assim, um processo tecnologicamente muito importante na engenharia de superfície são as ligas à base de ferro submetidas a processos de nitretação, isto é, a introdução de nitrogênio na rede metálica sob uma atmosfera externa (gás, plasma, sal)¹⁸.

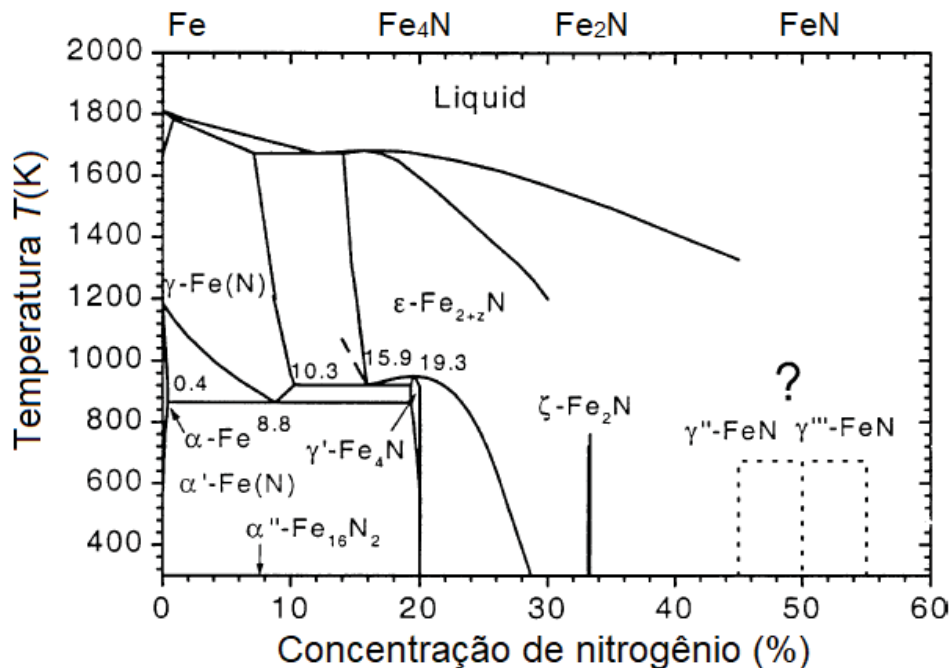


Figura 3 - Diagrama de fases do sistema Fe-N. Imagem adaptada da referência¹⁰.

Do ponto de vista científico, é necessário um conhecimento preciso das propriedades fundamentais dos nitretos de ferro nanoestruturados, a fim de que possam ser utilizados em novas aplicações. O estudo de amostras volumétricas macroscópicas é necessário para esclarecer os fundamentos das propriedades físicas e magnéticas destes materiais. No entanto, este tipo de amostra é sintetizado por métodos convencionais e comumente têm gradientes de concentração de nitrogênio. Por outro lado, as NPs podem ser sintetizadas em uma única fase de nitreto e mais facilmente do que as amostras macroscópicas, além de ampliar os campos de aplicação. Devido à grande área superficial das NPs, os átomos de nitrogênio podem penetrar facilmente e uniformemente nas partículas e, portanto, aumentar o tamanho das partículas dentro de uma única fase, viabilizando uma caracterização precisa do nitreto¹⁹.

Embora a pesquisa sobre nitretos metálicos de baixa dimensão não seja um tópico novo, apenas recentemente os nitretos bidimensionais de metais se consolidaram em diversas arenas promissoras da nanotecnologia. Além do potencial para armazenamento de alta taxa de energia, necessário para eletrônicos portáteis, os nitretos metálicos nanoestruturados oferecem muitas outras aplicações possíveis como na fotônica e plasmônica²⁰, coleta de energia (*energy harvesting*)²¹ e micro-supercapacitores²²⁻²⁴.

Mesmo com muitas aplicações importantes, ainda há um desafio na síntese bem-sucedida dos sistemas monofásicos de Fe-N, seja em filmes finos ou nanopartículas. Devido à grande área superficial e à maior concentração de defeitos na geometria das nanopartículas, os átomos de nitrogênio podem penetrar mais fácil e uniformemente nas partículas. Portanto, a formação do nitreto de ferro monofásico é mais fácil em nanopartículas quando comparada com filmes finos^{4,19}. As deposições assistidas por irradiação de íons de baixa energia (pulverização ou bombardeio de íons) podem ser usadas, mas podem facilmente resultar na geração de defeitos pontuais e no excesso de composição de nitrogênio. O processo de nitretação é bem conhecido para alguns nitretos metálicos e, frequentemente, verifica-se que a difusão do nitrogênio é significativamente mais rápida quando comparada ao átomo do metal²⁵.

As rotas convencionais de preparação de NPs são muitas vezes baseadas na redução de um metal na presença de estabilizadores. Os nitretos de ferro, por exemplo, são usualmente formados como resultado da interação de amônia (NH₃) com o precursor de ferro a temperaturas $\geq 400^\circ$ C. No entanto, a principal desvantagem desses procedimentos é a presença de contaminantes na superfície das NPs, o que é problemático quando é necessária uma alta atividade superficial nas aplicações. A irradiação à laser em meio líquido é um método de fabricação alternativo que possibilita a produção de NPs em ambientes reativos específicos e livre de agentes químicos, desde que um alvo de alta pureza seja irradiado em solvente puro^{26,27}. Além disso, a irradiação à laser tem o potencial de ser um método exclusivo para a síntese em uma única etapa, como no caso dos nitretos de ferro a partir da irradiação de um alvo metálico de Fe imerso em nitrogênio líquido.

Após a síntese por irradiação à laser, as nanopartículas são deixadas em um líquido de conservação onde são mantidas em suspensão, uma vez que a interação

da superfície da partícula com o solvente é forte o suficiente para superar as diferenças de densidade, evitando que o material precipite no líquido. Isso se deve a alta relação entre superfície/volume das nanopartículas, a qual fornece uma considerável força motriz para a difusão²⁸.

Entre os objetivos deste trabalho estão:

- (i) Produzir NPs de nitreto de ferro, separadamente, por irradiação à laser, variando a fluência e o comprimento de onda do laser;
- (ii) Investigar os efeitos desses parâmetros do laser nas nanopartículas sintetizadas, através do estudo das propriedades morfológicas, estruturais e ópticas das NPs;
- (iii) Identificar a fase α'' -Fe₁₆N₂ de interesse e otimizar a sua produção;
- (iv) Estudar a estabilidade das NPs de α'' -Fe₁₆N₂ em soluções salinas concentradas;
- (v) Estudar a estabilidade das NPs de α'' -Fe₁₆N₂ em soluções salinas concentradas.

O comprimento de onda do laser escolhido para variar a fluência foi o infravermelho (1064 nm), que é o modo fundamental do laser utilizado.

Conforme foi inicialmente citado, as NPs de Fe-N exibem grande potencial em aplicações biomédicas, especialmente as fases com elevado momento magnético, como a fase α'' -Fe₁₆N₂. Contudo, as interações dessas nanopartículas em fluidos e organismos biológicos não foram profundamente avaliadas. A capacidade de prever e controlar a reatividade desses sistemas em condições biologicamente relevantes, ou seja, a degradação das NPs, a liberação de produtos indesejados e a interação delas com tecidos biológicos, ajudariam a criar materiais seguros que tenham aplicações na área de nanomedicina. Neste estudo foi utilizado um animal invertebrado, o nematódeo[†] *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)²⁹, para testar os efeitos toxicológicos das NPs de nitreto de ferro. Devido a capacidade de cultivar

[†] Os nematódeos, ou vermes, são animais invertebrados de corpo cilíndrico. A maioria dos nematódeos de vida livre tem menos de 2,5 mm de comprimento, sendo grande parte com aproximadamente 1 mm. Muitos são microscópicos, mas alguns nematódeos do solo têm até 7 mm, algumas espécies marinhas atingem 5 cm e alguns parasitas alcançam 50 cm ou mais. Eles aparecem dos polos aos trópicos em todos os tipos de ambientes, inclusive desertos, altas montanhas e no mar profundo. Os Nematódeos também incluem um dos animais de laboratório mais intensamente estudado, *Caenorhabditis elegans*, o qual apresenta todas as células mapeadas ao longo de todo seu desenvolvimento e de quem o genoma está entre os mais bem conhecidos de todos os organismos²⁹.

centenas desses animais em uma única placa de Petri, alimentando-se de bactérias, com uma vida útil curta (2-3 semanas) e crescimento fácil e barato em laboratório, este verme tornou-se um modelo ideal para testes iniciais dos níveis de toxicidade de NPs. Além disso, os avanços na genética e na biologia molecular permitiram a identificação de todas as 959 células do *C. elegans* e do seu genoma completo, que demonstraram uma alta conservação de mecanismos biológicos entre o verme e os vertebrados³⁰.

O presente trabalho será dividido em 6 capítulos, cujo conteúdo está organizado como segue.

- No capítulo 1 introduzir de forma simplificada a motivação do trabalho e os objetivos principais.
- No capítulo 2 apresentar o estado-da-arte da fabricação e os principais registros de síntese de nanopartículas de nitreto de ferro, conforme extraímos da revisão bibliográfica, seguido da síntese de nanopartículas deste trabalho.
- No capítulo 3 apresentar os métodos experimentais utilizados, a descrição dos fundamentos teóricos de cada técnica e dos métodos de preparação das amostras deste trabalho para cada análise.
- No capítulo 4 apresentar os resultados e discussões.
- No capítulo 5 apresentar uma breve revisão bibliográfica sobre o animal invertebrado utilizado nos testes de toxicidade das nanopartículas de nitreto de ferro, seguido de alguns dos resultados obtidos, cujo estudo ainda está em andamento.
- No capítulo 6 apresentar as conclusões.

2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS

2.1 NANOPARTÍCULAS DE NITRETO DE FERRO

O principal interesse no magnetismo dos compostos Fe-N resulta da busca para se encontrar uma alternativa ao ferro metálico, especialmente com melhor estabilidade química em ambientes oxidativos. As NPs de Fe são extremamente reativas com o ambiente e apresentam momento magnético reduzido devido as camadas superficiais de óxido que se formam facilmente nas NPs de Fe, o que limita suas aplicações. Além disso, as NPs de Fe quando revestidas com surfactantes sofrem uma perda significativa de magnetização. Embora a introdução de átomos de nitrogênio na rede Fe dilua o momento magnético intrínseco, a estabilidade das nanoestruturas Fe-N é comparativamente melhor do que as NPs de Fe e, apresentam um momento magnético superior às NPs de óxidos de ferro (Fe_2O_3 e Fe_3O_4).

Diferentemente dos óxidos de ferro, os nitretos de ferro são estabilizados pelas interações dominantes de Fe-Fe, apresentando similaridades estruturais ao ferro metálico. Os átomos de nitrogênio são fracamente ligados aos átomos de ferro nos locais intersticiais, gerando entalpias menos negativas de formação e uma inclinação menos acentuada, conforme mostra a Figura 4. Ao contrário, nos óxidos a inclinação é mais íngreme e, o $\text{FeO}_{1.33}$ (Fe_3O_4) é energeticamente estabilizado em relação a uma mistura de FeO e $\text{FeO}_{1.50}$ ³¹.

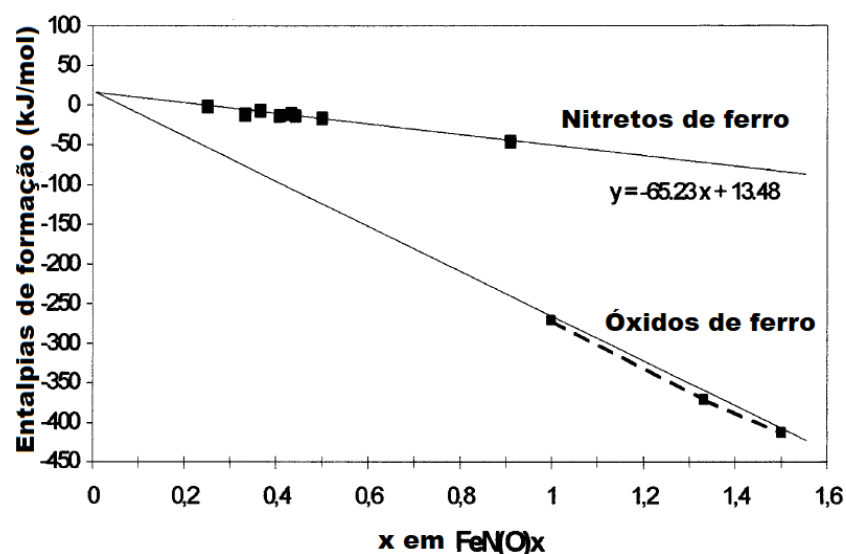


Figura 4 - Gráfico das entalpias de formação de nitretos de ferro FeN_x e óxidos de ferro FeO_x em relação ao teor x de N ou O. Imagem adaptada da referência³¹.

Tessier F. e colaboradores estimaram o valor da entalpia de formação da fase de nitreto de ferro de interesse para o presente estudo, $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$. Segundo os autores, o valor positivo obtido ($x = 0,125$) reflete provavelmente a metaestabilidade de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$, em comparação com o restante da série de nitretos de ferro. Neste caso, esse resultado concorda com o fato de que a $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ não é considerada como uma fase de equilíbrio termodinâmico, mas como metaestável. Como mencionado na seção de Introdução, sua síntese não é fácil, em parte porque a fase $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ é termicamente instável acima de 250 °C e se decompõe liberando N_2 após a separação da fase em $\alpha\text{-Fe}$ e Fe_4N^{31} .

Apesar do estudo das NPs de Fe-N ser vasto⁴, é escassa a quantidade de estudos que apresentam a formação em uma única fase e/ou um crescimento dessas NPs em uma única etapa.

Os trabalhos mais recentes sobre NPs de nitretos de ferro tem como motivação a funcionalização dessas NPs como eletrodos^{7,15,32}. Neste panorama, destaca-se um trabalho de 2019 que apresenta a síntese de NPs de Fe_2N (Figura 5 (a)) via NPs de Fe_2O_3 sob o fluxo de gás nitretante de amônia (NH_3)³³. O eletrodo fabricado pelos autores foi utilizado para a determinação do biomarcador 4-NQO. O 4-NQO é um importante marcador na pesquisa do câncer, produzido a partir das células tumorigênicas do câncer. Dessa forma, foi produzido um novo sensor eletroquímico para a detecção de estresse oxidativo e biomarcador de câncer à base de Fe_2N com eletrodo modificado de nano folhas de grafeno.

Huang e Wang³⁴ produziram NPs de Fe_3N , conforme apresenta a Figura 5 (b), com uma estreita distribuição de tamanho por reação química de ferro carbonil e gás de amônia. Os autores conseguiram estabilizar a fase e o tamanho das nanopartículas através do controle da proporção adequada de líquido transportador e surfactante. Também observaram um aumento da magnetização de saturação em concentrações maiores de NPs de Fe_3N , ou quando estas se encontram aglomeradas.

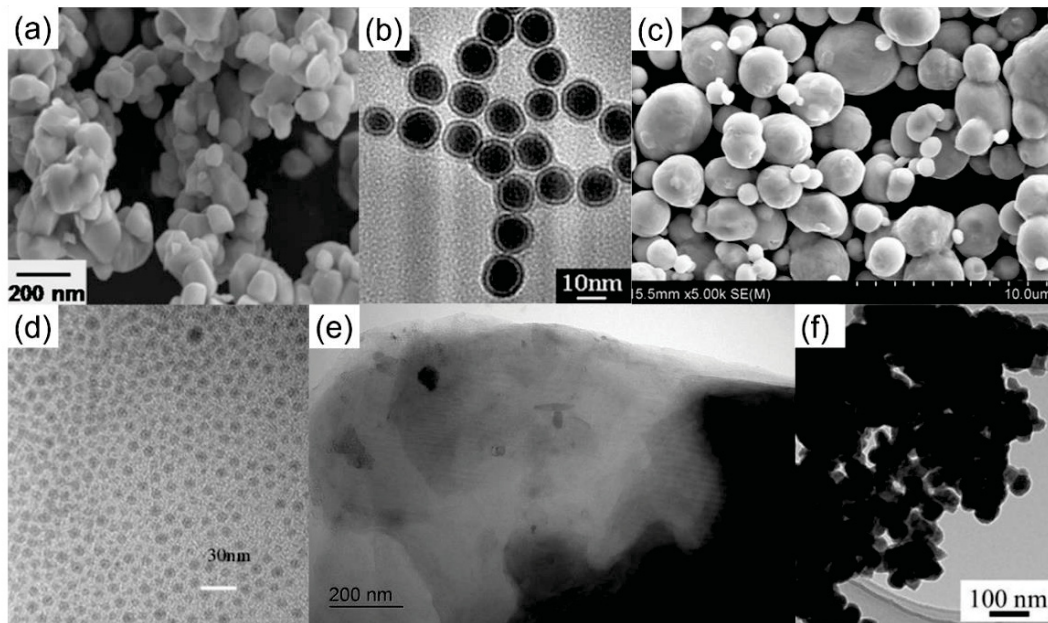


Figura 5 - Nanopartículas de Fe-N na fase (a) Fe_2N , (b) Fe_3N , (c) Fe_4N , (d) Fe_8N , (e) e (f) Fe_{16}N_2 . Imagens adaptadas das referências^{14,33-37}, respectivamente.

A fase Fe_4N foi sintetizada em tamanho micro e nano por nitretação gasosa de amônia na temperatura de 793 K por Yu M. e colaboradores em 2016³⁸. Este estudo demonstrou uma possível aplicação na produção de absorventes finos e leves a partir de partículas de Fe_4N (Figura 5 (c)) em tamanho nanométrico para absorção de microondas nas bandas S e C (2-8 GHz).

Gui-Fu Dong apresentou no *International Conference on Mechanics and Materials Engineering* (ICMME 2014) um dos primeiros indícios, se não único, da evidência de NPs compostas pela estrutura Fe_8N (Figura 5 (d)). O trabalho investigou as propriedades magnéticas, de fricção e de estabilidade de lubrificantes magnéticos (ferrofluidos) de NPs de Fe_8N preparadas via ativação por plasma³⁶.

Por fim, as partículas na fase única de Fe_{16}N_2 foram sintetizadas por Gubert G. e colaboradores¹⁴ pela técnica de ablação à laser de um alvo de ferro imerso em nitrogênio líquido (ver Figura 5 (e)). Este trabalho revelou que o crescimento em um ambiente saturado em nitrogênio, proporcionado pelo nitrogênio líquido, é útil para sintetizar partículas estáveis em uma única etapa. O trabalho mais recente encontrado na literatura (2019), propõe a síntese de NPs na fase única Fe_{16}N_2 por redução de Fe_3O_4 em gás hidrogênio, seguida da nitretação sob fluxo contínuo de gás amônia na taxa de 100 mL/min a 145 °C durante 40 h³⁹. As propriedades das nanopartículas de Fe_{16}N_2 , tanto magnéticas quanto relacionadas à geração de calor, foram comparadas

às NPs de magnetita. Neste caso, as amostras de Fe_{16}N_2 (Figura 5 (f)) apresentaram maior estimativa de geração de calor que as nanopartículas de magnetita, sugerindo um grande potencial de aplicação das NPs de Fe_{16}N_2 em tratamentos para hipertermia magnética com maior eficiência de aquecimento³⁹.

Apesar dos nitretos de ferro apresentarem propriedades atrativas em aplicações biológicas, as NPs de Fe_{16}N_2 ainda não foram testadas efetivamente *in vivo*. Além disso, os trabalhos que relatam sobre a toxicidade dos nitretos de ferro utilizam referências que não mostram evidências que comprovem a baixa toxicidade dos mesmos^{4,33,39}

2.2 PROCESSO DE NITRETAÇÃO

Os átomos de nitrogênio, que apresentam uma afinidade eletrônica de 3 eV, são muito reativos e capazes de formar ligações de alta energia, particularmente na molécula de N_2 . A reatividade do nitrogênio depende, portanto, de ela estar envolvida na reação no estado molecular ou atômico. No primeiro caso, a reação ocorre facilmente, como por exemplo na formação de complexos de nitrogênio. No segundo caso, a grande entalpia de dissociação de nitrogênio (226 kcal/mol) permite que as reações ocorram somente a altas temperaturas, o que explica a inércia química relativa tradicionalmente atribuída ao nitrogênio⁴⁰.

Quando os átomos de nitrogênio são adicionados aos sítios intersticiais do metal de transição, a densidade de elétrons no nível de Fermi muda, causando mudanças nas propriedades eletrônicas dos nitretos de metais de transição em relação ao metal. Inicialmente, ocorre uma expansão da rede metálica e, em seguida, a estrutura cristalina da rede metálica é alterada para outra à medida que aumenta a concentração de átomos de nitrogênio. O nitrogênio pode formar nitretos metálicos com todos os metais de transição em ambiente atmosférico, exceto com os últimos elementos da segunda e terceira fileiras da tabela periódica⁴¹.

Como vimos anteriormente, os métodos utilizados para a produção de nitretos são numerosos, e podem ser divididos em três grupos, dependendo se o crescimento introduz uma fase intermediária gasosa ou líquida, ou se o crescimento ocorre por meio de uma reação sólida-sólida. Contudo, a presença de impurezas, principalmente de oxigênio, é um problema comum nestes diferentes tipos de preparações. A

afinidade eletrônica de um átomo de oxigênio é sempre maior que a de nitrogênio, de modo que o menor vestígio de oxigênio provoca o deslocamento de nitrogênio e a formação de óxidos ou oxinitretos⁴⁰.

Especificamente, para a formação de nanopartículas de nitretos, cuja síntese ocorre em ambientes gasosos⁴², exige-se um sistema de evacuação rápida e uma câmara de vácuo sofisticada para evitar a produção de óxidos. Em contraste, a produção em nitrogênio líquido é uma maneira simples e eficiente de realizar produtos sem contaminações, pois as nanopartículas são geradas em um ambiente mais denso e reativo formado estritamente de nitrogênio. Entre os métodos de síntese em nitrogênio líquido, a técnica de irradiação à laser de um alvo em meio líquido atraiu grande interesse nos últimos anos pois possibilitou o acesso a uma variedade de fases metaestáveis, que geralmente não podem ser obtidas por outras vias, e coloides de nanopartículas com extrema estabilidade e pureza⁴³⁻⁴⁵. Existem muitos grupos que se concentram nesta direção de pesquisa globalmente e uma grande variedade de nanomateriais que podem ser produzidos por irradiação à laser. Isso tornou-se possível devido a simplicidade no processo de preparação e da ausência de reagentes desnecessários em irradiação à laser, como estabilizadores e subprodutos que normalmente são gerados em sínteses químicas⁴⁴. Portanto, na subseção seguinte, descrevemos detalhadamente o método de crescimento de nanoestruturas por irradiação à laser e consideramos os processos físicos e químicos básicos envolvidos.

2.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS POR IRRADIAÇÃO À LASER

Existem duas vias mais utilizadas na produção de nanoestruturas, nanoflúidos e nanopartículas. Elas são divididas em duas grandes abordagens: *top-down* e *bottom-up*. Os métodos *top-down* baseiam-se no material padrão em larga escala e, ao mesmo tempo, reduzem as dimensões deste à nanoescala usando recursos e processos de microfabricação. Enquanto os métodos *bottom-up* organizam os átomos e as moléculas em nanoestruturas, usando por exemplo propriedades químicas simples e recursos de auto-organização e auto-montagem. O método de irradiação à laser de um alvo em ambiente inerte ou reativo incorpora alguns aspectos dos métodos sintéticos físicos de *top-down* e químicos de *bottom-up*⁴⁶. Este último será mais evidenciado no decorrer da descrição para esta técnica durante essa seção.

A irradiação à laser de alvos sólidos no meio líquido pode ser realizada para fabricar nanoestruturas com várias composições (metais, ligas, óxidos, carbonetos, hidróxidos, entre outros) e morfologias (nanopartículas, nanocubos, nanohastes, nanocompósitos, entre outros). Como este método envolve um líquido e um sólido, pode-se escolher e combinar alvos e líquidos para fabricar nanoestruturas de interesse para pesquisas fundamentais e potenciais aplicações tecnológicas. Em alguns casos, a estrutura cristalina, a fase, o tamanho e a forma das nanoestruturas podem ser controlados através do ajuste dos parâmetros do laser e dos fatores ambientais, permitindo a síntese de nanoestruturas em um único passo. Ao mesmo tempo, é viável reirradiar com o mesmo laser os nanomateriais em suspensão para modificar, ainda mais, o produto desejado, por exemplo, para reduzir o tamanho das NPs. Comparado com outros métodos, tipicamente químicos, a ablação/irradiação por laser em meio líquido é uma técnica simples e "verde", que normalmente opera em água ou líquidos orgânicos em condições ambientes e sem rejeitos para descarte^{44,46}. Cabe ressaltar que, a ablação à laser é um processo específico de remoção de material de um alvo sólido que ocorre na irradiação à laser pulsado. Os processos de evaporação e/ou sublimação com a formação de um plasma e da bolha de cavitação ocorrem concomitantemente. A quantidade de energia liberada pelo laser por unidade de área (fluência) e o intervalo de tempo entre os pulsos é que determina a predominância ou não do processo de ablação do laser pulsado. Entretanto, os mecanismos básicos do processo de nitretação à laser ainda são pouco compreendidos, principalmente devido às complicadas interações laser-plasma-material^{45,47-49}.

Existem características únicas na fase líquida dos micro-plasmas que se formam durante a ablação à laser, e principalmente em metais, como o Fe, cuja evaporação começa a ocorrer quando a fluência do laser é da ordem de 1 J/cm^2 . Os plasmas da ablação à laser são densos e com pressões dificilmente alcançadas por outras técnicas de síntese, seja por descargas ou mesmo por ablação direta⁴⁹. As superfícies metálicas quando irradiadas pelo laser podem superar a temperatura de fusão (1811 K) e manter-se abaixo do ponto de ebulição (3134 K)¹⁰.

Na irradiação à laser, a produção das nanopartículas depende também da frequência de pulsos de laser em um alvo massivo imerso em uma solução líquida⁵⁰. O alvo pode ser uma única peça ou pó compactado e sinterizado. A formação das

NPs pode ocorrer através de vários mecanismos, como nucleação e crescimento ou ejeção de gotas em altas temperaturas e fragmentos sólidos do alvo.

Inicialmente, a síntese ocorre na superfície do material, conforme ilustra a Figura 6, onde o pulso do laser incidente penetra até uma certa profundidade, tipicamente poucas dezenas de nanômetros. O forte campo elétrico gerado pela luz do laser é suficiente para remover elétrons a partir do volume de penetração no alvo. Para uma fluência de laser suficientemente elevada, o material é convertido para a forma de plasma, gerando a chamada pluma de plasma. Esta contém várias fases energéticas, incluindo átomos, moléculas, elétrons, íons, aglomerados, partículas e glóbulos fundidos. Após findar a incidência do pulso do laser, a pluma de plasma absorve uma porção significativa de energia do laser por meio dos processos de fotoionização (PI) e o efeito de Bremsstrahlung (IB) inversa na fase gasosa induzida pela ablação por laser^{47,49}. O processo por PI consiste em uma absorção por fotoionização de um estado excitado, cuja seção de choque transversal σ_{PI} pode ser expressa como⁴⁹:

$$\sigma_{PI} = \kappa(E_o)\lambda^3 \quad (2-1)$$

onde $\kappa(E_o)$ é uma função da energia de ionização E_o do estado excitado. Na ablação de metais à laser no visível (Vis) e no ultravioleta (UV), a energia do fóton é comparável à energia de ionização típica de átomos excitados, levando a uma σ_{PI} da ordem de 10 a 17 cm² em muitos casos. A absorção de PI aumenta na região infravermelho (IR), enquanto que o processo de IB inclui a absorção de fótons por elétrons livres durante colisões com espécies neutras e ionizadas. De fato, o processo de ionização em sequência é construído através da absorção de IB, onde os elétrons livres que obtiveram energia suficiente liberam os elétrons ligados por colisões frequentes, criando mais íons. Esse processo leva à multiplicação de elétrons livres para estabelecer a formação do plasma. A seção transversal de IB, σ_{IB} , para contribuições dos elétron-íon e elétron-átomo depende do comprimento de onda do laser e pode ser expressa como^{47,49}:

$$\sigma_{IB} = \kappa_1 n_{ion} \lambda^3 \left[\exp\left(\frac{14387752}{\lambda(nm)T_e(K)}\right) - 1 \right] + \kappa_2 n_{atm} \lambda^2 \quad (2-2)$$

onde κ_1 e κ_2 são funções da concentração (densidade numérica) de elétrons e da temperatura dos elétrons T_e , enquanto n_{ion} e n_{atm} são as densidades numéricas dos íons e átomos neutros, respectivamente.

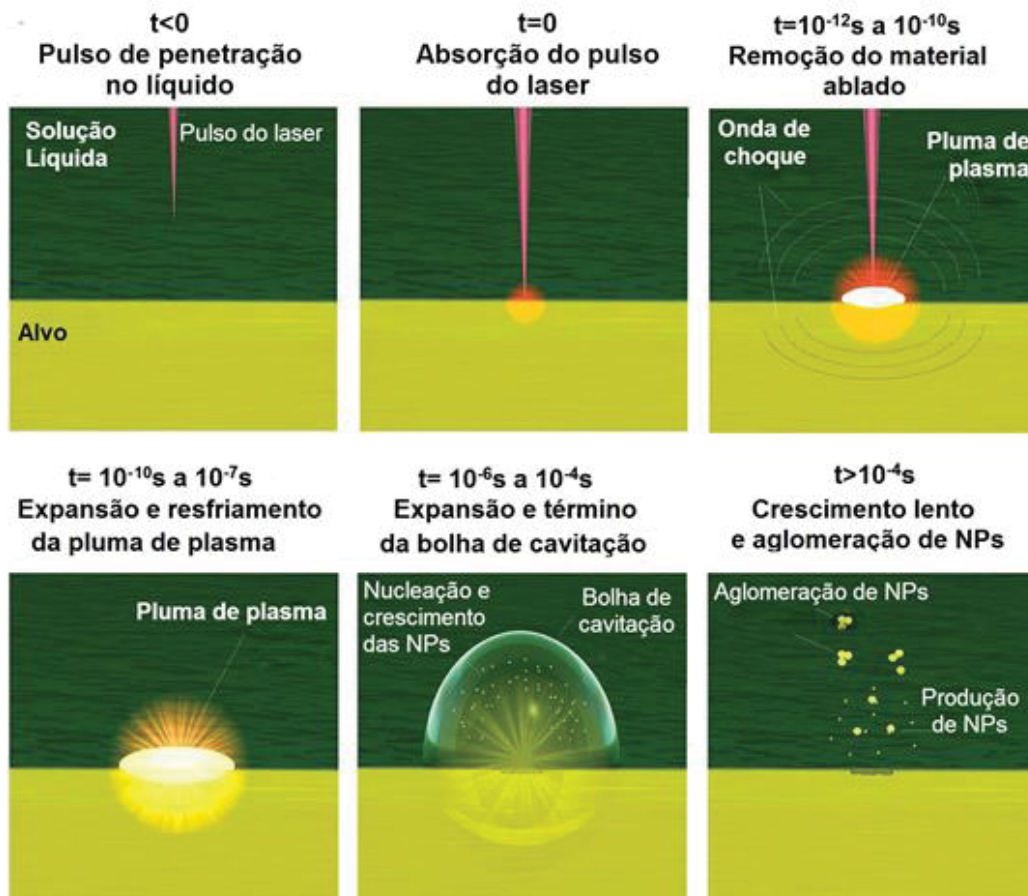


Figura 6 - Esquema ilustrativo das principais etapas do processo de irradiação à laser (para mais detalhes, veja o texto). Imagem adaptada da referência⁴⁶.

Considera-se este plasma inicial como o plasma induzido pelo feixe do laser, porque é diretamente formado pela incidência da radiação no alvo sólido pelo pulso do laser. Em seguida, ao contrário dos ambientes em vácuo e gás, a expansão do plasma induzida pelo laser é fortemente confinada pelo líquido. Depois que o alvo sólido absorve a parte posterior do pulso do laser para produzir uma oferta contínua de vapor, o plasma se expande para criar uma onda de choque, o que resulta em um estado termodinâmico único para o plasma, com aumento de pressão, temperatura e densidade em relação ao plasma originalmente formado⁴⁴. Este estado termodinâmico é obviamente favorável para a formação das fases metaestáveis, como a fase α'' -

Fe_{16}N_2 , que se encontram na região de alta temperatura e de alta pressão no diagrama de fase do equilíbrio termodinâmico⁵¹.

Durante a transformação do plasma ocorrem quatro tipos representativos de reações químicas, induzidas pelo laser, dentro do plasma e na interface entre o plasma e o líquido. Essas reações diferem das que ocorrem nos ambientes em vácuo e de gás, já que o confinamento do plasma no líquido conduz o plasma a um estado termodinâmico completamente diferente^{44,51}. A Figura 7 resume essas reações^{44,46}, incluindo sua localização, elementos envolvidos e produtos gerados.

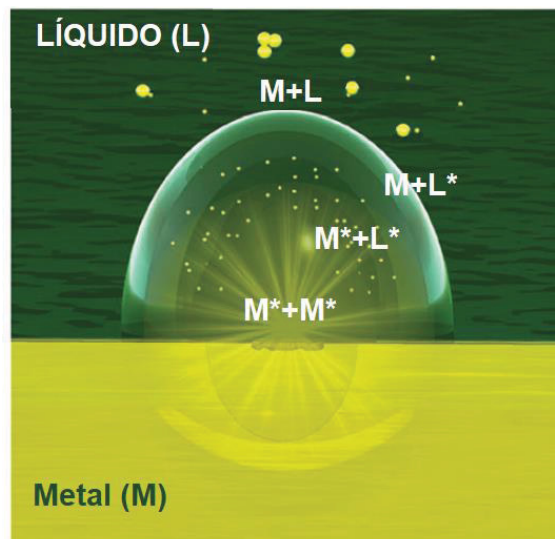


Figura 7 – Os quatro tipos de reações químicas que ocorrem dentro do plasma e do líquido, e entre a interface plasma/ líquido: reação do material do alvo dentro do plasma (M^*), reação entre o material do alvo e as moléculas do líquido dentro do plasma ($M^* + L^*$), ($M+L^*$) reação entre o material do alvo e o líquido na interface entre o plasma e o líquido ($M+L^*$), reação no meio líquido entre o material do alvo e do líquido ($M + L$). Note que o * indica os estados excitados e / ou ionizados. Imagem adaptada da referência⁴⁶.

Quando o plasma já esgotou a quantidade de energia recebida através do pulso do laser, ocorre um resfriamento do plasma. Neste caso, ele libera energia para a solução líquida e para o alvo a uma velocidade supersônica, criando uma onda de choque sob o líquido circundante, enquanto mantém a pressão aplicada por um período superior à duração do pulso do laser.

O plasma é resfriado em camadas, começando pelas externas, e a quantidade total de espécies diminui porque os átomos se agregam para gerar as nanopartículas e, portanto, são subtraídos do plasma. Assim, as nanopartículas são produzidas

principalmente durante a extinção do plasma. Este efeito foi confirmado através de espectros de emissão, os quais revelaram sinais de pequenas moléculas provenientes da reação química que ocorre entre as espécies ablatadas e as moléculas do líquido na pluma plasmática. Além disso, a transferência de energia do plasma para o líquido circundante, faz com que a fina camada de vapor aumente. A camada de vapor é considerada a fase inicial da bolha de cavitação e quando o plasma deixa de existir, esta última se forma no líquido, contendo no seu interior as partículas ejetadas do alvo. Ainda de acordo com a literatura, nos líquidos a bolha de cavitação primeiramente se expande e depois comprime com o tempo, colapsando em um ponto próximo à superfície do alvo. As nanoestruturas formadas ficam sujeitas a um campo de alta pressão e alta temperatura até a implosão da bolha de cavitação^{44,46,47,49}. O tamanho da bolha está intimamente relacionado com a largura temporal do pulso, o que indica que quanto maior for o pulso do laser, maior será o processo de expansão da bolha. Além disso, a duração da bolha é de duas ordens a mais de magnitude que o plasma, isto sugere que existe tempo suficiente para que as reações químicas continuem e ocorra a síntese de nanopartículas neste processo⁴⁴.

A fonte de laser é reconhecida como a componente mais importante na síntese de nanopartículas por irradiação à laser. Há uma década atrás, a pesquisa e a fabricação de NPs concentrava-se principalmente em lasers de nanosegundo (ns). Por isso, a compreensão fundamental dos outros tipos de lasers com diferentes larguras de pulso é limitada em comparação com a de lasers de ns. Até a presente data, foram utilizados lasers para executar a ablação de milissegundos (ms), microssegundos (μ s), ns, picossegundos (ps) e femtossegundo (fs). Cada tipo de laser tem suas vantagens únicas, o que amplifica consideravelmente a gama de opções disponíveis para sintetizar diferentes tipos de nanomateriais^{44,46}.

O líquido é o segundo componente mais importante e, inicialmente, a água e os solventes orgânicos comuns, incluindo álcool, acetona e dodecil sulfato de sódio, foram amplamente utilizados em irradiação à laser. Recentemente, pequenas biomoléculas, como soluções aquosas de oligonucleotídeos, polímeros, nitrogênio líquido, dióxido de carbono supercrítico e hélio líquido a temperaturas muito baixas, foram utilizadas como líquidos únicos para sintetizar nanocristais e fabricar nanoestruturas. Estes solventes recentemente investigados ampliam

substancialmente a aplicabilidade como, por exemplo, na catálise e na biomedicina^{44,46}.

Após a irradiação do laser, observa-se um som de estalos e emissões ópticas a partir do ponto irradiado pelo laser no alvo. A ruptura da rigidez dielétrica do ar e do meio líquido e a formação de ondas de choque e do plasma são alguns eventos frequentemente observados, desafiando a modelagem que é ainda incipiente. Durante a irradiação do laser, o sistema (alvo/líquido) deve ser agitado para remover do caminho do laser as NPs já produzidas, pois as que permanecem no caminho do feixe de laser podem absorver a radiação, o que reduz a eficiência da ablação de novas NPs⁴³.

Com relação ao controle do tamanho da partícula, este pode ser de extrema importância na fabricação de NPs devido algumas propriedades, como ópticas, magnéticas e catalíticas, das NPs dependerem fortemente do tamanho das partículas. Inicialmente, alguns parâmetros do feixe do laser podem ser ajustados para este fim, tais como: o comprimento de onda, intensidade e fluência do laser. Em estudos prévios de NPs de prata, verificou-se que em baixa fluência do laser ($< 1 \text{ J/cm}^2$) o tamanho das partículas aumentou com a diminuição do comprimento de onda do laser, e a eficiência de formação de NPs também teve o mesmo comportamento com relação ao comprimento de onda. Em contrapartida, com uma fluência elevada ($> 1 \text{ J/cm}^2$), a eficiência de formação e o tamanho das partículas aumentaram com um comprimento de onda do laser maior⁴³.

Um fator que pode afetar o processo de ablação em altas fluências do laser está relacionado a maior absorção da luz do laser incidente pelas partículas produzidas nesse processo. Isto ocorre, pois, o aumento da fluência pode levar a uma saturação da quantidade de NPs produzidas, o que resulta em uma maior absorção da radiação pelas partículas e uma diminuição da intensidade da luz laser efetiva que atinge o alvo. Ao usar um laser no comprimento de onda de 1064 nm, por exemplo, com menor energia de fótons, o plasma induzido pelo laser é mantido principalmente pela absorção de IB, e o aumento da fluência pode permitir o acesso a fases mais complexas e cristalinas do diagrama de fase de nitretos metálicos. Trabalhos recentes sobre a síntese de nanoestruturas por irradiação à laser em líquidos corroboram esta afirmação⁵². O comprimento de onda fundamental do laser Nd: YAG geralmente é

usado para ablação a laser em solução aquosa, cuja água pura é capaz de absorver 20% da energia do pulso em 1 cm de comprimento do caminho do laser. Isto significa que além de considerarmos a absorção da radiação do laser pela suspensão coloidal, se o alvo irradiado ficar sob uma lâmina de líquido muito espessa, a energia do pulso atingindo a superfície do alvo pode ser extremamente baixa e ocasionar em uma menor concentração de material produzido. Ao mesmo tempo que uma maior fluência pode aumentar a eficiência da produção, ela pode promover a fragmentação e reduzir o tamanho das NPs produzidas por uma radiação do laser em um baixo comprimento de onda de 355 nm, por exemplo⁴³.

Outro parâmetro que interfere na geração do produto final por irradiação à laser é a frequência de pulsos (taxa de repetição). A Figura 8 apresenta esquematicamente as diversas nanoestruturas preparadas no sistema Pb/S em função da reatividade do líquido e da frequência do pulso do laser. Niu K. Y. e colaboradores^{53,54} mostram que para um laser de ms a reatividade do meio líquido é decisiva para a estrutura final dos produtos. À medida que a reatividade do meio líquido aumenta, as reações da superfície avançam mais rápido e mais profundamente. Quando o líquido mais reativo foi usado, as nanogotículas de Pb foram completamente sulfetizadas em nanocubos de PbS perfeitos de fase única a altas temperaturas (Figura 8 (c)). Por outro lado, a frequência do laser também mostra um efeito significativo no tamanho e morfologia dos produtos. Segundo os autores, quando a frequência de pulso do laser é baixa, os produtos formados podem se afastar da área irradiada antes da chegada do próximo pulso, assim a nanoestrutura inicial produzida pode ser preservada. Por outro lado, as nanoestruturas produzidas são mais propensas a sofrer irradiação secundária no próximo pulso quando são aplicadas frequências de pulso mais altas de laser. Portanto, algumas delas (as nanopartículas de Pb puro e nanocubos de PbS puro) foram fragmentadas em nanopartículas menores com a mesma estrutura cristalina que as primárias, enquanto outras foram fragmentadas e transformadas em novas nanoestruturas finas⁵³.

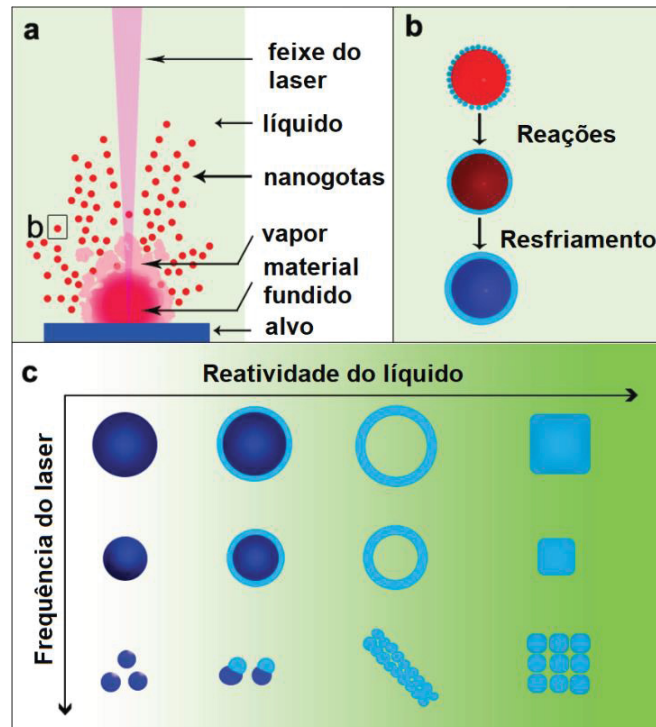


Figura 8 - Diagramas esquemáticos da ejeção de nanogotas de metal e formação de nanoestruturas: (a) formação de nanogotas no processo de ablação de um laser em milissegundos, (b) reações de nanogotas de metal ejetadas no líquido, (c) efeito da reatividade líquida e da frequência do laser na morfologia das nanoestruturas formadas no sistema Pb/S. Imagem adaptada da referência⁵³.

Dessa forma, apesar da técnica de irradiação à laser exigir o conhecimento sobre o controle dos parâmetros do laser em relação às condições e materiais envolvidos na síntese, ela permite a produção de NPs em um processo limpo, versátil e único de crescimento. Assim, é possível desenvolver materiais com estruturas cristalinas, morfologias e tamanhos específicos, conforme o interesse. Mesmo no caso em que a irradiação laser gera simultaneamente objetos com diferentes tamanhos e geometrias típicas de coloides (esferulitos, bastonetes, plaquetas, fibrilas, etc.), ainda é possível separar esses elementos filtrando ou purgando as suspensões, coletando as precipitações, realizando centrifugações ou por reirradiação do laser nas NPs previamente produzidas²⁸.

2.4 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS NESTE TRABALHO

As amostras estudadas neste trabalho são nanopartículas de nitretos de ferro produzidas por um laser Nd: YAG (Quantel, modelo Brilliant B). Foram sintetizados dois conjuntos de amostras, o primeiro mantendo a fluência do laser constante em 1.0

J/cm^2 e variando o comprimento de onda do laser (1064 nm, 532 nm, 355 nm e 266 nm). O segundo conjunto de amostras foi produzido mantendo constante o comprimento de onda fundamental do laser no infravermelho e variando a fluência do laser ($0.7 \text{ J}/\text{cm}^2$, $1.0 \text{ J}/\text{cm}^2$, $1.3 \text{ J}/\text{cm}^2$ e $1.6 \text{ J}/\text{cm}^2$). A síntese dessas NPs deu-se através da ablação a laser em meio líquido (acrônimo LASiS) de um alvo de Fe com pureza de 99.9% submerso em nitrogênio (N), com o intuito de produzir NPs de Fe-N. Esse alvo de ferro em formato de disco de raio de 1 cm e espessura de 5 mm foi cuidadosamente limpo em solução de ácido nítrico e água, enxaguado cuidadosamente em água bidestilada e colocado em banho de ultrassom por duas sessões sucessivas de 10 min em álcool isopropílico. Após 10 min em isopropílico no ultrassom, descartava-se o resíduo e colocava-se novamente o alvo em álcool no ultrassom por mais 10 min. Durante a síntese, o alvo metálico mantido imerso em nitrogênio líquido (Figura 9) recebeu pulsos de radiação do laser com duração de 5 ns com taxas de repetição de 10 Hz.

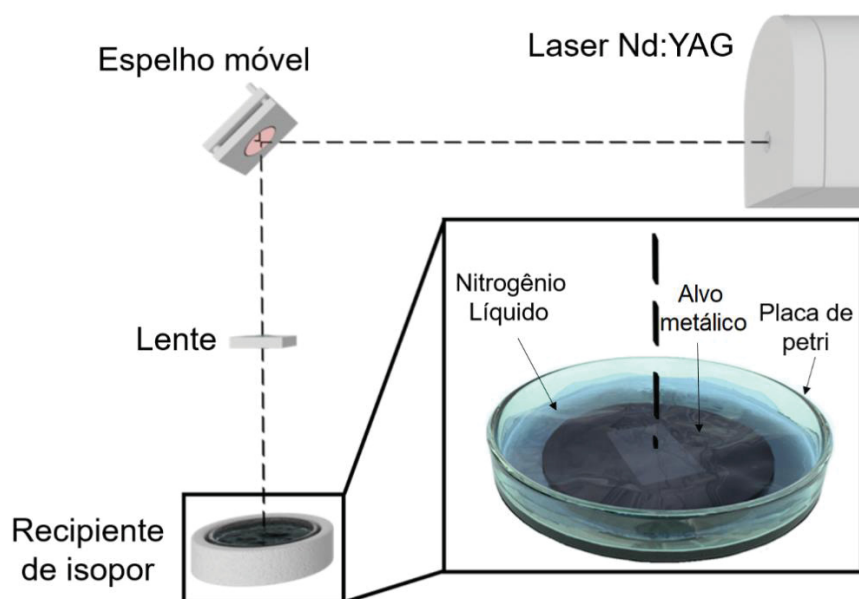


Figura 9 - Ilustração esquemática da configuração experimental usada para produzir NPs usando o método de ablação por laser em solução líquida.

O feixe do laser foi focalizado por uma lente de 1 m de distância focal sobre a superfície do alvo em um ponto focal de área de 1 mm^2 . Nesse estudo adotamos sessões de irradiações com duração de 2h e 30 min para todas as amostras, com exceção daquelas sintetizadas no comprimento de onda (λ) de 1064 nm em fluências

de 1.0 J/ cm² e 1.3 J/ cm², as quais foram produzidas por 5 h de irradiação do laser. Ao longo deste período, a superfície do material massivo manteve-se imersa por uma lâmina de 3-7 mm de nitrogênio líquido. Destes procedimentos de produção de amostras resultaram 8 amostras, tal como mostra a Tabela 1. Vale ressaltar que este conjunto de amostras apresenta uma intersecção, as amostras S1 e IR2 são equivalentes. Esta amostra recebeu dois nomes distintos, conforme a série estudada, permitindo a comparação direta entre análises das amostras submetidas a parâmetros de síntese distintos. Ao longo deste trabalho, essa nomenclatura individual das amostras será utilizada e também utilizaremos a convenção de série de amostras IR e S para referirmo-nos a caracterizações e propriedades do conjunto de amostras IR1 a IR4 e S1 a S4.

Tabela 1 - Resumo das condições de preparação das amostras sintetizadas estudadas neste trabalho.

Amostra	λ (nm)	Fluência (J/cm²)
S1	1064	1,0
S2	532	1,0
S3	355	1,0
S4	266	1,0
IR1	1064	0,7
IR2	1064	1,0
IR3	1064	1,3
IR4	1064	1,6

Um sistema automatizado de movimento do espelho do laser foi adaptado usando um *software* para controlar remotamente dois motores de passo. O movimento de varredura linear em vai-e-vem do espelho do laser permite que o feixe do laser gere a ablação em movimento sobre pontos diferentes da superfície do alvo, melhorando a eficiência da produção ao evitar a formação de crateras na superfície do alvo ou mesmo a sua perfuração. Esse procedimento demarcou uma região mais clara na superfície do alvo de Fe utilizado, que permaneceu visível no alvo durante e após a irradiação por laser. Dessa forma, sempre antes de um novo crescimento essa camada era removida pelo método de limpeza do alvo já descrito. Esse procedimento visa eliminar a nitretação superficial do alvo verificada por difração de raios X.

Ademais, a área e a profundidade da região ablada permitiu estimar a eficiência de ablação sob as condições usadas na preparação das amostras. Em nosso caso, o valor médio representativo da eficiência energética média de ablação é de 20 ng/Joule usando o laser de IR em fluência de 1 J/cm².

A ilustração da configuração experimental utilizada para produzir NPs é mostrada na Figura 9. Nele um recipiente de isopor foi utilizado para melhorar o isolamento térmico do nitrogênio líquido e facilitar o manuseio.

Após o processo de irradiação à laser e, posteriormente, evaporação de nitrogênio líquido em atmosfera seca, o alvo de Fe e o recipiente de vidro (placa de Petri) foram imediatamente enxaguados com álcool isopropílico para coletar e armazenar as nanopartículas em suspensão. A partir disso, as partículas sólidas em suspensão foram utilizadas em diferentes processos de caracterização, descritos nas seções seguintes.

3 FUNDAMENTOS DAS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Nesta seção são apresentadas as técnicas de caracterização que foram utilizadas para as análises morfológica e estrutural das amostras. Cada seção desse capítulo contém uma descrição breve da técnica, seguindo de uma revisão bibliográfica sobre análises prévias do material em estudo utilizando cada técnica e, por fim, informações sobre o preparo das amostras adotado neste trabalho para as caracterizações.

3.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A caracterização morfológica das NPs sempre recebeu grande interesse, pois a morfologia normalmente influencia a maioria das propriedades desses materiais. A análise de amostras por MET é uma importante ferramenta para a caracterização de materiais nanoestruturados, pois além de descrever qualitativamente as características morfológicas de nanomateriais, permite medir o tamanho das partículas e, assim, viabiliza obter um histograma de tamanho de partículas. As imagens em MET são formadas a partir da interação entre o feixe de elétrons, emergente de um canhão de elétrons com uma amostra. Para que os elétrons sejam transmitidos pelo material, a amostra deve ser suficientemente fina, tipicamente na ordem de 50 nm ou menos⁵⁵.

No microscópio eletrônico de transmissão uma diferença de potencial acelera e fornece uma energia aos elétrons propiciando a transmissão através do material. O feixe de elétrons é condensado por lentes eletrostáticas em um feixe quase paralelo antes de colidir com a amostra. O uso de lentes magnéticas em MET permite alterar a distância focal através da variação de corrente gerada por bobinas⁵⁵. Nessa configuração, o microscópio fornece informações da fase cristalográfica dos materiais, como veremos na próxima seção.

3.1.1 As técnicas de MET em campo claro, campo escuro e SAED

Em MET, a amostra é iluminada por um amplo feixe paralelo de elétrons que parte do canhão de elétrons e a imagem é projetada em uma tela. A ampliação não tem nada a ver com o tamanho da área iluminada, é determinada pelas lentes de

imagem. A Figura 10 representa um diagrama de um equipamento de MET convencional. O feixe de elétrons é coletado e focado pela lente objetiva após passar através da amostra suportada por uma grade de cobre com revestimento de carbono, específica para análises de MET. As lentes intermediárias têm a função de ampliar a primeira imagem intermediária, que é formada pela lente objetiva. Por fim, uma imagem real ampliada da amostra é projetada através das lentes de projeção para o dispositivo de visualização, que em nosso caso é uma câmera CCD (*charge-coupled device*). A imagem final é formada devido ao efeito de contraste de densidade eletrônica ocasionado por diferentes regiões da amostra e também pela difração dos elétrons⁵⁵. Neste caso, todos os raios transmitidos e difratados que saem da amostra são combinados para formar a imagem na tela de visualização (da mesma forma que em um microscópio óptico elementar é gerada uma imagem na retina do microscopista).

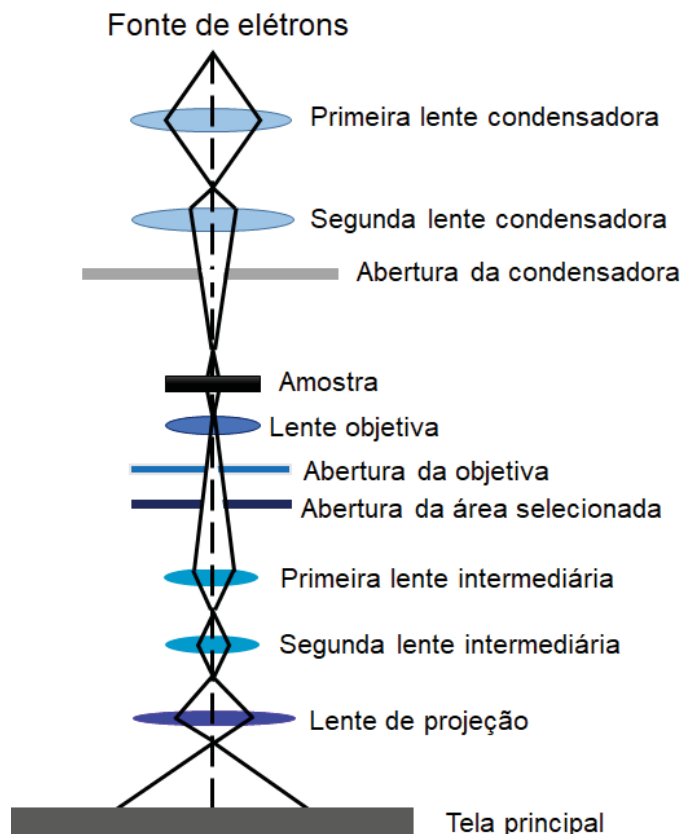


Figura 10 - Diagrama esquemático do caminho percorrido pelo feixe de elétrons no interior da coluna de um MET básico.

A abertura objetiva de um microscópio eletrônico de transmissão possui um pequeno orifício em uma placa, que é usado para selecionar cada modo ao formar uma imagem. Ao posicioná-la em um local específico no plano focal, uma imagem é feita apenas com os elétrons que foram difratados em um ângulo específico. Isso define dois modos de imageamento usando MET para caracterizar as nanopartículas⁵⁶:

- Quando a abertura é posicionada para passar somente os elétrons transmitidos (não difratados), uma imagem de campo claro é formada (ilustrado na Figura 11(a)).
- Quando a abertura é posicionada para passar apenas alguns elétrons difratados, uma imagem de campo escuro é formada (ilustrado na Figura 11 (b))⁵⁶.

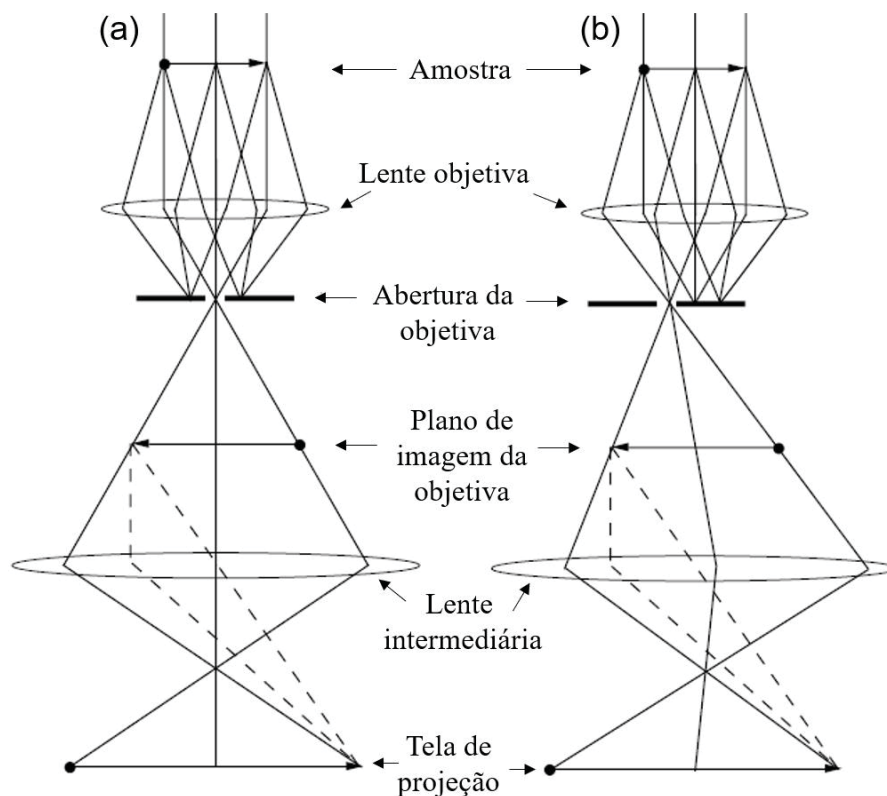


Figura 11 - (a) Modo campo claro e (b) modo campo escuro do MET. Imagem adaptada da referência⁵⁶.

O campo claro é considerado o modo tradicional ou convencional de construção de imagem de MET, cujos elétrons são transmitidos através da amostra

sem deflexão para formar a imagem, conforme já descrevemos. As regiões escuras da imagem em campo claro correspondem às regiões de maior espalhamento de elétrons. Assim as nanopartículas com alta densidade e cristalinidade aparecerão escuras nesta modalidade. Enquanto as imagens em campo escuro são formadas quando a abertura está posicionada para passar apenas alguns elétrons difratados, evidenciando a orientação cristalográfica e a cristalinidade das NPs em um contraste brilhante^{56,57}.

O contraste de difração é observado graças a abertura na objetiva para a passagem do feixe. Ao fazer isso, os recursos da imagem se tornam muito mais visíveis, pois sem a abertura objetiva, a imagem fica menos nítida e sem característica⁵⁶.

Na prática, os padrões de difração são obtidos por difração de elétrons a partir de uma região selecionada (SAED). Esta técnica tem uma vantagem importante sobre a caracterização por difração de raios-X (XRD), já que os elétrons podem ser focados facilmente na amostra. Ao focalizar o feixe de elétrons, os padrões de difração podem ser medidos a partir de regiões microscópicas, e muitas vezes é possível selecionar um único microcristal para uma medida de difração⁵⁶. Quando nanomateriais cristalinos são analisados por SAED, o feixe de elétrons cujo comprimento de onda é da ordem de 0,0037 Å, produz um padrão de manchas ou pontos claros ou ainda anéis na tela do microscópio que fornece informações sobre a rede cristalina do material (forma, orientação e espaçamento dos planos da rede)⁵⁸.

Em SAED a amostra é analisada primeiramente no modo de imagem convencional já descrito até que se verifique a presença de material ou região de interesse. Insere-se então uma “abertura intermediária” posicionada no plano da imagem da lente objetiva, a qual atua como um meio de confinamento da área difratada⁵⁶.

Como em XRD, a difração de elétrons também se fundamenta na lei de Bragg,

$$2 d \sin \theta = \lambda \quad (3-1)$$

onde $\theta \sim 1^\circ$ em difrações usuais (100 keV, $\lambda = 0,0037 \text{ \AA}$), d é a distância entre os planos/átomos do cristal e λ é o comprimento de onda dos elétrons. Para pequenos

ângulos podemos fazer as seguintes aproximações $\sin \theta \sim \tan \theta \sim \frac{1}{2} \tan 2\theta$ e relacioná-las com a geometria característica da óptica do microscópio (Figura 12), expressa pela Equação (3-2)⁵⁶.

$$\tan 2\theta = \frac{r}{L} \quad (3-2)$$

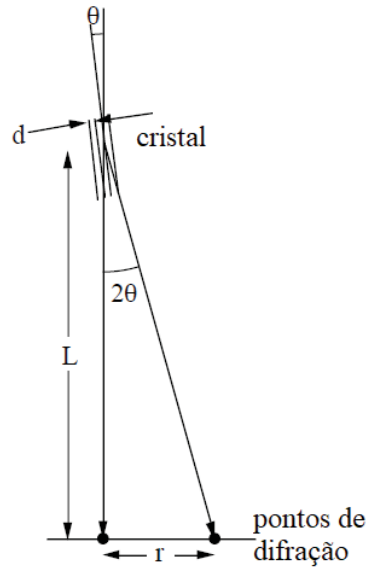


Figura 12 - Geometria da difração de elétrons por planos cristalinos de uma amostra e definição do comprimento da câmera, L . O comprimento de onda do elétron é λ , e a constante da câmera é λL . Imagem adaptada da referência⁵⁶.

Substituindo $\sin \theta \sim 1/2 \tan 2\theta$ na Eq. (3-1) e, por fim na Eq. (3-2) teremos a seguinte expressão⁵⁶,

$$rd = \lambda L, \quad (3-3)$$

permitindo-nos determinar o espaçamento interplanar d . Com isso podemos identificar a fase cristalográfica do material sob análise, por meio da comparação entre o espaçamento interplanar experimentalmente encontrado e um banco de dados disponível na literatura ou disponibilizado pela Universidade.

3.1.2 Revisão da literatura

A Figura 5 (b) e a Figura 5 (d)-(f) apresentam em seu conjunto de imagens algumas morfologias de nanopartículas de nitretos de ferro observadas através do sistema de imagem por MET na configuração de campo claro. A Figura 5 (a) e a Figura 5 (c) mostram imagens obtidas por técnicas alternativas de caracterização morfológica de NPs, FESEM (*Field emission scanning electron microscopy*) e SEM (*Scanning electron microscope*), respectivamente. Estas não são as únicas morfologias já relatadas na literatura para as nanopartículas de Fe-N.

Balogun M. e colaboradores⁵⁹ produziram NPs alongadas de ζ -Fe₂N com centenas de nanômetros de comprimento (Figura 13 (a)), Jiao W. e colaboradores produziram NPs na estrutura *yolk-shell* de Fe/Fe₄N³² com formato indicado por eles de quase-cúbico, Kurian S. e colaboradores produziram NPs esféricas Fe₄N dentro de *strips* de GaN formando nanoestruturas *core-shell* de aproximadamente 30 nm⁶⁰ e Imants Dirba apresentou em sua tese de doutorado NPs de Fe₁₆N₂ no formato de esponja com tamanho entre 5 nm e 47 nm⁶¹.

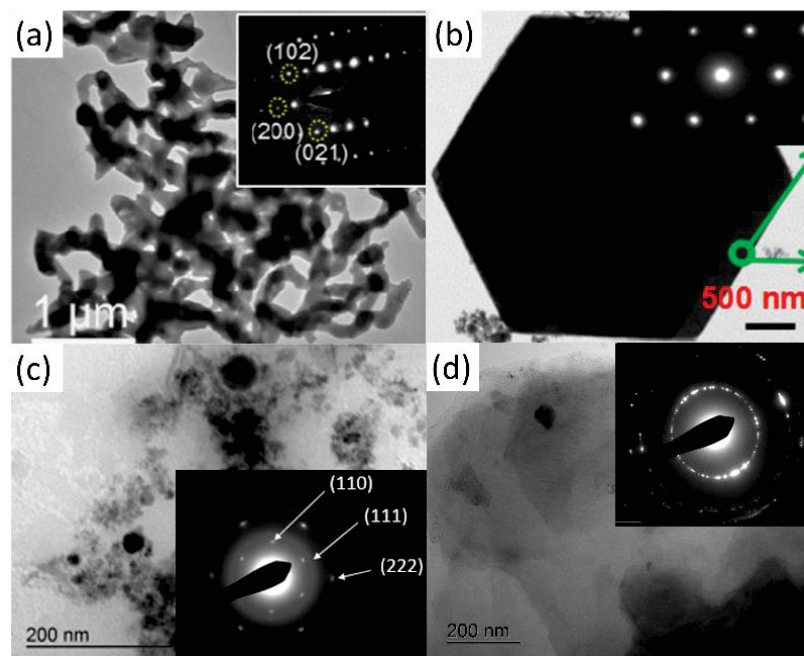


Figura 13 - Imagens de MET em campo claro para NPs de (a) ζ -Fe₂N⁵⁹ (b) ϵ -Fe₃N⁶² (c) γ -Fe₄N¹⁴ (d) α'' -Fe₁₆N₂¹⁴. Nas inserções das figuras estão apresentadas as imagens de SAED das correspondentes imagens de MET. Imagens adaptadas das referências^{14,59,62}.

O trabalho de Minagawa M. e colaboradores indica a formação de NPs de ϵ'' - Fe_xN ($2 \leq x \leq 3$) com tamanhos próximos a 150 nm e formato irregular⁶³, enquanto Sun X. e colaboradores apresentam NPs de ϵ'' - Fe_3N no formato de grandes placas hexagonais (*large hexagonal sheets*), cujo lado do hexágono excede 1000 nm e exibe uma espessura de cerca de 50 nm (Figura 13 (b))⁶². Namiki Y. e colaboradores mostram o formato *core-shell* de NPs de Fe_{16}N_2 /óxido metálico, cuja imagem MET revelou que esse nanocompósito tem um diâmetro médio de 26 nm e espessura da casca de aproximadamente 3,5 nm⁶⁴. Por fim, nosso grupo de pesquisa indicou tanto a formação de NPs na fase γ' - Fe_4N no formato esférico e tamanhos variando entre 3 nm até 50 nm, conforme a Figura 13 (c), quanto a formação de NPs lamelares na fase α'' - Fe_{16}N_2 com centenas de nanômetros de comprimento, como mostrado na Figura 13 (d)¹⁴.

Por meio do padrão de difração obtido por SAED, como por exemplo os indicados nas inserções da Figura 13, é possível medir os raios dos anéis cristalinos, halos difusos típicos de regiões amorfas, ou a distância entre os pares de pontos de difração associados a planos cristalinos. Usando a equação (3-3), pode-se obter as distâncias interplanares características do material em análise. Os parâmetros estruturais de cada fase de nitreto de ferro já descritos pela literatura, conforme mostra a Tabela 2, tornam-se indispensáveis para a comparação e identificação da estrutura em estudo de Fe-N.

A Tabela 2 reúne os parâmetros de rede das diversas fases de nitretos de ferro. Esses valores correspondem aos parâmetros de rede relatados por diversos grupos de pesquisa e encontrado em bases de dados. Cabe ainda destacar que regiões intergranulares no interior de NPs podem acumular uma fração significativa de átomos em estado de desordem que podem gerar padrões de difração SAED similares aos observados em materiais amorfos em conjunto com padrões regulares de pontos e anéis de difração.

Tabela 2 – Parâmetros estruturais das fases de Fe-N (segundo JCPDS fichas PDF 50-0958, PDF 49-1663 e referências^{4,13,17,33}).

Fase	Estrutura	Parâmetros de rede		
		a (Å)	b (Å)	c (Å)
FeN	(F-43m)	4,3070		
ζ-Fe₂N <i>bulk</i> ³³	(Pbcn)	4,4364	5,5400	4,8420
ϵ-Fe₃N <i>bulk</i>	hcp (P6322)	4,6982		4,3789
ϵ-Fe₃N NPs ⁴	hcp (P6322)	4,6910		4,3670
γ'-Fe₄N <i>bulk</i>	fcc (CaTiO ₃)		3,7980	
γ'-Fe₄N NPs ⁴	fcc (CaTiO ₃)		3,7870	
α'-Fe₈N <i>bulk</i> ⁶¹	bct (I4/mmm)	2,8636		3,1500
α''-Fe₁₆N₂ <i>bulk</i>	(I4/mmm)	5,7200		6,2900
α''-Fe₁₆N₂ pó ¹³	(I4/mmm)	5,71419		6,28847

3.1.3 Preparação das amostras neste trabalho

Neste trabalho, a caracterização de nanopartículas por MET foi realizada utilizando um microscópio eletrônico JEOL 1200EXII operando a uma diferença de potencial de 120 kV. Para este fim, após 10 min em banho de ultrassom, as NPs em suspensão foram coletadas com o auxílio de uma seringa e 5 gotas foram deixadas secar sobre uma grade comercial de cobre revestida com carbono. As NPs tendem a agrupar-se e fixar-se na tela de carbono à medida que as gotas de álcool isopropílico evaporam.

A preparação de amostras para as análises de MET utilizou suspensões com concentrações de NPs comparáveis dentro de cada série de amostras (fluência ou comprimentos de onda de laser diferentes). As micrografias e padrões de SAED das NPs mostradas nesse trabalho são representativas de regiões diferentes (no mínimo cinco) de cada amostra.

3.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman é uma técnica espectroscópica baseada na dispersão inelástica da luz monocromática, geralmente produzida a partir de uma fonte de laser com frequência dentro da faixa visível, infravermelha, verde ou ultravioleta. Isto significa que a frequência de uma parcela pequena de fótons da luz monocromática muda com a interação de uma amostra. Quando os fótons da luz do laser interagem com as vibrações moleculares, fônons ou outras excitações no sistema da amostra, ocorre uma mudança na energia dos fótons, resultando em uma frequência diferente, a qual fornece informações sobre os modos vibracionais no sistema. Uma ligação química específica apresenta modos vibracionais, rotacionais e outras transições da baixa frequência em moléculas ativas particulares, que permitem a identificação química e estrutural dos materiais em estudo. A espectroscopia Raman é um método não destrutivo de caracterização e pode ser usado para estudar amostras sólidas, líquidas e gasosas, inclusive de tamanhos nanométricos⁶⁵.

3.2.1 A técnica de RAMAN

Na interpretação clássica, a luz é vista como uma onda eletromagnética, que contém um campo elétrico oscilante, que interage com uma molécula através de sua polarizabilidade elétrica. A polarização é determinada pela capacidade da nuvem de elétrons de interagir com um campo elétrico. A maioria dos fótons é dispersa elasticamente por um processo conhecido como dispersão de Rayleigh, que irradia luz na frequência ν , conforme mostrado na Figura 14 (a). O efeito Raman ocorre quando a luz do laser ou fóton incidente interage com uma molécula e com o campo eletromagnético da molécula^{66,67}, levando-a à vibração e a um estado de energia

virtual[‡]. Quando as moléculas são excitadas de um estado de maior energia comparado ao estado inicial, o fóton espalhado terá sua energia deslocada para um estado de menor energia (frequência mais baixa), $\nu - \nu_i$, este fenômeno é conhecido como espalhamento Raman Stokes, como mostra a Figura 14 (b). Por outro lado, se o estado final apresentar menor energia que o estado inicial, o fóton espalhado será deslocado para uma frequência mais alta, $\nu + \nu_i$, este fenômeno é conhecido como espalhamento Raman anti-Stokes. As mudanças de frequência ocorrem para que a energia total do sistema permaneça constante após a molécula se mover para um novo estado rotacional-vibracional-eletrônico. A Figura 14 (b) ilustra os mecanismos de espalhamento de Raman que ocorre na transição entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado⁶⁸.

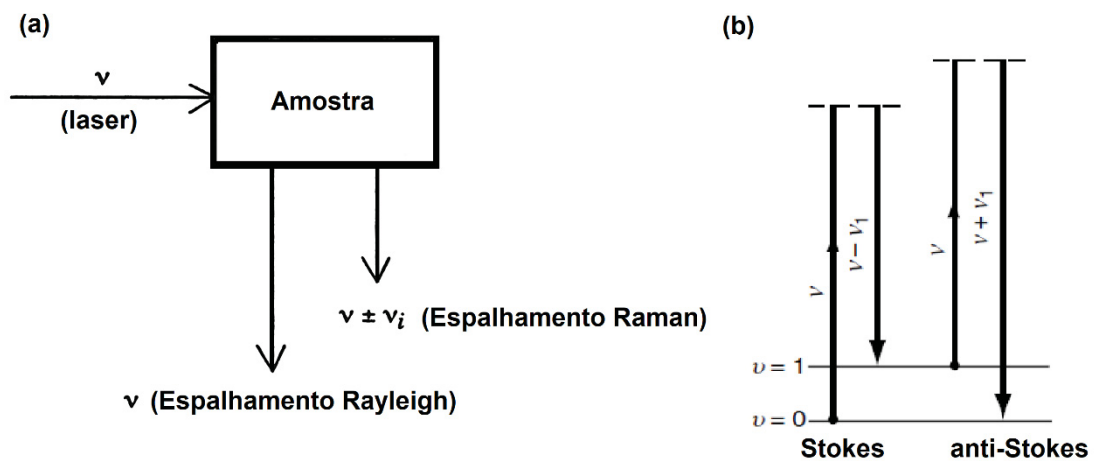


Figura 14 – Mecanismos (a) do espalhamento Raman em comparação com o espalhamento Rayleigh e (b) do processo de espalhamento Raman Stokes e anti-Stokes. Imagem adaptada da referência⁶⁸.

Em materiais nanoestruturados, a espectroscopia Raman é usada para sondar a composição das estruturas, a orientação cristalográfica da amostra e a mudança na frequência vibracional das moléculas das nanoestruturas. Isso permite caracterizar os arranjos de nanopartículas com base na análise das posições dos picos de Raman, seu alargamento e assimetria⁶⁹.

[‡] A energia virtual não precisa satisfazer o princípio de conservação de energia, pois o estado virtual (intermediário ou imaginário) não corresponde a nenhum dos estados estacionários da molécula, na verdade o termo "estado virtual" foi introduzido para explicar o fenômeno Raman^{66,67}.

3.2.2 Revisão da literatura

De acordo com o Princípio da Incerteza de Heisenberg, a lei de conservação do momento nas nanopartículas pode ser violada devido à localização da interação fóton-fônon no volume de uma partícula. Enquanto nos cristais macroscópicos apenas os fônons com vetor de onda $q = 0$ contribuem para o espectro Raman, nas nanopartículas q é quantizado devido ao efeito da quantização do tamanho. O vetor de onda de fônon mínimo é $q_L \sim 2\pi / L$, com L sendo o tamanho típico de um nanocristalito. Isso pode produzir um deslocamento de pico Raman mensurável de uma amostra de tamanho nanométrico em relação a uma amostra macroscópica⁶⁹.

No caso dos nitretos de ferro, encontramos na literatura o trabalho de George V. Chertihin e colaboradores (1996)⁷⁰ que relata diversos modos vibracionais de moléculas de Fe-N produzidas por ablação em ambiente rico de nitrogênio. Este trabalho focaliza nos modos vibracionais de bandas encontradas em infravermelho, técnica complementar a espectroscopia Raman. Neste trabalho é estudado o caso do sistema Fe + N₂, cujos átomos de Fe ablatados por laser reagem com átomos e moléculas de nitrogênio, e favorecem a formação de moléculas de FeN, NFeN e complexos de Fe(N₂)_x. A Tabela 3 fornece as energias relativas, as distâncias entre as ligações Fe-N e as frequências calculadas por eles para as estruturas de FeN, FeN₂ e Fe₂N em diferentes estados de rotação usando a teoria do funcional da densidade (DFT).

Tabela 3 – Energias relativas, distâncias entre as ligações e frequências calculadas para as estruturas de FeN, FeN₂ e Fe₂N usando a teoria do funcional da densidade. Tabela adaptada da referência⁷⁰.

Molécula	S mult	Energia (Kcal/mol)	Distância (Å)	Frequências (cm ⁻¹)
FeN	2	+3	1,571	986
	4	0	1,569	1004
	6	+11	1,632	863
FeNN	3	0	1,727, 1,152	2023, 530, 296, 286
Fe(N₂)	3	+4	1,863, 1,201	1788, 780, 570
NFeN	3	+76	1,580	1019, 997, 397
	5	+79	1,605	983, 807, 396
NFeN linear	3	105	1,594	961, 609, 386, 271
	5	111	1,648	849, 499, 453, 198
NNFeNN	3	0	1,798, 1,145	2180, 2062, 533, 450
	5	30	1,834, 1,155	2073, 1977, 531, 418
NNFeN	4	0	1,138, 1,834, 1,576	2138, 1030, 469, 322
Fe₂N	4	8	1,69, 2,14	866, 610, 240
	6	2	1,70, 2,49	722, 636, 196
	8	0	1,737, 2,478	779, 626, 248
NN	1		1,111	2318

A Figura 15 resume algumas das ligações entre espécies moleculares encontradas nas diferentes estruturas de Fe-N no estado fundamental e otimizadas para cálculos DFT, segundo o trabalho de Chertihin e colaboradores⁷⁰.

É pequeno o número de estudos sobre modos vibracionais Raman ativos em nanopartículas de nitretos de ferro. A seguir, abordamos algumas das análises espectroscópicas Raman encontradas na literatura para os nitretos de ferro.

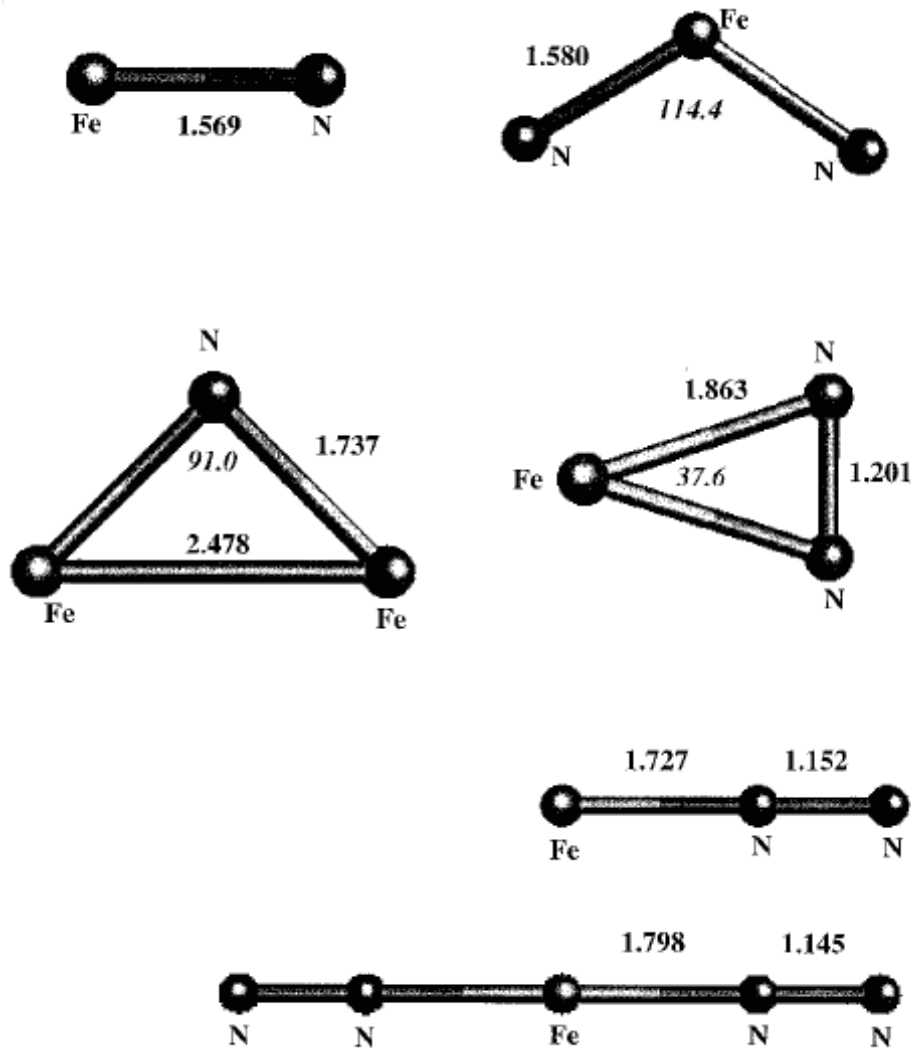


Figura 15 - Resultados da Teoria do funcional da densidade de estruturas otimizadas para espécies moleculares de ferro- nitrogênio conforme Tabela 3. As distâncias são dadas em angstroms e os ângulos em grau nas espécies identificadas como: FeN, FeNN, NFeNN lineares, FeNFe cíclica e NFeN. Imagem retirada da referência⁷⁰.

O espectro Raman do nitreto de ferro na fase pura de Fe₂N mostra como picos característicos das NPs deste material os picos abaixo de 1000 cm⁻¹, conforme mostra o espectro mais abaixo na Figura 16 (a)¹⁵. Os dois picos largos característicos em cerca de 1310 e 1595 cm⁻¹ estão, respectivamente, relacionados à banda D desordenada e à banda G gráfica de materiais de carbono e confirmam a existência de uma camada de grafeno nas NPs de Fe₂N. Resultado semelhante foi reportado por Yi Zhang e colaboradores, porém aqui os picos das NPs de Fe₂N apresentam menor intensidade como mostra a Figura 16 (c)⁷¹.

transição ferromagnéticos envolvem a ligação entre elementos metálicos, com pesos moleculares elevados similares em relação aos átomos de nitrogênio, que é um elemento extremamente leve em termos do seu peso molecular. De acordo com cálculos de DFT, os autores destacam a existência de frequências ativas em 574 cm^{-1} (F1), 1073 cm^{-1} (F2), 1091 cm^{-1} (F3) e 1435 cm^{-1} (F4). Apesar da variedade de estruturas cristalinas no conjunto de nanopartículas de nitreto, foram observadas frequências bastante próximas para as nanopartículas de Co-N, NiN e Fe-N, como pode ser observado no espectro de nanopartículas de Fe-N Figura 16 (b). Nesse caso, considerando a interação local elétron-fônon e componentes polarizáveis semelhantes para esses nitretos de metais de transição (Fe, Ni, Co), pode-se esperar que o componente mais leve (ou mais polarizável) mostre uma dispersão mais forte que o elemento mais pesado (ou menos polarizável). Dessa forma, concluiu-se que o comportamento dos modos de vibração molecular para os nitretos de metais de transição pode apresentar uma considerável semelhança¹⁴. Como as NPs deste trabalho estavam em suspensão em álcool isopropílico, foi utilizado como referência as contribuições de dispersão Raman atribuídas aos modos C-O de alongamento e flexão e os modos C-H e O-H de álcool isopropílico, os quais são respectivamente delimitados por retângulos tracejados nas regiões $800\text{-}880\text{ cm}^{-1}$, $1100\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, $1400\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$ na Figura 16 (b).

O pico característico de Fe-N em 824 cm^{-1} foi identificado por Chakravarty e colaboradores na análise deste sistema para filmes finos, mostrado na Figura 16 (d)⁷². A Figura 16 (e) exhibe através dos espectros Raman a dependência em temperatura dos modos de vibração do material macroscópico na fase $\epsilon\text{-Fe}_3\text{N}$. Com essa análise foi observado que a amostra passou a oxidar em contato com o ar a uma temperatura de $\sim 500^\circ\text{C}$ ⁷³.

3.2.3 Preparação das amostras neste trabalho

Neste trabalho, as amostras submetidas à espectroscopia Raman foram preparadas individualmente sob a precipitação de 10 gotas em uma placa de ouro, cuidadosamente limpa em banho de ultrassom, e subsequente evaporação de cada suspensão de NPs. O espectro Raman da placa de ouro limpa não dá contribuições espectrais detectáveis. Antes da precipitação das gotas, cada amostra ficou por 15

min em banho de ultrassom para que as gotas deixadas na placa de ouro representassem toda a amostra, caso partículas grandes da amostra estivessem precipitadas no líquido. Assim, os resultados de espalhamento Raman deste estudo descrevem o comportamento de cada amostra de forma integral. Nas análises, uma amostragem sistemática foi realizada em diferentes regiões da superfície da placa de ouro, que serviu de suporte para a formação dos agregados de NPs durante a evaporação do solvente das gotas de cada suspensão. Agregados de NPs da região central e da borda da amostra foram usados para obter o espectro Raman mais representativo para cada amostra.

O microscópio Raman Confocal Witec alpha 300R, instalado no Centro de Microscopia da UFPR, foi utilizado para realizar análises das amostras de Fe-N em uma potência do laser de 1 mW e sob uma fonte de excitação de 532 nm. A potência de 1mW foi escolhida pois as amostras apresentaram degradação quando submetidas a potências de 2 mW e 5 mW. Portanto, todos os resultados apresentados na seção de Resultados e Discussões serão referentes à potência de 1 mW.

3.3 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

As NPs possuem propriedades ópticas sensíveis ao tamanho, forma, concentração, estado de aglomeração e índice de refração próximo à superfície da partícula, o que faz da espectroscopia UV-Vis uma ferramenta importante para identificar, investigar esses materiais e avaliar a estabilidade das soluções coloidais das NPs^{74,75}.

Na espectroscopia UV-Vis, a medição da ressonância de Plasmon, em resposta as ondas eletromagnéticas, são utilizadas para confirmar a síntese das NPs. Como as NPs metálicas exibem faixas de absorbância específicas e espectros característicos, as NPs de cada metal têm uma faixa específica de picos de absorbância. É possível, então, através do espectro UV-Vis obter informações sobre a estrutura, tamanho, concentração, estado de aglomeração e indícios sobre o formato e possível precipitação das NPs no líquido⁷⁴.

3.3.1 A técnica de UV-VIS

Se passarmos um feixe de luz monocromática de um laser de intensidade conhecida (I_o) através de uma certa espessura da amostra e medirmos a intensidade da luz que emergiu, podemos calcular a transmitância (T) desta amostra da seguinte forma: $T = I/I_o$, isto é, a razão de luz que atravessa a amostra. Em óptica é usual utilizar a lei de Lambert-Beer $A = e l C$, onde $A = -\log T$ é a absorbância, e é uma constante, l é distância que a luz atravessa no meio material e C é a concentração de substância absorvente no meio material. Portanto, a partir da medida de absorbância é possível determinar a densidade das nanopartículas suspensas em um solvente⁷⁶. Esta técnica, no entanto, é susceptível a efeitos de recobrimento de nanopartículas menores por partículas maiores em distribuições de tamanho polidispersas, bem como, a efeitos de interação, agregação e solvatação das nanopartículas.

3.3.2 Revisão da literatura

A análise do tamanho das NPs é de grande importância quando relacionada à dependência dos parâmetros de crescimento por irradiação a laser. A dependência do comprimento de onda do laser na produção das NPs com o tamanho e a eficiência da formação das partículas foi relatada pela primeira vez por Jeon e Yeh⁴³. Eles realizaram a ablação a laser do alvo de prata em água e isopropanol usando radiação de 532 e 1064 nm de um laser de ns Nd: YAG. Através do espectro de absorção UV-Vis, mostrado na Figura 17 (a), os autores concluíram que o tamanho das partículas de prata preparadas no comprimento de onda de 532 nm nesses solventes era maior que o tamanho das partículas preparadas com luz de 1064 nm na fluência do laser de 397 mJ/cm². A eficiência de formação de NPs nessas condições usando o laser em 532 nm foi maior do que a luz de 1064 nm⁴³.

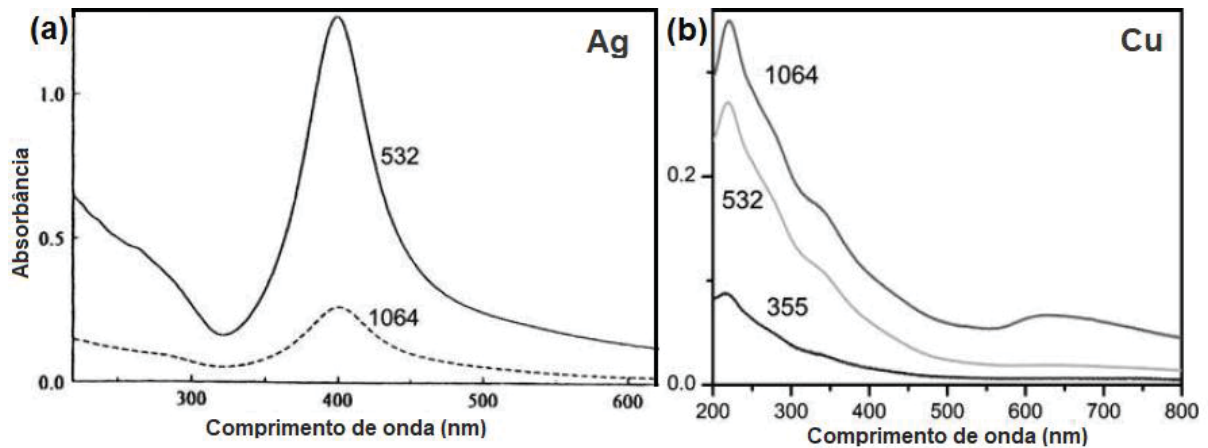


Figura 17 - Espectros de absorção UV-Vis de (a) NPs de prata em isopropanol preparados utilizando feixe de laser de 1064 nm e 532 nm com 397 mJ/cm^2 por 10 min e de (b) NPs coloidais de Cu preparados usando comprimentos de onda de 355 nm, 532 nm e 1064 nm com fluência de 12 J/cm^2 e duração da ablação de 10 min. Imagem adaptada da referência⁴³.

Curiosamente, trabalhos mais recentes reportam que o tamanho e a eficiência de produção das partículas de Ag aumentaram com o comprimento de onda do laser, uma relação diferente daquela relatada por Jeon e Yeh. Além disso, os autores destacam que o tamanho das partículas é alterado pela fluência do laser, e a alteração do tamanho pela fluência do laser também depende do comprimento de onda do laser. Assim, a espectroscopia UV-Vis das NPs de prata foi utilizada para concluir que à medida que a fluência do laser aumenta, o tamanho das NPs preparados em 1064 nm ligeiramente aumenta, ao passo que o NPs preparadas em 355 nm diminui⁴³.

A influência da absorção em sistemas coloidais aumenta a eficiência da formação de NPs de acordo com experimentos de produção de NPs de cobre (Cu). Conforme mostra a Figura 17 (b), o relato da redução do tamanho das NPs produzidas pela luz do laser de 355 nm, com alto valor de fluência, pode ser atribuída à fragmentação causada pela absorção coloidal de Cu⁴³. Assim, o aumento da fluência também pode provocar um aumento na fragmentação das NPs.

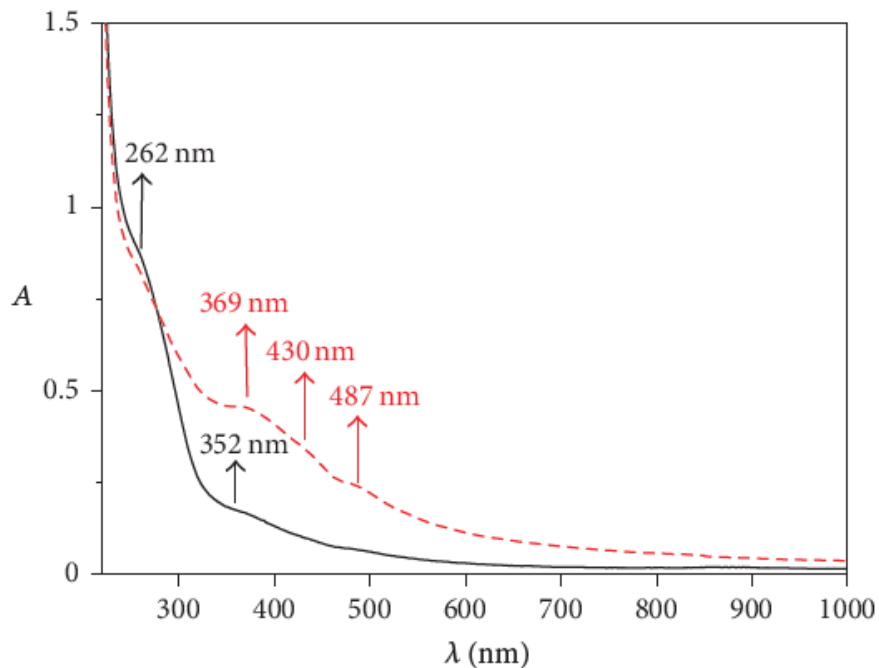


Figura 18 - Espectros de absorção UV/Vis de nanopartículas de Fe dispersas na água (linha sólida em preto) e depois da exposição da amostra ao ar (linha tracejada em vermelho). Imagem retirada da referência⁷⁷.

O espectro característico de absorção das NPs de Fe da Figura 18 foi medido por Klačanová e colaboradores⁷⁷. Eles observam os espectros de absorção UV-VIS das nanopartículas de Fe dispersas em água antes e depois da exposição ao ar atmosférico. Os espectros ópticos, medidos imediatamente após a permanência da amostra em atmosfera inerte, mostram um padrão muito semelhante ao encontrado para as nanopartículas puras de Fe dispersas na água (Figura 18). Há um pico intenso em 352 nm e um segundo pico em 262 nm. O pico em 352 nm é atribuído as oscilações coletivas dos plasmons de superfície. Ao manter a amostra ao ar, novas bandas de absorção apareceram devido à oxidação com vários máximos indicando várias nanopartículas de óxido de ferro⁷⁷.

3.3.3 Preparação das amostras neste trabalho

Os espectros de absorção óptica das amostras foram medidos em um espectrômetro UV-Vis-NIR Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific), localizado no Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar). Cada amostra é posicionada no local indicado pela Figura 19. Este equipamento utiliza lâmpada de xenônio, cuja geometria

de feixe duplo é ideal para monitorar a cinética ou qualquer amostra que possa mudar ao longo do tempo durante uma medição. O espectrofotômetro Evolution 201 possui alta resolução e uma largura espectral de 1,0 nm. O feixe incidente produzido por uma lâmpada de xenônio oferece excelente desempenho em toda a faixa de comprimento de onda de 190 a 1100 nm. Ademais, a lâmpada de xenônio permite a exposição minimizada das amostras aos efeitos da radiação UV e menor aquecimento do compartimento de amostras, proporcionando maior estabilidade de temperatura e eliminando os problemas de degradação de amostras comumente observados com as fontes de lâmpadas tradicionais^{78,79}.

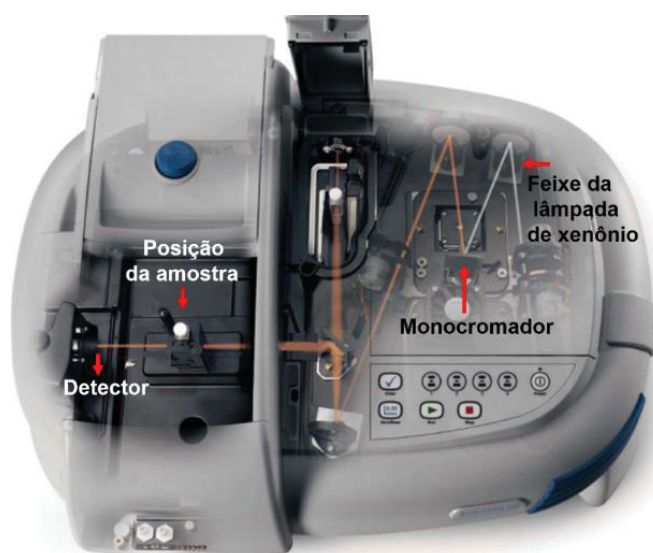


Figura 19 - Imagem interna do espectrômetro UV-Vis utilizado neste trabalho mostrando o caminho óptico percorrido pelo feixe do laser produzido pela lâmpada de xenônio. É indicada a posição que a amostra permanece enquanto o feixe é transmitido através das partículas em suspensão em álcool isopropílico. Imagem adaptada do manual do equipamento⁷⁸.

Nessas análises, é inicialmente realizada a medida da luz conhecida do laser do espectrômetro I_0 , utilizando uma cubeta de quartzo com capacidade de 1 mililitro contendo apenas o solvente dentro do qual as partículas estão suspensas. Posteriormente, o solvente é substituído pelas suspensões. Então, mede-se a intensidade I da luz transmitida a partir da suspensão de nanopartículas presente na cubeta de quartzo. Finalmente, os dados são registrados em função da absorbância do material em suspensão.

Nas últimas seções vimos todos os sistemas e processos usados desde a fabricação até a caracterização de nossas amostras. No próximo capítulo veremos os resultados obtidos e discutiremos os mesmos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As análises por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram usadas para determinar o aspecto morfológico, a composição química e a cristalinidade das nanoestruturas de nitreto de ferro sintetizadas com parâmetros variáveis do laser, tal como apresenta a Tabela 1. Para analisar o tamanho das partículas através das imagens de microscopia, foram medidos os tamanhos das NPs com o auxílio do software ImageJ, e representados na forma de histogramas. Nos casos em que a partícula apresenta formato irregular, foi considerado o comprimento maior da mesma. A seguir serão discutidos os resultados obtidos por MET para a série de amostras, cuja nomenclatura contém o prefixo IR, produzidas em um comprimento de onda no IR de 1064 nm sob diferentes valores de fluência do laser.

As micrografias de MET das nanopartículas da amostra IR1 sintetizadas usando a fluência de $0,7 \text{ J/cm}^2$ sob a irradiação do laser no infravermelho (1064 nm) são apresentadas na Figura 20 (a). O histograma representativo da imagem Figura 20 (a) indica um tamanho médio das partículas de $(28 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm})$. A caracterização pela técnica de SAED (Difração de Elétrons por Área Seleccionada) da amostra IR1, indica a formação de duas fases do sistema Fe-N. Conforme mostra a Figura 20 (b), o padrão de SAED exibe pares de pontos cristalinos consistentes com os planos cristalinos (110), (111) e (221) da estrutura ortorrômbica $\zeta\text{-Fe}_2\text{N}$ juntamente com os planos cristalinos (111) e (101) da estrutura hexagonal $\epsilon\text{-Fe}_3\text{N}$.

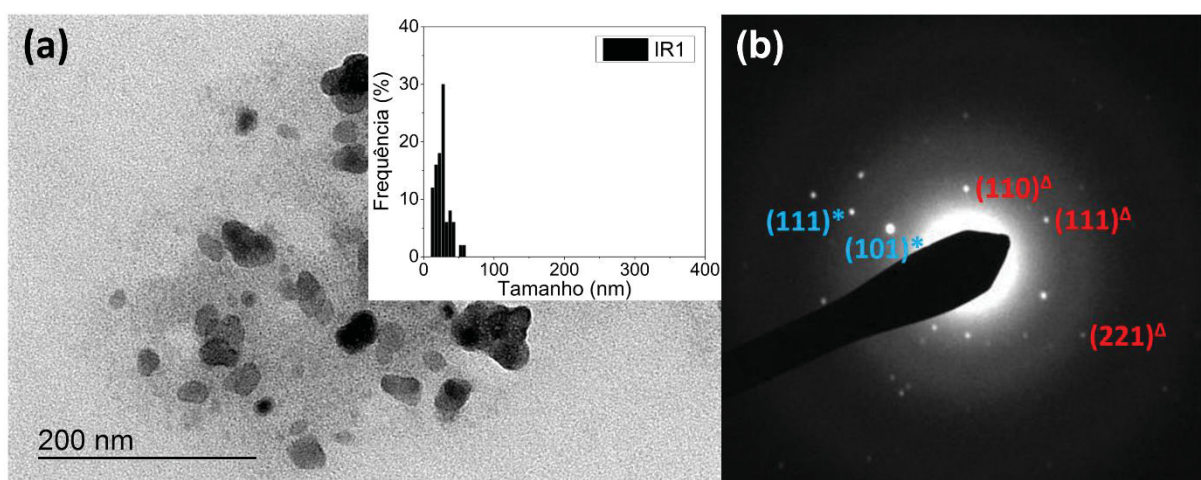


Figura 20 – (a) Micrografias de MET da amostra IR1, produzida com o comprimento de onda no infravermelho e utilizando a fluência do laser de $0,7 \text{ J/cm}^2$. A inserção em (a) apresenta o histograma de tamanhos de partículas representativo para a amostra IR1. (b) Imagem de SAED para a amostra

IR1 referente a área selecionada mostrada em (a). Os pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos correspondentes as fases ϵ -Fe₃N (cor azul*) e ζ -Fe₂N (cor vermelha^Δ).

Duas fases de nitreto de ferro também foram identificadas para a amostra produzida na fluência de 1,0 J/cm², conforme mostra a Figura 21 (b). O padrão de SAED para a amostra IR2 indica uma composição química condizente com a formação das fases ϵ -Fe₃N e α'' -Fe₁₆N₂. A amostra IR2 apresenta NPs com um tamanho médio de (82 nm ± 10 nm). A distribuição larga de tamanhos pode ser vista na Figura 21 (a).

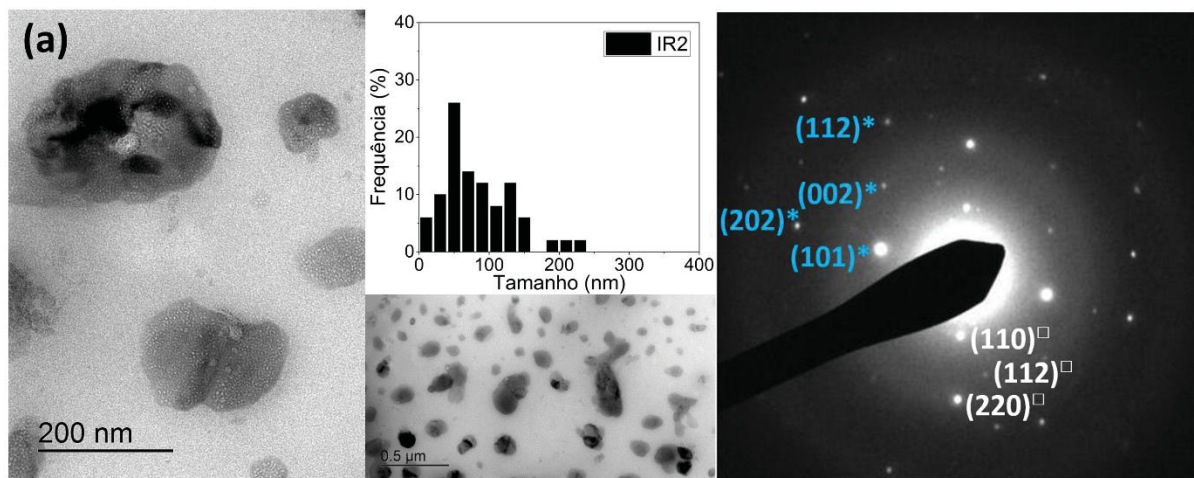


Figura 21 – (a) Micrografias de MET da amostra IR2, produzida com o comprimento de onda no infravermelho e utilizando a fluência do laser de 1,0 J/cm². A inserção em (a) apresenta o histograma de tamanhos de partículas representativo da amostra IR2. (b) Imagem de SAED para a amostra IR2 referente a área selecionada mostrada em (a). Os pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos correspondentes as fases ϵ -Fe₃N (cor azul*) e α'' -Fe₁₆N₂ (cor branca[□]).

Percebe-se um aumento considerável no tamanho das NPs com o acréscimo do valor da fluência do laser de 0,7 J/cm² para 1,0 J/cm² na síntese por irradiação à laser das amostras IR1 e IR2, respectivamente. Esse aumento no tamanho das nanopartículas passa a ser ainda mais evidente para a amostra IR3, cuja fluência foi de 1,3 J/cm². Conforme exibe a Figura 22 (a) temos o indicativo de regiões com duas distribuições de tamanho para a mesma amostra IR3, uma que apresenta um tamanho médio de partículas de (29 nm ± 4 nm) e outra região da amostra, representada na inserção IR3*, que tem um tamanho médio de partículas de (214 nm ± 17 nm). Nessa inserção da Figura 22 (a) são encontradas partículas grandes e com formato cuboidal. Elas são representadas no histograma de tamanho de partículas como barras hachuradas em vermelho. Claramente, podem ser visualizados padrões de pontos de

difração bem definidos e simétricos, que indicam a alta cristalinidade das NPs da amostra IR3. São identificados os índices de Miller dos principais planos cristalinos (maior simetria) correspondentes a fase única α "-Fe₁₆N₂ (Figura 22 (b)).

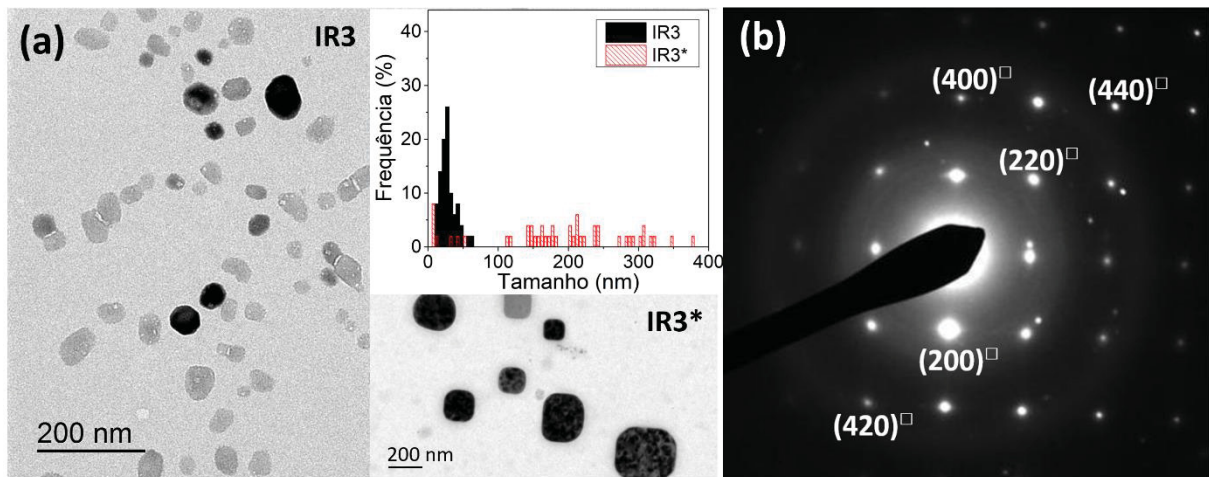


Figura 22 – (a) Micrografias de MET da amostra IR3, produzida com o comprimento de onda no infravermelho e utilizando a fluência do laser de 1,3 J/cm². A inserção em (a) apresenta os histogramas de tamanhos de partículas representativos da amostra IR3. (b) Imagem de SAED para a amostra IR3 referente a área selecionada mostrada em (a). Os anéis e padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller de planos cristalinos correspondentes a fase α "-Fe₁₆N₂ (cor branca[□]).

Para a amostra IR4 é possível observar nanopartículas com uma distribuição de tamanho mais larga do que aquela observada para a amostra IR3 (Figura 23 (a)). A largura da distribuição de tamanho das NPs é evidentemente maior com o aumento da fluência do laser. De acordo com a Equação (2-2), apenas a concentração de elétrons no plasma muda com o aumento dos valores de fluência nas irradiações de IR. A amostra IR4 produzida em uma fluência do laser de 1,6 J/cm² é constituída de nanopartículas com tamanho médio de 119 nm, como mostra o histograma de tamanhos de partículas da Figura 23 (a). Percebe-se que nas duas maiores fluências do laser foram produzidas as amostras de composição química com uma única fase, mas distintas em suas composições químicas. Dessa forma, a cinética de difusão de nitrogênio parece não estar concluída, pois foram observadas nanopartículas com fases distintas, de acordo com as análises de SAED mostradas nas Figura 20 (b) e Figura 21 (b). Ou ainda, a elevação da fluência pode ter propiciado uma fragmentação de tamanho que favoreceu a formação de uma fase com maior conteúdo de nitrogênio. A amostra IR4 tem um padrão de difração apresentado na Figura 23 (b) compatível com a fase ζ -Fe₂N. Cabe ainda destacar que a grande maioria das partículas

produzidas usando o comprimento de onda do laser de 1064 nm apresentam uma aparência condizente com plaquetas planas nas Figura 20 -Figura 23. Aumentando a fluência da irradiação por IR, a morfologia das nanoestruturas muda do formato de plaquetas para cuboidais e, finalmente, passa a apresentar formas alongadas e aciculares, como mostrado na Figura 20 à Figura 23.

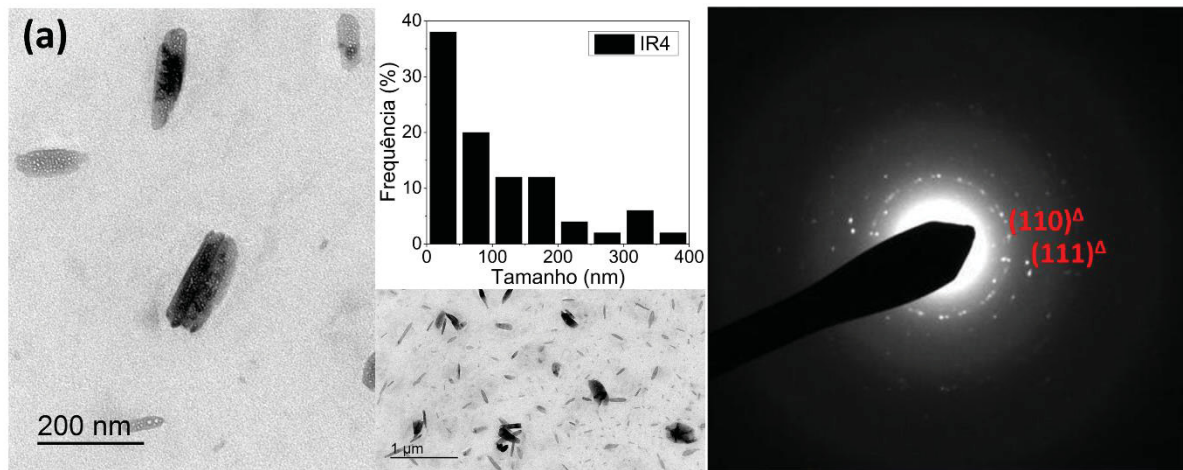


Figura 23 - (a) Micrografias de MET da amostra IR4, produzida com o comprimento de onda no infravermelho e utilizando a fluência do laser de 1,6 J/cm². A inserção em (a) apresenta o histograma de tamanhos de nanopartículas representativo para a amostra IR4. (b) Imagem de SAED para a amostra IR4 referente a área selecionada mostrada em (a). Os anéis e padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller de planos cristalinos atribuídos a fase ζ-Fe₂N (cor vermelha^Δ).

As micrografias de MET das NPs de nitreto de ferro produzidas nos comprimentos de onda do laser de 1064 nm, 532nm, 355 nm e 266 nm são mostradas nas Figura 24 (a) - Figura 27 (a), nesta ordem. As amostras S1, S2, S3 e S4 tiveram a fluência do laser fixada em 1,0 J/cm² durante o processo de síntese. Nesta série de amostras, podemos visualizar diferentes distribuições de tamanho e formatos das NPs. Morfologias esféricas são observadas nas amostras S2 e S4 como mostram as Figura 25 (a) e Figura 27 (a), respectivamente. Particularmente, a amostra S2 exibe uma distribuição estreita de tamanho.

O tamanho médio das partículas são de (82 nm ± 7 nm), (4 nm ± 1 nm), (101 ± 9 nm) e (9 nm ± 2 nm) para as amostras S1, S2, S3 e S4, respectivamente. Neste caso, também há uma dependência de tamanho das nanopartículas com relação ao comprimento de onda do laser usado na produção de NPs.

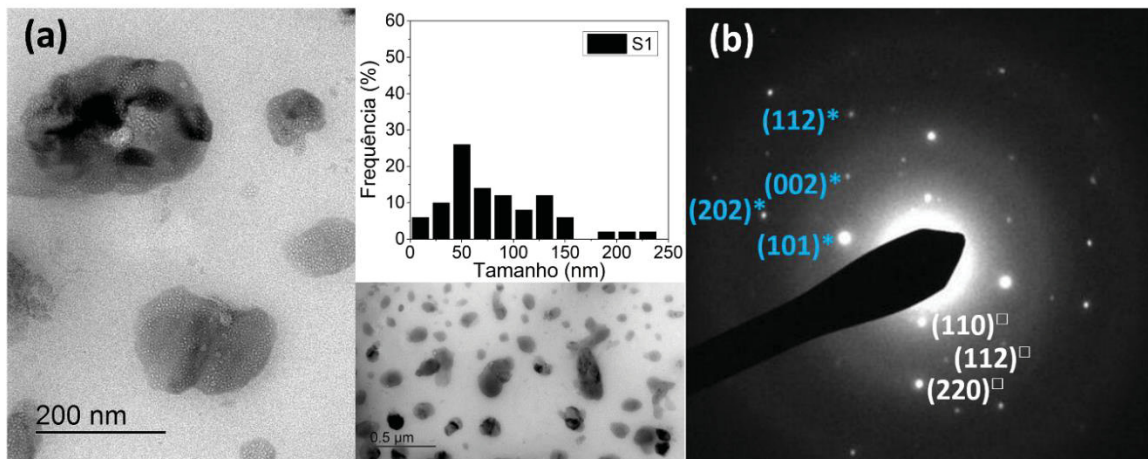


Figura 24 - (a) Micrografias de MET da amostra S1, produzida na fluência do laser de $1,0 \text{ J/cm}^2$ sob comprimento de onda do laser de 1064 nm . A inserção em (a) apresenta o histograma de tamanhos de partículas representativo para a amostra S1. (b) Imagem de SAED para a amostra S1 referente a área selecionada mostrada em (a). Os padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos atribuídos as fases $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ (cor branca \square) e $\epsilon\text{-Fe}_3\text{N}$ (cor azul $*$).

A análise estrutural das NPs usando a técnica de SAED e os resultados obtidos para a série de amostras, cuja nomenclatura possui prefixo S, são exibidos nos padrões de difração das Figura 24 (b) - Figura 27 (b). A formação de nanoestruturas monofásicas de nitreto de ferro é confirmada a partir das amostras produzidas nos comprimentos de onda menores que 1064 nm , ao mesmo tempo que a fluência é mantida em $1,0 \text{ J/cm}^2$. Conforme observamos nas análises, a única evidência de duas fases de Fe-N é encontrada para a amostra S1.

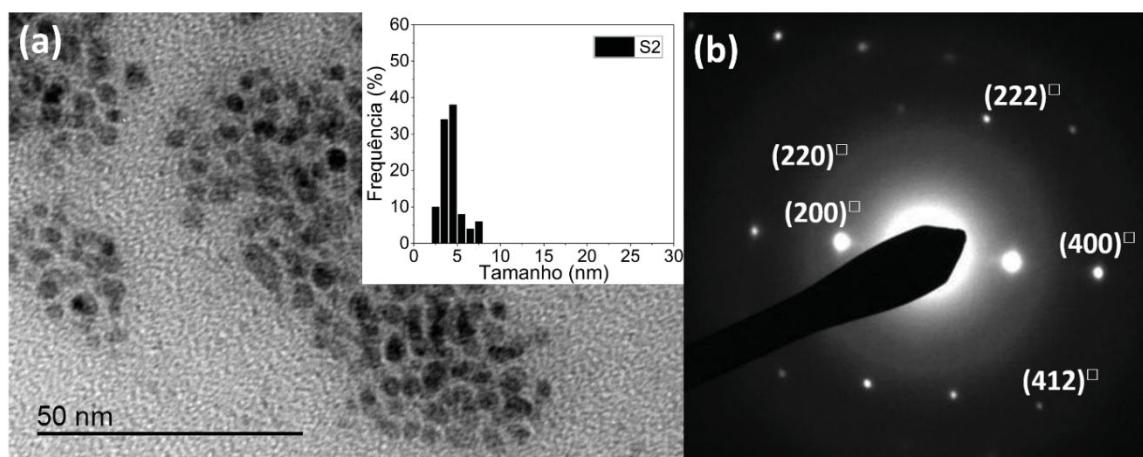


Figura 25 - (a) Micrografia de MET da amostra S2, produzida na fluência do laser de $1,0 \text{ J/cm}^2$ sob comprimento de onda do laser de 532 nm . A inserção em (a) apresenta o histograma de tamanhos de partículas representativo para a amostra S2. (b) Imagem de SAED para a amostra S2 referente a área selecionada mostrada em (a). Os anéis e padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos atribuídos a fase $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ (cor branca \square).

Todas as análises estruturais feitas com base nas imagens de SAED, tanto para as amostras IR quanto para a série de amostras S, foram feitas usando basicamente as referências^{13,80} e os arquivos de dados de difração PDF 50-0958 e PDF 49-1663. Apesar de não citarmos a evidência de óxido de ferro na composição química das amostras, incluímos nas análises de SAED a busca por identificação de fases de óxidos de ferro. Ou seja, nas análises foram também utilizadas as fichas de difração para o Fe metálico e óxidos de ferro mais comuns da literatura. No entanto, nenhuma identificação consistente de Fe metálico ou óxidos de ferro foi encontrada.

A indexação dos anéis de difração para amostras da série S está de acordo com a expectativa de observar os planos de difração de maior intensidade previstos para as fases identificadas. Além disso, um halo difuso é observado e identificado como o plano (220) da fase α'' -Fe₁₆N₂ na Figura 25 (b). Isto indica a presença de uma fração amorfa de NPs, ou simplesmente indica que o tamanho médio de 4 nm das nanoestruturas na amostra S2 possui um caráter de cristal finito, com caráter mais superficial do que volumétrico. Destaca-se ainda que, os halos de difração difusos são observados em praticamente todas as amostras. Além das hipóteses mencionadas acima, também é fato não desprezível a dificuldade técnica de obter boas micrografias e padrões de SAED em agregados de nanoestruturas com morfologias distintas muitas vezes superpostas e multifásicas.

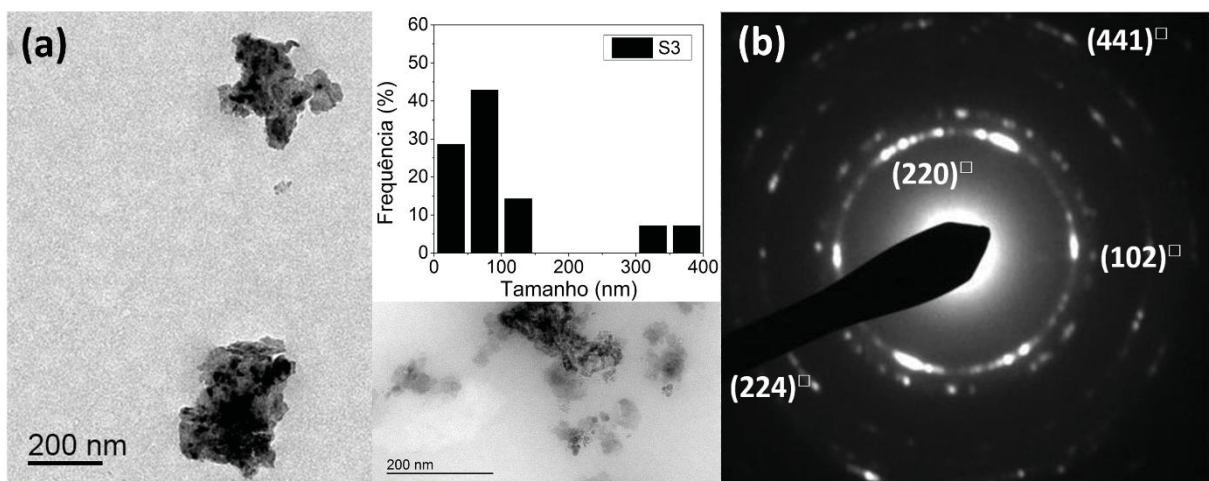


Figura 26 - (a) Micrografias de MET da amostra S3, produzida na fluência do laser de 1,0 J/cm² sob comprimento de onda do laser de 355 nm. A inserção superior em (a) apresenta o histograma de tamanhos de partículas representativo para a amostra S3. (b) Imagem de SAED para a amostra S3 referente a área selecionada mostrada em (a). Os anéis e padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos correspondentes a fase α'' -Fe₁₆N₂ (cor branca).

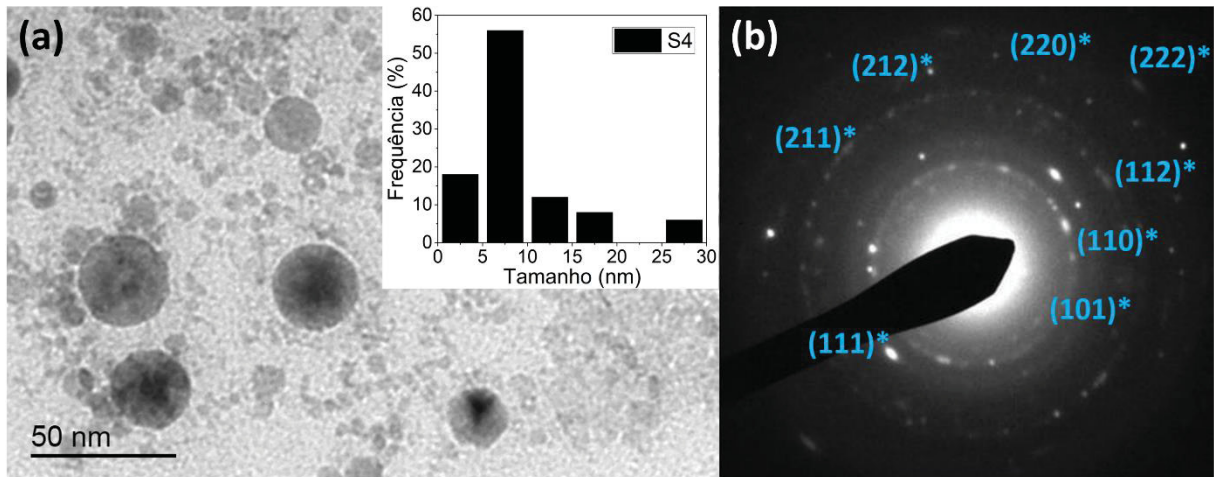


Figura 27 - (a) Micrografia de MET da amostra S4, produzida na fluência do laser de $1,0 \text{ J/cm}^2$ sob comprimento de onda do laser de 266 nm. A inserção em (a) apresenta o histograma de tamanhos de partículas representativo para a amostra S4. (b) Imagem de SAED para a amostra S4 referente a área selecionada mostrada em (a). Os anéis e padrões de pontos de difração estão identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos correspondentes a fase $\epsilon\text{-Fe}_3\text{N}$ (cor azul*).

A irradiação nas superfícies metálicas, como o Fe, com pulsos do laser com duração de ns em uma atmosfera estritamente saturada de nitrogênio leva a uma enorme absorção de nitrogênio nas superfícies irradiadas. Tal efeito de nitretação à laser foi demonstrado para as amostras da série IR e da série S. Com base na seção 2.3 deste trabalho, a solubilidade e a difusividade de N em Fe afetam fortemente a formação das fases de nitreto de ferro. Para o laser em estudo, com pulsos de duração de 5 ns, a absorção de IB é muito mais forte no infravermelho do que em relação à radiação UV. De acordo com a Eq. (2-2), a absorção de IB é menos eficiente em comprimentos de onda mais curtos (UV), mas torna-se significativa em comprimentos de onda mais longos (IR). Ao mesmo tempo que o termo λ na Eq. (2-2) ganha importância, os termos relacionados a fluência (κ_1 e κ_2) são os de menor contribuição. Isso sugere que os efeitos do comprimento de onda na série de amostras S devem apresentar maior influência na formação das NPs, comparados aos efeitos da mudança no valor da fluência para as amostras da série IR. No entanto, é importante notar que em nossos experimentos, o laser com duração de pulso de ns e com taxa de repetição de 0,1 s fornece um curto período de (re)irradiação das partículas ejetadas e das nanoestruturas formadas. Portanto, a influência do comprimento de onda do laser na nanomorfologia e na formação de nanofases (denominação de grãos menores do que 100 nm, tipicamente) depende apenas da energia fornecida à superfície do alvo de ferro durante cada pulso do laser. Diante disso, é possível verificar pela Tabela 4 que o melhor controle estequiométrico foi obtido para as

amostras produzidas sob a variação do comprimento de onda e em um mesmo valor de fluência do laser. Em contrapartida, para as amostras produzidas no IR temos uma maior evidência de mistura de fases de nitretos de ferro e distribuições de tamanho maiores. Além disso, as condições extremas de temperatura e pressão da irradiação à laser favoreceu a síntese de NPs na fase metaestável α'' -Fe₁₆N₂ em três condições diferentes da síntese das NPs (ver Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo das condições de preparação e identificação da fase nitreto nas amostras produzidas e estudadas neste trabalho.

Amostra	λ (nm)	Fluência (J/cm²)	Fases
IR1	1064	0,7	ϵ -Fe ₃ N + ζ -Fe ₂ N
IR2	1064	1,0	ϵ -Fe ₃ N + α'' -Fe ₁₆ N ₂
IR3	1064	1,3	α'' -Fe ₁₆ N ₂
IR4	1064	1,6	ζ -Fe ₂ N
S1	1064	1,0	α'' -Fe ₁₆ N ₂ + ϵ -Fe ₃ N
S2	532	1,0	α'' -Fe ₁₆ N ₂
S3	355	1,0	α'' -Fe ₁₆ N ₂
S4	266	1,0	ϵ -Fe ₃ N

Embora não haja dados e modelos detalhados para a síntese induzida por laser, a difusividade de N deve ser muito maior a que de Fe. Além disso, é esperada uma dependência na concentração de N em várias fases (ver seção 2.3), tomando ainda em conta a importância da entalpia de formação e a estabilidade termodinâmica de cada fase. Nesse sentido, vale lembrar que a fase α'' pode conter até 12 a.% de N e que as faixas no diagrama de fases (Figura 3) para a formação dos nitretos α'' -Fe₁₆N₂ e ζ -Fe₂N são muito estreitas. Tais fases foram encontradas entre nossos subprodutos induzidos por laser, enquanto as soluções com estequiometrias ricas em N, como a FeN e as estruturas intersticiais ϵ -Fe_{3-x}N, não foram observadas.

A formação da estrutura núcleo-casca está associada à formação de bolhas de gás em torno das partículas fundidas ejetadas no líquido circundante. Nesse caso, a vida útil da bolha de gás aumenta devido à transferência de calor da partícula para o ambiente. Durante seu resfriamento, um invólucro de gás é retido em torno da partícula ou aglomerados, aumentando a possibilidade de formação de núcleo-

invólucro. No ambiente saturado de nitrogênio líquido, um aumento da fluência na superfície do alvo geralmente torna esse efeito mais provável. No nosso caso, a fluência é mantida muito abaixo dos valores relatados, por exemplo, por Kazakevich e Fornarini e colaboradores^{49,81}. Aparentemente, o ambiente estrito de nitrogênio líquido inibe as possibilidades de mistura de fases associadas ao enriquecimento de nitrogênio da casca relativamente à estrutura interna do núcleo e também a agregação parcial de detritos devido conchas "rompidas". Este último efeito pode ter ocorrido para a amostra IR1, já que são visíveis vários aglomerados de partículas semelhantes a estruturas de casca rompida (ver Figura 20).

Nossos atuais resultados revelam a possibilidade de obter a formação em uma única etapa das nanoestruturas α'' -Fe₁₆N₂, ϵ -Fe₃N e ζ -Fe₂N por ablação à laser pulsado do alvo Fe imerso em nitrogênio líquido, controlando o comprimento de onda e a fluência do laser. Cabe destacar também, um certo controle da diversidade de tamanhos dessas NPs monofásicas.

A fluência ideal do laser no infravermelho para obter a estequiometria tetragonal α'' -Fe₁₆N₂ é de 1,3 J/cm², pois, ao aumentar a fluência do laser, são observadas as nanoestruturas que correspondem ao ζ -Fe₂N policristalino, como mostra a Figura 23 (b). No entanto, uma condição ideal para obter nanopartículas pequenas (diâmetro médio de aproximadamente 5 nm), com alta monodispersividade da fase α -Fe₁₆N₂, é utilizando um comprimento de onda em 532 nm e uma fluência de 1,0 J/cm². Entre as condições de síntese usadas neste trabalho, um laser pulsado no comprimento de onda de 266 nm, com alta energia de fótons, implica em uma alta fotoablação que provavelmente reforça a fragmentação do alvo do material pelo método de *top-down* (parte-se de um material massivo para se obter as nanoestruturas). As quantidades substanciais de pequenas nanopartículas nas amostras S3 e, principalmente, na S4 corroboram essa suposição. Nesse caso, o aumento da fluência pode melhorar o método de *bottom-up* (parte-se de construir as nanoestruturas de átomo a átomo ou molécula por molécula, nesse caso, a difusão do N no Fe das NPs), permitindo o acesso a fases cristalinas mais complexas do diagrama de fases de nitretos de ferro. No entanto, o α'' -Fe₁₆N₂ é formado na amostra de IR3 e possivelmente convertido para ζ -Fe₂N na amostra de IR4, produzida com uma fluência maior. Trabalhos recentes sobre a síntese de nanoestruturas por ablação

a laser em líquidos corroboram esta afirmação sobre as duas abordagens para a fabricação de nanoproductos⁵².

A análise das amostras por espectroscopia Raman também foi realizada para avaliar a formação das fases nos nanoproductos sintetizados à laser. Para nos ajudar na identificação das fases, também realizamos alguns cálculos computacionais baseados na teoria do funcional da densidade (DFT) para prever as posições dos picos esperadas no espectro Raman, já que esses dados são bastante escassos na literatura. Os cálculos computacionais foram realizados por intermédio do Prof. Dr. José Varalda no laboratório LANSEN. Os nitretos de ferro têm modos Raman ativos na região de baixa frequência, abaixo de 1000 cm^{-1} , como vimos na Figura 16.

Conforme mostra a Figura 28, referente as amostras produzidas no infravermelho com diferentes fluências do laser, o pico característico em torno de 203 cm^{-1} corresponde ao pico relatado para as nanopartículas puras de $\zeta\text{-Fe}_2\text{N}$, o que pode corresponder as vibrações de alongamento de espécies moleculares de FeFeN ⁷¹. Características espectrais mais pronunciadas são observadas em frequências mais altas em torno de 492 cm^{-1} e 715 cm^{-1} . Elas são apropriadas para descrever os modos de vibração de alongamento da cadeia de ligação linear NFeN e da estrutura cíclica de FeNFe com um ângulo de 90° de Fe-N-Fe , respectivamente. Para entender melhor esses espectros Raman, que estão relacionados com as diferentes fases do nitreto de ferro identificados pelas análises de TEM das amostras, foram incluídas abaixo das curvas Raman várias barras verticais associadas as posições de linhas espectrais de IR (Figura 28 e Figura 29). Estas linhas são atribuídas a moléculas e espécies complexas do sistema Fe-N, obtidas para átomos de Fe ablatados por laser que reagem com átomos de nitrogênio.

As posições das linhas espectrais dos modos ativos Raman da fase $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ no ponto gama do centro da primeira zona de Brillouin (que é a célula primitiva no espaço recíproco) foram calculadas usando um pacote de teoria do funcional da densidade, que usa o potencial de todos os elétrons do *Exciting code*⁸². Os cálculos do estado fundamental foram realizados com o GGA *exchange-correlation functional* do *Perdew-Burke-Ernzerhof*. As frequências de Raman foram calculadas usando a teoria funcional de densidade dependente do tempo com a aproximação de fase aleatória (RPA) para o núcleo de correlação de troca. Neste caso, os cálculos foram

realizados para a fase α'' -Fe₁₆N₂, pois sua estrutura cristalina complexa contém todas as estruturas das espécies moleculares de Fe-N relevantes.

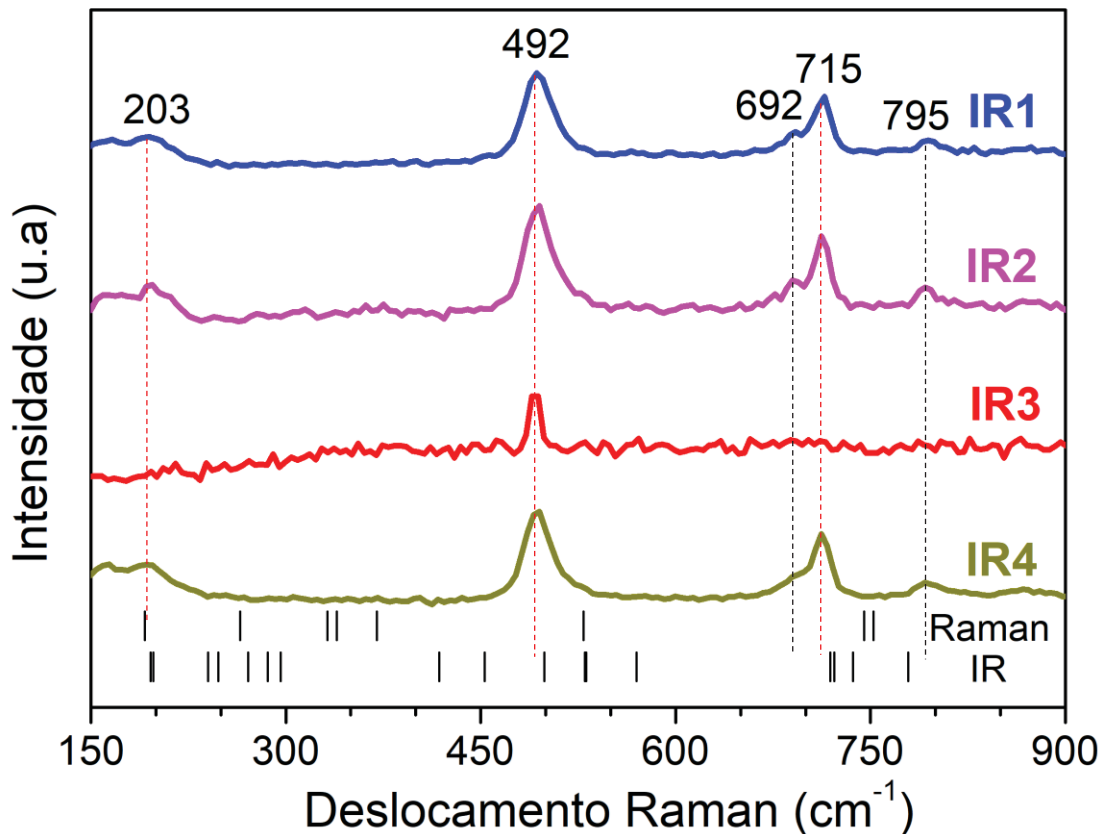


Figura 28 - Espectros Raman para as amostras IR1, IR2, IR3 e IR4 produzidas no comprimento de onda do laser de 1064 nm, usando as fluências do laser de 0,7 J/cm², 1,0 J/cm², 1,3 J/cm² e 1,6 J/cm², respectivamente. As barras verticais indicam frequências das linhas Raman ativas calculadas no trabalho atual e as faixas de IR fornecidas pela referência⁷⁰.

Os espectros Raman para as nanopartículas produzidas com comprimentos de onda de laser distintos são mostrados na Figura 29. Lembrando que as amostras S1 e IR2 foram produzidas sob as mesmas condições. Com exceção da amostra IR3, as amostras IR1 e IR4 exibem picos de Raman como os encontrados em amostras produzidas nos diferentes comprimentos de onda do laser (série de amostras S). Um espectro Raman distinto é encontrado para a amostra IR3, que exhibe apenas um pico Raman estreito em torno de 492 cm⁻¹. De acordo com o SAED, esta amostra consiste em nanoestruturas da fase tetragonal α'' -Fe₁₆N₂ e tamanhos da ordem de micrômetros. Claramente, existem muitos picos espectrais atribuídos às bandas observadas no IR, extraídas da referência⁷⁰ e resumidas pela Tabela 3, e os modos

vibracionais Raman calculados neste trabalho, cujos dados estão de acordo com os nossos dados experimentais.

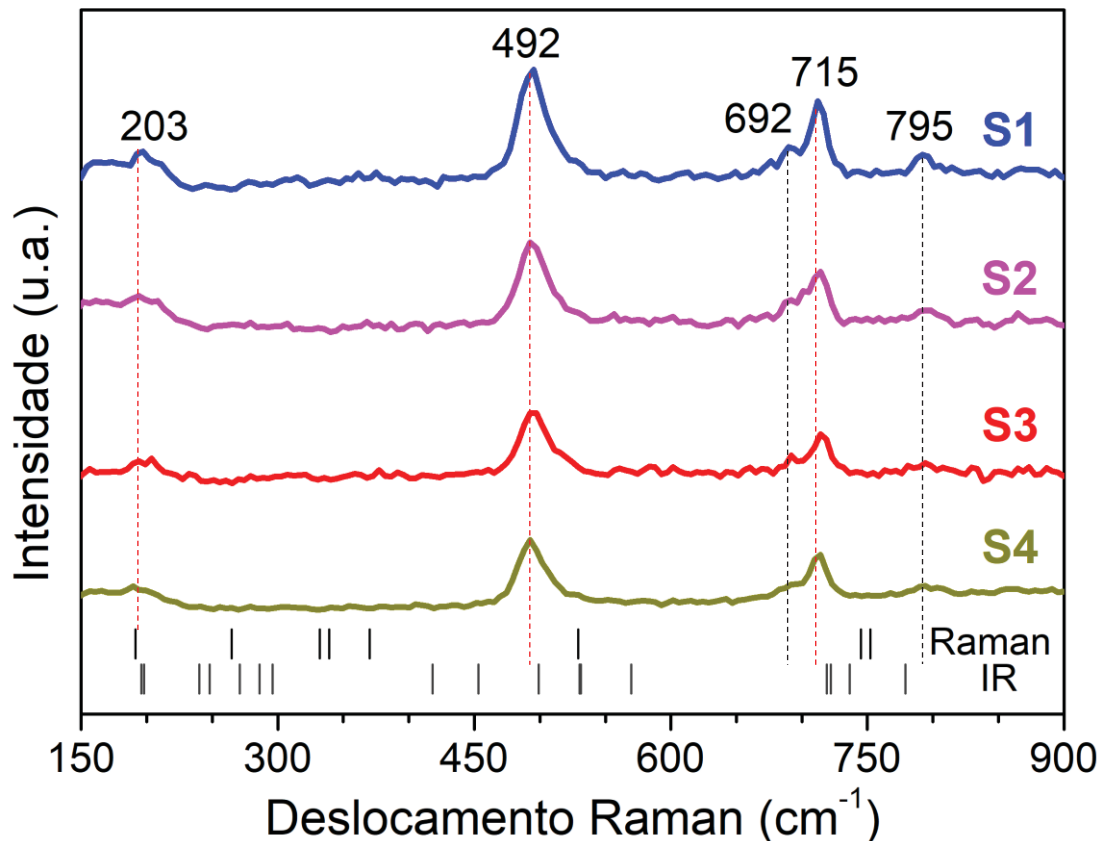


Figura 29 - Espectros Raman para amostras S1, S2, S3 e S4 produzidas com uma fluência do laser de $1,0 \text{ J/cm}^2$ e usando os comprimentos de onda do laser de 1064 nm, 532 nm, 355 nm e 266 nm, respectivamente. As barras verticais indicam as frequências das linhas Raman ativas calculadas no trabalho atual e as faixas de IR fornecidas pela referência⁷⁰.

De acordo com os espectros Raman, pelo menos 3 picos corroboram às bandas observadas no IR, indicados nas linhas tracejadas em vermelho nas Figura 28 e Figura 29. Lembrando que 10 cm^{-1} equivale aproximadamente 1,24 meV, portanto, vale ressaltar que os desvios das mudanças de frequência observados para alguns picos de Raman correspondem, na verdade, a quantidades muito pequenas de energia nos modos vibracionais. Considerando que as frequências das linhas Raman ativas foram calculadas para materiais massivos⁷⁰, não se pode descartar os efeitos da reduzida dimensionalidade e as interações das nanopartículas preparadas para as análises por espectroscopia Raman, inclusive com a lâmina suporte de ouro. De fato, as NPs foram excitadas por um laser em 532 nm e submetidas a atmosfera ambiente,

envolvendo agregados de nanopartículas formados após a secagem de gotículas de suspensão na superfície de lâminas de ouro.

A fim de evitar possíveis artefatos associados à contaminação ou degradação da amostra após a exposição ao ar, também foram produzidas nanopartículas de óxido de ferro usando a irradiação com laser no IR do alvo de ferro imerso em água com uma fluência do laser de $1,3 \text{ J/cm}^2$.

As análises de MET e os espectros de Raman mostrados nas Figura 30 e Figura 31, respectivamente, podem ser usados para direcionar as comparações de nossos resultados como NPs de óxidos de ferro. O padrão de SAED indexado em Figura 30 indica a composição do óxido de ferro do tipo maghemita, cujas partículas apresentam o formato de agulhas e plaquetas.

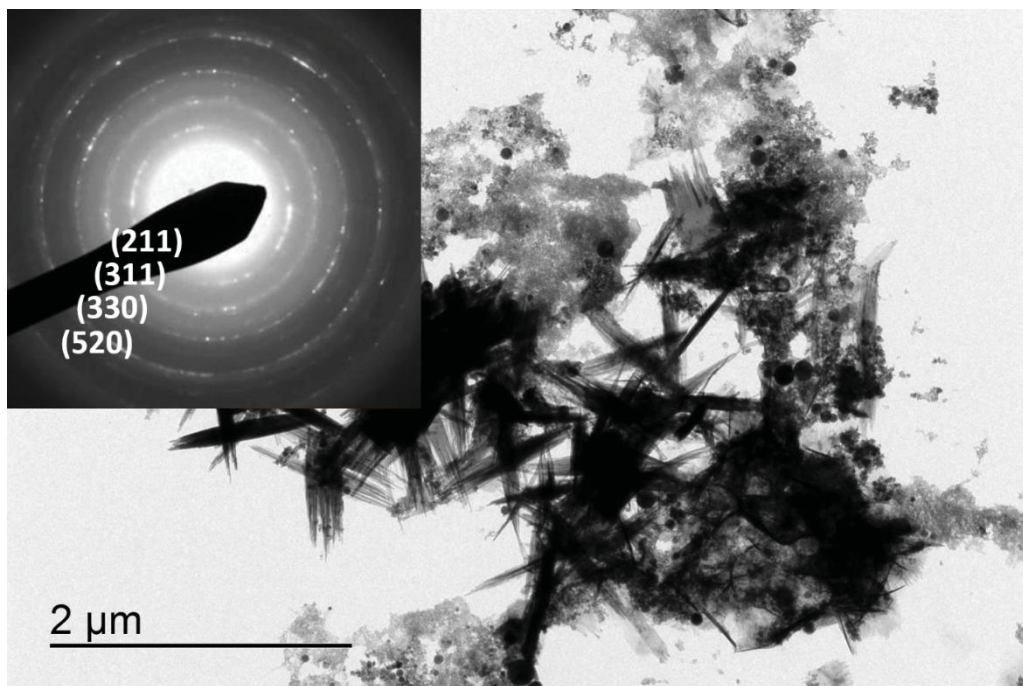


Figura 30 - Imagem por microscopia eletrônica de transmissão e a inserção mostrando o correspondente padrão de difração de elétrons por área selecionada que demonstra a formação de nanoestruturas de óxido de ferro produzidas com o laser de comprimento de onda a laser de 1064 nm, usando uma fluência de $1,3 \text{ J/cm}^2$. Os anéis e pontos de difração são identificados com os índices de Miller dos planos cristalinos e correspondem à fase de Fe_2O_3 (maghemita).

Claramente, as nanoestruturas de óxido de ferro também exibem picos com desvios no espectro Raman distintos daqueles observados para a amostra com nanoestruturas de nitrato de ferro, conforme apresenta o espectro da Figura 31. Vale ressaltar que após uma revisão bibliográfica, verificou-se que a maghemita pode

sofrer uma transição de fase quando submetida a uma potência do laser de 1 mW, cujo parâmetro foi fixado para todas as amostras do presente trabalho. O trabalho de Hanesch M.⁸³ relata o uso do laser em 0,01 mW nas medições por espectroscopia Raman, já que a potência do laser de 1 mW levou à transformação da fase maghemita em uma mistura de fases, maghemita e hematita. Observou-se na referência⁸³ alguns modos de vibração para a maghemita como em 350 cm^{-1} , 512 cm^{-1} , 664 cm^{-1} . Apesar de não termos uma evidência real se as partículas de óxido de ferro do espectro da Figura 31 apresentaram alguma transição de fase durante a análise por espectroscopia Raman, sob a incidência do laser em 1 mW, o principal objetivo dessa análise foi avaliar o comportamento de todas as amostras em uma potência fixa, para fins comparativos. Neste caso, é válido observar através da Figura 31 uma diferença considerável entre o espectro característico das NPs de nitreto de ferro, com relação ao espectro das partículas de óxido de ferro.

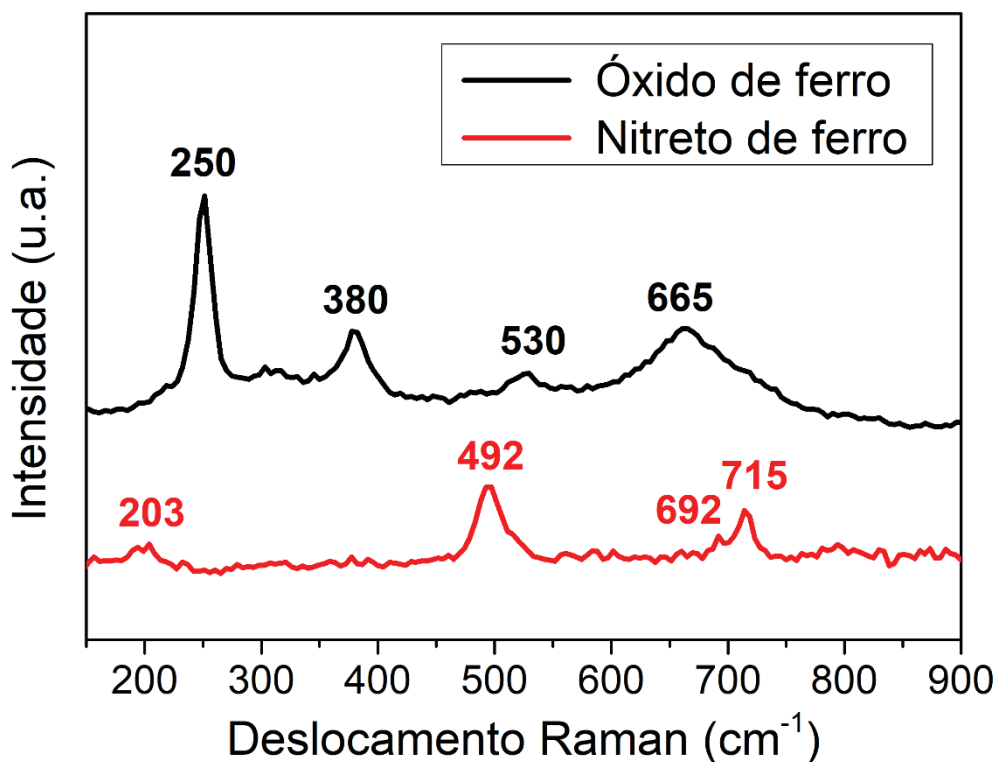


Figura 31 - Espectros Raman comparativos de nanopartículas de nitreto de ferro (amostra S3) e das nanopartículas de óxido de ferro (amostra Fe₂O₃).

Todas as análises por espectroscopia UV-Vis foram realizadas utilizando a concentração dos subprodutos resultantes de cada sessão de preparação por irradiação a laser após diluição em 4 ml de álcool isopropílico para todas as amostras.

Os espectros de UV-Vis das amostras irradiadas por IR, tal como mostra a Figura 32, apresentam máximos de absorção na faixa do comprimento de onda de 300-600 nm. Por outro lado, os espectros de absorção de UV-Vis a partir do álcool isopropílico puro revelam picos abaixo de 300 nm e acima de 870 nm. Portanto, não há contribuições do solvente se sobrepondo às respostas de absorção referentes à NPs em suspensão. Assim, a escolha do álcool isopropílico como líquido, dentro do qual as NPs ficaram em suspensão, favoreceu as análises experimentais das amostras do presente trabalho.

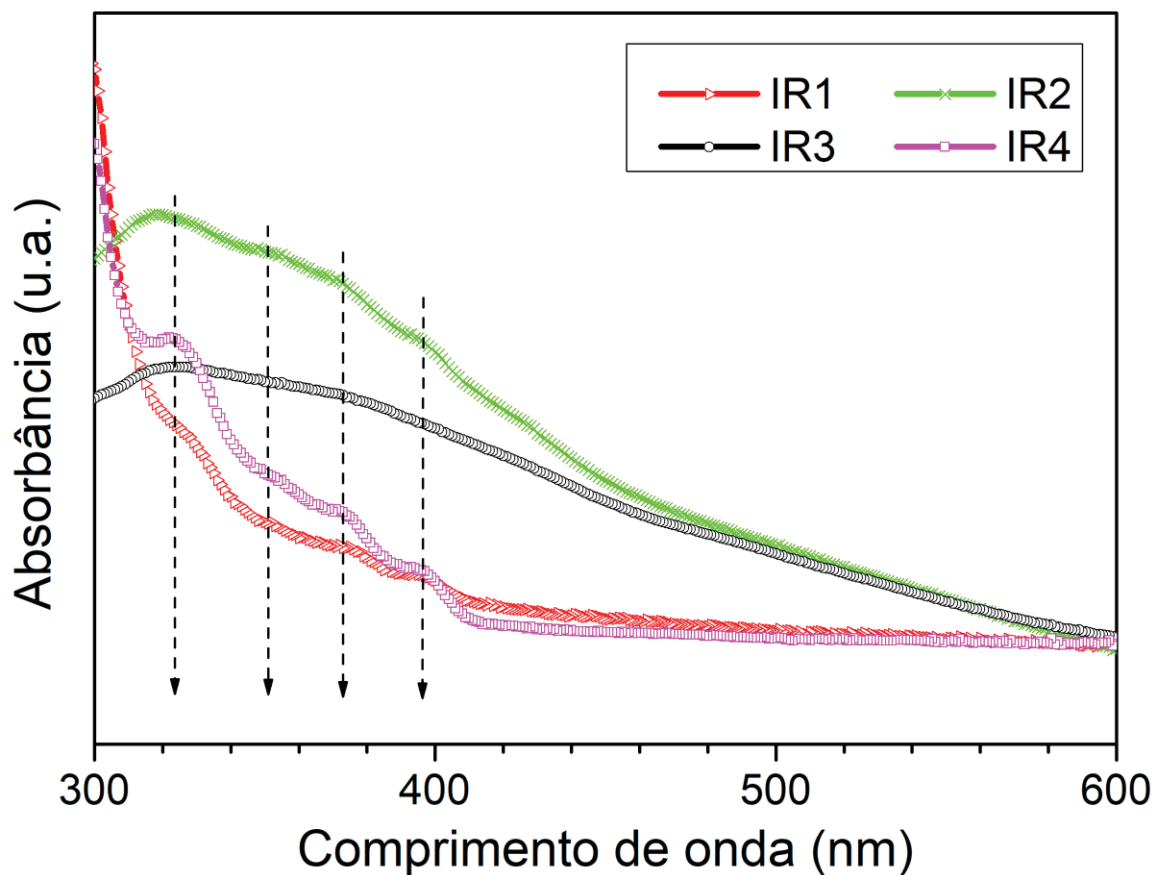


Figura 32 - Espectros de absorção de UV-Vis obtidos a partir de suspensões de nanopartículas em álcool isopropílico das amostras IR1, IR2, IR3 e IR4. As setas verticais tracejadas foram inseridas para indicar as características peculiares e comuns nas curvas de absorção.

As medições de absorbância fornecem uma compreensão qualitativa das influências das partículas pequenas e grandes na absorção da fonte de luz de xenônio, uma vez que se o tamanho das nanopartículas é constante, a absorbância geralmente é diretamente proporcional às concentrações de nanopartículas com grande valor de absorbância em comprimentos de onda maiores, indicando partículas relativamente

grandes na distribuição de tamanho (ver seção 3.3.1 e referência⁸⁴). Assim, a distribuição multimodal de partículas (distribuição de probabilidade contínua com dois ou mais modos) pode, em princípio, ser obtida a partir de espectros de absorvância⁸⁵.

Considerando que as amostras IR3 e IR4 exibem distribuições de tamanho mais amplas na série de amostras de acordo com as análises MET mostradas nas Figura 22 e Figura 23, respectivamente, torna-se evidente que não há correlação direta entre o número e largura de picos de absorvância e as distribuições de tamanho de nanopartículas nessas duas amostras. As amostras IR2 e IR3 (Figura 21 e Figura 22) cujas análises de MET sugerem distribuições de tamanho de partícula bimodal exibem grande absorvância, o que é indicativo de partículas relativamente grandes na distribuição de tamanho. Por outro lado, a amostra IR1 apresenta uma baixa absorvância, corroborando o pequeno tamanho das partículas, com um tamanho médio de 28 nm (Figura 20), observado nas análise de MET. Lembrando que o tamanho médio das partículas são de 28 nm, 82 nm, 29 nm e 214 nm, e 119 nm para as amostras IR1, IR2, IR3 e IR4, sendo que a amostra IR3 possui duas distribuições de tamanho com tamanhos médios de 29 nm e 214 nm. Os espectros de absorção das suspensões no álcool isopropílico não puderam ser explicados em termos de tamanho, principalmente com relação a amostra IR4. Em vez disso, a absorvância também depende da forma da partícula⁸⁶, o que pode ser fator influenciador para a baixa absorvância na amostra IR4, que mostra uma larga distribuição de tamanho, mas com um formato alongado não observado nas demais amostras (Figura 23).

Na faixa de 300 a 450 nm, todas as amostras exibem até quatro picos suaves de absorvância e são amplos em largura, localizados em comprimentos de onda em torno de 320 nm, 350 nm, 370 e 400 nm, conforme indicado pelas setas verticais tracejadas nas Figura 32 e Figura 33. As bandas de ressonância, portanto, provavelmente se originam da oscilação coletiva dos plasmons de superfície das nanopartículas de nitreto de ferro, também observadas nos espectros UV-Vis da Figura 18 de NPs de Fe em água⁷⁷. No entanto, a intensidade de cada banda varia de um espectro para outro (ver setas verticais tracejadas nas Figura 32 e Figura 33), o que pode ser atribuído à complexa interação entre diferentes morfologias e estruturas das nanopartículas de nitreto de ferro em suspensão.

Os tamanhos médios das partículas são de 82 nm, 4 nm, 101 nm e 9 nm para as amostras S1, S2, S3 e S4, respectivamente. Da mesma forma que para as amostras produzidas no IR, a amostra com menor tamanho médio de partículas apresentou, segundo espectro UV-Vis da Figura 33, a mais baixa intensidade de absorção para as NPs pequenas da amostra S2. As amostras produzidas nos comprimentos de onda de 1064 nm (S1) e em 266 nm (S4) exibiram maior absorbância, relacionado à eficiência de produção nesses comprimentos de onda, tamanho e/ou formato das NPs. De fato, a amostra S3 produzida no comprimento de onda de 355 nm apresenta a mais larga distribuição de tamanho dentre as amostras produzidas sob uma fluência fixa de 1 J/cm² (Figura 26). A baixa intensidade de absorção para essa amostra pode vir a indicar uma menor eficiência de produção de NPs nessa amostra, em comparação com a amostra S1. Ainda, não podemos descartar a possibilidade de precipitação rápida das NPs grandes da amostra S3, impedindo que o feixe de luz produzido pela lâmpada de xenônio transmita por todas as partículas da amostra durante a caracterização por UV-Vis.

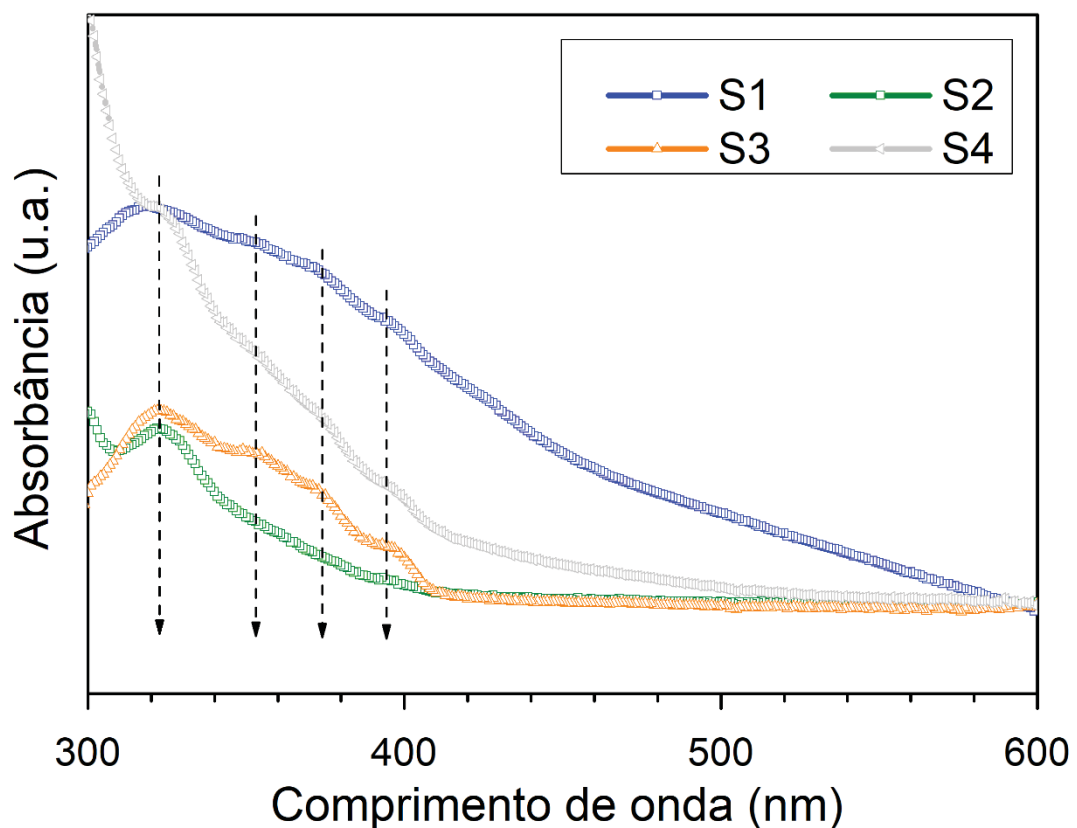


Figura 33 - Espectros de absorção de UV-Vis obtidos a partir de suspensões de nanopartículas em álcool isopropílico das amostras S1, S2, S3 e S4. As setas verticais tracejadas foram inseridas para indicar as características peculiares e comuns nas curvas de absorção.

A formação de nanoestruturas de nitreto de ferro foi corroborada pelas medidas de Raman e UV-Vis, no entanto, essas técnicas não mostram sensibilidade específica às fases formadas.

Além disso, é importante ressaltar que o tamanho médio e a eficiência da formação de nanopartículas em função da fluência e do comprimento de onda da luz laser são tópicos controversos na literatura, mesmo quando se presume que a absorção durante o pulso predomina na ablação à laser com pulsos na escala de nanossegundos⁴³. Nossos dados mostram um tamanho médio mínimo das NPs com o comprimento do laser de 532 nm com fluência de 1,0 J/cm² (Figura 25) e para o laser infravermelho para fluência de 0,7 J/cm² (Figura 20). A absorção relativa mais alta observada, que presumivelmente reflete a uma maior eficiência de ablação, ocorre com a luz do laser de 266 nm por 1,0 J/cm² (Figura 33) e com o laser IR por 0,7 J/cm² (Figura 32).

Considerando as Tabela 5 e Tabela 6 e os resultados reportados neste estudo, foi possível sintetizar três fases distintas de NPs de nitreto de ferro (ζ -Fe₂N, ϵ -Fe₃N e α' -Fe₁₆N₂), potencialmente interessantes em nanotecnologia, pela técnica de irradiação a laser. Através do controle do comprimento de onda e da fluência do laser foi possível identificar a dependência desses parâmetros com o tamanho, a morfologia e as características estruturais de cada amostra de NPs em suspensão em álcool isopropílico. Os resultados obtidos por espectroscopia Raman das amostras de NPs de nitreto de ferro, tanto do grupo IR quanto do grupo S, concordam com os modos de vibração calculados no nosso laboratório e previstos pela literatura, assim como com os resultados indicados por MET. Comparando as intensidades Raman encontradas para a maghemita, os espectros Raman das NPs de nitreto de ferro não mostram similaridade a posição dos picos do óxido de ferro. Nota-se ainda que, para todos os casos investigados, não houve a evidência de oxidação das NPs em suspensão em álcool isopropílico até o período de medidas experimentais das amostras (1 ano). Até quatro bandas de ressonância foram identificadas através das análises por espectroscopia UV-Vis para as amostras do grupo IR e S. Os máximos de absorção evidenciados na faixa de comprimentos de onda de 300-600 nm apresentaram maior intensidade para as amostras IR2 (ou S1) e S4, que possivelmente indicam a uma maior eficiência de síntese para essas amostras.

Tabela 5 - Resumo dos resultados morfológicos e estruturais das amostras sintetizadas no comprimento de onda do laser fixo em 1064 nm.

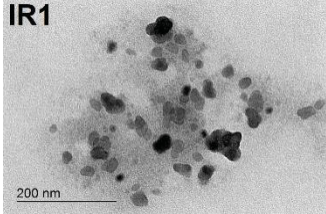
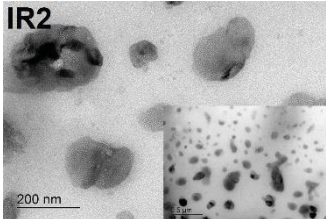
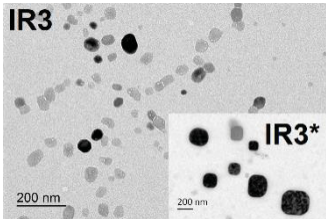
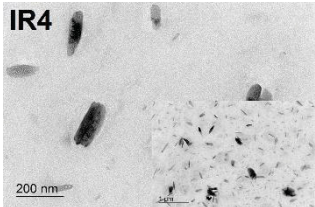
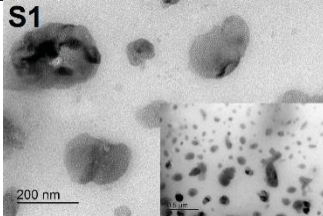
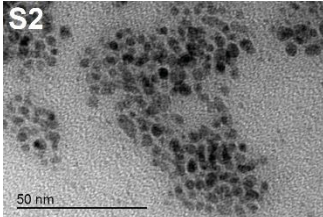
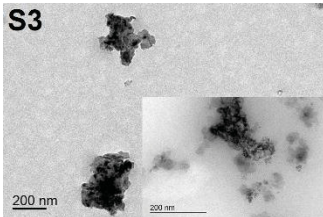
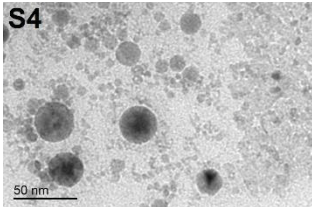
Fluência (J/cm ²)	Amostra	Composição	Tamanho
0,7		$\epsilon\text{-Fe}_3\text{N} + \zeta\text{-Fe}_2\text{N}$	28 nm
1,0		$\epsilon\text{-Fe}_3\text{N} + \alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$	82 nm
1,3		$\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$	29 nm e 214 nm
1,6		$\zeta\text{-Fe}_2\text{N}$	119 nm

Tabela 6 - Resumo dos resultados morfológicos e estruturais das amostras sintetizadas na fluência do laser fixa em 1,0 J/cm².

λ (nm)	Amostra	Composição	Tamanho
1064		α'' -Fe ₁₆ N ₂ + ϵ -Fe ₃ N	82 nm
532		α'' -Fe ₁₆ N ₂	4 nm
355		α'' -Fe ₁₆ N ₂	101 nm
266		ϵ -Fe ₃ N	9 nm

Assumindo como princípio a viabilidade da produção de NPs da fase única α'' -Fe₁₆N₂ por este trabalho, bem como suas características promissoras para aplicações biomédicas^{39,64}, nas próximas seções estudaremos o comportamento dessas NPs *in vivo*. As avaliações possibilitarão informar os níveis de toxicidade das NPs de α'' -Fe₁₆N₂ em diferentes concentrações utilizando um animal invertebrado.

5 TESTES DE TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

Neste capítulo são relatados os testes de toxicidade de NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ em modelo animal realizados no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) com o apoio da Profa. Dra. Priscila Gubert, docente do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE. A autora do presente trabalho acompanhou o desenvolvimento dos testes de toxicidade por meio de áudios, vídeos e reuniões com a Profa. Dra. Priscila Gubert durante todo o período das avaliações.

5.1 *C. ELEGANS* COMO MODELO EM AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS

O modelo animal *Caenorhabditis elegans*, ou simplesmente *C. elegans*, é um nematódeo com 1 mm de comprimento (na fase adulta) encontrado no solo e bastante utilizado para avaliações toxicológicas preliminares de novos compostos farmacêuticos⁸⁷. Em 1963, foi indicado pelo pesquisador Sydney Brenner como organismo modelo para investigações sobre a biologia do desenvolvimento e organização de redes neuronais⁸⁸. Diversos estudos revelam o alto potencial do uso desse nematódeo como modelo alternativo em testes rápidos de toxicidade no solo, água, compostos farmacêuticos, fitoquímicos, em estudos neurotóxicos, de reprodução e de desenvolvimento³⁰.

O nematódeo apresenta-se nas formas sexuais hermafrodita ou macho, sendo o hermafrodita, a forma predominante. Os hermafroditas são capazes de se auto fecundar, ou seja, produzir seus próprios espermatozoides e oócitos podendo gerar aproximadamente 300 ovos por verme⁸⁹. Entretanto, a reprodução sexuada gera um aumento na prole podendo alcançar 1000 ovos por verme. A vida do *C. elegans* inicia-se em uma única célula, que dá origem, através de divisões celulares repetidas a 959 células em hermafroditas adultos e 1.031 células em machos adultos⁸⁸. Estes últimos são relativamente raros, representando cerca de 0,1% da população e diferenciados pelo corpo mais curto e pela cauda que se assemelha a uma barbatana de peixe.

O corpo do verme é essencialmente um tubo e a anatomia do *C. elegans* inclui os seguintes sistemas: sistema alimentar, sistema reprodutor, sistema nervoso e sistema excretor, todos protegidos pela cutícula (Figura 34)³⁰.

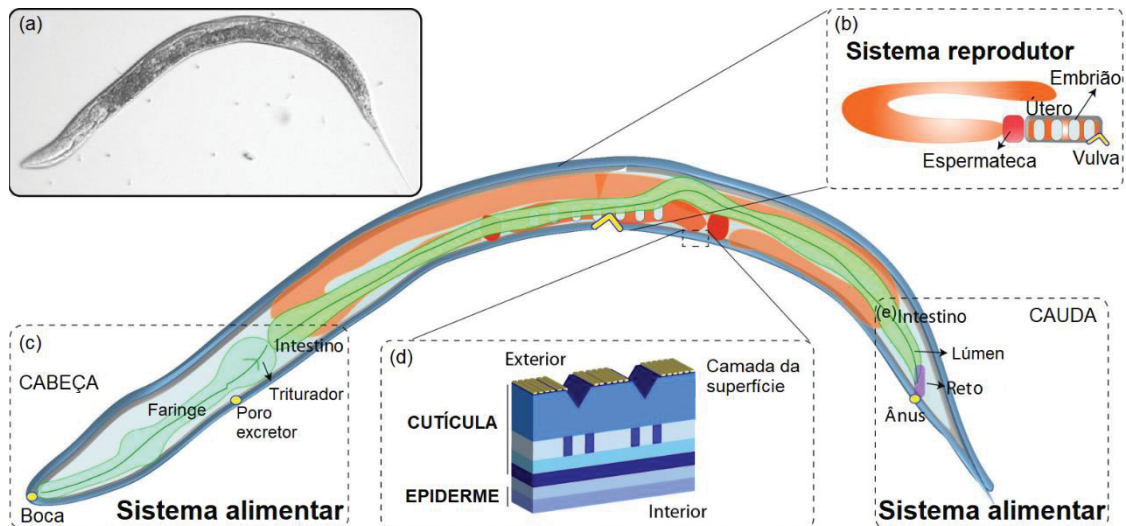


Figura 34 - Anatomia do *C. elegans*. (a) Micrografia óptica do *C. elegans*. Abaixo, temos uma representação esquemática da anatomia de *C. elegans* mostrando as partes de interesse para a avaliação de NPs. (b) O sistema reprodutor é formado por duas gônadas simétricas em forma de U, que são unidas ao útero e a um aparelho de colocação de ovos no meio do corpo. O sistema alimentar em (c) e (e) consiste em boca, intestino faríngeo, reto e ânus. (d) A cutícula é formada por cinco camadas, cuja função é de revestir e proteger os órgãos do nematódeo. Legenda: cutícula e epiderme em azul, sistema alimentar em verde, sistema reprodutor em laranja, pseudoceloma em azul claro, canais de entrada (boca) e saída (poro excretor, vulva, ânus) indicados em amarelo. Imagem adaptada da referência³⁰.

O *C. elegans* não possui sistema circulatório e depende da difusão passiva no líquido pseudocelômico para o transporte de O_2 , CO_2 e nutrientes. A faringe também tem importante função no processo de alimentação do verme, pois como um órgão muscular, ela bombeia o alimento para o interior do tubo digestivo do verme⁹⁰.

São quatro os estágios larvais existentes para o *C. elegans* após a eclosão do ovo, identificados de L1 a L4 e, em seguida, os vermes se tornam adultos reprodutivos (Figura 35). Entretanto, na privação de alimentos ou em condições adversas de temperatura, o verme pode apresentar-se como larva *dauer*, caracterizado por um estágio de “dormência”, que confere maior resistência ao organismo. Quando as condições ambientais adequadas retornam, as *dauers* podem retornar ao desenvolvimento reprodutivo, continuando o desenvolvimento até o estágio L4⁸⁸.

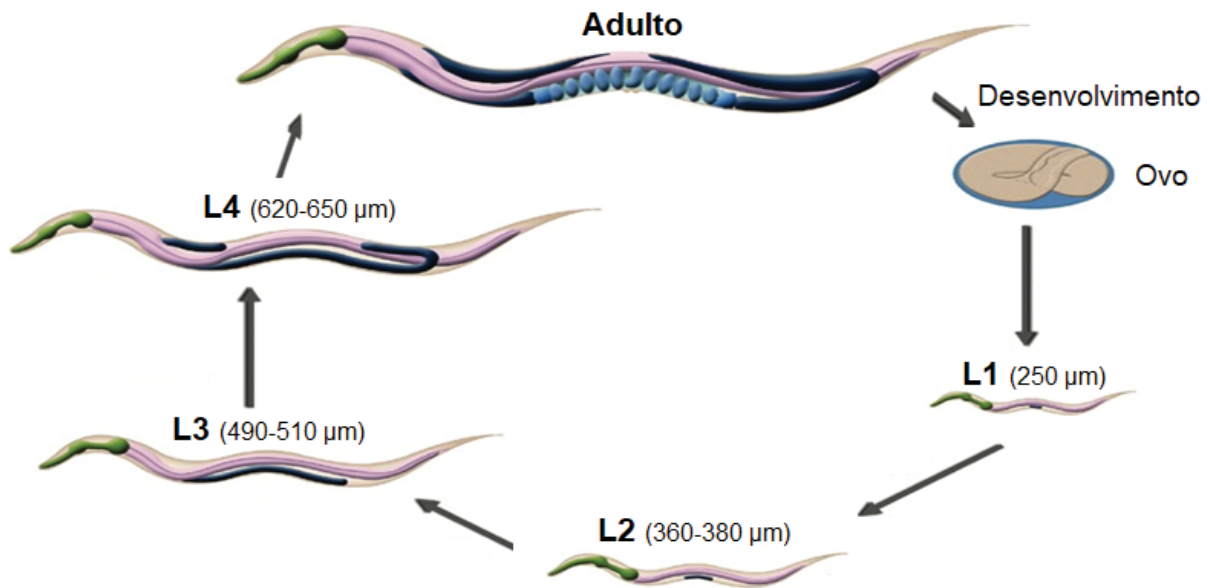


Figura 35 - Ciclo de vida do nematódeo *C. elegans* sob manutenção à 22 °C nos 4 estágios larvares (L1 a L4). As larvas L4 dão origem aos adultos jovens que posteriormente se tornam adultos reprodutivos. Estes sobrevivem por aproximadamente 3 semanas sob ótimas condições. Imagem adaptada da referência⁹¹.

O *C. elegans* possui ciclo de vida curto (~ 3 dias), com prole numerosa (300 filhotes por verme adulto), e manutenção simples, com uma dieta baseada em bactérias, entre elas a *E. coli cepa* OP50⁹². Além disso, este nematódeo possui transparência, o que favorece uma melhor visualização e identificação das estruturas internas, tal como evidencia a Figura 36 (a)-(d). Isso possibilita a visualização de nanoestruturas, por exemplo, por microscopia de contraste de interferência diferencial, em microscopia óptica, por observação direta ou pelo uso de fluorescências, fazendo deste verme um modelo muito interessante e vantajoso para a pesquisa em nanotecnologia.

Por exemplo, as NPs de Fe₂O₃ aparecem marrons ao longo do sistema alimentar do *C. elegans* expostas e azuis se manchadas com corante azul (Prússia), o que confirma a presença de ferro (Figura 36). A espectroscopia UV-Vis pode fornecer resultados colorimétricos, ou seja, para os nematódeos expostos a NPs de ouro (Au), devido as propriedades ópticas das NPs de Au, as suas cores mudam de acordo com o tamanho das NPs. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier também pode auxiliar a caracterizar o comportamento das NPs dentro do verme, enquanto técnicas como microscopia eletrônica de transmissão, microscopia

eletrônica de varredura ou a análise de raios (XRD) seriam úteis para visualizar e avaliar a estabilidade estrutural das NPs dentro do *C. elegans*³⁰.

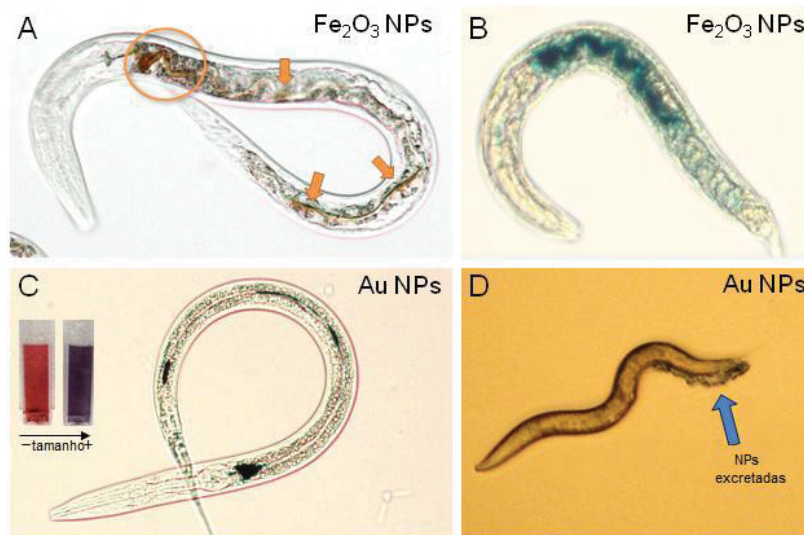


Figura 36 - Imagens de microscopia óptica de NPs de Fe_2O_3 (A e B) e Au (C e D) sendo visualizadas internamente ou externamente ao *C. elegans*. (A) As NPs de Fe_2O_3 podem ser vistos dentro do corpo de vermes em marrom por observação direta. (B) Quando os vermes tratados são corados com o azul da Prússia (uma coloração de ferro), as NPs aparecem em azul e facilitam a visualização. (C) As NPs de Au aparecem em azul no sistema alimentar dos vermes tratados, indicando a agregação dos NPs em relação a suspensão (vermelha) devido à interação com *C. elegans*. (D) Quando o alimento a base de bactérias são reintroduzidos, os vermes excretam as NPs de Au. Figura adaptada da referência³⁰.

O verme foi o primeiro organismo multicelular a ter o genoma sequenciado apresentando homologia genética com genes dos mamíferos, variando entre 60-80%. A partir disso, verificou-se que aproximadamente 36% das proteínas do verme apresentam homólogos humanos, aos quais foram evolutivamente conservadas⁹³. Entretanto, o maior conhecimento sobre o genoma humano possibilitou a realização de mais comparações, resultando em uma elevação do percentual para 83%⁹⁴. A partir desses dados, os processos biológicos envolvidos com o nematódeo *C. elegans* têm potencial a fornecer importantes informações sobre processos biológicos humanos.

A realização de experimentos bem planejados com um modelo alternativo é fundamental para reduzir o número de materiais antes de futuros testes em animais mais complexos (Figura 37). Os ensaios que fornecem informações biológicas úteis a um custo mais baixo utilizando as NPs são de extremo interesse nas diversas áreas da ciência. No entanto, há limitações para estudos mais complexos utilizando o *C. elegans*, pois ele não tem alguns órgãos específicos encontrados em mamíferos e um sistema circulatório³⁰.

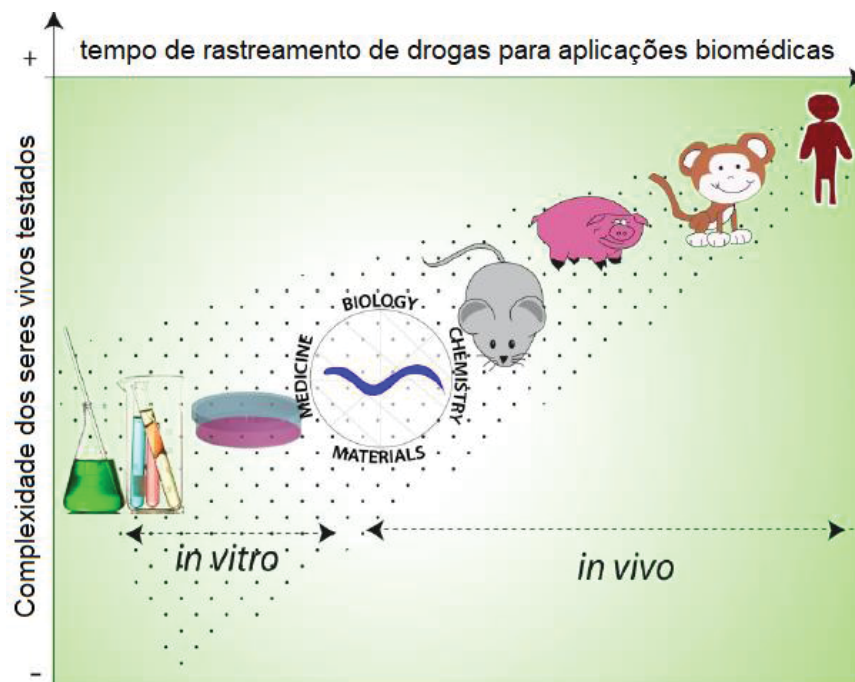


Figura 37 - Metodologias típicas para rastrear drogas, desde processos *in vitro* até uma crescente complexidade dos organismos modelo. Imagem adaptada da referência³⁰.

Esse organismo é crucial para estudos iniciais, pois é o único organismo com todos os neurônios bem caracterizados e conexões nervosas mapeadas⁹⁵. Tais vantagens permitem avaliações rápidas dos efeitos tóxicos de várias substâncias. Do ponto de vista toxicológico, o *C. elegans* é sensível a uma ampla gama de substâncias, incluindo metais pesados, fosfatos orgânicos e pesticidas⁹⁶. Como prova da eficiência em sua utilização, foi realizada uma varredura nas bibliotecas ToxCast™ da Environmental Protection Agency (EPA's), com um total de 968 produtos químicos usados para novos testes toxicológicos com o *C. elegans*. O perfil de toxicidade dos compostos testados nesse estudo em *C. elegans*, especialmente os impactos no desenvolvimento, foram semelhantes aos observados após a exposição a tais substâncias em outros modelos, como em ratos, coelhos e peixe-zebra⁹⁷. Para a avaliação da toxicidade, alguns parâmetros são frequentemente considerados como preditivos do estado saudável do verme, incluindo sobrevivência, progressão dos estágios larvais no tempo correto, frequência de pulsações na faringe (preditivo de taxa de alimentação), ciclos de defecação (processo de excreção), movimento, produção e postura de ovos (comportamento reprodutivo). Tais comportamentos são alterados frente à modificações na liberação de neurotransmissores, vitalidade neuronal, neuropeptídios, mutações gênicas, entre outros³⁰.

O *C. elegans* também tem sido usado com sucesso na avaliação de toxicidade de nanomateriais diferentes, como em NPs de Fe⁹⁸, Al, Ti, Ce, ZnO, Ag, Si, Fe₂O₃³⁰, fulerenos e *quantum dots*⁹⁹. Um exemplo disso é o estudo de investigação *in vivo* da neurotoxicidade de partículas de Telureto de Cádmio¹⁰⁰. Dessa forma, prova-se a aplicabilidade do modelo experimental *C. elegans* para análises de toxicidade. Pode-se observar pela Tabela 7 alguns resultados propostos do comportamento de NPs metálicas nos nematódeos *C. elegans*. A caracterização das NPs, o sistema de análise e a finalidade do estudo também são indicados. Esta servirá de ferramenta comparativa para a análise dos resultados desse trabalho.

Tabela 7 – Exemplos de avaliação *in vivo* de NPs metálicas usando o modelo animal *Caenorhabditis elegans*. Tabela adaptada da referência³⁰.

NPs	Caracterização das NPs		Condição do ensaio			Proposta
	Diâmetro (nm)	Conc. das NPs (mg/L)	Tempo de exposição	Fonte de Comida	Estágio larval	
Ag	1, 28	0,5-10	24, 48, 72 h	sim/não	L2	Toxicidade, dissolução das NPs
	3, 13, 76	0,5-50	tempo de vida	sim	L1	Toxicidade, dissolução das NPs
	51	10-1000	24, 48 h	----	L3	Toxicidade, dissolução das NPs
Al ₂ O ₃	60	10-408	24 h, 5 d	sim	L1	Toxicidade, análise do metal
	60	0,01-23	6, 48 h, 10 d	sim	adulto jovem	Toxicidade
Au	10	12,5 µg	48 h	sim	L3	Toxicidade
	20	7000	30 min	não	adulto jovem	Toxicidade, imagens
Cu	23,5	100 µM	36 h	sim	L1	Biodistribuição, análise do metal
Fe ₂ O ₃	9	0,5-100	24 h	sim	L4	Toxicidade
Fe ₃ O ₄	15	500	30 min	não	adulto jovem	Toxicidade, imagens
MnFe ₂ O ₄	6~8	0,1% (v/v)	4-6 h	não	adulto jovem	Toxicidade, imagens
Pt	2,4	0,1-50 µM	tempo de vida	sim	L4	Atividade biológica

Como foi visto na seção 1 deste trabalho, as NPs magnéticas exibem numerosas aplicações biomédicas. Considerando que nós evidenciamos¹⁴ a alta magnetização de saturação para as NPs da fase α'' -Fe₁₆N₂, justifica-se a escolha desse material para a realização dos testes deste trabalho, que avalia os efeitos toxicológicos de NPs de nitreto de ferro na fase única e metaestável α'' -Fe₁₆N₂ usando o *C. elegans*.

5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS PARA OS TESTES DE TOXICIDADE

As NPs de nitreto de ferro para os testes de toxicidade foram sintetizadas pelo método descrito na seção 2.4, utilizando os mesmos parâmetros de crescimento da amostra IR3. A escolha dos parâmetros justificam-se pelo caráter estrutural e de tamanho bimodal, indicado para a amostra IR3 nas análises morfológicas e estruturais das seções anteriores. Isto favorece uma análise toxicológica ampla das NPs da fase α'' -Fe₁₆N₂, válida tanto para partículas pequenas quanto para as de centenas de nanômetros. Neste caso, o laser no infravermelho irradiou o alvo de ferro submerso por nitrogênio a uma fluência de 1,3 J/cm². A ablação foi feita em tempos e dias intercalados (a partir do dia 20/06/2017) somando um total de dezesseis horas de produção (primeiro dia 5 h, segundo dia 4 h, terceiro dia 7 h), já que as análises posteriores demandavam uma concentração de amostra considerável. Após a evaporação do nitrogênio na superfície do alvo, a amostra coletada ficava em suspensão em solução salina 0,9%. Como o álcool isopropílico não é tolerado pelo *C. elegans*, o NaCl 0,9% foi a melhor opção para deixar as NPs em suspensão, visto que tal solução auxilia no processo de manutenção dos tecidos e células durante a exposição às NPs.

A estabilidade das NPs foi acompanhada por meses, a primeira seção de microscopia foi feita dia 07/2017, a segunda 08/2018, a terceira 09/2018, a quarta 11/2018. Entre os três períodos finais de caracterização por microscopia foram realizadas as avaliações toxicológicas das amostras de nitreto de ferro. Apesar das nanopartículas poderem passar por efeitos corrosivos ou de mudança de fase, causados pelo soro fisiológico, as análises por microscopia de MET e SAED não evidenciaram alteração morfológica ou estrutural das NPs durante o período caracterizado.

As imagens por MET obtidas em espaços de tempo distintos das nanopartículas são apresentadas na Figura 38. Os tamanhos médios medidos sobre um grande conjunto amostral de NPs (Figura 38), indicam uma larga distribuição de tamanho, também evidenciada pela amostra IR3, sintetizada sob as mesmas condições (Figura 22). A caracterização pela técnica de SAED das NPs da Figura 38, indica a formação da fase α'' -Fe₁₆N₂. Conforme mostra a Figura 39, o padrão de SAED exhibe pares de pontos cristalinos bastante simétricos consistentes com os planos cristalográficos indexados como (200), (220), (420), (400), (442) e (440) da estrutura tetragonal α'' -Fe₁₆N₂.

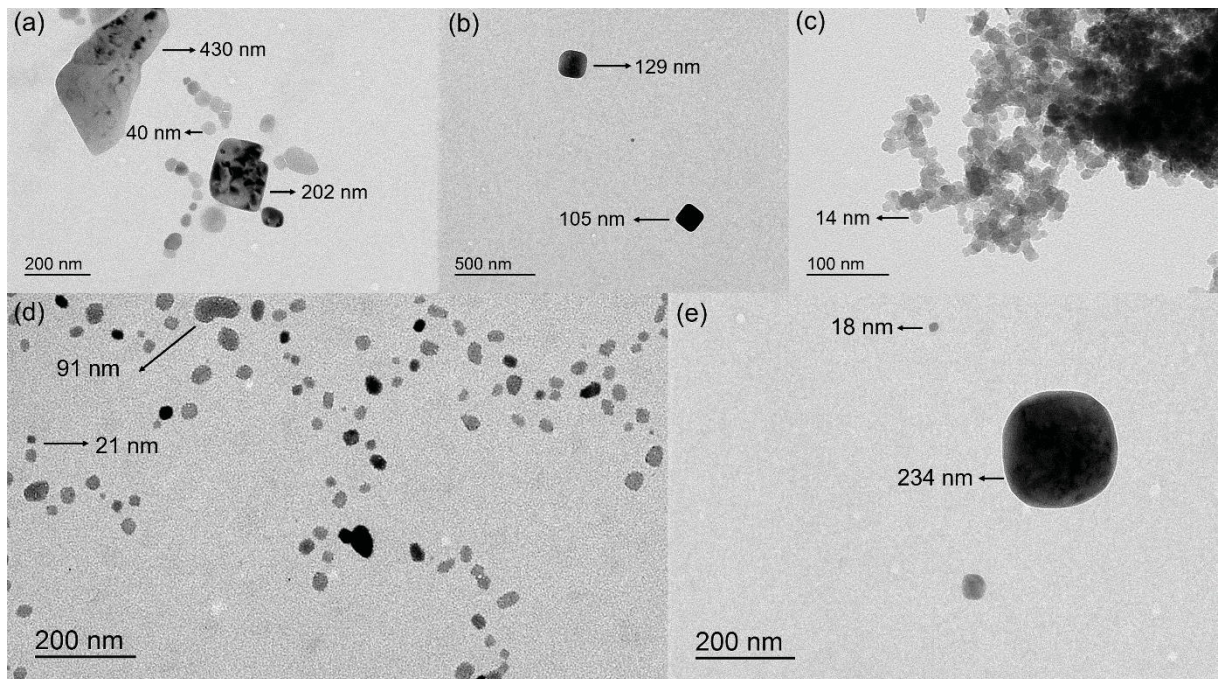


Figura 38 – Micrografias das amostras produzidas para fins de testes de toxicidade, segundo as análises MET realizadas nos períodos de (a)-(c) 07/2017 e (d) e (e) 11/2018.

A amostra das NPs de α'' -Fe₁₆N₂ produzida por dezesseis horas também foi analisado por espectroscopia UV-Vis. Os espectros de absorção óptica foram medidos em um espectrômetro UV-Vis-NIR USB 2000 (*Ocean Optics*). Este equipamento apresenta duas lâmpadas, uma de deutério e outra do tipo alógena de tungstênio, com uma grade de difração que fornecem os comprimentos de onda do ultravioleta ao infravermelho, possibilitando a análise entre 200 nm e 1080 nm.

Os espectros de absorção de UV-Vis obtidos a partir da suspensão das NPs em solução salina são representados na Figura 40. Foi observada a precipitação das NPs de α'' -Fe₁₆N₂ com o tempo de repouso da amostra, possivelmente relacionado às NPs com dimensões de centenas de nanômetros (Figura 38).

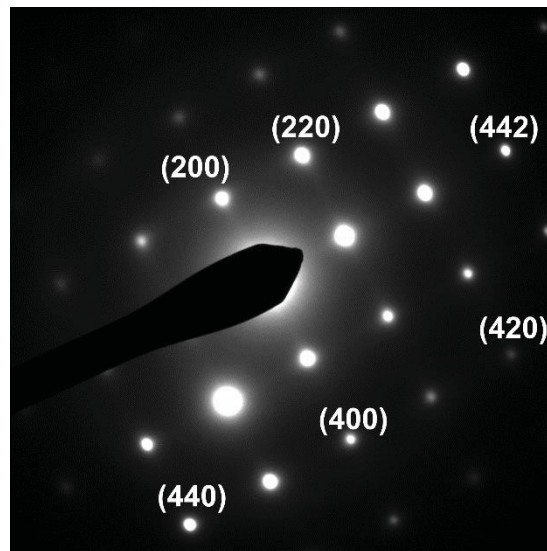


Figura 39 - Imagem de difração de elétrons por área selecionada característica das NPs da Figura 38. Os planos cristalinos indexados no padrão de SAED confirmam a formação da estrutura α'' -Fe₁₆N₂.

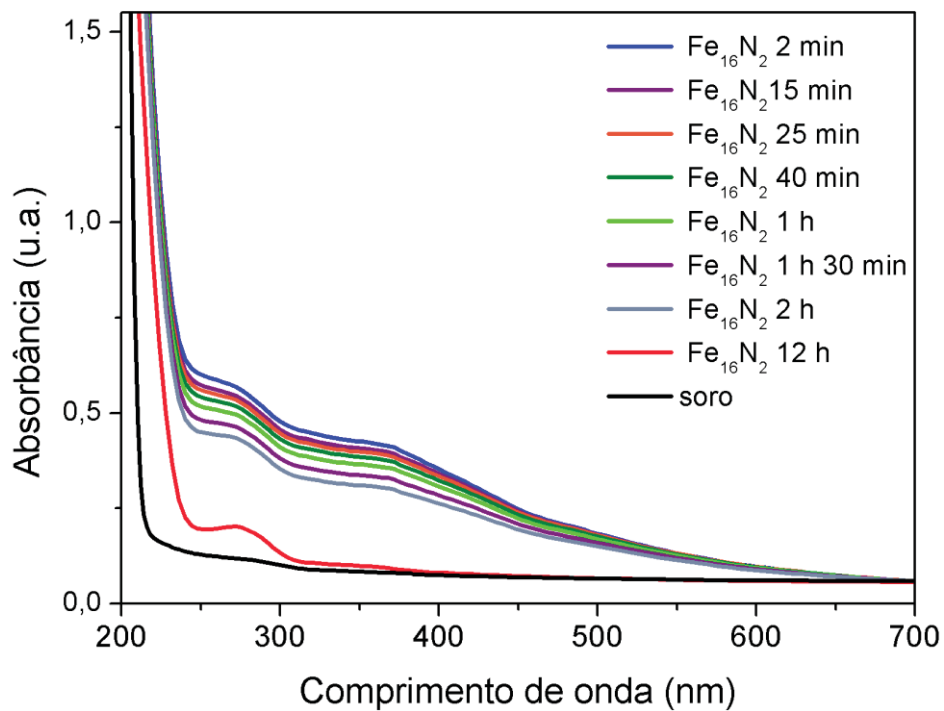


Figura 40 - Espectros de absorção de UV-Vis obtidos a partir de suspensões de NPs de α'' -Fe₁₆N₂ em soro fisiológico (ou solução salina). As setas foram inseridas com os respectivos valores de absorção e comprimento de onda referente a cada pico de absorção.

Os máximos na Figura 40 indicam o valor de absorção das NPs após 2 min de descanso da amostra na cubeta de quartzo, anteriormente agitada em banho de ultrassom. Foi possível obter o valor de concentração das NPs a partir da concentração do soro fisiológico e da equação de Lambert-Beer, apresentada na seção 3.3.2. A concentração obtida utilizando o espectro em azul através do primeiro pico de absorção, com valor de absorbância de 0,57 na Figura 40 é de 43,08 mg/ml, sendo que a concentração do soro fisiológico é de 9 mg/ml.

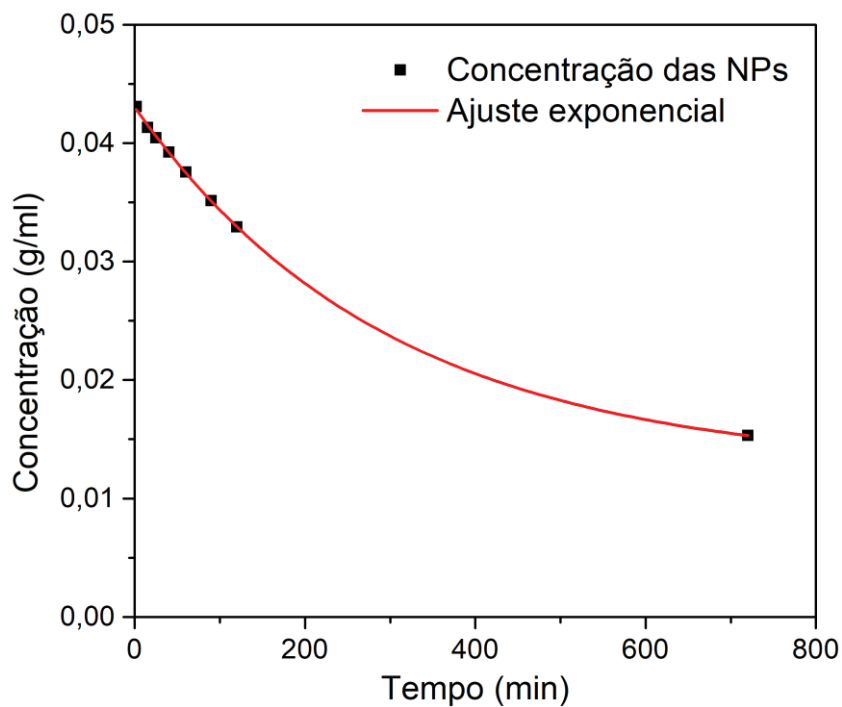


Figura 41 - Relação entre a concentração das NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ com o tempo de repouso da amostra de NPS em suspensão.

Na Figura 39 está representada a relação entre a concentração e o tempo de repouso da amostra para todos os espectros de absorção da Figura 38 das NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ em soro fisiológico. Neste caso, percebe-se que a NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ sintetizadas por irradiação à laser precipitam no soro fisiológico exponencialmente, durante o intervalo de tempo de 2 min à 12 h de repouso na suspensão, após a agitação das NPs por 25 min em banho de ultrassom.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS DAS AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS

5.3.1 Condições do crescimento e desenvolvimento do *C. elegans*

A cepa do tipo selvagem (N2, Bristol) foi adquirida no *Caenorhabditis Genetic Center* (CGC, Universidade de Minnesota). As cepas de *C. elegans* foram geradas e mantidas em condições padrão de cultivo a 20° C em placas de Petri alimentadas pelas bactérias OP50 *Escherichia coli* (*E. coli*) semeadas em meio de crescimento para nematódeos (NGM, *nematode growth medium*: 3 g de NaCl, 2,5 g de peptona, 17 g de ágar e 975 ml de H₂O, autoclavadas; adicionou 1 ml de CaCl₂ 1 M, 1 ml de 5 mg/ml de colesterol em etanol, 1 ml de MgSO₄ 1 M e 25 ml de tampão KPO₄ 1 M), segundo o método descrito na referência⁸⁹.

Para todos os procedimentos de crescimento, os nematódeos foram sincronizados, a fim de garantir toda a população no mesmo estágio larval (L1). Os vermes hermafroditas adultos (grávidos) foram expostos à solução de branqueamento, causando o rompimento do verme e a liberação dos ovos (Figura 42). Os ovos foram coletados por lavagens subsequentes e repousados em recipientes planos contendo apenas a solução tampão M9 (NaCl 5 g L⁻¹, 3 g de KH₂PO₄ 3 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 6 g L⁻¹, 1 mL de MgSO₄ 1M, H₂O para 1 L autoclavado). Na ausência de alimentos, os ovos eclodidos (estágio larval L1) têm crescimento interrompido e podem ser mantidos todos no mesmo estágio⁸⁹. Aproximadamente doze horas após a sincronização, os animais no estágio larval L1 foram expostos ao tratamento com as NPs de α"-Fe₁₆N₂.

5.3.2 Exposição das nanopartículas e monitoramento da sobrevivência

A suspensão de NPs de α"-Fe₁₆N₂ em NaCl a 0,9% foi incubada no banho de ultrassom por 25 min e imediatamente usada no tratamento dos vermes. Os vermes hermafroditas sincronizados no estágio larval L1 foram expostos às concentrações de NPs de α"-Fe₁₆N₂ de 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 7,5 mg/ml e 10 mg/ml, por 1 h¹⁰¹ (Figura 42). As concentrações usadas na curva de sobrevivência foram escolhidas partindo da solução mais concentrada das NPs de α"-Fe₁₆N₂ obtidas durante a síntese (10 mg/ml). Após 1 h de exposição, os vermes foram lavados três

vezes com NaCl (0,9%) por centrifugação (2 min, 2000 rpm) para interromper o tratamento e transferidos (20 - 50 vermes) para placas de Petri de 60 mm contendo meio NGM e *E. coli* OP50. O grupo controle correspondeu aos vermes expostos apenas ao veículo das NPs em suspensão de NaCl (0,9%). Os vermes foram mantidos em uma incubadora sob a temperatura controlada de 20 °C para as posteriores observações experimentais.

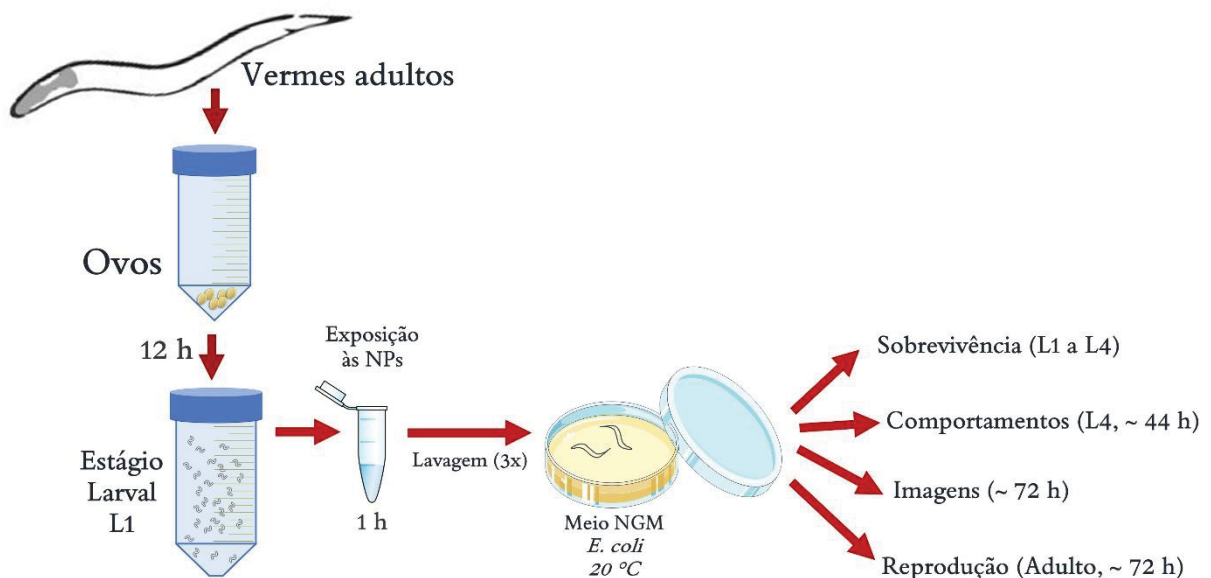


Figura 42 - Esquema ilustrativo para a exposição com as NPs de $\alpha^2\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$. Os animais grávidos foram sincronizados para a obtenção de ovos. Após a eclosão, vermes de mesmo estágio larval (L1) foram expostos às NPs de $\alpha^2\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ por 1 h ou ao veículo NaCl 0,9 % (controle). Os vermes foram lavados por centrifugação e transferidos para placas de petri com NGM e bactéria *E. coli* OP50. As observações comportamentais (L4), reprodução (Adulto), sobrevivência (L1 a L4), desenvolvimento (L1 a L4) e imagens (L1 e L4) foram realizadas em tempos determinados.

Considerando os testes de sobrevivência, os vermes foram contados e classificados como vivos ou mortos após identificação da presença de movimento, batimento faríngeo ou resposta ao toque. A contagem dos vermes foi realizada após o tratamento (dia 1, L1) e nos quatro dias seguintes (dia 4, estágio adulto grávido). A progressão dos estágios larvais foi determinada desde o dia 1 (L1) até o dia 4 (adulto grávido). O tamanho do corpo, o desenvolvimento do órgão sexual (vulva) e a produção de ovos foram considerados para classificar os vermes em L1, L2, L3, L4 e adulto¹⁰². Os ensaios de sobrevivência e desenvolvimento larval foram realizados em três vezes, em diferentes dias e em duplicatas.

5.3.3 Observação comportamental: batimento faríngeo, ciclos de defecação e curvaturas corporais.

Após a interrupção do tratamento, os vermes foram deixados crescer na incubadora (20 °C) até o estágio larval de L4 (dia 3, ~44 h após o tratamento) para avaliações comportamentais. Este estágio foi escolhido pois o verme já está com o sistema nervoso desenvolvido e o tamanho maior facilita as observações. Caso sejam avaliados no estágio larval adulto grávido, a presença de nematódeos em L1 (recém eclodidos) podem interferir nas avaliações. As taxas de alimentação foram medidas considerando a frequência de batimentos na faringe do verme segundo protocolo estabelecido¹⁰³. Resumidamente, as contrações do bulbo faríngeo foram contadas em vermes L4 sobre o alimento por 10 s em triplicatas. Foram observados seis vermes de cada condição de tratamento. As médias de contração foram normalizadas por minuto para análises estatísticas. O intervalo entre as defecações foi utilizado como parâmetro de toxicidade, no qual o intervalo entre as contrações intestinais representa uma medida indireta do tráfego intestinal. Esse processo foi registrado três vezes para seis vermes em contato com as bactérias¹⁰³. A avaliação do movimento consistiu na contagem de duas voltas na cabeça, que representam uma curvatura do corpo. Cerca de dez vermes L4 foram transferidos individualmente para uma placa NGM (100 mm) sem bactéria e deixados por 1 minuto para a ambientação. A mudança de direção da cabeça foi registrada por 20 segundos. A média da contagem foi normalizada para um minuto para a análise estatística. Cada experiência foi repetida três vezes em duplicadas a 22 °C ± 2 °C.

5.3.4 Perfil reprodutivo

Os vermes adultos grávidos (dia 4) foram utilizados para acessar o perfil reprodutivo, uma vez que os vermes L4 ainda não apresentam ovos. Para o ensaio de postura de ovos, dez vermes de cada condição de tratamento foram transferidos individualmente para uma nova placa NGM semeada com *E. coli* OP50 e deixados por 2 horas^{103,104}. Em seguida, cada verme foi retirado da placa e desprezado, restando apenas os ovos. A placa foi incubada por 24 horas a 20 °C, e o número de vermes em estágio larval L1 eclodidos vivos foi registrado, como um método para a contagem dos ovos postos por verme. A avaliação do número de ovos dentro do útero é denominada

ovoprodução. Dez vermes por grupo foram estourados com a solução de branqueamento, e os ovos liberados passaram pela contagem. Cada ensaio foi repetido três vezes em duplicatas na temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o *GraphPad InStat*® (versão 5.0 para *Macintosh OSX*, *GraphPad Software*, San Diego, CA). As diferenças significativas entre as médias foram avaliadas pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida por comparação *post-hoc* com o teste de Bonferroni.

A ANOVA é uma ferramenta estatística bastante utilizada para testar a igualdade de três ou mais médias populacionais, capaz de examinar diferenças observadas nas médias dos grupos. A análise *post-hoc* é uma etapa usualmente realizada após a ANOVA, já que este procedimento estatístico é utilizado para analisar padrões nos dados que não foram determinados anteriormente. Já o teste de Bonferroni, tem como objetivo ajustar o valor de significância do teste baseado no número de comparações para diminuir a chance de erro¹⁰⁵.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES DAS AVALIAÇÕES TOXICOLÓGICAS

5.4.1 Sobrevivência e desenvolvimento larval

Ensaio de sobrevivência podem ser usados para acessar a toxicidade de novos compostos. Testamos a viabilidade do *C. elegans* exposto às NPs de α - Fe_{16}N_2 por 1 h no estágio larval de L1. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos controle e tratados, conforme mostra a Figura 43. Mesmo na maior concentração testada, de 10 mg/ml de NPs de α - Fe_{16}N_2 , não houve indícios de mortalidade dos *C. elegans* expostos (Figura 43). Se compararmos com as concentrações utilizadas para os testes de toxicidade indicados na Tabela 7, a concentração de 10 mg/ml é superior. Diferentemente de outros modelos animais, não há um protocolo padrão usado para a avaliação da toxicidade de NPs. Neste estudo, adaptamos o tempo de tratamento (1 h) para os vermes em L1, pois os mesmos não

podem ficar um tempo excessivo sem comida para que o estágio larval *dauer* não seja ativado, assim como sistemas antioxidantes. O sistema de tratamento foi escolhido devido à pequena quantidade disponível de amostra de NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$. Ressaltamos também que a bactéria *E. coli* não foi adicionada durante o tratamento para evitar que a mesma metabolizasse as NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ antes que o verme pudesse acessá-las.

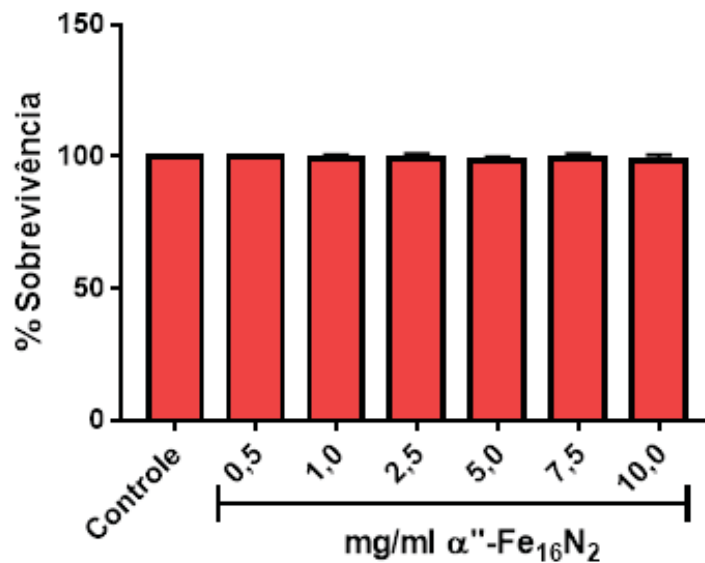


Figura 43 - Curva concentração-resposta da sobrevivência do *C. elegans* após da exposição aguda às NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$. Animais sincronizados no estágio larval L1 foram expostos por 1 h, lavados e transferidos para placas NGM contendo bactéria *E. coli* OP50. Os vermes vivos e mortos foram contabilizados diariamente até o estágio larval L4. Os resultados foram apresentados em porcentagem da média de animais vivos \pm SEM (Erro padrão da média) de cinco experimentos independentes em duplicata. Nenhuma diferença estatística foi observada comparando os grupos ao controle (NaCl 0,9 %) por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni.

Além disso, avaliamos a progressão dos estágios larvais, a qual ocorre em tempos estabelecidos como mostra a Figura 44. As NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ não alteraram significativamente o desenvolvimento do *C. elegans* (Figura 44). Sendo assim, nas condições de tratamento utilizadas, as NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ não geraram toxicidade.

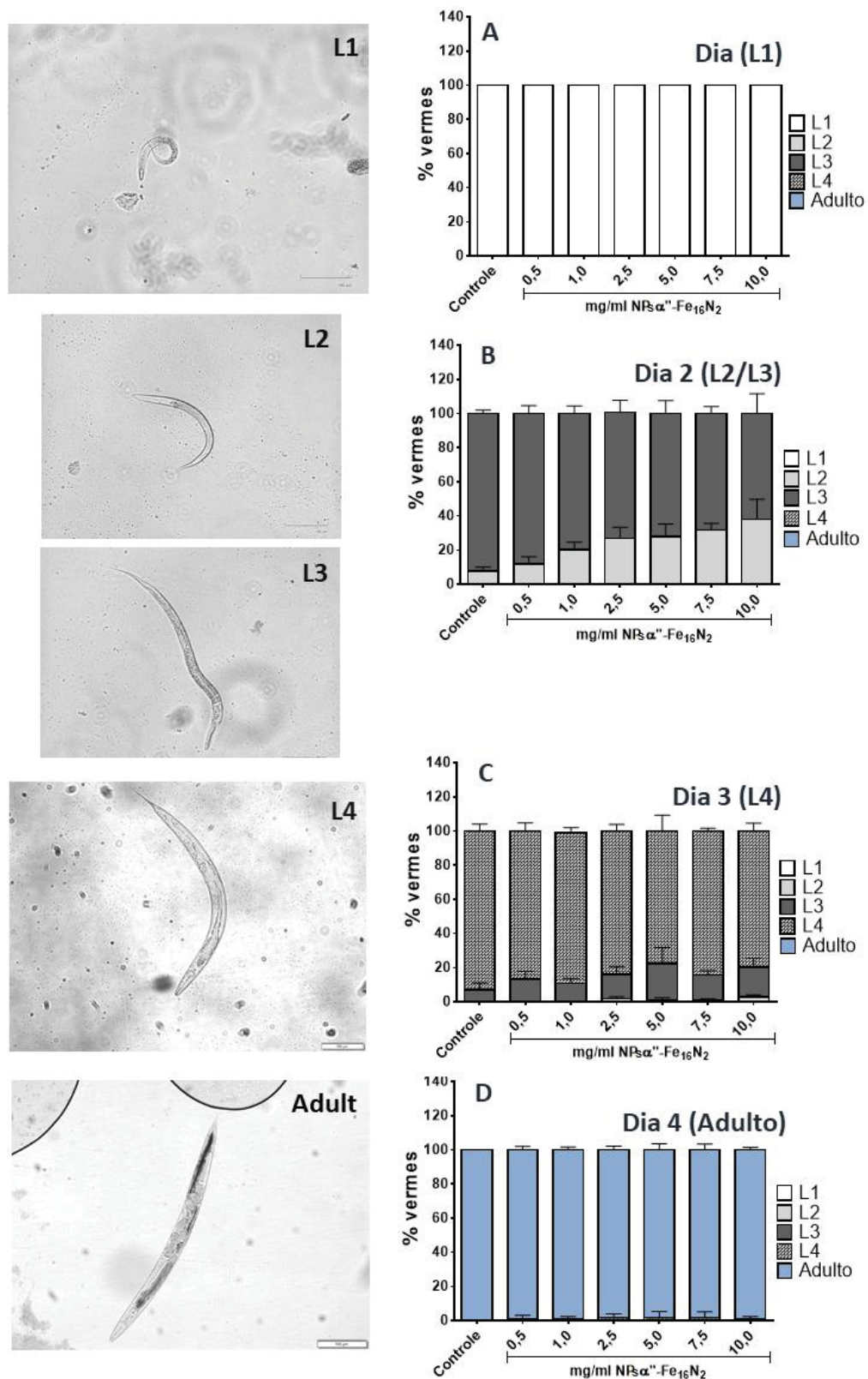


Figura 44 - Desenvolvimento larval do *C. elegans* após a exposição às NPs de $\alpha\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$. Animais sincronizados no estágio larval L1 foram expostos por 1 h, lavados e transferidos para placas NGM contendo bactéria *E. coli* OP50. Os estágios larvais foram avaliados diariamente: dia 1 (A), dia 2 (B), dia 3 (C) e dia 4 (D). Os resultados foram apresentados em porcentagem da média de animais em cada estágio larval \pm SEM (Erro padrão da média). Nenhuma diferença estatística foi observada

comparando os grupos ao controle (NaCl 0,9 %) por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni. Os gráficos representam a média de 5 experimentos realizados em duplicatas.

5.4.2 Batimento faríngeo, ciclos de defecação e movimento

O comportamento do *C. elegans* pode ser afetado por substâncias tóxicas como metais, pesticidas e drogas^{30,106}. Conforme a Figura 45, a exposição às NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ não modificou significativamente os ciclos de defecação e movimentos do *C. elegans* nas concentrações testadas.

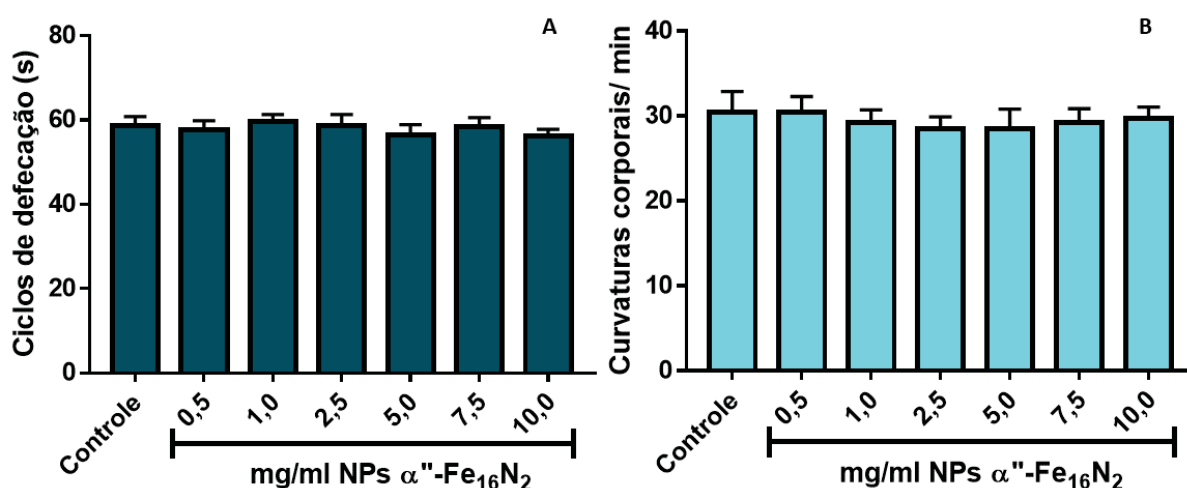


Figura 45 - As NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ não modificaram os comportamentos de movimento e ciclos de defecação no *C. elegans*. Animais sincronizados no estágio larval L1 foram expostos por 1 h, lavados e transferidos para placas NGM contendo bactéria *E. coli* OP50. Os ciclos de defecação (A) e curvaturas corporais (B) foram observadas em vermes no estágio larval L4 (44 h). Três tempos entre as defecações foram considerados e as curvaturas observadas por 20 s. Os resultados representam a média \pm SEM (Erro padrão da média) de três experimentos independentes, n=6. Nenhuma diferença estatística foi observada comparando os grupos ao controle (NaCl 0,9 %) por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni.

O comportamento alimentar pode ser caracterizado pelas contagens de batimento faríngeo que ocorre no segundo bulbo da faringe (Figura 46 (a)). A frequência dos batimentos aumentou significativamente apenas na menor concentração testada (0,5 mg/ml de NPs de $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$, $p < 0,05$, Figura 46). Nesse sentido, a exposição gerou um aumento na frequência alimentar do verme.

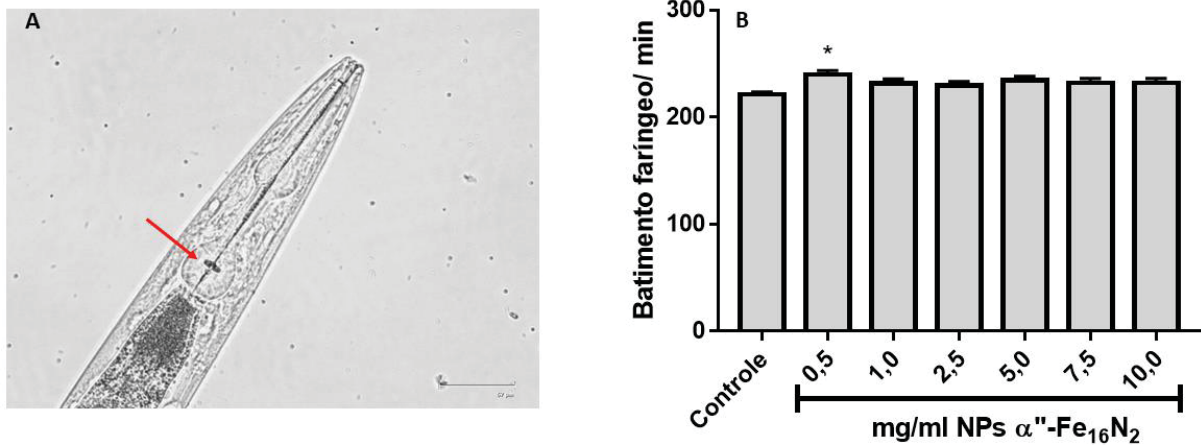


Figura 46 - Comportamento alimentar do *C. elegans* após a exposição às NPs de α -Fe₁₆N₂. Animais sincronizados no estágio larval L1 foram expostos por 1 h, lavados e transferidos para placas NGM contendo bactéria *E. coli* OP50. O segundo bulbo da faringe indicado em (A) e a contagem de batimentos faríngeos (B) foram observados em vermes no estágio larval L4 por 10 s e normalizados para 1 min. O asterisco* indica a significância estatística ($p < 0.05$) por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni. Seis vermes são verificados em cada experimento e os ensaios realizados quatro vezes.

5.4.3 Perfil reprodutivo

A reprodução de *C. elegans* pode ser avaliada através da contagem de ovos dentro do útero (Figura 47 (a)), o que indica o ovo produzido por vermes. Além disso, é possível verificar o número de ovos depositados (Figura 47 (c)), que infere a eficiência da contração especializada dos músculos específicos que abrem a vulva e permitem que os ovos sejam expelidos. Avaliamos os dois parâmetros em *C. elegans* expostos às NPs de α -Fe₁₆N₂. A produção de ovos (Figura 47 (b)) foi reduzida a partir de 0,5 mg/ml de NPs de α -Fe₁₆N₂ ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. A redução foi mais evidenciada nas concentrações mais altas de NPs de α -Fe₁₆N₂ (1,0, 2,5, 7,5 mg/ml, $p < 0,01$; 5,0 e 10,0, $p < 0,0001$; Figura 47 (b)). Já o número de ovos postos foi reduzido significativamente apenas na concentração mais alta testada (10,0 mg/ml).

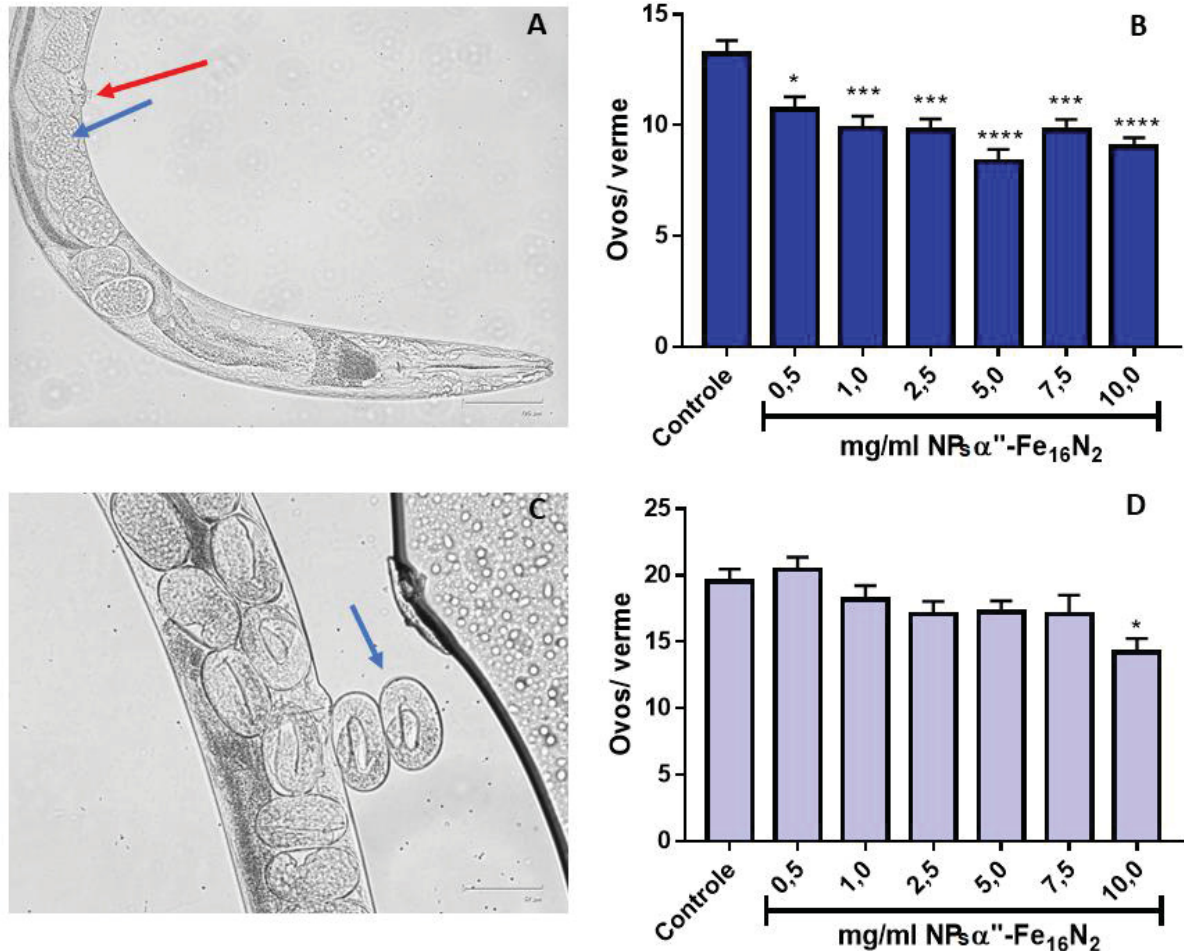


Figura 47 - Modificações reprodutivas após a exposição do *C. elegans* às NPs de α - Fe_{16}N_2 . Os animais sincronizados no estágio larval L1 foram expostos por 1 h, lavados e transferidos para placas NGM contendo bactéria *E. coli* OP50. A reprodução foi observada em vermes adultos (dia 1,72 h após o tratamento). Ovos dentro do útero (ovoprodução) e (B) e ovos postos (D) foram contados. A flecha vermelha indica a posição da vulva (A) e as azuis, os ovos (C). Seis vermes foram individualmente observados em três diferentes experimentos. Data foram apresentados em média \pm SEM (Erro padrão da média). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ indicam diferenças significativas comparando os grupos tratados ao grupo controle por ANOVA de uma via seguida de teste de Bonferroni.

Os mecanismos inerentes das alterações no comportamento reprodutivo são multifatoriais incluindo modificações na sinalização de neurotransmissores e dinâmicas metabólicas, visto que os ovos são formados a partir do direcionamento de nutrientes⁹⁶. Os neurotransmissores controlam a postura dos ovos, a exemplo da serotonina que estimula a postura de ovos pela regulação nas células vulvares¹⁰⁷. Além disso, alterações sutis no desenvolvimento podem gerar modificações na reprodução. Ainda que não significativo, observamos a presença de alguns vermes em estágio larval atrasado durante as avaliações de desenvolvimento o que poderia justificar a redução na produção de ovos (Figura 44). Como a determinação do perfil

reprodutivo gera menos subjetividades, alterações sutis no desenvolvimento podem ser identificadas. A redução na reprodução também foi observada após a exposição a outras NPs metálicas como as NPs de Au¹⁰⁸. Mesmo sem avaliação da absorção e bioacumulação (ainda sendo processada), a redução no perfil reprodutivo denota que houve uma resposta induzida pelas NPs de α'' -Fe₁₆N₂ no *C. elegans*, ou seja, uma ação endógena.

Em suma, o presente estudo é bastante promissor sugerindo uma fraca interação nano-biológica no *C. elegans*, pois não houve redução significativa na sobrevivência, ou alterações no desenvolvimento, no perfil alimentar, excreção e movimento. Sendo assim, os resultados da avaliação toxicológica norteiam a condução de futuras investigações das propriedades farmacológicas das NPs α'' -Fe₁₆N₂ em modelos experimentais mais complexos.

6 CONCLUSÕES

Nanoestruturas de nitreto de ferro cristalinas foram produzidas por ablação a laser usando o modo fundamental e os modos harmônicos do laser pulsado de Nd:YAG. Diferentes fluências de laser no alvo de ferro metálico imerso em nitrogênio líquido foram testadas. Em especial, demonstrou-se a viabilidade de produção por processo de etapa única de nanoestruturas monofásicas de α'' -Fe₁₆N₂, ϵ -Fe₃N e ζ -Fe₂N ajustando o comprimento de onda e a fluência do laser de acordo com o interesse.

Foi possível produzir nanoestruturas de α'' -Fe₁₆N₂ com fluências do laser de 1,0 J/cm² usando os comprimentos de onda de 355 nm e 532 nm. No entanto, no que se refere ao melhor controle da fase de α'' -Fe₁₆N₂ e tamanho das NPs, a amostra obtida com uma fluência de 1,3 J/cm² sob irradiação do alvo de ferro com laser IR de 1064 nm destacou-se.

As nanoestruturas de ζ -Fe₂N foram produzidas com fluências mais baixas do IR do laser Nd: YAG e suas morfologias mostram formas irregulares ao lado das formas tipo plaquetas com tamanhos na escala nanométrica. Com a fluência fixa de 1,0 J/cm², os maiores comprimentos de onda do laser permitem controlar o perfil de tamanho e a dispersão das nanoestruturas produzidas. Nesta fluência do laser também foi possível obter NPs esféricas de até 30 nm de diâmetro na fase única ϵ -Fe₃N, mediante irradiações do alvo de ferro com o laser em 266 nm.

As nanoestruturas de nitreto de ferro produzidas foram coletadas e armazenadas por períodos de vários meses em suspensão no álcool isopropílico e solução salina. Em ambos os casos, as nanopartículas em suspensão e também em agregados suportados sobre superfícies de carbono e de ouro expostos a feixes de elétrons e laser demonstraram-se altamente estáveis, sem quaisquer evidências experimentais de mudanças em suas estequiometrias e suas estruturas cristalinas.

Dessa forma, o método de produção de nanopartículas de nitretos de ferro utilizado neste trabalho demonstrou-se bastante eficaz para obtenção de fases complexas de nitreto de ferro e inclusive metaestáveis, como a α'' -Fe₁₆N₂.

Em particular, nanopartículas de α'' -Fe₁₆N₂ foram obtidas em diversas amostras deste trabalho mediante diferentes combinações de comprimentos de onda e fluências

de laser. Essas nanoestruturas em particular apresentam inúmeras propriedades de interesse tecnológico que ainda não se converteram em produtos tecnológicos devido à dificuldade e custo de sua produção, que é comumente alcançada por processos complexos de nitretação multipassos.

Neste trabalho, demonstramos, além da obtenção de nanopartículas de α "-Fe₁₆N₂, também a viabilidade concreta de seu emprego em nanomedicina. A avaliação toxicológica das nanopartículas de α "-Fe₁₆N₂ no modelo animal *C. elegans* mostrou que as mesmas não induziram letalidade no verme, bem como não alteraram o movimento, defecação, desenvolvimento larval e comportamento alimentar. A produção de ovos pelo *C. elegans* foi comprometida pela exposição às NPs de α "-Fe₁₆N₂. Tais resultados sugerem que às NPs de α "-Fe₁₆N₂ são altamente promissoras para testes experimentais em modelos experimentais superiores. Além disso, mais estudos são necessários para avaliar as vias responsáveis pelos efeitos observados, incluindo a reprodução. Os estudos de carreamento magnético de fármacos *in vivo* serão desenvolvidos como desdobramentos deste trabalho, visando a geração de produto tecnológico.

Finalmente, destacamos que este trabalho vem também eliminar uma lacuna na literatura sobre a produção de nanoestruturas de nitreto de ferro por ablação a laser em um ambiente saturado com nitrogênio e incentivar o uso dessa técnica para a produção simples e em uma etapa desses nanomateriais com tão alto interesse tecnológico.

REFERÊNCIAS

1. Sharma, G. Kumar, A. Sharma, S. Naushad, M. Dwivedi, R. P. AlOthman, Z. A. Mola, G. T. Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: A review. *J. King Saud Univ. - Sci.* **31**, 257–269 (2019).
2. Singh, A. K. *Engineered Nanoparticles: Structure, Properties and Mechanisms of Toxicity*. (2015).
3. Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab. J. Chem.* (2017). doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011
4. Bhattacharyya, S. Iron nitride family at reduced dimensions: A review of their synthesis protocols and structural and magnetic properties. *J. Phys. Chem. C* **119**, 1601–1622 (2015).
5. Balogun, M.-S. Qiu, W. Wang, W. Fang, P. Lu, X. Tong, Y. Recent advances in metal nitrides as high-performance electrode materials for energy storage devices. *J. Mater. Chem. A* **3**, 1364–1387 (2015).
6. Lu, X. Liu, T. Zhai, T. Wang, G. Yu, M. Xie, S. Ling, Y. Liang, C. Tong, Y. Li, Y. Improving the Cycling Stability of Metal-Nitride Supercapacitor Electrodes with a Thin Carbon Shell. *Adv. Energy Mater.* **4**, 1300994 (2014).
7. Li, Z., Fang, Y., Zhang, J. & Lou, X. W. (David). Necklace-Like Structures Composed of Fe₃N@C Yolk–Shell Particles as an Advanced Anode for Sodium-Ion Batteries. *Adv. Mater.* **30**, 3–7 (2018).
8. Zheng, J. Yang, R. Chen, W. Xie, L. Li, X. Chen, C. Iron nitride thin films deposited by chloride assisted plasma enhanced chemical vapour deposition: facile stoichiometry control and mechanism study. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42**, 185209 (2009).
9. WU, Y. Effects of lattice mismatch strain on Fe₈N-Fe₁₆N₂ phase transformation and aging process. (University of Minnesota, 2010).
10. Schaaf, P. Laser nitriding of metals. *Prog. Mater. Sci.* **47**, 1–161 (2002).

11. Mi, W. B. Feng, X. P. Duan, X. F. Yang, H. Li, Y. Bai, H. L. Microstructure, magnetic and electronic transport properties of polycrystalline γ' -Fe₄N films. *Thin Solid Films* **520**, 7035–7040 (2012).
12. Brazhkin, V. V. Metastable phases , phase transformations , and phase diagrams in physics and chemistry. *Physics-Uspekhi* **49**, 719–724 (2006).
13. Yamashita, S. Masubuchi, Y. Nakazawa, Y. Okayama, T. Tsuchiya, M. Kikkawa, S. Crystal structure and magnetic properties of α'' -Fe₁₆N₂ containing residual α -Fe prepared by low-temperature ammonia nitridation. *J. Solid State Chem.* **194**, 76–79 (2012).
14. Gubert, G. Ribeiro, E. Varalda, J. Bezerra, A.G. Schreiner, W.H. Mosca, D.H. Laser irradiation of iron, cobalt, and nickel targets in liquid nitrogen: A facile approach for nitride nanoparticle fabrication of ferromagnetic transition metals. *J. Alloys Compd.* **725**, 519–525 (2017).
15. Yu, P. Wang, L. Sun, F. Zhao, D. Tian, C. Zhao, L. Liu, X. Wang, J. Fu, H. Three-dimensional Fe₂N@C microspheres grown on reduced graphite oxide for lithium-ion batteries and the Li storage mechanism. *Chem. - A Eur. J.* **21**, 3249–3256 (2015).
16. Li, H. Liu, H. Zhou, L. Wu, X. Pan, Y. Ji, W. Zheng, B. Zhang, Q. Zhuang, X. Zhu, X. Wang, X. Duan, X. Pan, A. Strain-Tuning Atomic Substitution in Two-Dimensional Atomic Crystals. *ACS Nano* **12**, 4853–4860 (2018).
17. Schaaf, P. Laser nitriding of metals. *Prog. Mater. Sci.* **47**, 1–161 (2002).
18. Stein, J. Schacherl, R. E. Jung, M. Sairamudu M. Rheingans, B. Mittemeijer, E. J. Solubility of nitrogen in ferrite; the Fe–N phase diagram. *Int. J. Mater. Res.* **104**, 1053–1065 (2013).
19. Minagawa, M., Yanagihara, H., Kishimoto, M. & Kita, E. Synthesis of ϵ -Fe_xN (2 ≤ x ≤ 3) Submicron Particles and the Diffusion Mechanism of Nitrogen Atoms. *Mater. Trans.* **51**, 2173–2176 (2010).
20. Patsalas, P. Kalfagiannis, N. Kassavetis, S. Abadias, G. Bellas, D.V. Lekka, Ch Lidorikis, E. Conductive nitrides: Growth principles, optical and electronic properties, and their perspectives in photonics and plasmonics. *Mater. Sci. Eng.*

- R Reports* **123**, 1–55 (2018).
21. Eklund, P., Kerdsongpanya, S. & Alling, B. Transition-metal-nitride-based thin films as novel energy harvesting materials. *J. Mater. Chem. C* **4**, 3905–3914 (2016).
 22. Xu, Y., Wang, J., Shen, L., Dou, H. & Zhang, X. One-Dimensional Vanadium Nitride Nanofibers Fabricated by Electrospinning for Supercapacitors. *Electrochim. Acta* **173**, 680–686 (2015).
 23. Achour, A. Lucio-Porto, R. Chaker, M. Arman, A. Ahmadpourian, A. Soussou, M.A. Boujtita, M. Le Brizoual, L. Djouadi, M.A. Brousse, T. Titanium vanadium nitride electrode for micro-supercapacitors. *Electrochem. commun.* **77**, 40–43 (2017).
 24. Hanumantha, P. J. Datta, M. K. Kadakia, K. Okoli, C. Patel, P. Kumta, P. N. Vanadium nitride supercapacitors: Effect of Processing Parameters on electrochemical charge storage behavior. *Electrochim. Acta* **207**, 37–47 (2016).
 25. Hultman, L. Thermal stability of nitride thin films. *Vacuum* **57**, 1–30 (2000).
 26. Resano-Garcia, A., Battie, Y., Koch, A., En Naciri, A. & Chaoui, N. Influence of the laser light absorption by the colloid on the properties of silver nanoparticles produced by laser ablation in stirred and stationary liquid. *J. Appl. Phys.* **117**, 113103 (2015).
 27. Amendola, V. & Meneghetti, M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 3805 (2009).
 28. Xiong, Y., Lu, X. & Nanostructures, M. *Metallic Nanostructures*. (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-11304-3
 29. Ruppert, E. E., Fox, R. S. & Barnes, R. D. *Zoologia dos Invertebrados: Uma Abordagem Funcional-Evolutiva*. (2005).
 30. Gonzalez-Moragas, L., Roig, A. & Laromaine, A. C. elegans as a tool for *in vivo* nanoparticle assessment. *Adv. Colloid Interface Sci.* **219**, 10–26 (2015).
 31. Tessier, F. Navrotsky, A. Niewa, R. Leineweber, A. Jacobs, H. Kikkawa, S.

- Takahashi, M. Kanamaru, F. DiSalvo, F. J. Energetics of binary iron nitrides. *Solid State Sci.* **2**, 457–462 (2000).
32. Jiao, W. Chen, C. You, W. Zhang, J. Liu, J. Che, R. Yolk–Shell Fe/Fe₄N@Pd/C Magnetic Nanocomposite as an Efficient Recyclable ORR Electrocatalyst and SERS Substrate. *Small* **15**, 1–13 (2019).
 33. Rajaji, U., Muthumariyappan, A., Chen, S. M., Chen, T. W. & Ramalingam, R. J. A novel electrochemical sensor for the detection of oxidative stress and cancer biomarker (4-nitroquinoline N-oxide) based on iron nitride nanoparticles with multilayer reduced graphene nanosheets modified electrode. *Sensors Actuators, B Chem.* **291**, 120–129 (2019).
 34. Huang, W. & Wang, X. Preparation and properties of ϵ -Fe₃N-based magnetic fluid. *Nanoscale Res. Lett.* **3**, 260–264 (2008).
 35. Yu, M., Xu, Y., Mao, Q., Li, F. & Wang, C. Electromagnetic and absorption properties of nano-sized and micro-sized Fe₄N particles. *J. Alloys Compd.* **656**, 362–367 (2016).
 36. Dong, G.-F. Frictional and Stable Properties of Fe₈N Magnetic Lubrications. in *International Conference on Mechanics and Materials Engineering (ICMME 2014)* 617–622 (2014).
 37. Shibata, M., Ogawa, T. & Kawashita, M. Synthesis of iron nitride nanoparticles from magnetite nanoparticles of different sizes for application to magnetic hyperthermia. *Ceram. Int.* **45**, 23707–23714 (2019).
 38. Yu, M., Xu, Y., Mao, Q., Li, F. & Wang, C. Electromagnetic and absorption properties of nano-sized and micro-sized Fe₄N particles. *J. Alloys Compd.* **656**, 362–367 (2016).
 39. Shibata, M., Ogawa, T. & Kawashita, M. Synthesis of iron nitride nanoparticles from magnetite nanoparticles of different sizes for application to magnetic hyperthermia. *Ceram. Int.* **45**, 23707–23714 (2019).
 40. Lang, J., Laurent, Y., Maunaye, M. & Marchand, R. Nitrides—Structures and crystal growth. *Prog. Cryst. Growth Charact.* **2**, 207–235 (1979).
 41. Ningthoujam, R. S. & Gajbhiye, N. S. Synthesis, electron transport properties of

- transition metal nitrides and applications. *Prog. Mater. Sci.* **70**, 50–154 (2015).
42. Feng, W. J. Li, D. Li, W.F. Ma, S. Li, Y.B. Xiong, D.K. Zhang, W.S. Zhang, Z.D. Structure and magnetic properties of Cr(N)– β -Cr₂N nanoparticles prepared by arc-discharge. *J. Alloys Compd.* **425**, 4–9 (2006).
 43. Yang, G. *Laser Ablation in Liquids: Principles and Applications in the Preparation of Nanomaterials*. (2012).
 44. Xiao, J., Liu, P., Wang, C. X. & Yang, G. W. External field-assisted laser ablation in liquid: An efficient strategy for nanocrystal synthesis and nanostructure assembly. *Prog. Mater. Sci.* **87**, 140–220 (2017).
 45. Takada, N., Sasaki, T. & Sasaki, K. Synthesis of crystalline TiN and Si particles by laser ablation in liquid nitrogen. *Appl. Phys. A* **93**, 833–836 (2008).
 46. Amendola, V. & Meneghetti, M. What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution? *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 3027–3046 (2013).
 47. Mortazavi, S. Z., Parvin, P., Reyhani, A., Golikand, A. N. & Mirershadi, S. Effect of Laser Wavelength at IR (1064 nm) and UV (193 nm) on the Structural Formation of Palladium Nanoparticles in Deionized Water. *J. Phys. Chem. C* **115**, 5049–5057 (2011).
 48. Stafe, M., Marcu, A. & Puscas, N. N. *Pulsed Laser Ablation of Solids. Romanian Reports in Physics* **53**, (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
 49. Fornarini, L., Colao, F., Fantoni, R., Lazic, V. & Spizzicchino, V. Calibration analysis of bronze samples by nanosecond laser induced breakdown spectroscopy: A theoretical and experimental approach. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **60**, 1186–1201 (2005).
 50. Chakif, M. Prymak, O. Slota, M. Heintze, E. Gurevich, E. L. Esen, C. Bogani, L. Epple, M. Ostendorf, A. Impact of solvent mixture on iron nanoparticles generated by laser ablation. in *SPIE Proceedings* (eds. Parak, W. J., Osinski, M. & Yamamoto, K. I.) **8955**, 895507 (2014).
 51. Yang, G. W. Laser ablation in liquids: Applications in the synthesis of nanocrystals. *Prog. Mater. Sci.* **52**, 648–698 (2007).

52. Park, H. Reddy, D. A. Kim, Y. Lee, S. Ma, R. Kim, T. K. Synthesis of Ultra-Small Palladium Nanoparticles Deposited on CdS Nanorods by Pulsed Laser Ablation in Liquid: Role of Metal Nanocrystal Size in the Photocatalytic Hydrogen Production. *Chem. - A Eur. J.* **23**, 13112–13119 (2017).
53. Niu, K. Y. Yang, J. Kulinich, S. A. Sun, J. Li, H. Du, X. W. Morphology Control of Nanostructures via Surface Reaction of Metal Nanodroplets. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9814–9819 (2010).
54. Zeng, H. Du, X.-W. Singh, S. C. Kulinich, S. A. Yang, S. He, J. Cai, W. Nanomaterials via laser ablation/irradiation in liquid: A review. *Adv. Funct. Mater.* **22**, 1333–1353 (2012).
55. David B. Williams. & Carter, C. B. *Transmission electron microscopy. A Textbook for Materials Science* (2009).
56. Fultz, B. & Howe, J. *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials.* (2001).
57. Wang, Z. L. Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies. *J. Phys. Chem. B* **104**, 1153–1175 (2000).
58. Jacob, L. & Aldrich, L. T. An Introduction to Electron Optics. *Am. J. Phys.* **20**, 58–58 (1952).
59. Balogun, M.- S. Yu, M. Huang, Y. Li, C. Fang, P. Liu, Y. Lu, X. Tong, Y. Binder-free Fe₂N nanoparticles on carbon textile with high power density as novel anode for high-performance flexible lithium ion batteries. *Nano Energy* **11**, 348–355 (2015).
60. Kurian, S. Bhattacharyya, S. Desimoni, J. Blancá E. L. P., Rebaza, A. V. G. Gajbhiye, N. S. Investigation of γ' -Fe₄N-GaN nanocomposites: Structural and magnetic characterization, Mössbauer spectroscopy and Ab initio calculations. *J. Phys. Chem. C* **114**, 17542–17549 (2010).
61. Dirba, I. Fe₃N_x Thin Films and Nanoparticles: from Intrinsic Properties Towards Magnetic Applications. (2017).
62. Sun, X., Wang, M. & Ma, Y. Q. 2D ϵ -Fe₃N nano-sheet and 1D Fe₃O₄/Fe₃N heterogeneous nano-chain: The directing agent for the BiOCl growth. *Appl. Surf.*

- Sci.* **465**, 1019–1027 (2019).
63. Minagawa, M., Yanagihara, H., Kishimoto, M. & Kita, E. Synthesis of ϵ -Fe_xN ($2 \leq x \leq 3$) Submicron Submicron Particles and the Diffusion Mechanism of Nitrogen Atoms. *Mater. Trans.* **51**, 2173–2176 (2010).
 64. Namiki, Y. Matsunuma, S. Inoue, T. Koido, S. Tsubota, A. Kuse, Y. Tada, N. Magnetic Nanostructures for Biomedical Applications : An Iron Nitride Crystal / Cationic Lipid Nanocomposite for Enhanced Magnetically Guided RNA Interference in Cancer Cells. in *Nanocrystal* 349–372 (2011).
 65. Ahmed, W. & Jackson, M. J. *Emerging nanotechnologies for manufacturing. Emerging Nanotechnologies for Manufacturing* (2014). doi:10.1016/B978-0-323-28990-0.00018-X
 66. Williams, S. & Imre, D. G. Raman Spectroscopy : Time-Dependent Pictures. *J. Phys. Chem.* **95**, 3363–3374 (1988).
 67. Ando, R. A. Espectroscopia Vibracional, Raman Ressonante e Eletrônica de Nitroderivados em Sistemas Conjugados. 1-30 (2005).
 68. Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds.* (2009).
 69. Koniakhin, S. V. Utesov, O. I. Terterov, I. N. Siklitskaya, A. V. Yashenkin, A. G. Solnyshkov, D. Raman Spectra of Crystalline Nanoparticles: Replacement for the Phonon Confinement Model. *J. Phys. Chem. C* **122**, 19219–19229 (2018).
 70. Chertihin, G. V, Andrews, L. & Neurock, M. Reactions of Laser-Ablated Iron Atoms with Nitrogen Atoms and Molecules. Matrix Infrared Spectra and Density Functional Calculations of Novel Iron Nitride Molecules. *J. Phys. Chem.* **100**, 14609–14617 (1996).
 71. Zhang, Y., Xie, Y., Zhou, Y., Wang, X. & Pan, K. Well dispersed Fe₂N nanoparticles on surface of nitrogen-doped reduced graphite oxide for highly efficient electrochemical hydrogen evolution. *J. Mater. Res.* **32**, 1770–1776 (2017).
 72. Chakravarty, S. Kumar, N. Panda, K. Ravindran, T. R. Panigrahi, B. K. Dash, S. Tyagi, A. K. Amarendra, G. The influence of nitrogen concentration on

- microstructure and ultra-low friction behaviour of Fe-N thin films. *Tribol. Int.* **74**, 62–71 (2014).
73. Yin, W. Lei, L. Jiang, X. Liu, P. Liu, F. Li, Y. Peng, F. He, D. High pressure synthesis and properties studies on spherical bulk ϵ -Fe₃N. *High Press. Res.* **34**, 317–326 (2014).
74. Rafique, M. Shaikh, A. J. Rasheed, R. Tahir, M. B. Bakhat, H. F. Rafique, M. S. Rabbani, F. A Review on Synthesis, Characterization and Applications of Copper Nanoparticles Using Green Method. *Nano* **12**, (2017).
75. Mourdikoudis, S., Pallares, R. M. & Thanh, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* **10**, 12871–12934 (2018).
76. Owen, T. Summary for Policymakers. in *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (ed. Intergovernmental Panel on Climate Change) 1–30 (Cambridge University Press, 1996). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
77. Klačanová, K. Fodran, P. Šimon, P. Raptá, P. Boča, R. Jorík, V. Migliorini, M. Kolek, E. Čaplovič, L. Formation of Fe(0)-nanoparticles via reduction of Fe(II) compounds by amino acids and their subsequent oxidation to iron oxides. *J. Chem.* **2013**, (2013).
78. Scientific, T. Brochure - Evolution 201 Spectrometer. 1–12 (2016).
79. Scientific, T. UV-Vis transformed. 1–9 (2010).
80. Widenmeyer, M., Hansen, T. C. & Niewa, R. Formation and Decomposition of Metastable α'' -Fe₁₆N₂ from in situ Powder Neutron Diffraction and Thermal Analysis. *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemie* **639**, 2851–2859 (2013).
81. Kazakevich, P. V., Yares'ko, P. S., Kazakevich, V. S. & Kamynina, D. A. Gold nanoparticle production by laser ablation in liquid nitrogen medium followed by cryogenic medium substitution with ethanol. *Bull. Lebedev Phys. Inst.* **41**, 269–274 (2014).
82. Exciting code. Disponível em: <http://exciting-code.org/>. Acessado em: 08/2019.
83. Hanesch, M. Raman spectroscopy of iron oxides and (oxy) hydroxides at low

- laser power and possible applications in environmental magnetic studies. *Geophysical Journal International* **177**, 941–948 (2009).
84. Doak, J., Gupta, R. K., Manivannan, K., Ghosh, K. & Kahol, P. K. Effect of particle size distributions on absorbance spectra of gold nanoparticles. *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures* **42**, 1605–1609 (2010).
 85. Segets, D., Gradl, J., Taylor, R. K. & Vassilev, V. Absorbance Spectra for the Determination of ZnO Nanoparticle Size Distribution, Solubility. *ACS Nano* **3**, 1703–1710 (2009).
 86. Muller, O., Dengler, S., Ritt, G. & Eberle, B. Size and shape effects on the nonlinear optical behavior of silver nanoparticles for power limiters. *Appl. Opt.* **52**, 139–149 (2013).
 87. Leung, M. C. K. Williams, P. L. Benedetto, A. Au, C. Helmcke, K. J. Aschner, M. Meyer, J. N. *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol. Sci.* **106**, 5–28 (2008).
 88. Sulston, J. E. & Hodgkin, J. *The Nematode Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Laboratory* **52**, 1–667 (1988).
 89. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71–94 (1974).
 90. Gonzalez-Moragas, L., Roig, A. & Laromaine, A. C. *elegans* as a tool for in vivo nanoparticle assessment. *Adv. Colloid Interface Sci.* **219**, 10–26 (2015).
 91. Wormatlas. Disponível em: <https://www.wormatlas.org/>. Acessado em: 11/2019.
 92. Hope, I. A. *C. elegans: A Practical Approach*. (1999).
 93. Consortium, T. C. E. S. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science*. **282**, 2012–2018 (1998).
 94. Lai, C., Chou, C., Ch, L., Liu, C. & Lin, W. Identification of Novel Human Genes Evolutionarily Conserved in *Caenorhabditis elegans* by Comparative Proteomics. *Cold Spring Harb. Lab. Press* **10**, 703–713 (2000).
 95. Cook, S. J. Jarrell, T. A. Brittin, C. A. Wang, Y. Bloniarz, A. E. Yakovlev, M. A. Nguyen, K. C.Q. Tang, L. T.H. Bayer, E. A. Duerr, J. S. Bülow, H. E. Hobert, O. Hall, D. H. Emmons, S. W. Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis*

- elegans* sexes *Nature* **571**, 63–71 (2019).
96. Gubert, P. Pundel, B. Lehmen, T. Fessel, J.P. Cheng, P. Bornhorst, J. Trindade, L.S. Avila, D.S. Aschner, M. Soares, F.A.A. Metabolic effects of manganese in the nematode *Caenorhabditis elegans* through DAergic pathway and transcription factors activation. *Neurotoxicology* **67**, 65–72 (2018).
 97. Boyd, W. A. Smith, M. V. Co, C. A. Pirone, J. R. Rice, J. R. Shockley, K. R. Freedman, J. H. Developmental effects of the ToxCast™ phase I and phase II chemicals in *Caenorhabditis elegans* and corresponding responses in Zebrafish, Rats, and Rabbits. *Environ. Health Perspect.* **124**, 586–593 (2016).
 98. Yang, Y. & Lin, Y. Toxicity-based toxicokinetic / toxicodynamic assessment of bioaccumulation and nanotoxicity of zerovalent iron nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. **12**, 4607–4621 (2017).
 99. Ma, H., Bertsch, P. M., Glenn, T. C., Kabengi, N. J. & Williams, P. L. Toxicity of manufactured zinc oxide nanoparticles in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.* **28**, 1324–1330 (2009).
 100. Zhao, Y., Wang, X., Wu, Q., Li, Y. & Wang, D. Quantum dots exposure alters both development and function of D-type GABAergic motor neurons in nematode *Caenorhabditis elegans* †. *Toxicology Research* **4**, 399-408 (2015).
 101. Avila, D. S. Benedetto, A. Au, C. Manarin, F. Erikson, K. Soares, F. A. Rocha, J. B. T. Aschner, M. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1903–1910 (2012).
 102. Gubert, P. Aguiar, G. C. Mourão, T. Bridi, J. C. Barros, A. G. Soares, F. A. Romano-Silva, M. A. Behavioral and Metabolic Effects of the Atypical Antipsychotic Ziprasidone on the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **8**, 1–15 (2013).
 103. Wang, M. C., O'Rourke, E. J. & Ruvkun, G. Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. *Science*. **322**, 957–960 (2008).
 104. Schafer, W. R., Kenyon, C. J. A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **375**,

- 73-78 (1995).
105. Fukuchi, R. K. Análise de Variância (ANOVA). Disponível em: https://rstudio-pubs-static.s3.amazonaws.com/201742_ba0f209e7e2c47619342c0112d616e7a.html. Acessado em: 11/2019.
 106. Avila, D., Helmcke, K. & Aschner, M. The *Caenorhabditis elegans* model as a reliable tool in neurotoxicology. *Hum. Exp. Toxicol.* **31**, 236–243 (2012).
 107. Shyn, S. I., Kerr, R. & Schafer, W. R. Serotonin and Go Modulate Functional States of Neurons and Muscles Controlling *C. elegans* Egg-Laying Behavior. *Curr. Biol.* **13**, 1910–1915 (2003).
 108. Hu, C. C. Wu, G. H. Lai, S.- F. Shanmugam, M. M. Hwu, Y. Wagner, O. I. Yen, T. J. Toxic Effects of Size-tunable Gold Nanoparticles on *Caenorhabditis elegans* Development and Gene Regulation. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).

APÊNDICE

1. Trabalhos e publicações produzidos

A) Trabalhos Apresentados

Apresentação Oral no(a) **XVIII Brazil MRS Meeting 2019**, 2019. (Congresso)
Iron nitride nanoparticles synthesized by laser irradiation at different laser wavelengths.

Apresentação de Poster / Painel no(a) **I WORKSHOP DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**, 2018. (Outra)
Nitride nanoparticles synthesized by laser irradiation in liquid nitrogen.

Apresentação Oral no(a) **XVII Brazilian MRS meeting**, 2018. (Congresso)
Formation of Cr₂N nanoparticles by pulsed laser irradiation of a chromium target immersed in liquid nitrogen.

Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVI Brazilian MRS Meeting**, 2017. (Congresso)
Magnetic nitride nanoparticles synthesized by laser ablation in liquid nitrogen.

Apresentação de Poster / Painel no(a) **Encontro de Física 2016**, 2016. (Congresso)
Nitride nanoparticles of ferromagnetic metals (Fe, Co and Ni) synthesized by laser ablation in liquid nitrogen.

B) Publicações

Artigos completos publicados em periódicos

1. **GUBERT, G.**; OLIVEIRA, R. C.; COSTA, D. S.; METZGER, G. K.; MAZZARO, I.; KELLERMANN, G.; RIBEIRO, E.; VARALDA, J.; MOSCA, D. H.
Single-step formation of Cr₂N nanoparticles by pulsed laser irradiation. JOURNAL OF APPLIED PHYSICS. , v.125, p.024301 - , 2019.

Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: <http://https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.5070149>[doi:10.1063/1.5070149]

2. **GUBERT, G.**; RIBEIRO, E.; VARALDA, J.; BEZERRA, A.G.; SCHREINER, W.H.; MOSCA, D.H.

Laser irradiation of iron, cobalt, and nickel targets in liquid nitrogen: A facile approach for nitride nanoparticle fabrication of ferromagnetic transition metals. JOURNAL OF ALLOYS AND COMPOUNDS. , v.725, p.519 - 525, 2017.

Áreas do conhecimento: Materiais Magnéticos e Propriedades Magnéticas, Física da Matéria Condensada
Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925838817325525>[doi:10.1016/j.jallcom.2017.07.176]

C) Trabalhos em preparação

1. Effect of wavelength and fluence in laser-induced iron nitride nanostructures
2. Toxicity assessment of α -Fe₁₆N₂ nanoparticles on *Caenorhabditis elegans*.